

Diss. ETH No. 25798

# Reference-Free Traction Force Microscopy: Experimental Platform and Algorithmic Analysis Pipeline for Complex Cell Studies

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

TOBIAS LENDENMANN  
MSc ETH ME  
born November 15<sup>th</sup>, 1987  
citizen of Zurich, ZH

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Dimos Poulidakos, examiner  
Prof Dr. Edoardo Mazza, co-examiner  
Prof. Dr. Daniele Panozzo, co-examiner  
Dr. Aldo Ferrari, co-examiner

2019

# Summary

Single cells, the smallest living entities of the human body, are constantly interacting with each other and the surrounding tissue through mechanical, biochemical, and electrical signals. Out of these, the mechanical cues are the most widespread and emerge as the fastest information pathway cells can exploit. Contractile elements within the cells have the ability to generate forces. The physical adhesions that cells make to both their environment and neighbors propagate the internally generated forces. These same adhesions also act as mechanosensors for external forces to which cells are able to adapt. This mechanical communication pathway is the main interest of the field of mechanobiology, which makes use of specialized tools to measure the mechanical interaction between cells and their environment.

The methods to measure cellular forces have seen vast improvements in the last decades. The state-of-art protocols for measuring forces generated from cell collectives, single cells, and even single adhesions are generally summarized as traction force microscopy. The common procedure of all the traction force microscopy approaches is to visualize deformations of a mechanically characterized material. The deformations, in conjunction with the material characterization, can be used to calculate the produced cellular forces. The methods, however, differ strongly in how the forces are visualized and each comes with an inherent limitation. These range from the need for a load free reference image to measure displacements, the introduction of topography that alters cell behavior, or simplifying materials to the point where measurements are unreliable.

In this thesis, I will present a newly developed method for traction force microscopy and its application to several relevant biological processes. The new technology overcomes limitations from currently available methods. It does not need a reference image, which allows for live assessment of the forces and downstream processing, such as immunofluorescence. It uses an accurate material model in a finite element analysis to account for non-linearities of both material and geometry. And it employs a flat, non-intrusive substrate that does not impede the cellular behavior.

In the first part of the thesis at hand, I will explain how the new method termed confocal reference free traction force microscopy, or cTFM in short, works and why it does not require a reference image to determine the cellular forces. Next, I will demonstrate the usefulness

---

of this property on relevant biological studies that require immunofluorescence to colocalize traction forces and the expression of proteins of interest.

In the second part, I will further expand the capabilities of cTFM by introducing a robust and fast analysis pipeline using new algorithms. The new computational pipeline proves fast enough to keep up with the pace of image acquisition of relevant biological processes. The speed of analysis and the reference free capabilities allow for a live assessment of forces. These capabilities are demonstrated during a study where cells are exposed to controlled shear stress in flow chambers. The cells have varying reactions to different magnitudes of shear, which is most evident in the cell shape, but also manifests itself in the measured forces. The characterization of the cells and their collective behavior under the influence of the external shear flow allows us to model the monolayer as polar nematic liquid crystals to make further prediction on its behavior.

Altogether this thesis presents a new traction force microscopy method with capabilities that have the potential to advance our understanding in the field of mechanobiology.

# Zusammenfassung

Zellen sind die kleinste lebende Einheit des menschlichen Körpers. Durch mechanische, biochemische, und elektrische Signale interagieren sie ständig mit anderen Zellen und mit dem umgebenden Gewebe. Insbesondere die mechanischen Signale sind sehr vielseitig und stellen den schnellsten Kommunikationspfad zwischen Zellen dar. Kontraktile Elemente innerhalb der Zellen haben die Fähigkeit, Kräfte zu erzeugen. Die physikalischen Adhäsionen der Zellen zu ihrer Umgebung und zu benachbarten Zellen leiten die intern erzeugten Kräfte weiter. Diese Adhäsionen wirken auch als Mechanosensoren für äussere Kräfte, auf welche die Zellen reagieren und an die sie sich anpassen können. Der mechanische Kommunikationsweg ist das Hauptinteresse der Mechanobiologie, die spezielle Werkzeuge zur Messung mechanischer Interaktionen zwischen Zellen einsetzt.

Die Methoden zur Messung zellulärer Kräfte haben sich in den vergangenen Jahrzehnten stark verbessert. Modernste Verfahren zur Messung von Kräften aus Zellkollektiven, Einzelzellen und Einzeladhäsionen werden im Allgemeinen als Traction Force Microscopy (TFM) bezeichnet. Alle TFM-Verfahren visualisieren Verformungen eines mechanisch charakterisierten Materials. Die Verformungen können in Verbindung mit den Materialeigenschaften zur Berechnung der erzeugten Zellkräfte benutzt werden. Obschon alle TFM-Methoden Verformungen messen, unterscheiden sie sich stark in der Art und Weise, wie sie diese Verschiebungen visualisieren. Zudem haben all diese Methoden inhärente Einschränkungen. Diese reichen von der Notwendigkeit eines lastfreien Referenzbildes für die Messung von Verschiebungen, über die Einführung einer Topographie, die das Zellverhalten verändert, bis hin zur Vereinfachung von Materialien, sodass die Auswertung unzuverlässig wird.

