



Doctoral Thesis

Mechanoregulation of cell migration, differentiation and ECM remodeling in wound healing models

Author(s):

Lin, Zhe

Publication Date:

2016

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010803231> →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO 23543

***Mechanoregulation of cell migration, differentiation and ECM
remodeling in wound healing models***

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Zhe Lin

M. Sc. in Materials Sciences (ETH Zurich)

B.Sc. in Biomedical Engineering (NTU Singapore)

born on 27.11.1984

citizen of

P. R China

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. M. Zenobi-Wong

Prof. Dr. J. G. Snedeker;

2016

Abstract

Wound healing is a tightly regulated process that involves cell migration into the provisional blood clot matrix, growth factor mediated cell activation into wound associated phenotypes, extracellular matrix (ECM) production and remodeling. At the early stage of wound healing, cell adhesion and migration are guided by the fibrillary ECM within blood clots rich in fibrin and fibronectin (Fn). However, the underlying mechanism of how cells sense the spatial cues of anisotropic ECM remains unclear. Cells adhere to ECM via transmembrane integrins that consist of 24 α and β heterodimeric subunits serving different functions. In the first part we asked which fibronectin binding integrins, $\alpha 5\beta 1$ or $\alpha v\beta 3$, are mostly responsible for the recognition of the spatial cues of the ECM. For this purpose, we used patterned 2 μm ECM stripes to provide spatial guidance and studied the adhesion and migration of the previously described pan-integrin null cells that selectively express $\beta 1$ and/or αv -class integrins. We observed that Fn stripes induced cell alignment and directional migration were lost when $\beta 1$ integrins are absent. Furthermore, nanopillar arrays printed with fibronectin stripes were used to probe the distribution of cell generated traction forces at high resolution. Pan-integrin null cells that do not express $\beta 1$ integrins lose their ability to recognize the stripe patterns. Moreover, directional migration along Fn stripes is impaired upon lamin A/C knockout, even in the presence of $\beta 1$ integrin, and can be restored upon lamin A rescue. Our data reveals that $\beta 1$ integrins are required for the recognition of ECM spatial cues and actin cap formation supported by lamin A/C is needed for subsequent directional migration.

In addition to ECM signaling, growth factors released at the wound site provide soluble cues inducing cytoskeletal rearrangement and ECM remodeling. To explore the growth factor induced mechanical responses of cells and their early ECM in the context of cornea wound healing, primary corneal keratocytes were exposed to cycles of growth

factor conditioning and deprivation to study the transition of keratocytes into wound healing associated fibroblasts (PDGF, FGF, FBS conditioned) and myofibroblasts (TGF β 1 conditioned) *in vitro*. Upregulated cell contractility, altered subcellular traction force distribution and nuclear translocation of YAP were observed in FBS and TGF β 1 conditioned keratocytes. Growth factor deprivation downregulated cell contractility, but nuclear translocation of YAP is not completely reverted. FRET labeled Fn was added to probe the molecular conformation of Fn within the early ECM. A more extended Fn conformation was detected in the ECM assembled by FBS and TGF β 1 conditioned keratocytes. ECM scaffolds assembled by myofibroblasts downregulated the TGF β 1-driven differentiation of freshly seeded keratocytes into myofibroblasts, which suggests an ECM-derived negative feedback mechanism that prevents myofibroblast differentiation.

At the early stage of wound healing, Fn deposited within provisional ECM serves as a template for other ECM molecule deposition, in particular type I collagen (Col1). To study the interplay between Col1 and Fn within ECM, ascorbic acid or monomeric Col1 was added in supplement to exogenous plasma fibronectin to induce collagen deposition on cell derived ECM. Colocalization of Col1 with Fn was observed. The presence of Col1 not only decreased MMP secretion but also shielded Fn fibrils from being stretched by cellular traction forces.

