

DISS. ETH No. 24425

Use of fibronectin binding peptides to measure mechanical strain of fibronectin fibers in tissue

A thesis submitted to attain the degree of

Doctor of Sciences (Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

SIMON ARNOLDINI

MSc ETH in Material Science, ETH Zürich

born on 08.08.1988

citizen of Austria

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Dr. h.c. Viola Vogel, examiner

Dr. Martin Behe, co-examiner

Prof. Dr. Oliver Distler, co-examiner

2017

Summary

The extracellular matrix (ECM) plays an important role in tissue homeostasis and as mechanical anchorage for cells. Especially the ECM protein fibronectin (Fn) represents a crucial factor in early development of organisms, in wound healing, but also in several pathologies, such as cancer or fibrotic disorders. These pathologies have frequently been reported to go along with an increase in tissue stiffness, mediated in part by an enhanced expression of collagen-I, an enhanced enzymatic crosslinking of ECM residues, as well as an increased number of highly contractile, activated fibroblasts, so called myofibroblasts. However, despite growing knowledge on alterations in tissue mechanics in cancer, it remains unclear whether and how changed tissue stiffness can impact the strain state of protein fibrils and thus the display and accessibility of potential binding sites on these fibers. Given the knowledge of mechanically induced opening up of cryptic motifs and destruction of binding epitopes on Fn and the sheer abundance of binding sites for a variety of growth factors, cytokines, integrins and other matrix proteins, the question arises, to what extent and which of these binding sites are affected by a changed mechanical strain state of fibronectin protein fibers in tissues. However, to address this important question in a satisfactory way, methods and probes for the measurement of Fn fiber strain in tissues are missing, as previously proposed methods are either only applicable *in vitro*, or have unknown binding mechanism and affinities.

Therefore, the aim here is to introduce and establish the Fn binding peptide FnBPA5, originating from bacterium *S. aureus*, as a novel strain probe to specifically bind to relaxed Fn fibers in tissue and *in vivo* to ultimately find correlations with functional aspects triggering Fn relaxation in different systems. Utilization of this novel strain probe enables a first of its kind assessment and comparison of the mechanical strain of Fn fibers in different tissue. First, the strain sensitive binding of FnBPA5 peptide is assessed via binding capability to relaxed or stretched manually pulled Fn fibers and comparison of FnBPA5 binding with Fn-FRET ratio in fibroblast cell culture matrices. In a second step FnBPA5 is then utilized as a strain probe to visualize Fn fiber strain in tissue sections and *in vivo*, to investigate the physiological strain state in organs, and assess alterations of this parameter in pathologic situations.

The herein presented data reveal, that FnBPA5 shows preferential binding to relaxed Fn fibers in an *in vitro* assay of manually pulled Fn fibers, as well as in comparison with the Fn-FRET probe in human dermal fibroblast cell culture experiments. FnBPA5 is found to exhibit high affinity binding to both plasma Fn and relaxed Fn fibers with a dissociation constant in the nanomolar range, similar to currently used antibodies against fibronectin, and has an adequate plasma stability for *in vivo* applications. *Ex vivo* tissue staining of tumor tissue with FnBPA5 shows that areas of relaxed Fn fibers, exhibiting high FnBPA5 binding to Fn, coincide with presence of mature collagen fibers and alpha-smooth muscle actin (α -SMA) expressing cells. *In vivo* experiments using ¹¹¹In-radiolabeled FnBPA5 derivative reveals specific uptake in tumors and other organs with enhanced retention in tumors compared to other organs in a mouse prostate cancer (PC-3) xenograft tumor model.

Tissue stainings of PC-3 tumor tissue sections and sections from healthy organs reveal no binding to tissue sections from healthy organs, with binding of FnBPA5 only observable in tumor tissue sections, suggesting a highly stretched state of Fn fibers in healthy organs and relaxation of Fn fibers only occurring in tumor tissue. Co-staining of FnBPA5 with cell contractility marker α -SMA reveals higher FnBPA5 binding to Fn in areas adjacent to α -SMA expressing cells, suggesting a relaxation of Fn in these areas, triggered by yet unknown mechanisms. A model of lymph node swelling using lymph nodes from mice injected with lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) or CpG oligodeoxynucleotide adjuvant compared to untreated lymph nodes only shows binding of FnBPA5 to lymph node tissue sections from LCMV infected mice, compared to the other two experimental groups leading to the notion that infection and partial destruction of lymph node fibroblasts as previously reported for LCMV is responsible for Fn relaxation, with physiological lymph node swelling, as observed for CpG, leaving Fn fiber strain unchanged.

