

# Contractile response of alveolar epithelial cells to biochemical or mechanical stimulation probed by traction microscopy

Núria Gavara i Casas

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

# **Contractile response of alveolar epithelial cells to biochemical or mechanical stimulation probed by traction microscopy**

A dissertation by  
**Núria Gavara i Casas**  
in partial fulfilment of the requirements for  
the degree of Doctor of Philosophy

Thesis supervisor : Prof. Ramon Farré i Ventura

Unitat de Biofísica i Bioenginyeria  
Dept. de Ciències Fisiològiques I  
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.



O me! O life!... of the questions of these recurring;  
Of the endless trains of the faithless  
of cities fill'd with the foolish;  
Of myself forever reproaching myself,  
(for who more foolish than I, and who more faithless?)  
Of eyes that vainly crave the light  
of the objects mean--of the struggle ever renew'd;  
Of the poor results of all  
of the plodding and sordid crowds I see around me;  
Of the empty and useless years of the rest  
with the rest me intertwined;

The question, O me! so sad, recurring  
What good amid these, O me, O life?

Answer.

That you are here -- that life exists, and identity;  
That the powerful play goes on, and you may contribute a verse.

Walt Whitman



## AGRAÏMENTS

I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale

Marie Curie

Quan vaig acabar la carrera, vaig sortir de la facultat de física amb el cap ple d'integrals, hamiltonians i brakets. I vaig aterrar en un lloc on les coses es podien observar, tocar i sobretot, manipular. Amb el temps, la teva recerca es converteix en el teu petit conte de fades, i observes, fascinat, com cèl·lules, substàncies i aparells de mesura entren en escena cada matí. Sincerament, no sé si aquests quatre anys de doctorat m'han fet més intel·ligent, il·lustrada, preparada o ni tan sols millor persona. Només sé que m'han fet feliç.

En aquestes ratlles vull reconèixer i agrair l'ajuda de moltes persones...

... primer de tot, el Ramon. Podria citar la il·lusió que fàcilment transmet a l'hora d'encarar nous projectes o la seva permanent disponibilitat. Però sobretot vull destacar que sempre ha sabut veure quan podia avançar en llibertat seguint el meu criteri i quan estava encallada i necessitava suport.

... també del Daniel, de qui valoro l'esperit crític però ordenat que sempre ens intenta inculcar. I sobretot, vull agrair-li la paciència que va tenir, compartida amb el Ramon, ensenyant-me a escriure un publicació científica i lluitant després per tirar-ho endavant.

... i de la resta de professors de la Unitat, el Domènec, la Mar i el Carles, que sempre han estat propers i disposats a ajudar en qualsevol cosa i moment. I també el Miguel Ángel, que és el principal responsable de fer realitat qualsevol "artilugi" que necessitem.

... i finalment, els companys amb qui he anat convivint durant aquests quatre anys. Crec que ells han sigut el motiu principal pel qual aquests anys han estat tan agradables, divertits i sovint surrealistes. I també productius, per que sense els coneixements que ens hem anat transmetent els uns als altres, tot el que hi ha en aquesta tesi hagués necessitat molts més anys per ser dut a terme. Trobaré a faltar les nostres intenses converses sobre ciència, política, vida mundana i fins i tot metafísica. D'entre tots, però, vull agrair especialment l'ajuda del Félix, la Ferranda i el Pere, amb qui més hores de laboratori i sobretauls he compartit i amb qui m'he sentit més propera durant aquests anys.

Per altra banda, també vull donar les gràcies a tothom amb qui he compartit dies, hores o moments durant aquests anys. Crec que tothom, faci el que faci, té coses a aprendre, i sobretot a ensenyar. Si miro enrera, penso amb un somriure que tots m'heu ensenyat alguna cosa.

I finalment, vull agrair molt especialment el suport de tres persones sense les quals aquesta tesi, i probablement aquesta Núria que coneixeu, no seria possible. Per una banda els meus pares, que sempre han intentat oferir-me la millor educació i les millors possibilitats, però que sempre m'han volgut fer conscient de la meva situació privilegiada. I també el Guillem, per totes les converses, els projectes i els somnis que hem anat construint junts durant aquests anys i que mica en mica anem veient realitzats.

I per acabar, volia recordar en aquestes últimes ratlles als meus avis, que van assumir amb il·lusió i orgull que me'n anés lluny durant els propers anys, però que no podran veure aquesta tesi acabada. Ara més que mai sóc conscient que el que dóna sentit a la nostra recerca (aquest conte de fades sovint tan allunyat de la realitat) són les persones individuals a les que pot ajudar.

