

DISS. ETH NO. 29532

**HOW OSMOTIC CHANGES REGULATE TISSUE MECHANICS  
AND CELLULAR REGENERATIVE PROCESSES**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**Matthias Reiner Kollert**

M. Sc. in Mechanical Engineering, RWTH Aachen University

born on 18.05.1989

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

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

Univ.-Prof. Dr.-Ing. Georg Duda, co-examiner

Prof. Dr. David Mooney, co-examiner

2023

## Summary

Organ-specific cellular niches provide a home environment for cells with specific biophysical cues, facilitating their functions by guiding their behavior in physiological processes. Disruption of this homeostatic environment, such as through injury, abruptly affects cell function. Following injury, various cells that can contribute to tissue repair processes, such as mesenchymal stromal cells (MSCs), respond to altered properties of the extracellular matrix (ECM), the local environment, and the surrounding cells. MSCs have significant regenerative capabilities due to paracrine and autocrine signaling functions, and their multi-lineage potential, allowing them to differentiate into specialized cell types that build new matrix. Although such processes aim at repairing the injured tissue, a scar free reconstruction of the original cell niche, or organ, can rarely be achieved. Impaired healing capacities of patients, such as those suffering from metabolic or auto-immune diseases, and limited regenerative potential of organs, such as the brain, eyes and many more, pose challenges to effective regeneration, particularly in adults. Nonetheless, certain organ systems, such as bone and liver, retain their regenerative potential even in the adult body. These organs possess remarkable abilities to heal without scarring and restore their original function after acute injury. In bone fracture, previous studies have highlighted the importance of the initial phases of regeneration for successful healing. The initial haematoma formed during fracture has been found to possess properties crucial for the initiation of regenerative cascades, including its composition of cells, its stabilizing matrix, and also its mechanical properties. The elastic and, particularly, the viscous mechanical properties of physiological tissues, including haematomas, have been shown to play a significant role in tissue repair by driving cellular regenerative processes such as proliferation and fate determination. In addition to their mechanical and structural properties, the biophysical properties of tissues also encompass the uptake of water and ions, which are essential for creating a conducive environment for cellular viability. Osmotic properties play diverse roles in regulating tissue properties and cell behavior in physiology and pathophysiology. However, the influence of osmotic niche changes on tissue viscoelastic properties and cell function remains poorly understood.

In the present thesis, the role of osmotic niche changes that occur as consequence of injury and thus precede the onset of regeneration is investigated, focusing on bone fracture. The impact of osmotic changes on cells residing within the bone marrow niche were investigated here in an engineered in a 3D cell culture system involving alginate hydrogels as artificial ECMs. As a

model regenerative process, the experiments primarily examine the osteogenic differentiation of MSCs, an essential process driving the early phases of bone regeneration. Most previous studies have focused on the effects of osmotic pressure, which is well known to dehydrate cells or tissues, or have relied on 2D culture systems. However, the interplay between osmotic changes and the viscoelastic properties of the cellular environment, or ECM, has not been adequately considered. The present work provides osmotic and mechanical characterizations of *ex vivo* human tissue samples, which suggest that the bone marrow niche, where MSCs reside, experiences an osmolality drop during bone fracture, which may enhance the stress relaxing, or viscous, properties of the tissue. Increased stress relaxing properties of the cellular environment are known to stimulate regenerative processes of MSCs, such as proliferation and osteogenic differentiation. Consequently, a drop in osmolality and associated changes in the viscoelastic properties of the niche are mimicked *in vitro* to study their impact on the osteogenic differentiation of MSCs. Different configurations of alginate hydrogels are employed to investigate how osmotic and mechanical niche changes influence the onset of regeneration. The results presented in this thesis reveal that the osmolality drop acts as a regenerative stimulus by tuning niche mechanics towards faster stress relaxation and by directly influencing cells within the matrix. This stimulus function requires physiological viscoelastic properties within the 3D cell environment. RNA sequencing and nuclear staining, two hours and 15 minutes post osmolality drop, respectively, demonstrate the immediate impact of the osmotic change on gene expression and nuclear structures. Analysis of RNA sequencing data suggests a mechanistic regulation of the osmotic stimulus that is related to chromatin organization and DNA methylation. Interestingly, stress relaxing material characteristics moderate how osmotic changes regulate osteogenic differentiation. The results unveil a previously unrecognized fast-acting stimulus in the onset of regenerative processes. These findings may help identify novel targets for regenerative therapies that could benefit patients with impaired healing capacity.

