



Doctoral Thesis

Living cell adhesion measured by force spectroscopy

Author(s):

Weder, Gilles

Publication Date:

2010

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006092558> →

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. 18943

LIVING CELL ADHESION MEASURED BY FORCE SPECTROSCOPY

a dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences (Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Gilles WEDER

Master of Science in Biology, University of Neuchâtel, Switzerland, 2006

born on June 13, 1983

citizen of Au (SG)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Janos Vörös, examiner

Dr. Martha Liley, co-examiner

Dr. Harry Heinzelmann, co-examiner

Dr. Mathis Riehle, co-examiner

2010

Summary

Cell adhesion is the binding of a cell to another cell, extracellular matrix or a surface, using cell adhesion molecules. Many of these interactions involve transmembrane integrin receptors. Integrins cluster to provide dynamic links between extracellular and intracellular environments, by bi-directional signaling and stabilization of the focal adhesion points. The interactions involve complex couplings between cell biochemistry, structural mechanics, and surface bonding.

Adhesive interactions play a major role in the development of multicellular organisms, by guiding and anchoring cells into their appropriate locations. Adhesion is also important in the maintenance of the body: changes in the expression or function of cell adhesion molecules are implicated in all steps of tumor progression. Tumor cells are able to loosen their attachment to leave their original location and become lodged at distant tissues (metastasis). Implantology research and tissue engineering are directly focused on cell-surface interactions, since events leading to integration of an implant into bone and to long performance of the device take place at the interface formed between tissue and implant. Modifying the surface of an implant either by providing chemical and/or topographical cues encourages bone cell attachment. Cell adhesion is one way to increase osteointegration and to stabilize the implant. Tissue engineering aims to replace or restore the anatomic structure and function of damaged or missing tissue. Cell adhesion is a crucial parameter in the development of biodegradable scaffolds and cell sheet engineering techniques.

It is not easy to measure and quantify cell adhesion. Cell adhesion has been investigated using many techniques. The combination of cell biology with force spectroscopy provides a powerful tool for exploring the complexity of cell adhesion. The main objective of this work is to use force spectroscopy to quantify the long-term global adhesion between cells and surfaces and their response to modified surfaces. Atomic force microscopy-based force spectroscopy is capable of resolving individual cell binding events as well as global cell adhesion of living cells under physiological condition. It was used to study and quantify the adhesion of living cells to their growing substrate.

In order to determine if cell adhesion has to be studied independently of cell cycle or not, cell adhesion at different phases was measured. The adhesion of osteosarcoma cells to a glass surface was measured at different phases of the cell cycle. The cells were synchronized in three phases of the cell cycle: G₁, S and G₂M. Cells in these phases were compared with unsynchronized and native mitotic cells. Individual cells were attached to an atomic force microscope cantilever, brought into brief contact with the glass surface and, then pulled off again. The force-distance curves obtained allowed the work and maximum force of detachment as well as the number, amplitude, and position of discrete unbinding steps to be determined. The properties of the binding proteins present at the cell surface remained similar throughout the cell cycle, including mitosis. Therefore, next cell detachment experiments were allowed to be studied independently of cell cycle.

Long-term cell adhesion involves living adherent cells. The challenge was to find a method of attachment, between cells and atomic force microscope cantilevers, that allows their detachment from the surface. Fibronectin-coated cantilevers were used to detach individual immortalized fibroblasts from their growing substrate. The detachment of living adherent cells by force spectroscopy was tested on a number of chemically functionalized surfaces in order to validate the technique. The forces involved in the adhesion of fibroblasts were quantified. The cells were grown on glass surfaces as well as on surfaces used for cell sheet engineering: glass surfaces coated with polyelectrolyte multilayers (poly-L-lysine and hyaluronic acid) and thermally-responsive poly(N-isopropylacrylamide) brushes. Large differences in cellular adhesion were observed on polyelectrolyte coatings, depending on the number of polyelectrolyte bilayers. On poly(N-isopropylacrylamide)-grafted surfaces, changes of more than an order of magnitude were observed in cell adhesion above and below the lower critical solution temperature. Glass surfaces

patterned with periodic poly(N-isopropylacrylamide) microdomains were also investigated. In this last case, it was shown that cellular adhesion could be reduced while keeping cellular morphology unchanged.

Finally, in order to investigate the potential and limitations of this technique, two important experimental parameters were altered: the topography and the cell type. Immortalized and primary fibroblasts were studied on flat and topographically structured quartz surfaces. Using a fibronectin-coated AFM cantilever, it was possible to detach a large proportion of the immortalized cells from the quartz surfaces. Their adhesion to the quartz surface, and the effects of topography on this adhesion, could be quantified. In contrast, few primary cells were detached under the same experimental conditions. A qualitative analysis of their behavior showed that immortalized fibroblasts adhered less strongly than primary fibroblasts to at least one quartz surface.

The potential and limitations of single cell force spectroscopy in the study of the adhesive properties of cells are discussed. Quantitative data of this nature should open the way for more rigorous investigation and comparison of the influence of different parameters on cell/substrate adhesion.

Résumé

L'adhérence cellulaire correspond à la liaison d'une cellule à une autre cellule, à la matrice extracellulaire ou à une surface, en utilisant des molécules spécifiques d'adhésion. La plupart de ces interactions impliquent des récepteurs transmembranaires de type intégrines. Les intégrines se regroupent et s'organisent afin d'établir des liens dynamiques entre le milieu extracellulaire et intracellulaire, pour la signalisation moléculaire et la stabilisation des points d'adhésion focaux. Les interactions sont le résultat de couplages complexes entre la biochimie cellulaire, la structure mécanique et les liaisons de surface.