In dieser Arbeit stelle ich ein neu entwickeltes TFM-Verfahren vor und wende es an mehreren relevanten biologischen Beispielen an. Die neue Technologie überwindet die Einschränkungen der derzeit verfügbaren Methoden. Das Verfahren benötigt kein Referenzbild, was eine Echtzeitüberprüfung der Kräfte und der nachgelagerten Prozesse, wie beispielsweise der Immunfluoreszenz, ermöglicht. Es verwendet ein genaues Materialmodell in einer finiten Elemente-Analyse, um Nichtlinearitäten von Material und von Geometrie zu berücksichtigen. Und es besteht aus einem flachen, nicht-intrusiven Substrat, welches das Zellverhalten nicht beeinträchtigt.

---

Im ersten Teil dieser Arbeit stelle ich die neu entwickelte Methode vor, welche die Einschränkung der derzeit verfügbaren Methoden überwindet. Das neue Verfahren, genannt Confocal Reference Free Traction Force Microscopy (cTFM), benötigt kein Referenzbild, um die Kräfte zu berechnen. In einem weiteren Schritt demonstriere ich den Nutzen dieser Eigenschaft an Beispielen, die Immunfluoreszenz erfordern, um Traktionskräfte und das Vorkommen eines Proteins zu kolokalisieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit erweitere ich die Möglichkeiten von cTFM, in dem ich eine robuste und schnelle Analysepipeline mit neuen Algorithmen einführe. Die neue Pipeline ist schnell genug, um mit der Bilderfassung relevanter biologischer Prozesse Schritt zu halten. Dies wird dann an einem Beispiel demonstriert, bei dem Zellen einer Scherkraft ausgesetzt sind. Die Zellen zeigen unterschiedliche Reaktionen auf die variierenden Scherkräfte, was sich am offensichtlichsten bei der Form der Zelle, aber auch in den erzeugten zellulären Kräften zeigt.

Insgesamt stellt diese Arbeit eine neue TFM-Methode vor, die das Potenzial hat, das Verständnis auf dem Gebiet der Mechanobiologie zu verbessern.

# Resumaziùn

Las zelas en las ple pintgas unitads d'igl tgierp human. Ellas reageschan cuntstàntameing antras signals mecanics, biocemics ad electricics cun otras zelas a cun la tela digl conturn. Oravànttut en igls signals mecanics fetg polivalents ad en la ple sperta veia da comunicaziùn trànter las zelas. Igls elements da contracziùn andavains las zelas en capavels da crear forzas. Las adesiùns fisicalas da las zelas anviers igl sieus conturn a tier las zelas vaschinantas datan anavànt las forzas creadas agl intern. Quellas adesiùns opareschan ear sco mecanosensurs par forzas externas, sen qualas las zelas reageschan a pon s'adatar veda lezas. La veia da comunicaziùn mecanica e igl interess prinzipal da la mecanobiologieia, ca dovra guafens spezials par masirar las interacziùns mecanicas trànter las zelas.

Las metodos par masirar las forzas zelularas ân samigliuro igls davos ons fetg ferm. Igls ple moderns prozess par masirar las forzas or da collectivs da zelas, zelas singularas ad adesiùns singularas sanumnan generalmeing Traction Force Microscopy (TFM). Tut igls prozess TFM visualiseschan la defurmaziùn dad egn material cun características mecanicas. Las defurmaziùns agl conex cun igl caracter d'igl material pon vagnir duvradas par masirar las forzas creadas an las zelas. Schagea ca tut las metodos TFM masiran las defurmaziùns, dat igl gràndas diferenzas an la moda a maniera da visualisar quellas defurmaziùns. Plenavànt ân tut quellas metodos restricziùns inerentas. Quellas tànschan d'igl basegn d'egn maletg referenzial sainza mulestis par masirar las dislocaziùns, sur l'introducziùn d'egna topografeia ca modifizescha igl cumportamaint da las zelas, antocen tar la simplificaziùn d'igls materials, ascheia ca la evaluaziùn vean malfidevla.

An quella lavur vight jou a preschantar egn nov svilup d'egn prozess TFM cun la si'aplicaziùn veda plirs relevànts exaimpels biologics. La nova tecnologieia dumogna las restricziùns da las metodos c'en actualmeing disponiblas. Igl prozess dovra nign maletg referenzial, tge ca fa pussevel egn controla an tains real da las forzas ad igls prozess posteriurs, sco par exaimpel la imunofluorescenza. El dovra egn exact model da material an egn analisa finita d'igls elements par cunsiderar las nonlinearitads d'igl material a da la geometreia. Plenavànt cunsista igl prozess d'egn nunintrusiv substrat plat, ca disturba betga igl cumport da las zelas.

An l'amprema part da quella lavur preschaint' jou la nova metoda, ca riva da surmontar las restricziùns da las metodos c'en actualmeing disponiblas. Igl nov prozess, numno Confocal Reference Free Traction Force Microscopy (cTFM), dovra nign maletg da referenza par masirar

---

las forzas. An egn savund zap demonstresch jou igl nez da quella caratteristica veda exaimpels, ca dovràn la imunofluorescenza par colocalisar las forzas da tracziùn a l'existenza da proteins. An la savunda part da quella lavur schlargel jou las pussevladads da cTFM, antras ca jou introdutgesch egn pipeline d'analisa robusta a sperta cun algoritmus novs. La nova pipeline e avunda sperta par taner pass cun la registraziùn da maletgs da relevànts prozess biologics. Quegl vean demonstro veda egn exaimpel, noua ca las zelas vignan exponadas a la forza da stuschada. Las zelas mussan diferaintas reacziùns sen las forzas da stuschada ca varieschan. Quegl samussa igl ple cler veda la furma da la zela, mobagn ear veda las forzas zelularas creadas. Agl antier preschainta quella lavur egn metoda TFM, ca â igl potenzial da migliurar la capientscha an la sperta da la mecanobiologieia.