ETH zürich

ETH Library

Fibronectin extracellular matrix serves as a signal transducer to mediate the effects of material properties and heparin on mesenchymal stem cell differentiation

Doctoral Thesis

Author(s):
Li, Bojun

Publication date:
2012

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-007620371

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

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.20751

Fibronectin extracellular matrix serves as a signal transducer to mediate the effects of material properties and heparin on mesenchymal stem cell differentiation

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
BOJUN LI
M.Sc. in Microbiology, National University of Singapore

born December 18, 1974
citizen of the People's Republic of China

Prof. Dr. Viola Vogel, examiner
Prof. Dr. Christian Wolfrum, co-examiner
Prof. Dr. Marcy Zenobi-Wong, co-examiner

2012

Abstract

Great efforts have been made to exploit human mesenchymal stem cells (hMSCs) for regenerative therapies because of their diverse differentiation potential. However, clinical applications of hMSCs are still hampered, since it is difficult to control the specific differentiation of hMSCs *in vivo*. In addition to soluble factors, many physical cues have been shown to impact the differentiation of hMSCs, such as the rigidity and topography of substrates. Though various correlations have been established between hMSC differentiation and material properties, the underlying molecular mechanisms by which hMSCs sense material properties and translate them into biochemical signals remain unclear.

In this thesis, we demonstrate that fibronectin (Fn) extracellular matrix (ECM) fibrils play a pivotal role in translating material properties into biochemical signals that eventually determine the hMSC differentiation. We showed here that hMSCs harvested plasma Fn from the medium and assembled it into three-dimensional (3D) ECM fibrils within 24 hours. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) studies revealed that the conformations of Fn in these assembled fibrils were locally adjusted by cell-traction forces in response to the rigidity of polyacrylamide gels. Rigid polyacrylamide gels correlated with more stretched Fn conformations, and more hMSC osteogenic differentiation compared to soft polyacrylamide gels. The same correlations do not hold for hMSCs on polydimethylsiloxane (PDMS). When the adhesion molecules were chemically crosslinked to PDMS, rigidity changes of PDMS did not affect hMSC differentiation, and we showed that the Fn conformations of hMSC assembled ECM on PDMS of varying rigidities remained unchanged. It showed that the rigidity of a polymer did not regulate hMSC differentiation directly. Instead, the altered rigidity affected the differentiation of hMSCs in those cases where the Fn conformations of Fn fibrils were altered too.

To assess the effect of force-induced conformational changes of Fn on hMSC differentiation, hMSCs were cultured on manually pulled Fn fibers with relaxed or stretched conformations. We showed that stretched Fn fibers upregulated hMSC osteogenesis independently of cell shape and substrate rigidity. Function-blocking

antibodies against Fn related integrins α5β1 and αvβ3 were used to test the role of integrin signaling in hMSC differentiation on Fn fibers. Osteogenesis of hMSCs was increased when the αvβ3 integrin was blocked on relaxed fibers, and decreased when the α5β1 integrin was blocked on stretched fibers. This suggests that the osteogenic differentiation of hMSCs on manually pulled Fn fibers is regulated by the force-induced conformational changes of Fn through integrin signaling pathways.

To assess the impact of Fn conformations of cell-derived ECM on hMSC differentiation, hMSCs were cultured in decellularized cell-derived Fn ECM scaffolds with chemical crosslinking (crosslinked ECM) or without crosslinking (native ECM). Crosslinking of ECM scaffolds increased the rigidity significantly, but relaxed Fn conformations were preserved. We found that the rigidification of 3D ECM by chemical crosslinking did not increase hMSC osteogenesis. It showed that increasing ECM rigidity alone could not promote hMSC osteogenesis if the Fn conformations within the ECM scaffold were fixed. Our results suggest a new mechanism by which the properties of polyacrylamide gels influence hMSC osteogenesis: hMSCs regulate Fn conformations of assembled ECM fibrils according to the properties of polyacrylamide gels by cell-generated forces. hMSCs stretch the assembled Fn fibrils more on rigid than on soft polyacrylamide gels, and the stretched Fn fibrils serve as a mechano-regulated check point that promotes hMSC osteogenesis.

In addition to mechanical force, biochemical treatment of Fn or Fn fibrils with heparin can also change Fn conformations. We showed that heparin treatment changed the Fn conformations of cell-derived ECM scaffolds from relaxed to extended conformations. Chemical crosslinking of heparin-treated ECM scaffolds locked the heparin-induced Fn conformations and significantly increased hMSC osteogenic differentiation, whereas only heparin treatment or chemical crosslinking of ECM did not impact hMSC osteogenic differentiation. It suggests that heparin-induced Fn conformations in ECM promote hMSC osteogenesis, thus the Fn conformational changes could mediate the effect of heparin on hMSC differentiation.

In summary, our studies indicate that Fn extracellular matrix serves as a signal transducer that translates the properties of polyacrylamide gels and heparin treatment into different Fn conformations. The conformational changes of Fn could regulate integrin

signaling together with other possible mechanisms, and finally impact hMSC osteogenic differentiation. We propose a new mechanism by which the physical properties of biomaterials and heparin impact hMSC differentiation, and provide essential insights that may ultimately advance stem cell therapies.

Zusammenfassung

Auf Grund ihres vielfältigen Differenzierungspotentals, ist es ein grosses Bestreben humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) für regenerative Therapien zu nutzen. Allerdings sind klinische Anwendungen von hMSCs noch gehindert, da nicht bekannt ist, wie die Differenzierung von hMSCs in vivo gesteuert werden kann. Neben löslichen Signalfaktoren wurde der Einfluss vieler physikalischer Grössen auf die Differenzierung von hMSCs gezeigt, wie zum Beispiel die Steifigkeit und Topographie der extrazellulären Matrix (ECM). Obwohl Korrelationen zwischen der Differenzierung von hMSCs und verschiedenen Materialeigenschaften aufgestellt wurden, sind die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen, durch die hMSCs Materialeigenschaften spüren und diese in biochemische Signale umwandeln, noch unklar.

