

# **Submicron Protein Patterning: An Experimental Platform for Cell- Surface Interaction Research**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH  
For the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES

Presented by

**Jost Wendelin Lussi**

Dipl. Werkstoff-Ing. ETH Zürich

Born on 18<sup>th</sup> February 1974

Citizen of Stans, NW

Accepted on the recommendation of

Prof. Jeffrey A. Hubbell, examiner,  
Prof. Gaudenz Danuser, co-examiner,  
Prof. Marcus Textor, co-examiner  
Prof. Bradley Nelson, co-examiner

**2004**

## Zusammenfassung

Bereits anfangs des letzten Jahrhunderts wurde entdeckt, dass Zellen ihre Morphologie an topographische Strukturen in ihrer Umgebung anpassen. Etwas später hat man auch einen Zusammenhang zwischen der Zellform und der DNA-Synthese festgestellt, worauf sich Zellbiologen die Frage stellten, ob rein strukturelle Signale von ausserhalb der Zelle in der Lage sind, in ähnlicher Weise Zellreaktionen hervorzurufen wie lösliche Signalproteine. Ebenso wurde beobachtet, dass Knochenimplantate mit strukturierter Oberfläche im Vergleich zu solchen mit glatter Oberfläche ein besseres Einwachsverhalten zeigten, woraus der Wunsch entstand, mittels gezielter Modifizierung der Grenzfläche zum biologischen System (z.B. Knochengewebe) generell ein besseres Implantatverhalten zu erreichen. Dies hat viele Forscher insbesondere im Bereich der Biomaterialien dazu bewogen, den Effekt von Oberflächenstrukturen auf das Zellverhalten näher zu untersuchen. Dazu wurden gezielt neue Techniken entwickelt, die es ermöglichen, die Zellmorphologie bezüglich Form und Grösse, die Zellausrichtung oder die Migration zu beeinflussen. Fortschritte in der Oberflächentechnologie und der mikro- und nanotechnologischen Fertigungstechnik haben dazu beigetragen, dass es heute Möglichkeiten gibt, auf flachen Oberflächen nicht nur topographische Strukturen aller Grössenordnungen herzustellen, sondern auch die Anordnung biochemischer Moleküle in Strukturen bis hinunter in den Nanometerbereich zu kontrollieren.

Eine Pionierarbeit in diesem Gebiet wurde vor rund 10 Jahren von Forschern an der Harvard Universität publiziert. Sie zeigten auf, dass die Kontrolle über die Form und Grösse der Zellen - mittels zell-adhäsiver Oberflächenstrukturen innerhalb eines nicht-adhäsiven Hintergrundes - zu gleichen Zellzuständen führen kann, wie sie normalerweise durch spezifische lösliche Botenstoffe hervorgerufen werden. Die Frage nach den Mechanismen, wie die Zelle solche „unlöslichen“ Struktursignale in bestimmte Zellreaktionen umzusetzen vermag, ist heute, obwohl es unzählige Beobachtungen dazu gibt, nur ansatzweise geklärt. Eine Hypothese ist die, dass die Zellform grundsätzlich den Zellzustand bestimmt, unabhängig davon wie die Zelle in diese Form gebracht wird, und dass es keine spezifischen Rezeptoren für Struktursignale gibt. Die Verfechter dieser Hypothese vermögen jedoch nicht zu beantworten, ob Zellen nicht doch Sensorsysteme besitzen, die analog zu Rezeptoren für lösliche Botenstoffe, Struktursignale in der Zellumgebung fühlen und Signalkaskaden auslösen können, die das Zellverhalten entsprechend beeinflussen.

Zellen bilden, in erster Linie auf rigiden Substraten, spezifische Kontaktzonen (fokale Kontakte), die das Zytoskelett der Zelle über transmembrane Rezeptoren an so genannte Adhäsionsproteine ausserhalb der Zelle binden. Diese Kontakte bestehen aus aggregierten Rezeptoren und einer Ansammlung von Proteinen auf der Innenseite der Zellmembran, die sowohl mechanische wie auch biochemische Signalfunktionen besitzen. Fokale Kontakte sind ein intensiv bearbeitetes Gebiet in der medizinischen Grundlagenforschung, da ein verbessertes Verständnis der Zelladhäsion unter anderem für die Krebsforschung von grossem Interesse ist. Dass diese im Lichtmikroskop gerade noch erkennbaren Kontaktzonen, Sensoren gleich, auf biochemische Unterschiede in der Zellumgebung reagieren, intrazelluläre Signalkaskaden auslösen und so das Zellverhalten beeinflussen können, ist mittlerweile etabliert. Es liegt deshalb nahe zu untersuchen, ob und wie diese Sensoren auch Struktursignale in Signalkaskaden umzusetzen und so das Zellverhalten zu beeinflussen vermögen.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es, Methoden zu etablieren, die es erlauben, solche Fragen experimentell zu erörtern. Dazu wurden neben der Entwicklung geeigneter chemisch strukturierter Substrate, auch eine Methode zur Kontrolle von submikrometer kleinen Proteinstrukturen erstellt und Experimente mit relevanten Zellsystemen durchgeführt.