Based on the knowledge obtained from the abovementioned studies, we also tried to identify a therapeutic drug target that can be used to specifically block TGF β 1 driven myofibroblast differentiation and fibrosis. Using the primary keratocytes as cell culture model, we discovered that cytoplasmic tissue transglutaminase (tTG) was specifically upregulated within TGF β 1 induced keratocytes, which was not fully reverted by subsequent four-day TGF β 1 deprivation treatment. To ask whether tTG inhibition can block myofibroblast differentiation and the resulting excess traction force generation,

we tested the previously reported tTG catalytic site inhibitor “Z006”. We demonstrated that tTG inhibition by Z006 suppressed TGFβ1 driven myofibroblast differentiation, characterized by the reduction of α smooth-muscle-actin (α-SMA) expression and the maintenance of the native keratocytes morphology. By exploiting nanopillar arrays as force sensors, we further demonstrated that tTG inhibition blocked TGFβ1 driven upregulation of cell generated traction force.

In summary, our studies showed that cells rely on β1 integrin mediated traction forces and nuclear lamina to probe the spatial cues of their surrounding environment. FBS / TGFβ1 conditioning alternates the distribution of cellular β1 integrins and the subcellular traction force within keratocytes, which leads to the assembly of Fn ECM with increased strain. tTG can be further investigated as a drug target to specifically block TGFβ1 driven myofibroblast differentiation and excess traction force generation. New knowledge obtained in this thesis might inspire novel therapeutic strategies that reduce fibrosis responses and promote scarless wound healing.

Zusammenfassung

Wundheilung ist ein dynamischer, mehrstufiger Prozess und beinhaltet die Aktivierung und Differenzierung von Zellen durch Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, die Migration von Zellen in das provisorische Wundgewebe sowie die Produktion und Umbau der extrazellulären Matrix (ECM). In der ersten Phase der Wundheilung wird die Zelladhäsion und Migration durch die Anordnung des Fibrin- und Fibronectin (Fn) ECM Netzwerks innerhalb des Blutgerinnsels vorgegeben. Die zugrundeliegenden Mechanismen wie Zellen die ECM Anisotropie erkennen und darauf reagieren sind aber in weiten Teilen nicht im Detail beschrieben. Zellen binden spezifisch an ECM Liganden über Integrine, heterodimere, transmembrane Rezeptoren bestehend aus je

einer α und β Untereinheit. Jede dieser 24 Untereinheiten sowie die daraus aufgebauten Integrinrezeptoren hat eine spezifische Funktion.

Im ersten Teil dieser Arbeit untersuchen wir welches Fibronectin-bindende Integrin - $\alpha 5 \beta 1$ oder $\alpha v \beta 3$ - hauptverantwortlich für die Erkennung der räumlichen Anordnung der ECM ist. Zu diesem Ziel wurden Integrin-null Fibroblasten, auf 2 μm breiten Fibronectin Streifen kultiviert und die Ausrichtung der Zellen analysiert. Wir konnten zeigen, dass die ECM-induzierte Ausrichtung und gerichtete Migration der Zellen verloren geht wenn die $\beta 1$ Untereinheit fehlt. Zudem bildeten die pan-integrin null Zellen kein Actin cap um den Zellkern. Auch konnte keine Orientierung der Zellkräfte mittels Fibronectin funktionalisierter Nanopillar Kraftsensoren gemessen werden. Zusätzlich beeinflusste die Präsenz von Lamin A/C im Zellkern die gerichtete Migration entlang der Fibronectinstreifen. Unsere Daten zeigen, dass $\beta 1$ Integrine für die Erkennung der ECM Signale sowie der daraus resultierenden gerichteten Zellmigration sowie für die Kraftweiterleitung von der ECM zum Zellkern über Lamin A/C und der daraus folgenden erforderlich sind.

