

VU Research Portal

In vitro studies of the role of mechanical cues in skeletal patterning and differentiation

Klumpers, D.D.

2014

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Klumpers, D. D. (2014). *In vitro studies of the role of mechanical cues in skeletal patterning and differentiation*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Summary



During embryonic development, tissues obtain their specific shapes and patterns through dynamic and complex morphogenetic processes. The skeletal system consists of rigid bony elements and flexible cartilaginous structures. Their patterns are highly functional, such as the alternating pattern of bone and cartilage of the spine, which provides stability and flexibility to the vertebrate body. These skeletal patterns are determined during early development. Both bone and cartilage are derived from a common stem cell source, and their development involves a tightly orchestrated process of pattern formation and stem cell differentiation. The first step in this process is mesenchymal condensation. Condensations are characterized by a local physical clustering of mesenchymal cells, and are believed to induce differentiation. It is an essential step in skeletal development, as this determines the location and pattern of future skeletal elements. Despite growing insight into the role of molecular signaling pathways in regulating the process of early skeletal development, the impact of mechanical cues is largely unknown.

Skeletal development takes place in a mechanically dynamic environment. Individual cells exert forces on the surrounding matrix and/or neighboring cells, and distinctive tissues grow at different rates. Collectively, such cell-generated forces and differential growth rates can generate large tissue deformations and stresses. Their net effect is influenced by a set of mechanical boundary conditions, such as the proximity or adherence to neighboring tissues. The role of these mechanical cues in early skeletal patterning and differentiation is poorly understood, partly due to a lack of interdisciplinary model systems.

The general aim of this thesis is to investigate the role of cell-mediated contraction, growth-induced stretch, and geometric boundary conditions on skeletal stem cell differentiation and patterning *in vitro*, by developing novel cross-disciplinary model systems combining tools from developmental biology and engineering.

In **chapter 2**, a three-dimensional cell-gel model was used to investigate the effect of cell-generated forces on skeletal progenitor cell differentiation and patterning thereof. Mesenchymal stem cells were embedded in a collagen matrix, which they collectively contracted while subjected to inhomogeneous boundary conditions. The experimental model was compared with a computational model to predict the stresses generated in the construct during contraction. It was found that contraction under these conditions led to a significant shape change of the construct as well as an inhomogeneous stress distribution that changed over time. This was shown to result in patterned osteogenic differentiation, independent of osteogenic factors in the culture medium. The regions of distinct osteogenesis correlated with regions that were predicted to have experienced relatively high shear stress at any time during contraction. Together, this indicates that the interplay of cell-mediated contraction and mechanical boundary conditions alone can result in patterned differentiation. Also, the results suggest that a transient exposure to a high-stress environment might be sufficient to induce lineage commitment. This emphasizes the importance of the role of cell-mediated contraction and boundary conditions in creating a microenvironment that changes in time and space, which can lead to patterning differentiation. Such insights into the cues that regulate skeletal progenitor cell

differentiation and patterning could be valuable for skeletal tissue engineering strategies.

Disease, trauma, and aging can lead to damage and degeneration of the skeletal elements, resulting in a significant socio-economic burden. Skeletal tissue engineering strategies aim to regenerate functional bone and cartilage in the adult body. In order to improve tissue-engineering strategies, it could be useful to look at the robust morphogenetic process of skeletal development. Aspects of this process can be modeled *in vitro* by the micromass assay, where embryonic skeletal progenitor cells are cultured in a high-density drop. In **chapter 3**, we specifically address what lessons the skeletal tissue-engineering field can learn from this model system. Embryonic skeletal progenitor cells from different anatomic locations as well as from different developmental stages could be compared in culture to assess intrinsic cellular differences and environmental cues that determine their commitment. As undesired chondrocyte hypertrophy and mineralization is a major issue in cartilage tissue engineering, genetic and molecular tools can be used in combination with the micromass to shed light on the signaling pathways that regulate chondrocyte hypertrophy. Also, the cues that guide patterning and boundary formation can be studied by combining the micromass with various engineering tools. Examples of such studies are performed in chapter 4 and 5 described below. The lessons that can be drawn from the micromass assay are limited by two major differences between developmental and regenerative skeletogenesis: cell type and scale. For example, adult progenitors do not spontaneously form mesenchymal condensations, which is key in skeletal development. Also, the mechanisms of tissue patterning need to be adjusted to the larger tissue engineering constructs. Altogether, fundamental insights gained from the micromass model could lead to a better mechanistic understanding of skeletal tissue (re)generation and can guide the improved design of tissue-engineering constructs.

