

Deciphering the Mechanosensitivity of Mesenchymal Stem Cells to their Environment

Doctoral Thesis

Author(s):

Razafiarison, Tojo

Publication date:

2017

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000202043>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO 24499

Deciphering the mechanosensitivity of mesenchymal stem cells to their environment

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by
Tojo Razafiarison
MSc, EPF Lausanne, Switzerland
born on 9TH March, 1984
citizen of Geneva GE, Switzerland

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Jess Snedeker, examiner
Prof. Dr. Viola Vogel, co-examiner
Prof. Dr. Marcy Zenobi-Wong, co-examiner

2017

Summary

Stem cell-extracellular matrix interactions are driven by topological, mechanical and biochemical properties of a biomaterial substrate. Studies until now have failed to elucidate the unexpected inability of stem cells to sense and react to soft elastomer substrates like polydimethylsiloxane (PDMS) in comparison to hydrogels like polyacrylamide (PAA). While such comparative experiments widely attributed this insensitivity to factors such as substrate noncompliance or amorphous topology, they neglected inherent differences in surface energy between highly hydrophobic PDMS and hydrophilic PAA. This body of work examines the implication of surface energy in stem cell mechanosensitivity.

The first goal of the present doctoral thesis was to develop a PDMS-based platform whose stiffness and surface energy could be independently modulated without altering other potential confounding factors such as mechanical properties and surface topology. Secondly, it was investigated whether altering the surface energy of the platform could affect the assembly of protein ligands, which in turn could influence stem cell adhesion and osteogenic differentiation. Thirdly, it was investigated whether the surface energy-driven ligand assembly could affect stem cell mechanosensitivity to a broad range of PDMS stiffness.

To develop a PDMS-based platform whose particularly surface energy could be modulated, we employed a PDMS-b-PEO surfactant that could be directly added in a very small amount to the standard PDMS slurry. By simply adjusting the weight percentage of surfactant to the PDMS base polymer from 0% to 1.0%, the measured contact angle that determines the surface energy could be tuned from 110° to 40°. Considering the reported contact angle range for optimal cell adhesion, we have selected the adequate surfactant percentage (0.2%) that led to a moderately hydrophilic surface (80°) and named the resulting substrate PEO-PDMS. Mechanical

characterization by bulk compression revealed very similar viscoelastic properties and rigidity for both pristine PDMS and PEO-PDMS of different base to catalyst ratios. Multi-scale mechanical testing exhibited a broad range of PDMS stiffness. Furthermore, indentation at microscale within the focal adhesion dimensions indicated homogeneity and integrity of the surface prior and after surface treatment with a commonly used heterobifunctional linker to allow covalent protein ligand coating, which is activated under UV.

Next, we evaluated whether controlling for surface energy on our previously developed platform could influence our collagen model ligand assembly and affect in turn osteogenic stem cell signalling early events. While we first ensured to have the same ligand density on the different substrates by adapting empirically the collagen loading molarity, we observed by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) a difference in ligand assembly on the hydrophobic PDMS and hydrophilic PEO-PDMS surfaces. While collagen molecules appeared clumpy and formed a relatively rough layer with numerous aggregates on PDMS, they formed a smooth layer on PEO-PDMS. Cellular and molecular investigations with human bone marrow stromal cells indicated higher osteogenic differentiation and upregulation of focal adhesion-related molecules on the resulting smooth collagen layer coated surfaces.

Finally, we fabricated various PDMS and PEO-PDMS substrates of different stiffness to assess whether the surface energy-driven ligand assembly may alter stem cell mechanosensitivity. When seeded on hydrophobic PDMS of different stiffness, stem cells could spread and osteogenically differentiate on all the substrates. In contrast, cells cultured on hydrophilic PEO-PDMS of different stiffness presented on softer substrates (<1kPa) a reduced cell spreading and lower osteogenic differentiation. Furthermore, we developed a novel traction force microscopy (TFM) platform to assess cellular contractility. Although cells could spread on soft PDMS (<1kPa), the

measured cell contractility by TFM and activity of Rho Kinase (ROCK) were diminished in comparison with stiffer substrates ($> 5\text{kPa}$).

In conclusion, a novel silicone-based system whose stiffness and surface energy can be independently modulated to investigate quantitatively stem cell mechanobiology has been developed. Furthermore, the use of the platform has proven to be relevant in open biological questions: (i) the key role of surface energy in driving stem cell differentiation by modulating ligand assembly and the resulting topography; (ii) the relationship between cell morphology, contractility and fate.

Résumé

Les interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules souches sont contrôlées par les propriétés mécaniques et biochimiques du substrat composé de biomatériaux. Les études jusqu'à ce jour n'ont pas pu expliquer l'incapacité inattendue des cellules souches à sentir et réagir aux substrats mous d'élastomère tels que le polydiméthysiloxane (PDMS) en comparaison des hydrogels tels que le polyacrylamide (PAA). Alors que les précédentes expériences comparatives attribuent essentiellement cette insensibilité aux facteurs tels que la non-souplesse des substrats ou encore la topologie amorphe du polymère, ils ont négligé les différences inhérentes d'énergie de surface entre le PDMS hautement hydrophobe et le PAA hydrophile. Cette thèse doctorale examine l'implication de l'énergie de surface dans la mécanosensibilité des cellules souches.