Ullastrell, novembre de 2006

**Contractile response of alveolar epithelial cells  
to biochemical or mechanical stimulation  
probed by traction microscopy**





# Contents

<b>Chapter 1. Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 The alveolar epithelium</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Introduction .....	1
1.1.2 Structure of the alveoli.....	2
1.1.3 Models of alveolar epithelial cells.....	4
<b>1.2 Acute lung injury</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3 Integrity of the alveolar-capillary barrier</b> .....	<b>8</b>
1.3.1 Force balance in the epithelial monolayer.....	8
1.3.2 Thrombin as an inflammatory stimulus inducing contractile response in alveolar epithelial cells.....	10
1.3.3 Stretch as a mechanical stimulus inducing contractile response of alveolar epithelial cells .....	12
<b>1.4 Mechanisms responsible for contractile force generation exerted by adhered cells</b> .....	<b>14</b>
1.4.1 Actin cytoskeleton.....	14
1.4.2 Myosin .....	16
1.4.3 Focal adhesions .....	20
1.4.4 Tensegrity, a model of cell architecture.....	22
<b>1.5 Physical methods to probe cell contractile forces</b> .....	<b>23</b>
1.5.1 Micromachined cantilevers .....	24
1.5.2 Microneedles .....	25
1.5.3 Wrinkling of silicone films .....	26
1.5.4 Contraction of collagen gels measured by gel area reduction or by force transducers.....	26
1.5.5 Traction microscopy .....	28
<b>Chapter 2. Aims of the thesis</b> .....	<b>33</b>
<b>Chapter 3. Traction microscopy to probe contractile forces of alveolar epithelial cells</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1 Introduction</b> .....	<b>35</b>
<b>3.2 Traction microscopy algorithms</b> .....	<b>36</b>
3.2.1 Computation of the displacement field.....	36
3.2.2 Computation of the traction field .....	39
3.2.3 Parameters that reflect cell contractility .....	41

<b>3.3 Implemented traction microscopy setups to probe contraction of alveolar epithelial cells .....</b>	<b>43</b>
3.3.1 Selected gel substrates and optimization of gel stiffness .....	43
3.3.2 Fluorescence images of the polyacrylamide and collagen gels .....	44
<b>3.4 Validation of the implemented software .....</b>	<b>45</b>
3.4.1 Computation of the displacement field .....	45
3.4.2 Computation of the traction field .....	50
3.4.3 Determination of the cell contour .....	53

## **Chapter 4. Thrombin-induced contraction in alveolar epithelial cells probed by traction microscopy..... 55**

<b>4.1 Introduction .....</b>	<b>55</b>
<b>4.2 Materials and methods .....</b>	<b>57</b>
4.2.1 Materials.....	57
4.2.2 Cell culture .....	57
4.2.3 Polyacrilamide gels .....	58
4.2.4 Actin staining .....	59
4.2.5 Measurements .....	59
4.2.6 Traction microscopy data processing.....	60
4.2.7 Statistics .....	61
<b>4.3 Results.....</b>	<b>61</b>
4.3.1 Mapping of cell contraction.....	61
4.3.2 Effect of thrombin on cell contraction and the actin cytoskeleton.....	62
4.3.3 Role of the actin cytoskeleton in cell contraction.....	64
4.3.4 Role of inhibition of MLCK and Rho kinase in cell contraction.....	67
<b>4.4 Discussion.....</b>	<b>70</b>
4.4.1 Methods to probe cell contractile forces.....	70
4.4.2 A549 as a model of alveolar epithelial cells.....	71
4.4.3 Contractile forces exerted by alveolar epithelial cells .....	71
4.4.4 Effect of thrombin on cell contraction and the actin cytoskeleton.....	72
4.4.5 Activation of pathways signaling MLC phosphorylation by thrombin.....	73
4.4.6 Force balance in the epithelial monolayer.....	74

## **Chapter 5. Stretch-induced contraction of alveolar epithelial cells..... 77**

<b>5.1 Introduction .....</b>	<b>77</b>
<b>5.2 Materials and methods .....</b>	<b>79</b>
5.2.1 Materials.....	79

5.2.2 Cell culture .....	80
5.2.3 Stretching device.....	80
5.2.4 Traction microscopy .....	82
5.2.5 Microscopy.....	82
5.2.6 Measurements .....	83
5.2.7 Traction microscopy data processing.....	85
5.2.8 Statistics .....	88
<b>5.3 Results.....</b>	<b>88</b>
5.3.1 Calibration and performance of the stretching device .....	88
5.3.2 Mapping of traction forces.....	91
5.3.3 Effect of stretch on cell contractile forces.....	91
5.3.4 Contribution of the actin cytoskeleton and the acto-myosin machinery.....	94
<b>5.4 Discussion.....</b>	<b>96</b>
5.4.1 Substrate deformation pattern.....	96
5.4.2 Collagen gel substrates.....	97
5.4.3 Traction microscopy to probe stretch-induced traction force generation.....	97
5.4.4 Applied stretch and its computation.....	99
5.4.5 Comparison of traction data with previous results on the same cell type .....	101
5.4.6 Effect of stretch on traction forces exerted by alveolar epithelial cells .....	101
5.4.7 Mechanisms involved in the stretch-induced increase in traction forces .....	102
5.4.8 Recovery of traction forces after stretch release .....	105
5.4.9 Cell contraction in cyclic stretch conditions and force balance in the cyclically-stretched lung.....	106
<b>Chapter 6. Conclusions of the thesis .....</b>	<b>109</b>
<b>Chapter 7. References .....</b>	<b>113</b>
<b>Appendix A Preparation of collagen I coated polyacrylamide gels .....</b>	<b>133</b>
<b>Appendix B Preparation of collagen type I gels .....</b>	<b>137</b>
<b>Appendix C Quantification of F/G-actin ratio.....</b>	<b>139</b>
<b>Appendix D Program codes .....</b>	<b>143</b>
<b>Appendix E Publications and congress contributions .....</b>	<b>151</b>