It was further investigated whether different glycosaminoglycans (GAGs), such as heparin, clinically used low molecular weight heparin derivatives, as well as hyaluronic acid and synthetically sulfated hyaluronic acid, bind to and are capable of changing Fn conformation. Additionally, given the fact that one major binding site for GAGs on Fn is overlapping with the bacterial binding site also used by FnBPA5, competitive binding studies with different GAGs and FnBPA5 were carried out revealing only little potential of these GAGs to efficiently block FnBPA5 binding to manually pulled Fn fibers.

In summary, this thesis introduces a novel class of peptide probes, showcased here using the *S. aureus* Fn binding peptide FnBPA5, being capable of visualizing relaxed Fn fibers in tissue sections and *in vivo*. The usage of such probes could lead to a better understanding of the dynamic interplay of matrix composition, cellular forces and mechanical strain of Fn fibers and how this is altered in pathologies, such as cancer or fibrotic disorders. The herein presented characterization of an *in vivo* tumor model and *ex vivo* tissue stainings from cancer and lymph node model gives first evidence that the FnBPA5 peptide can serve as an important novel tool to characterize alterations in Fn fiber strain upon pathological changes in tissues. Ultimately, it can be envisioned that bacterial peptide probes, after careful trial experiments can be clinically exploited for diagnosis of pathologic tissue changes affecting Fn strain state, or even for targeting such changes *in vivo*.

Zusammenfassung

Die extrazelluläre Matrix (EZM) spielt eine wichtige Rolle in der Gewebshomeostase und als mechanisches Stabilisationsnetzwerk der Zellen. Das extrazelluläre Protein Fibronectin (Fn) spielt eine Schlüsselrolle in der Frühentwicklung von Organismen und in der Wundheilung, aber auch in verschiedenen Krankheiten, beispielsweise in Krebs oder krankhaften fibrotischen Veränderungen. Ein Charakteristikum dieser Krankheiten ist eine erhöhte mechanische Steifigkeit des Gewebes, welche aus Veränderungen verschiedener Faktoren resultiert. Erhöhte Expression von Kollagen-I, erhöhte enzymatische Vernetzung von Proteinfasern in der EZM, sowie einen erhöhten Anteil an kontraktilen, aktivierten Fibroblasten, sogenannten Myofibroblasten. Obwohl die Veränderungen der Gewebsteifigkeit in diesen Krankheiten bekannt sind, bleibt es weiterhin unklar, wie dieses veränderte mechanische Umfeld den Verstreckungsgrad von Proteinfasern und damit die Präsentation von potentiellen Bindungsstellen auf diesen Fasern verändert oder beeinträchtigt. Aufgrund der grossen Anzahl von Bindungsstellen für Wachstumsfaktoren, Cytokine, Integrine und andere Matrixproteine innerhalb des Proteins Fibronectin und dem Vorhandensein verschiedener mechanisch aktivierbarer Bindungsstellen stellt sich die Frage, ob und inwiefern einige dieser Bindungsstellen von einem veränderten Verstreckungsgrad von Fn-Fasern im Gewebekontext verändert werden können. Für eine befriedigende Beantwortung dieser Frage fehlen jedoch wirksame Methoden und Mittel um den Verstreckungsgrad von Fn Fasern in Geweben zu bestimmen. Bisher vorgeschlagene Ansätze sind entweder nur für *in vitro* Experimente geeignet, oder der genaue Mechanismus beziehungsweise die Bindungsaffinitäten sind nicht bekannt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die bakterielle Peptidsequenz FnBPA5 des Bakteriums *S. aureus*, als neues Mittel zur Messung des Verstreckungsgrades und zur spezifischen Bindung an relaxiertes Fibronectin in Gewebe und *in vivo* einzuführen und zu etablieren. Weiters werden Zusammenhänge mit funktionellen Aspekten die für diese Fn-Relaxation verantwortlich sind untersucht.

Die hier präsentierten Resultate zeigen eine präferentielle Bindung von FnBPA5 an relaxierte manuell gezogenen Fn Fasern *in vitro*, sowie eine verstärkte Peptidbindung zu relaxierten Fn-Fasern in humaner Fibroblasten Zellkultur, die mit Fn-FRET visualisiert wurden. Affinitätsmessungen zu Plasma Fibronectin und zu relaxierten Fibronectin Fasern zeigen eine hohe Affinität von FnBPA5 mit Werten der Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich, vergleichbar mit der Affinität von Antikörpern. Weiters wird gezeigt, dass die Stabilität von FnBPA5 in Blutplasma adäquat für die *in vivo* Nutzung des Peptids ist. Färbungen von Tumor Gewebsschnitten zeigen, dass Bereiche von relaxiertem Fibronectin, mit starker Peptidbindung zu Fibronectin, mit der erhöhten Präsenz von Kollagen und alpha smooth muscle actin (α -SMA) exprimierenden Zellen koinzidieren. *In vivo* Experimente mit Hilfe von ¹¹¹In radiomarkiertem FnBPA5 in Mäusen mit Prostatakrebs (PC-3) Xenografts durchgeführt, zeigen die spezifische Aufnahme des Peptids in Tumoren und anderen Organen mit verlängerter Verweildauer in Tumoren verglichen mit anderen Organen.

