



Doctoral Thesis

Nanoscopy and nanomechanics of biological systems

Author(s):

Klotzsch, Enrico

Publication Date:

2010

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006448489> →

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. 19306

“Nanoscopy and Nanomechanics of Biological Systems”

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Enrico Klotzsch

Dipl.-Phys. , TU Dresden

born 26. July 1981

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Viola Vogel, supervisor

Prof. Dr. Vahid Sandoghdar, co-supervisor

Prof. Dr. Ralph Spolenak

2010

SUMMARY

Fibronectin (Fn) is an extracellular matrix (ECM) protein that is assembled into supermolecular, fibrous networks *in vivo*. Upon external force application by cells pulling on the ECM, the Fn fibrils can be stretched several times of their resting length. This high extensibility was shown earlier to originate from unfolding of individual Fn type III modules. The network of force-bearing proteins links the cytoskeleton to the extracellular matrix thereby allowing for mechanical force regulation of cell function. Physical properties of a cell's microenvironment are sensed via force-bearing protein networks. Probing the mechanical characteristics of our single Fn fibers exceeded the reachable force levels of conventional techniques used for mechanical testing of single molecules and other fibers, such as atomic force microscopy AFM and tweezers. In the present thesis, a microelectromechanical system (MEMS) force sensor and other microfabricated devices were thus exploited to characterize the mechanical properties of individual Fn fibers in terms of their total extensibility, stress/strain relationship, and their hysteresis upon refolding. Additionally, structural changes of photolabeled Fn probe molecules inside the fiber were optically monitored by various techniques, including intramolecular Förster Resonance Energy Transfer (FRET). Finally, the stress-induced exposure of binding sites and binding kinetics were investigated.

Our measurements demonstrated that Fn fibers are among the most extensible fibers derived from biological molecules, and exhibit unique mechanical properties. Some fibers remained unbroken even when approaching over 700% strain. Stress-strain curves were highly nonlinear, being soft at low and turning rigid at high extensions. The derived Young's modulus of single fibers changed orders of magnitude from less than hundred kPa to several MPa.

Measuring the stiffness of crosslinked and non-crosslinked matrix fibers allowed to quantify how the alterations of their mechanical properties affected cell behavior. Therefore, Fn-FRET data taken in cell culture were calibrated against FRET versus strain data derived from single Fn fibers and the associated Young's moduli.

Furthermore the mechanical properties of single silk fibers were assessed by stretching them to their breakage point, thereby extending previous measurements of bulk properties of silk fiber meshes.

Cell fate can be influenced by variations of the Fn conformation. In order to understand the structural changes within Fn molecules upon surface adsorption, the conformation of single Fn molecules was measured in dependence of either different denaturant and salt concentrations in solution, or of the hydrophobicity of the surface. To measure Fn conformation, the four cryptic cysteines within one Fn molecule were labeled with four fluorophores and their relative positions were localized at the nanoscale by an optical high resolution method. By measuring distances between the fluorophores conformational information of the surface bound molecules can be obtained. The technique was also used to obtain ‘conformational snapshots’ of single molecules inside manually pulled fibers.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Protein Fibronectin ist Teil der extrazellulären Matrix (EZM). Im lebenden Organismus setzt sich dieses zu einem Netzwerk aus Fasern zusammen. Wenn Zellen an den Fibronectin - Fasern ziehen, werden diese um ein Vielfaches ihrer Ursprungslänge gestreckt. Dies wird ermöglicht durch die Entfaltung einzelner Fibronectinmodule (Sekundärstruktur). Im Gewebe existieren viele dieser Protein-Netzwerke. Sie verbinden das Zytoskelett, die Matrix innerhalb der Zelle, mit der EZM, um mechanisch verschiedenste zelluläre Funktionen zu schalten. Dies wird durch die Interaktion der Zelle mit ihrer näheren Umgebung in Form eines Protein-Netzwerkes welche Kräften standhält und diese überträgt gewährleistet. Um die mechanischen Eigenschaften der einzelnen Fibronectin Fasern zu untersuchen, bedarf es Kräften die denen der Standard Techniken wie Rasterkraftmikroskopie oder optischen und magnetischen Pinzetten, welche normalerweise für Einzelmoleküle oder andere Fasern verwendet werden übersteigt. Der Einfluss einer applizierten Kraft und der daraus entstehenden Streckung auf einzelne handgezogene Fibronectin - Fasern wurde im Rahmen dieser Arbeit erforscht. Dabei wurden insbesondere die inhärenten mechanischen Eigenschaften, die Exposition kryptischer Bindungsstellen sowie die Bindungskinetik gemessen. Weiterhin wurde ein MEMS Kraft Sensor in Kombination mit einem Mikromanipulator benutzt, um die maximale Ausdehnung, Spannungs-Dehnungs Diagramme und die Hysterese zu messen. Strukturelle Veränderungen innerhalb der Fasern wurden zusätzlich mit Hilfe von Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET), einer spektroskopischen Methode, analysiert.