Rapid growth of distinctive tissues in the developing embryo leads to growth-generated stresses and deformations. To address the effect of growth on early skeletal development, in **chapter 4** a novel culture model was developed in which embryonic skeletal progenitor cells in micromass culture are subjected to slow, growth-mimicking stretch. A total of 25% strain was applied during three different phases of culture, at the beginning, the middle or the end, to specifically address the effect of mechanical loading on the sequential stages of early skeletal development: proliferation, condensation and differentiation. It was found that growth-mimicking stretch at either time point did not affect proliferation and chondrogenic differentiation under the tested conditions. However, the number of condensations per unit area was affected by the timing of stretch, showing a decreased number per unit area when stretch was applied at later time points. When these results were corrected for the applied strain, it became clear that the number of condensations per unit original surface area increased only when stretched during the first 20 hrs, possibly indicating a sensitivity to stretch during the initiation phase of the condensation process. This suggests a role for the mechanically dynamic environment in skeletal patterning deformation.

Developing tissues are also subjected to a set of mechanical boundary conditions, such as attachment to specific structures or the geometric constraints set by neighboring tissues. The cell population that gives rise to the vertebral column for example is restricted to a long narrow space in the embryo closely surrounded by adjacent structures. In **chapter 5**, the effect of such geometric boundary conditions on the linear patterning of mesenchymal condensations was investigated. The micromass model was combined with a microchannel patterning technique that allowed for the culture of skeletal progenitor cells on long, narrow adhesive islands of varying width. It was found that the spacing between condensations increased on narrower islands, a phenomenon that could not be explained by cell availability alone. Also, the alignment of condensations and the overall chondrogenic differentiation was increased when subjected to tighter geometric constraints. When the pattern of condensations *in vivo* at the site of the developing vertebral column in chicken embryos was investigated, it was found to closely fit the linear correlation between inter-condensation distance and geometric constraints that was found *in vitro*. Together, these findings indicate that geometric boundary condition might play a role in skeletal patterning through a process of self-organization.

Taken together, this thesis addresses the role of mechanical cues in early skeletal development by employing novel cross-disciplinary cell culture models. Mesenchymal condensation is a key process in skeletal development *in vivo* and it was observed that mechanical cues such as growth-mimicking stretch and geometric constraints modulate their patterning *in vitro*. To better understand how mechanical cues affect condensation and subsequent differentiation, more insight into the molecular, cellular and physical mechanisms underlying the initiation and maturation of condensations is required. Insights into the cues that guide skeletal progenitor cell differentiation and patterning could greatly benefit the design of skeletal tissue engineering constructs. In future studies, a more detailed quantitative characterization of the dynamic stress/strain fields in the developing embryo would be required to improve current models. Furthermore, advanced techniques such as 3D printing and traction force microscopy could be useful to further exploit the cross-disciplinary models described in this thesis. Such approaches will provide a more profound understanding of the role of mechanical cues in skeletal development.

Nederlandse samenvatting

Het skelet met de bijbehorende gewrichten bestaat uit een combinatie van harde botten en flexibele kraakbeenstructuren. De patronen van deze twee wezenlijk verschillende weefsels zijn uiterst functioneel, zoals bijvoorbeeld het alternerende patroon van bot en kraakbeen van de wervelkolom, welke zorgt voor zowel stabiliteit als flexibiliteit. Deze patronen worden bepaald tijdens de vroege embryonale ontwikkeling wanneer de specifieke vormen en patronen van de verschillende weefsels tot stand komen. Bot en kraakbeen ontwikkelen zich vanuit een gemeenschappelijke bron van stamcellen, mesenchymale stamcellen, via een nauwkeurig gecoördineerd proces van patroonvorming en stamceldifferentiatie. De eerste stap in dit proces is de vorming van mesenchymale condensaties, waarbij mesenchymale stamcellen lokale clusters vormen. In de condensaties wordt vervolgens differentiatie geïnduceerd. Condensatie is een essentiële stap in de ontwikkeling van het skelet, aangezien de locaties en patronen van de skeletstructuren tijdens deze stap bepaald worden. Er is steeds meer inzicht in de rol van moleculaire en genetische factoren tijdens de vroege ontwikkeling van het skelet, echter de invloed van mechanische factoren is nog grotendeels onbekend.