The physiological stress relaxing properties of human fracture haematoma are enhanced in hypoosmolar environments. This observation is significant considering the aforementioned relevance of stress relaxing properties in physiology and regeneration. However, the mechanisms by which osmotic changes, specifically those established by decreased ion concentration, regulate bulk stress-relaxing properties of the ECM remain elusive. Therefore, an *ex vivo* model of the ECM is devised suitable for mechanical, structural, and magnetic resonance (MR) characterization. The *ex vivo* model based on tendon tissues, which offers advantages for structural analysis due to their ordered structure and simple composition mainly

consisting of collagen fibers, proteoglycans, and water. Using the same experimental setup for osmotic modulation as mentioned earlier, the osmotic properties, such as water and ion binding, are tuned here to unravel their effects on the elastic modulus and stress relaxing properties of the ECM. MR relaxation parameter mapping was then used to detect changes in water binding, while small-angle x-ray scattering (SAXS) shed light on a potential role of collagen fiber contraction. The data reveal that in hypoosmolar environments, the amount of more strongly bound water increases in the ECM, elevating the elastic modulus and enhancing stress relaxation of the tissue. No collagen fiber contraction is detected, distinguishing the findings of this work from previously reported effects of osmotic pressure, which dehydrates tissue, leading to collagen contraction and increased elastic modulus. Structural and ion diffusion analyses further highlight the regulatory role of proteoglycans, specifically their negatively charged glycosaminoglycan subunits, in the observed interplay between ion concentration changes and ECM mechanics. The improved understanding of the osmotic and mechanical properties of tissues enables to relate the conventional MR relaxation parameters  $T_1$  and  $T_2^*$  to tissue swelling and pathological alteration of mechanical properties. Performing *in vivo* scans of patients with the same MR sequence as used for *ex vivo* ECM supports the potential of combined  $T_1$  and  $T_2^*$  mapping for clinical applications, improving diagnostics and data interpretation.

In conclusion, this thesis uncovers that tissue damage causing a major osmotic change in cell niches might serve as a fast-acting stimulus that synergises regenerative processes. While the focus was on the bone fracture gap, the processes described here have potential relevance to regenerative processes of other organ injuries as well. The understanding gained regarding osmotic changes in tissue mechanics and cell function may inspire novel biomaterial-based therapy strategies. The acquired insight into the fundamental osmotic and mechanical properties of *ex vivo* tendon tissue enables to relate MR readouts to ECM biophysical properties, suggesting their potential for clinical application.

## Zusammenfassung

Organspezifische zelluläre Nischen bieten eine Heimumgebung für Zellen, mit spezifischen biophysikalischen Merkmalen, die ihre Funktionen ermöglichen und die ihr Verhalten in physiologischen Prozessen steuern. Eine Störung dieser homöostatischen Umgebung, z. B. durch eine Verletzung, wirkt sich abrupt auf die Zellfunktionen aus. Nach einer Verletzung reagieren verschiedene Zellen, die zu Gewebereparaturprozessen beitragen können, wie mesenchymale Stromazellen (MSCs), auf veränderte Eigenschaften der extrazellulären Matrix (ECM), der lokalen Umgebung und der umgebenden Zellen. Aufgrund ihrer parakrinen und autokrinen Signalfunktionen und ihres Multilinenpotenzials, das es ihnen ermöglicht, sich in spezialisierte Zelltypen zu differenzieren, die eine neue Matrix aufbauen, verfügen MSCs über bedeutende regenerative Fähigkeiten. Obwohl solche Prozesse darauf abzielen, das verletzte Gewebe zu reparieren, kann eine narbenfreie Rekonstruktion der ursprünglichen Zellnische, oder des Organs, nur selten erreicht werden. Beeinträchtigte Heilungskapazitäten von Patienten, die z. B. an Stoffwechsel- oder Autoimmunkrankheiten leiden, und das begrenzte Regenerationspotenzial von Organen wie dem Gehirn, den Augen und vielen anderen, stellen eine Herausforderung für eine wirksame Regeneration dar, insbesondere bei Erwachsenen. Bestimmte Organsysteme, wie Knochen und Leber, behalten jedoch auch im erwachsenen Körper ihr Regenerationspotenzial. Diese Organe verfügen über bemerkenswerte Fähigkeiten, ohne Narbenbildung zu heilen und ihre ursprüngliche Funktion nach einer akuten Verletzung wiederherzustellen. Bei Knochenbrüchen haben frühere Studien die Bedeutung der ersten Regenerationsphasen für eine erfolgreiche Heilung hervorgehoben. Es wurde festgestellt, dass das anfängliche Hämatom, das sich bei einer Fraktur bildet, Eigenschaften besitzt, die für die Einleitung von Regenerationskaskaden entscheidend sind, einschließlich seiner Zellzusammensetzung, seiner stabilisierenden Matrix und auch seiner mechanischen Eigenschaften. Es hat sich gezeigt, dass die elastischen und insbesondere die viskosen mechanischen Eigenschaften von physiologischem Gewebe, einschließlich Hämatomen, eine wichtige Rolle bei der Gewebereparatur spielen, indem sie zelluläre Regenerationsprozesse wie Proliferation und Linienbestimmung vorantreiben. Neben ihren mechanischen und strukturellen Eigenschaften umfassen die biophysikalischen Eigenschaften von Geweben auch die Aufnahme von Wasser und Ionen, die für die Schaffung eines günstigen Umfelds für die Lebensfähigkeit der Zellen von wesentlicher Bedeutung sind. Die osmotischen Eigenschaften spielen bei der Regulierung der Gewebeeigenschaften und des Zellverhaltens in der Physiologie und Pathophysiologie eine vielfältige Rolle. Der Einfluss von Veränderungen der osmotischen