Die Messungen zeigten, dass Fibronectin eine der dehnbarsten biologischen Fasern mit einzigartigen mechanischen Eigenschaften ist. Demnach halten einige Fasern selbst dann noch stand, nachdem sie um mehr als 700 % überdehnt wurden. Die Spannungs-Dehnungs Diagramme sind hochgradig nichtlinear, weich am Anfang und immer härter bei grossen Ausdehnungen. Das gemessene Young's Modul von einzelnen Fasern veränderte sich über Grössenordnungen von weniger als hundert kPa zu mehreren MPa.

Wenn man chemisch vernetzte mit nativen Fibronectin Matrizen vergleicht, stellt man Unterschiede im Zellverhalten fest. Diese Arbeit ermöglicht es die mechanischen Eigenschaften zu messen, welche zu diesen Unterschieden in den Verhaltensweisen von Zellen und deren Kraftwahrnehmung führen. Dazu werden die FRET Daten von Zellproduzierten Gewebematrizen in den Kontext der Steifigkeit gesetzt. Die FRET-Dehnungs-

sowie die Spannungs-Dehnungskurve, gemessen an handgezogenen Fibronectin Fasern, dienen zur Kalibrierung der Steifigkeit und des Young's Modul der Matrix.

Weiterhin wurden mechanische Eigenschaften von einzelnen Seidenfasern gemessen. Diese Messungen auf Einzelfaser-Niveau erweitern das Verständnis bekannter Ensembleeigenschaften. Die Studien demonstrieren die Vielseitigkeit von Seide als Biomaterial.

Das Verhalten der Zelle kann durch die Konformation von Fn beeinflusst werden. Diese besonderen mechanischen Eigenschaften basieren auf der zugrundeliegenden molekularen Struktur. Die einzelnen Fibronectin Moleküle und deren Adsorption unter verschiedenen Bedingungen (Denaturant Konzentration, Salzgehalt und verschieden beschichtete Oberflächen) wurden untersucht. Die Konformation der adsorbierten Moleküle ist insofern wichtig, da sie verschiedene Zelleigenschaften beeinflusst. Um die Konformation messen zu können, wurden die vier kryptischen Cysteine innerhalb eines Fn Moleküls mit Farbstoffen markiert und mit Hilfe der optischen Methode genau lokalisiert. Dabei lässt sich von den Abständen zwischen den Farbstoffen auf die Konformation rückschließen. Herkömmliche mikroskopische Methoden können bisher die Farbstoffe nicht weiter trennen, da die Abstände im Nanometer Bereich liegen. Deswegen wurde eine hochauflösende Technik eingeführt, die auf einer zeitlich getrennten Messung dieser Farbstoffe beruht. Selbige Technik wurde dazu benutzt, um einen ersten Eindruck der bestehenden Struktur und Konformation einzelner Moleküle innerhalb einer Proteinfaser zu untersuchen.