Die Herstellung von geometrisch definierten zell-adhäsiven Strukturen auf flachen Substraten kann auf unzählige Arten erreicht werden. Zwei solche Methoden, welche in Zusammenarbeit mit zwei Gruppen an der ETH Zürich entwickelt wurden, sind das „Selective Molecular Assembly Patterning“ (SMAP) und eine Variation des häufig benützten Micro Contact Printing ( $\mu$ CP). Beide Methoden erlauben es, gut definierte Proteinstrukturen in Grössenordnungen bis zu einem Mikrometer herzustellen, weisen jedoch erhebliche Nachteile auf in der Herstellung kleinerer Strukturen auf transparenten Substraten. Dies ist jedoch eine Voraussetzung für eine Vielzahl biologisch interessanter Experimente basierend auf optischer Mikroskopie. Um diese zu ermöglichen wurde die SMAP Methode im Kontext dieser Doktorarbeit weiterentwickelt. Durch Abscheiden einer dünnen, leitfähigen Oxidschicht und anschliessender Elektronenstrahl-Lithographie, kombiniert mit der Oberflächenmodifizierung von SMAP, können nun Proteinstrukturen im Submikrometerbereich auf transparenten Substraten hergestellt werden, welche es erlauben, den Einfluss von strukturierten Oberflächen auf fokale Kontakte zu untersuchen.

Die Analyse von Proteinstrukturen und Zellreaktionen im Submikrometerbereich mittels Fluoreszenzmikroskopie ist nicht ohne Tücken, da die Strukturgrössen im Bereich der optischen Auflösung ( $\sim 350$  nm) liegen und Brechungseffekte die Interpretation der Bilder erschweren. Als Teil dieser Doktorarbeit wurde deshalb eine Bildanalysemethode ausgearbeitet, die es

ermöglicht, unter Kenntnis der Geometrie künstlich erzeugter Proteinstrukturen, genauere Aussagen bezüglich deren Qualität zu machen.

Zellversuche auf adhäsiv/nicht-adhäsiven Strukturen erlaubten in dieser Doktorarbeit zu erörtern, welche Strukturparameter die Ausprägung fokaler Kontakte überhaupt zu beeinflussen vermögen. Dazu wurden in erster Linie morphologische Betrachtungen beigezogen. Es stellte sich heraus, dass über geometrisch definierte Proteinstrukturen die Verteilung der fokalen Kontakte sowie ihre maximale Grösse unabhängig von der Zellform kontrolliert werden kann, nicht aber ihre genaue Morphologie oder Orientierung. Während eine morphologische Antwort der Zellen auf eine vorgegebene Verteilung dieser Kontaktzonen erkennbar ist, bleibt es unklar, ob dies für die Funktion der Zellen eine gewichtige Rolle spielt. Andererseits wurde jedoch für einen bestimmten Zelltyp ein Zusammenhang zwischen limitierter Kontaktgrösse und Funktion festgestellt. Zu kleine Proteinstrukturen verhindern die Differenzierung von glatten Muskelzellen. Dies ist ein erstes konkretes Indiz dafür, dass Strukturparameter, die spezifisch fokale Kontakte und nicht die Zellform als Ganzes beeinflussen, sehr wohl auch einen Einfluss auf die Zellfunktionen haben können.

Die Verwendung solch *chemischer* Oberflächenstrukturierung in Implantat-systemen, um negative Reaktionen zu verhindern oder aber erwünschte Prozesse im Körper hervorzurufen, ist jedoch zur Zeit noch nicht absehbar. Die komplexen Wechselwirkungen zwischen Implantatoberfläche und dem Körpergewebe, sowie die Ignoranz über konkrete biologische Mechanismen, deren Beeinflussung zur gewünschten Kontrolle über die Körperreaktion führen könnte, sind die Hauptgründe dafür. Neue experimentelle Methoden, wie in dieser Arbeit vorgestellt, werden in Zukunft aber dazu beitragen, solche Mechanismen zu identifizieren, und möglicherweise auch zu einem besseren Verständnis anderer für die Medizin wichtigen biologischen Prozesse, wie zum Beispiel der Adhäsion und Migration von Krebszellen, führen.