Le premier but de cette thèse doctorale était de développer une plateforme composée de PDMS dont la dureté et l'énergie de surface pouvaient être indépendamment modulés sans affecter les autres facteurs pouvant influencer tels que les propriétés mécaniques et la topologie de surface. Deuxièmement, nous avons investigué si la modification de l'énergie de surface de la plateforme pouvait affecter l'assemblage des ligands protéiques qui en retour pourrait influencer l'adhésion des cellules souches et la différenciation ostéogénique. Troisièmement, nous avons investigué si l'assemblage des ligands contrôlé par l'énergie de surface pouvait affecter la mécanosensibilité des cellules souches à une large gamme de rigidité de PDMS.

Pour développer une plateforme composée de PDMS dont l'énergie de surface pouvait être modulée, nous avons utilisé un surfactant de PDMS-b-PEO qui peut être ajouté directement en petite quantité à la mixture de PDMS. En ajustant simplement le pourcentage du poids du surfactant en fonction du poids du polymère de PDMS de base de 0% à 1%, l'angle de

contact mesuré qui détermine l'énergie de surface, pouvait être réduit de 110° à 40°. Prenant en considération la gamme reportée pour l'angle de contact étant optimale pour l'adhésion cellulaire, nous avons choisi le pourcentage adéquat de surfactant (0.2%) qui menait à une surface hydrophile modérée que nous avons appelé le substrat PEO-PDMS. La caractérisation mécanique par compression à des ratios différents de base par rapport au catalyseur indiquait des propriétés viscoélastiques et une rigidité très similaires pour le PDMS et le PEO-PDMS. Les tests mécaniques du PDMS à plusieurs niveaux montraient une large gamme de souplesse et de dureté. De plus, l'indentation à l'échelle du micron dans les dimensions de l'adhésion focale indiquait une homogénéité et une intégrité de la surface avant et après le traitement de surface avec un connecteur covalent pour des ligands protéiques qui est hétéro-bifonctionnel et activé sous UV.

Ensuite, nous avons évalué si le contrôle de l'énergie de surface de notre plateforme précédemment développée pouvait influencer l'assemblage du ligand modèle que nous avons choisi qui est le collagène et ainsi affecter en retour les événements précurseurs de la signalisation ostéogénique des cellules souches. Après avoir vérifié que la densité de ligand était la même sur les différents substrats en adaptant de manière empirique la molarité du collagène qui est utilisée, nous avons observé sous SEM et AFM une différence dans l'assemblage des ligands sur les surfaces du PDMS hydrophobe et du PEO-PDMS hydrophile. Alors que les molécules de collagène apparaissaient agglutinées et formaient une couche rugueuse avec des nombreux agrégats sur le PDMS, elles formaient une couche lisse sur le PEO-PDMS. Les analyses moléculaires et cellulaires avec des cellules stromales humaines originaires de la moelle osseuse indiquaient que sur les surfaces couvertes d'une couche lisse de collagène présentaient une plus haute différenciation ostéogénique et une régulation positive des molécules impliquées dans l'adhésion focale.

Dernièrement, nous avons fabriqué différents substrats de PDMS et PEO-PDMS avec différentes rigidités pour évaluer si l'assemblage des ligands contrôlé par l'énergie de surface pouvait affecter la mécanosensibilité des cellules souches. Quand les cellules souches sont cultivées sur le PDMS hydrophobe de différentes rigidités, elles pouvaient se répandre et se différencier de manière ostéogénique sur tous les substrats. A l'inverse, les cellules cultivées sur les substrats hydrophiles de PEO-PDMS ayant différentes rigidités présentaient sur les substrats mous (<1kPa) un épandage réduit et une diminution de la différenciation ostéogénique. De plus, nous avons développé une nouvelle plateforme de « traction force microscopy » (TFM) pour évaluer la contractilité cellulaire. Alors que les cellules pouvaient se répandre sur le PDMS mou (<1kPa), la contractilité cellulaire mesurée par le TFM ainsi que l'activité du Rho Kinase (ROCK) étaient diminuées en comparaison avec les substrats plus rigides (>5 kPa).

En conclusion, un nouveau système à base de silicone dont la dureté et l'énergie de surface peuvent être indépendamment modulées a été développé pour investiguer de manière quantitative la biologie mécanique des cellules souches. De plus, l'utilisation de la plateforme a montré son utilité dans diverses questions biologiques telles que : (i) le rôle clef de l'énergie de surface dans le contrôle de la différenciation des cellules souches en modulant l'assemblage des ligands et la topographie résultante ; (ii) la relation entre la morphologie cellulaire, la contractilité et le destin des cellules souches.