Färbung von Gewebsschnitten von PC-3 Tumoren und gesunden Organen mit FnBPA5 zeigten ausschliesslich für Tumorschnitte eine spezifische Bindung von FnBPA5 mit praktisch keiner Bindung zu Gewebsschnitten der gesunden Organe. Dies legt nahe, dass Fibronektin Fasern in gesundem Gewebe stark gestreckt sind und eine Faser Relaxierung nur in Tumoren beobachtbar ist. Eine Ko-Färbung von FnBPA5 mit dem Zellkontraktilitätsmarker α -SMA zeigt weiters, dass die Bindung von FnBPA5 an Fn Fasern in Bereichen mit α -SMA exprimierenden Zellen stark erhöht ist, was auf eine Relaxierung der Fn Fasern in diesen Bereichen basierend auf einem noch unklaren Mechanismus hinweist. Weiters wurde ein Modell der Lymphknoten-Schwellung untersucht und Bindung von FnBPA5 zeigt sich nur in Lymphknoten von Mäusen, welche mit dem Lymphozytischen Choriomeningitis Virus (LCMV) infiziert wurden, nicht jedoch für Lymphknoten von Kontrollmäusen und Mäusen welche mit CpG Oligodeoxynucleotid Adjuvanten behandelt wurden. Dieses Resultat suggeriert, dass die Infektion mit LCMV und die damit einhergehende partielle Zerstörung des Fibroblasten Netzwerks im Lymphknoten, welche für diese Infektion berichtet wurde, für die Relaxierung der Fibronektin Fasern verantwortlich zeichnet. Physiologisches Anschwellen der Lymphknoten, wie es mit dem CpG Adjuvanten getestet wurde zeigt hingegen keine signifikante Relaxierung der Fibronektin Fasern innerhalb des Lymphknotens.

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurde getestet, ob verschiedenen Glycosaminoglycane (GAGs), beispielsweise Heparin, sowie klinisch genutzte niedermolekulare Heparinderivate, als auch Hyaluronsäure und synthetisch sulfatierte Hyaluronsäure, an Fibronektin binden und ob sie dazu in der Lage sind die Fibronektin Konformation zu beeinflussen. Aufgrund der Überlappung der Bindungsstelle von Heparin und anderen GAGs an Fibronektin mit der Bindungsstelle von bakteriellen Peptiden wurde eine kompetitive Bindungsstudie mit verschiedenen GAGs und FnBPA5 durchgeführt. Diese Experimente zeigen jedoch nur geringes Potential dieser Glycosaminoglycane die Bindung von FnBPA5 an Fn Fasern zu blockieren.

Die vorliegende Arbeit führt hier, beispielhaft am Fn bindenden Peptid FnBPA5 von *S. aureus*, eine neuartige Klasse von Peptidsensoren zur Visualisierung von relaxierten Fibronektinfasern in Geweben und *in vivo* ein. Die Anwendung dieser neuen Methodik hat Potential zum besseren Verständnis der dynamischen Interaktion zwischen Matrixzusammensetzung, zellulären Kräften und mechanischem Verstreckungsgrad von Fn Fasern beizutragen. Dies ist von speziellem Interesse für Krebs oder fibrotischen Erkrankungen, in welchen das Gleichgewicht dieser Faktoren gestört ist. Die hier gezeigte Charakterisierung eines *in vivo* Tumormodells und *ex vivo* Gewebsschnitt Färbungen von Krebs- und Lymphknoten-Schwellungsmodellen weist klar darauf hin, dass das FnBPA5 Peptid als wichtiges Instrument zur Charakterisierung von pathologischen Veränderungen der EZM in Geweben dienen kann. Nach weiteren Charakterisierungsschritten kann die Entwicklung klinisch einsetzbarer bakterieller Peptide zur Diagnose von pathologischen Veränderungen von Geweben, beziehungsweise zum spezifischen Ansteuern von relaxiertem Fn *in vivo* als Vision für die Zukunft definiert werden.