## Summary

Already at the beginning of the last century it was observed that cells adapt their morphology to topographical structures in their environment. More recently, a relationship between cell shape and DNA synthesis was found. As a result, a number of biologists started to investigate whether structural cues from outside the cell are capable of inducing similar cell reactions as soluble signaling proteins do by inducing intracellular biochemical pathways. At the same time it was also observed that bone implants with structured surfaces exhibited a better performance compared to the ones with smooth surfaces. This finding provoked the interest in improving the performance of implants by specifically modifying the interface to the biological system (e.g. bone tissue). Especially in the area of biomaterials research, many investigators therefore started to examine the effects of surface structures on cell behaviour. As a consequence, new techniques were developed with the goal to influence cell morphology with regard to shape and size, or to impose cell polarization and direction of migration. Advancements in surface science as well as in micro- and nanotechnological fabrication have contributed to today's possibilities of producing not only well-defined topographical structures but also of controlling the lateral arrangement of biofunctional moieties, such as proteins, in various geometrical structures down to the nanometer range.

Pioneering work in this field was published about ten years ago by researchers at Harvard University. They showed that the control of shape and size of cells - by means of cell-adhesive patches within a non-adhesive background - can result in the same functional states of the cells which are normally provoked by soluble signaling proteins. The mechanisms by which the cells translate such „non-soluble“, structural signals into a specific cell response is to date still not conclusively known despite numerous descriptive observations. One hypothesis is that cell shape alone determines the cell state independently of what signaling cues actually brought the cell into that shape. This explanation, however, cannot exclude the presence of sensory systems, which actually sense structural signals in the cell environment and, in analogy to receptors for soluble signaling proteins, activate intracellular signaling pathways and thus determine cell behaviour.

Cells attached to rigid substrates form specific contact zones (focal contacts) which link the cell cytoskeleton to adhesion proteins outside of the cell via transmembrane receptors. These contacts are comprised of aggregated receptors and an accumulation of proteins on the cytoplasmic side of the membrane, which possess mechanical as well as biochemical signaling functions. Focal

contacts are an intensively studied field of research because an improved understanding of cell adhesion is of great biomedical interest, e.g. for cancer research. It is established that these small contact zones, which can still be observed by light microscopy, are able to react to the biochemical cell environment and trigger corresponding signaling cascades and thus steer cell function. This evidently leads to the question whether these sensory structures are also capable of converting structural cues into corresponding signaling pathways and thus steer cell behaviour. The specific aim of this thesis is to establish experimental methods, which will allow us to investigate such questions.

The fabrication of geometrically defined cell-adhesive structures on flat substrates can be achieved by a variety of methods. Two techniques were developed in collaboration with different groups at the ETH Zurich: Selective Molecular Assembly Patterning (SMAP) and a variation of the widely used micro contact printing ( $\mu\text{CP}$ ). Both of these methods allow the production of well-defined protein structures with dimensions down to 1  $\mu\text{m}$ , yet they comprise considerable disadvantages in the fabrication of smaller structures on transparent substrates. This, however, is a prerequisite for a large number of biologically interesting experiments using optical microscopy. To circumvent these issues, the SMAP method was extended in the context of this work. By depositing a conductive oxide layer and applying e-beam lithography in combination with the SMAP surface modification, submicron protein structures can now be produced on transparent substrates, which serve to study how focal contacts are influenced by surface patterns.

Fluorescence microscopy-based analysis of protein structures and cell reactions in the submicron range is not straightforward, since the size of the structures is in the range of the optical resolution limit ( $\sim 350$  nm). Therefore image interpretation needs to consider optical effects. To account for these, an image analysis routine was developed in the course of this PhD thesis, which allows assessing the quality of real protein patterns by comparing them to synthetic model images based on knowledge of the theoretical patch geometry.

Initial cell experiments on adhesive / non-adhesive structures helped us determine what kind of structural parameters were capable of influencing focal contacts at all, mainly considering morphological aspects. It turned out that the distribution and maximal size of focal contacts can indeed be controlled by surface patterns independently from overall cell shape but not so their exact morphology. An effect of the imposed focal contact distribution on cell morphology is evident but it is unclear whether this plays an important role for cell functioning as well. For a particular cell system, on the other hand, a relationship between restricted focal contact growth and cell function could be

detected. Too small adhesive sites prevent smooth muscle cells from differentiating. This is a first indication that structural cues, which specifically affect focal contacts and not the cell shape as a whole, can indeed influence functional cell behaviour.

It is not likely, however, that in the near future implants will be modified by such *chemical* surface structures in order to prevent negative reactions or to specifically induce desired tissue responses. The reasons for this are the complexity of the interactions between implant surfaces and biological systems as well as the lack of understanding of specific biological mechanisms, which need to be controlled to lead to a desired system response after implantation. New experimental methods, such as the ones presented in this thesis, will provide a platform for the identification of those mechanisms and potentially also improve our understanding of other biological processes, adhesion and migration of cancer cells among others, which will be important for the advancement of medicine in general.