De ontwikkeling van het skelet vindt plaats in een mechanisch dynamische omgeving. Individuele cellen oefenen kracht uit op de extracellulaire matrix en/of naburige cellen en verschillende weefsels groeien vaak met verschillende snelheden. Door dergelijke krachten en verschillen in groeisnelheden kunnen significante vervormingen en spanningen in het weefsel ontstaan. Hun uiteindelijke effect wordt mede bepaald door de mechanische randvoorwaarden van de omgeving, zoals de nabijheid en de hechting aan naburige weefsels. Op dit moment is de rol van deze mechanische factoren in het proces van de vroege patroonvorming en differentiatie van bot en kraakbeen vrijwel onbekend, onder andere door een gebrek aan interdisciplinaire modelsystemen.

In dit proefschrift is het effect van cellulaire krachten, groei-imiterende rek en geometrische randvoorwaarden op stamceldifferentiatie en patroonvorming onderzocht. Daartoe zijn nieuwe interdisciplinaire *in vitro* modelsystemen ontwikkeld waarin methoden uit de ontwikkelingsbiologie en engineering met elkaar zijn gecombineerd.

In **hoofdstuk 2** is een driedimensionaal cel-gel model gebruikt om het effect van cellulaire krachten op de differentiatie van mesenchymale stamcellen en de patronen daarvan te bestuderen. Hiertoe werden mesenchymale stamcellen ingebed in een collageenmatrix, welke zij collectief samentrokken. De contractie vond plaats onder invloed van inhomogene randvoorwaarden. De spanningen die daardoor in het construct ontstaan, werden vervolgens berekend met behulp van een theoretisch model. Onder invloed van de inhomogene randvoorwaarden leidde de contractie tot een significante vervorming van het construct en inhomogene spanningsvelden die veranderden gedurende het experiment. Dit leidde tot een specifiek patroon van osteogene differentiatie, waarbij de osteogene locaties correleerden met de locaties

die een relatief hoge schuifspanning hadden ondergaan tijdens de contractie. Deze resultaten laten zien dat een combinatie van cellulaire contractie en inhomogene randvoorwaarden in een oorspronkelijk homogeen construct kan leiden tot een specifiek patroon van differentiatie. Daarbij suggereren deze bevindingen een belangrijke rol voor de continu veranderende spanningen in het construct. Dergelijk inzicht in de factoren die van invloed zijn op stamceldifferentiatie en patroonvorming is belangrijk voor de regeneratie van bot en kraakbeen.

Ziekte, trauma en ouderdom kunnen leiden tot de beschadiging en degeneratie van bot- en kraakbeenstructuren, hetgeen ernstige gezondheidsproblemen en significante economische gevolgen met zich meebrengt. Tissue engineering heeft als doel om met behulp van stamcellen functioneel bot en kraakbeen te regenereren. Daartoe kan het nuttig zijn om naar het proces van de ontwikkeling van bot en kraakbeen in het embryo te kijken. Het is mogelijk om belangrijke aspecten van dit proces *in vitro* te modelleren door middel van het *micromass* model. In dit model worden embryonale mesenchymale stamcellen gekweekt in een kleine druppel met een hoge celdichtheid. In **hoofdstuk 3** wordt beschreven wat het tissue engineering-vakgebied van dit modelsysteem kan leren. Embryonale mesenchymale stamcellen van verschillende locaties in het embryo of van verschillende fases in de ontwikkeling kunnen *in vitro* met elkaar vergeleken worden om intrinsieke verschillen en de invloed van omgevingsfactoren op differentiatie te onderzoeken. Verder kan de *micromass* gecombineerd worden met verscheidene genetische, moleculaire en fysische onderzoeksmethoden. Dergelijke experimenten kunnen inzicht bieden in relevante processen met betrekking tot de tissue engineering, zoals het voorkomen van mineralisatie van kraakbeen en het tot stand komen van specifieke patronen van bot- en kraakbeenstructuren. In hoofdstuk 4 en 5 zijn dergelijke studies uitgevoerd. Er zijn echter twee belangrijke verschillen tussen de embryonale ontwikkeling en de regeneratie van bot en kraakbeen waar rekening mee gehouden moet worden: celtypen en schaal. Volwassen mesenchymale stamcellen vormen bijvoorbeeld niet spontaan mesenchymale condensaties, hetgeen een cruciale stap is in de embryonale ontwikkeling. Ook moeten de mechanismen die leiden tot patroonvorming worden aangepast aan de aanzienlijk grotere tissue engineering-constructen. Rekening houdend met de verschillen en overeenkomsten kan het *micromass* model fundamenteel inzicht verschaffen in het proces van de vorming van bot en kraakbeen en daarmee het ontwerp van tissue engineering-constructen verbeteren.