Les interactions d'adhésion jouent un rôle majeur dans le développement des organismes pluricellulaires, en guidant et fixant les cellules dans leur emplacement approprié. L'adhésion est également importante dans l'homéostasie du corps ; des changements dans l'expression et la fonction des molécules d'adhésion cellulaire sont impliqués dans toutes les étapes de la progression de tumeurs. Les cellules tumorales sont capables de se détacher et de quitter leur emplacement d'origine afin de coloniser d'autres tissus (métastases). La recherche sur les implants et le génie tissulaire sont directement intéressés par les interactions cellule-surface, car la réussite d'une bonne intégration d'un implant dans l'os et l'efficacité à long terme se joue à l'interface du tissu et de l'implant. Des modifications chimiques et/ou topographiques de la surface d'un implant peuvent favoriser l'attachement des cellules osseuses. L'adhésion cellulaire est responsable de l'ostéo-intégration de l'implant. L'adhésion cellulaire est aussi un paramètre

crucial dans le développement des prothèses biodégradables et des feuillets cellulaires.

L'adhésion cellulaire n'est pas facile à mesurer et quantifier. L'adhésion cellulaire a été investiguée par de nombreuses techniques. La combinaison de la biologie et de la spectroscopie de force offre un outil puissant pour l'exploration de la complexité de l'adhésion cellulaire. L'objectif principal de ce travail est d'utiliser la spectroscopie de force pour quantifier les forces globales d'adhésion à long terme entre des cellules et des surfaces, ainsi que leur réponse à des surfaces modifiées. La spectroscopie de force issue de la microscopie à force atomique est capable de mesurer aussi bien des liaisons d'adhésion individuelles que l'adhésion globale de cellules vivantes en condition physiologique. Elle a été utilisée pour étudier et quantifier l'adhésion de cellules vivantes à leur substrat de croissance.

L'adhésion cellulaire a été mesurée à différentes phases du cycle cellulaire afin de déterminer si elle pouvait être étudiée indépendamment, ou non, du cycle cellulaire. L'adhésion entre des cellules provenant d'un ostéo-sarcome et une surface en verre a été mesurée à différentes phases du cycle cellulaire. Les cellules ont été synchronisées dans trois phases du cycle cellulaire : G₁, S et G₂M. Dans ces phases, les cellules ont été comparées avec des cellules non synchronisées et des cellules naturellement en mitose. Des cellules individuelles ont été attachées à un levier de microscope à force atomique, mises en bref contact avec la surface en verre et, ensuite retirées à nouveau. Les courbes de force obtenues en fonction de la distance ont permis de déterminer le travail et la force maximale de détachement aussi bien que le nombre, l'amplitude et la position des étapes de détachement. Les propriétés des protéines d'adhésion présentes à la surface de la cellule sont restées similaires au travers du cycle cellulaire entier, y compris en mitose. Par conséquent, les mesures suivantes de détachement cellulaire ont été étudiées indépendamment du cycle cellulaire.

L'adhésion cellulaire à long terme implique des cellules adhérentes vivantes. Le défi a été de trouver une méthode d'attachement, entre les cellules et les leviers de microscope à force atomique, capable de supporter leur détachement de la surface. Des leviers recouverts de fibronectine ont été utilisés pour détacher des fibroblastes individuels immortalisés de leur surface de croissance. Le détachement de cellules adhérentes vivantes, en utilisant la spectroscopie de force, a été testé sur de nombreuses surfaces fonctionnalisées chimiquement afin de valider la technique. Les forces impliquées dans l'adhésion des fibroblastes ont été quantifiées.

La croissance des cellules a été réalisée sur des surfaces en verre ainsi que sur des surfaces utilisées pour le génie tissulaire : des surfaces en verre fonctionnalisées avec des multi-couches de polyélectrolytes (poly-L-lysine et acide hyaluronique) et avec le polymère thermo-sensible poly(N-isopropylacrylamide). De grandes différences en terme d'adhésion cellulaire ont pu être observées sur les revêtements de polyélectrolytes, en fonction du nombre de bicouches de polyélectrolytes. Concernant les surfaces fonctionnalisées avec le poly(N-isopropylacrylamide), des changements de plus d'un ordre de magnitude ont pu être observés au niveau de l'adhésion cellulaire au-dessus et au-dessous de la température critique inférieure de solution. Des surfaces en verre modifiées avec des micro-domaines de poly(N-isopropylacrylamide) ont également été investiguées. Dans ce dernier cas, il a été montré que l'adhésion cellulaire pouvait être réduite tout en gardant une morphologie cellulaire identique.

Finalement, deux paramètres expérimentaux importants ont été modifiés, la topographie et le type cellulaire, afin d'investir le potentiel et les limites de cette technique. Des cellules immortalisées et primaires ont été étudiées sur des surfaces en quartz plates et avec une topographie. Grâce à l'utilisation d'un levier fonctionnalisé avec de la fibronectine il a été possible de détacher une grande proportion des cellules immortalisées des surfaces en quartz. Leur adhésion aux surfaces en quartz, et les effets de la topographie sur cette adhésion, ont pu être quantifiés. En revanche, seules quelques cellules primaires ont pu être détachées en utilisant les mêmes conditions expérimentales. Une analyse qualitative de leur comportement a montré que les fibroblastes immortalisés adhéraient moins fortement que les fibroblastes primaires sur au moins une surface en quartz.

L'aspect du potentiel et des limites de la spectroscopie de force avec des cellules individuelles pour l'étude des propriétés d'adhésion est discuté. Des données quantitatives de ce genre devraient ouvrir le chemin pour des investigations et comparaisons plus rigoureuses de l'influence de différents paramètres sur l'adhésion entre une cellule et son substrat.