Zusätzlich zu den ECM Signalen werden Wachstumsfaktoren in der Wunde ausgeschüttet, welche als lösliche Faktoren den Umbau des Zellskelets sowie der ECM beeinflussen können. Im Zusammenhang mit der Wundheilung der Augenhornhaut ist es weitgehend unbekannt wie die lokale Verteilung von Wachstumsfaktoren die von den Zellen ausgeübten Zugkräfte und die daraus resultierende Deformationen der ECM beeinflussen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit werden primäre Keratozyten aus der Augenhornhaut Zyklen von Wachstumsfaktorengabe und Entzug ausgesetzt um in vitro eine gezielte, umkehrbare Differenzierung von Keratozyten zu Wundfibroblasten (über PDGF, FGF, FBS) sowie Myofibroblasten (über TGF $\beta 1$) zu erreichen.

In FBS und TGFβ1 konditionierten Keratozyten war die Zellkontraktion erhöht, die Verteilung der Zellkräfte innerhalb der Zellen verändert und der Transkriptionsfaktor YAP translozierte in den Zellkern. Der Entzug der Wachstumsfaktoren reduzierte die Zellkontraktion aber nicht die Translokation von YAP. Über die Zugabe von FRET markiertem Fn konnte die Konformation der von den Zellen gebildeten ECM untersucht werden. In FBS und TGFβ1 konditionierten Keratozyten zeigte die ECM eine erhöhte Entfaltung des Fn. Zudem war die Differenzierung von Keratozyten zu Myofibroblasten reduziert wenn die Zellen auf ECM Netzwerke ausgesät wurden, die durch TGFβ1 behandelte Myofibroblasten aufgebaut wurden. Diese Ergebnisse suggerieren einen ECM-basierenden negativen Regelmechanismus der Myofibroblastendifferenzierung und fortschreitende Anstieg der Zellkontraktion verhindert.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Studien haben wir versucht, ein spezifisches Ziel für therapeutische Medikamente zu identifizieren um die TGFβ1-basierende Differenzierung von Myofibroblasten und den Prozess der Fibrose zu blockieren. Mittels des primären Keratozyten in vitro Zellkulturmodells, konnten wir zeigen, dass die Expression der zytosolischen Gewebetransglutaminase (tTG) in TGFβ1-induzierten Keratozyten spezifisch hochreguliert ist. Anschließender Entzug von TGFβ1 konnte diesen Effekt nur teilweise umkehren. Um zu testen ob eine tTG Inhibierung die Myofibroblastendifferenzierung und die damit verbundene erhöhte Kraftausübung blockieren kann, haben wir den tTG Inhibitor "Z006" benutzt. Charakterisiert durch eine Reduzierung der α smooth-muscle-actin (α-SMA) Expression sowie der Beibehaltung der nativen Morphologie konnten wir zeigen, dass tTG die TGFβ1-induzierte Differenzierung von Keratozyten zu Myofibroblasten unterbindet. Mittels Nanopillar Kraftsensoren konnten wir zudem zeigen, dass tTG die TGFβ1-induzierte Steigerung der zellulären Zugkräfte hemmt.

Zusammenfassend zeigen unsere Studien, dass Zellen die räumliche Anordnung Ihrer Umgebung durch $\beta 1$ Integrine übertragene Zugkräfte und die mechanischen Eigenschaften des Zellkerns erkennen. FBS / TGF $\beta 1$ Konditionierung verändert dabei die Verteilung von $\beta 1$ Integrinen sowie von zellulären Kräften in Keratozyten, was dazu führt das die durch die Zellen aufgebaute Fn ECM stärker entfaltet ist. Zudem konnten wir zeigen, dass tTG die Differenzierung von Keratozyten zu Myofibroblasten spezifisch hemmt, wodurch tTG als Ziel für therapeutische Medikamente identifiziert wurde. Damit können die neuen Erkenntnisse dieser Arbeit dazu beitragen, neue Therapieansätze zur Verminderung von Fibrose und Narbenbildung während der Wundheilung zu entwickeln.