De groei van de verschillende weefsels tijdens de ontwikkeling van het embryo leidt tot spanningen en vervormingen van die weefsels. In **hoofdstuk 4** is het effect van groei op de vroege ontwikkeling van het skelet onderzocht met behulp van een nieuw *in vitro* model waarbij langzame, groei-imiterende rek wordt toegepast op embryonale mesenchymale stamcellen in het *micromass* model. Een rek van 25% werd toegepast tijdens de eerste 20 uur, de middelste 20 uur of de laatste 20 uur van het experiment om te bestuderen wat het effect is van mechanische spanning op de verschillende fases van de vroege ontwikkeling van het skelet: proliferatie, condensatie en differentiatie. Groei-imiterende rek had tijdens geen van deze drie fases effect op proliferatie en chondrogene differentiatie onder de onderzochte omstandigheden. Echter, het aantal condensaties per oppervlakte-eenheid was afhankelijk van het

tijdstip van rek, waarbij minder condensaties geobserveerd werden wanneer de rek werd toegepast tijdens de middelste of laatste 20 uur. Wanneer we deze resultaten corrigeren voor de toegepaste rek wordt duidelijk dat het aantal condensaties per oorspronkelijke oppervlakte-eenheid enkel toeneemt wanneer rek wordt toegepast tijdens de eerste 20 uur. Dit suggereert mogelijk een gevoeligheid voor rek tijdens de initiatie-fase van het condensatie-proces. De dynamische vervorming van het weefsel speelt dus mogelijk een rol in de patroonvorming van de skeletstructuren.

Ontwikkende weefsels zijn ook onderworpen aan een aantal mechanische randvoorwaarden, zoals de hechting aan nabijgelegen structuren of geometrische beperkingen door omliggende weefsels. De groep cellen van waaruit de wervelkolom zich ontwikkelt, wordt bijvoorbeeld door naburige structuren beperkt tot een lange, smalle ruimte. In **hoofdstuk 5** is het effect van dergelijke geometrische randvoorwaarden op het ontstaan van lineaire patronen van mesenchymale condensaties onderzocht. Het *micromass* model werd gecombineerd met een techniek waarbij microkanalen worden gebruikt om embryonale mesenchymale stamcellen op nauwkeurig gedefinieerde lange smalle eilandjes te kweken. De afstand tussen condensaties bleek afhankelijk van de breedte van het eiland, waarbij de afstand toeneemt op smallere eilandjes. De chondrogene differentiatie neemt toe wanneer de cellen onderworpen worden aan striktere geometrische beperkingen. Het patroon van condensaties *in vivo* op de plek van de toekomstige welvelkolom in kippen-embryo's is ook bestudeerd. Dit patroon bleek goed te passen in de lineaire correlatie tussen het condensatie-patroon en de geometrische beperkingen in de *in vitro* experimenten. Deze bevindingen suggereren dat geometrische randvoorwaarden een rol spelen in het ontstaan van de patronen van skeletstructuren, mogelijk door middel van zelforganisatie.

Door middel van nieuwe interdisciplinaire modelsystemen is in dit proefschrift de rol van mechanische factoren in de vroege ontwikkeling van het skelet onderzocht. Condensatie is een belangrijk proces in de ontwikkeling van skeletstructuren *in vivo* en wij hebben aangetoond dat mechanische signalen zoals groei-imiterende rek en geometrische beperkingen het patroon van condensaties *in vitro* kan beïnvloeden. Om beter te kunnen begrijpen hoe mechanische factoren het proces van condensatie en differentiatie beïnvloeden, zal meer inzicht nodig zijn in de moleculaire, cellulaire en fysische mechanismen die ten grondslag liggen aan de initiatie en maturatie van condensaties. Om de huidige modellen te verbeteren is het verder belangrijk om de krachten en dynamische spanningsvelden in de embryonale weefsels kwantitatief in kaart te brengen. Daarnaast kunnen geavanceerde technieken zoals 3D printers en *traction force microscopy* worden toegepast om de interdisciplinaire modellen uit dit proefschrift nog verder uit te baten. De bevindingen in dit proefschrift bieden inzicht in de rol van mechanische factoren in de ontwikkeling van het skelet en dergelijk inzicht in het ontstaan van bot en kraakbeen zal de regeneratie van deze weefsels bevorderen.