Nische auf die viskoelastischen Eigenschaften des Gewebes und die Zellfunktion ist jedoch noch wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle osmotischer Nischenveränderungen untersucht, die als Folge von Verletzungen auftreten und somit dem Beginn der Regeneration vorausgehen, wobei der Schwerpunkt auf Knochenbrüchen liegt. Die Auswirkungen osmotischer Veränderungen auf Zellen, die sich in der Nische des Knochenmarks befinden, wurden hier in einem 3D-Zellkultursystem mit Alginathydrogelen als künstlicher ECM untersucht. Als Modell für einen Regenerationsprozess wird in den Experimenten vor allem die osteogene Differenzierung von MSCs untersucht, ein wesentlicher Prozess, der die frühen Phasen der Knochenregeneration bestimmt. Die meisten bisherigen Studien konzentrierten sich auf die Auswirkungen des osmotischen Drucks, der zu einer Dehydrierung von Zellen oder Geweben führt, oder stützten sich auf 2D-Kultursysteme. Das Zusammenspiel zwischen osmotischen Veränderungen und den viskoelastischen Eigenschaften der zellulären Umgebung bzw. der ECM wurde jedoch nicht angemessen berücksichtigt. Die vorliegende Arbeit liefert osmotische und mechanische Charakterisierungen *ex vivo* humaner Gewebeproben, die darauf hindeuten, dass die Nische des Knochenmarks, in der sich die MSCs befinden, während eines Knochenbruchs einen Osmolalitätsabfall erfährt, der die spannungsrelaxierenden, oder viskosen, Eigenschaften des Gewebes verbessern kann. Es ist bekannt, dass eine erhöhte Spannungsrelaxation der zellulären Umgebung Regenerationsprozesse von MSCs, wie Proliferation und osteogene Differenzierung, stimuliert. Daher werden ein Abfall der Osmolalität und damit verbundene Veränderungen der Spannungsrelaxationseigenschaften der Nische *in vitro* nachgeahmt, um ihre Auswirkungen auf die osteogene Differenzierung von MSCs zu untersuchen. Es werden verschiedene Konfigurationen von Alginathydrogelen verwendet, um zu untersuchen, wie osmotische und mechanische Veränderungen in der Nische den Beginn der Regeneration beeinflussen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass der Osmolalitätsabfall als Regenerationsstimulus wirkt, indem er die Nischenmechanik auf eine schnellere Spannungsrelaxation einstellt und die Zellen innerhalb der Matrix direkt beeinflusst. Diese Stimulusfunktion erfordert physiologische viskoelastische Eigenschaften in der 3D-Zellumgebung. RNA-Sequenzierung und histologische Färbungen, zwei Stunden bzw. 15 Minuten nach dem Osmolalitätsabfall, zeigen die unmittelbare Auswirkung der osmotischen Veränderung auf die Genexpression und die Kernstrukturen. Die Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten deutet auf eine mechanistische Regulierung des osmotischen Reizes hin, die mit der Chromatinorganisation und der DNA-Methylierung

zusammenhängt. Interessant ist, dass die Spannungsrelaxationseigenschaften der Hydrogele die Regulierung der osteogenen Differenzierung durch osmotische Veränderungen moderieren. Die Ergebnisse enthüllen einen bisher unerkannten, schnell wirkenden Stimulus für den Beginn von Regenerationsprozessen. Diese Erkenntnisse könnten dazu beitragen, neue Ziele für regenerative Therapien zu identifizieren, die Patienten mit eingeschränkter Heilungsfähigkeit zugutekommen könnten.