In dieser Arbeit zeigen wir, dass Fibronektin (Fn)-Fibrillen eine entscheidende Rolle spielen, physikalische Eigenschaften von Polyacrylamidgelen in biochemische Signale umzusetzen, welche Auswirkungen auf die Differenzierung von hMSCs haben. Wir haben gezeigt, dass hMSCs Plasma-Fn aus dem Medium nutzen um es innerhalb von 24 Stunden in 3D Fn Matrizen einzubauen. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zeigte, dass die Fn Konformationen dieser Matrizen in Reaktion auf die Steifigkeit des Polyacrylamidgels lokal durch zelluläre Zugkräfte moduliert wurden. Harte Polyacrylamidgele produzierten gestreckte Fn Konformationen und korrelierten mit höherer hMSC Osteogenese. Interessanterweise hatte die Steifigkeit von Polydimethylsiloxan (PDMS) keinen Einfluss auf die Differenzierung der hMSCs und die Fn Konformationen der durch die hMSC-produzierten Matrizen auf PDMS blieben

konstant. Dies zeigt, dass Änderungen der Steifigkeit die Differenzierung von hMSCs nur dann beeinflussten, wenn die Konformationen der Fn Fibrillen sich auch änderten.

Um die Auswirkung der kraftinduzierten Änderung der Konformation von Fn auf die Differenzierung von hMSCs zu untersuchen, wurden hMSCs auf manuell gezogenen Fn Fasern mit entspannten oder gestreckten Konformationen kultiviert. Wir zeigten, dass gestreckte Fn Fasern zu einer Hochregulierung der Osteogenese von hMSCs führten, welche unabhängig von Zellform und der Steifigkeit des Substrates war. Funktions-blockierende Antikörper gegen die Integrine α5β1 und avß3 wurden verwendet, um die Rolle des Integrin Signalwegs in der hMSC Differenzierung auf Fn Fasern zu testen. Die Osteogenese war erhöht, wenn Integrin avß3 auf entspannten Fasern blockiert wurde, und verringert, wenn Integrin α5β1 auf gestreckten Fasern blockiert wurde. Dies impliziert, dass die osteogene Differenzierung von hMSCs auf manuell gezogen Fn Fasern durch die Kraft-induzierte Konformationsänderung von Fn über Integrin-Signalwege reguliert wird. Um die Auswirkungen der Fn Konformation von 3D-Matrizen auf die hMSC Differenzierung zu untersuchen, wurden hMSCs in dezellularisierten Fn Matrizen kultiviert, jeweils mit chemischer Vernetzung (vernetzte Matrix mittels Formaldehyd) oder ohne Vernetzung (native Matrix) kultiviert. Die Vernetzung von Matrizen erhöhte stark die Steifigkeit und bewahrte gleichzeitig die entspannte Konformation von Fn. Wir fanden, dass die Versteifung der 3D-Matrix durch chemische Vernetzung die Osteogenese von hMSCs nicht erhöhte. Dies zeigt, dass ohne ausreichend gestreckte Fn Konformationen das starre ECM nicht zu einer höheren Osteogenese führte. Unsere Ergebnisse schlagen einen neuen Mechanismus vor, durch den Eigenschaften von Polyacrylamidgele die Osteogenese von hMSCs beeinflussen: hMSCs regulieren die Fn Konformation ihrer produzierten Matrizen entsprechend den Eigenschaften des Polyacrylamidgels über lokale zelluläre Zugkräfte. hMSCs strecken die neu produzierten Fn Fibrillen mehr auf starren als auf weichen Polyacrylamidgelen, und die gestreckten Fn Fibrillen dienen als ein mechano-regulierter Check Point, der die Osteogenese von hMSCs verstärkt.

Schließlich haben wir unsere Untersuchung auf Heparin-induzierte Fn Konformationsänderung in ECMs erweitert. Wir haben gezeigt, dass Heparin die Fn-Konformationen in den von den Zellen produzierten Matrizen zu einer mehr gestreckten

Konformation führte. Die chemische Vernetzung der mit Heparin behandelten Matrix fixierte die Heparin-induzierte Fn Konformation und erhöhte deutlich die osteogene Differenzierung der hMSCs, während die Heparinbehandlung allein oder die chemische Vernetzung der Matrizen keinen Einfluss auf die Osteogenese hatte. Dies impliziert, dass die Heparin-induzierten Fn Konformationen die Osteogenese von hMSCs fördern und dass damit die Fn Konformationsänderung die Wirkung von Heparin auf die Differenzierung von hMSCs vermittelt.

Zusammenfassend zeigen unsere Studien, dass Fn als Signalträger, die Eigenschaften von Polyacrylamidgelen und einer Heparinbehandlung in verschiedene Konformationen von Fn übersetzt. Die Konformationsänderung von Fn wird über Integrin-Signalwege zur Zelle übermittelt, und beeinflusst schliesslich zusammen mit der Bindung von Wachstumsfaktoren an Fn und anderen möglichen Mechanismen die osteogene Differenzierung von hMSCs. Dies zeigt einen neuen Mechanismus, durch welchen die physikalischen Eigenschaften von Biomaterialien und Heparin Auswirkungen auf die Differenzierung von hMSCs haben und bietet neue Erkenntnisse, die für Zelltherapien eingesetzt werden könnten.