Die physiologischen Spannungsrelaxationseigenschaften des humanen Frakturhämatoms sind in hypoosmolaren Umgebungen verstärkt. Diese Beobachtung ist angesichts der bereits erwähnten Bedeutung der Spannungsrelaxationseigenschaften in Physiologie und Regeneration von Bedeutung. Die Mechanismen, durch die osmotische Veränderungen, insbesondere solche, die durch eine verringerte Ionenkonzentration hervorgerufen werden, die spannungsrelaxationseigenschaften der ECM regulieren, sind jedoch nach wie vor unklar. Aus diesem Grund wurde ein *ex vivo* Modell der ECM entwickelt, das sich für die mechanische, strukturelle und magnetische Resonanz (MR) Charakterisierung eignet. Das *ex vivo* Modell basiert auf Sehngewebe, die aufgrund ihrer geordneten Struktur und einfachen Zusammensetzung, die hauptsächlich aus Kollagenfasern, Proteoglykanen und Wasser besteht, Vorteile für die Strukturanalyse bietet. Unter Verwendung desselben Versuchsaufbaus für die osmotische Modulation wie für die Hydrogele, werden die osmotischen Eigenschaften, wie Wasser- und Ionenbindung, hier moduliert, um ihre Auswirkungen auf den Elastizitätsmodul und die Spannungsrelaxationseigenschaften der ECM zu entschlüsseln. Die MR-Relaxationsparameter-Kartierung wurde dann eingesetzt, um Veränderungen in der Wasserbindung zu erkennen detektieren, während die Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) Aufschluss über eine mögliche Rolle der Kontraktion der Kollagenfasern gab. Die Daten zeigen, dass in hypoosmolaren Umgebungen die Menge des stärker gebundenen Wassers in der ECM zunimmt, was den Elastizitätsmodul erhöht und die Spannungsrelaxation des Gewebes verstärkt. Es wurde keine Kontraktion der Kollagenfasern festgestellt, was die Ergebnisse dieser Arbeit von den früher berichteten Auswirkungen des osmotischen Drucks unterscheidet, der das Gewebe dehydriert und zu einer Kontraktion des Kollagens und einem erhöhten Elastizitätsmodul führt. Struktur- und Ionendiffusionsanalysen unterstreichen außerdem die regulierende Rolle von Proteoglykanen, insbesondere ihrer negativ geladenen Glykosaminoglykan-Untereinheiten, bei dem beobachteten Zusammenspiel zwischen Ionenkonzentrationsänderungen und ECM-Mechanik. Das verbesserte Verständnis der osmotischen und mechanischen Eigenschaften von Geweben ermöglicht es, die

konventionellen MR-Relaxationsparameter  $T_1$  und  $T_2^*$  mit Gewebeswellung und pathologisch veränderten mechanischen Eigenschaften in Beziehung zu setzen. Die Durchführung von *in vivo* Scans von Patienten mit derselben MR-Sequenz, wie sie für die *ex vivo* ECM verwendet wird, unterstreicht das Potenzial der kombinierten  $T_1$ - und  $T_2^*$ -Kartierung für klinische Anwendungen und für verbesserte Diagnostik und Dateninterpretation.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Arbeit aufzeigt, dass eine Gewebeschädigung, die zu einer starken osmotischen Veränderung in Zellen führt, als schnell wirkender Stimulus dienen kann, der Regenerationsprozesse synergisiert. Während der Fokus auf dem Knochenbruchspalt lag, haben die hier beschriebenen Prozesse potenziell auch Bedeutung für Regenerationsprozesse bei anderen Organverletzungen. Das gewonnene Verständnis der osmotischen Veränderungen in der Gewebemechanik und der Zellfunktion könnte neue biomaterialbasierte Therapiestrategien inspirieren. Der gewonnene Einblick in die grundlegenden osmotischen und mechanischen Eigenschaften von *ex vivo* Sehngewebe ermöglicht es, MR-Messwerte mit den biophysikalischen Eigenschaften der ECM in Verbindung zu bringen, was auf ihr Potenzial für klinische Anwendungen schließen lässt.