

Tesi doctoral

**Role of substrate attachment in cell mechanics:
Implications in neutrophils and microvascular endothelial
cells.**

Memòria presentada per

Pere Roca-Cusachs Soulere

Per optar al grau de doctor

Barcelona, Octubre de 2006

Treball dirigit pel Dr. Daniel Navajas Navarro

A la Unitat de Biofísica i Bioenginyeria

Del departament de Ciències Fisiològiques I;

Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

Resum en català de la tesi doctoral

**Role of substrate attachment in cell mechanics:
Implications in neutrophils and microvascular
endothelial cells.**

**Importància de l'adhesió al substrat en la mecànica
cel·lular: Implicacions en neutròfils i cèl·lules
endotelials microvasculars.**

Memòria presentada per
Pere Roca-Cusachs Soulere
Per optar al grau de doctor
Barcelona, Octubre de 2006

Treball dirigit pel Dr. Daniel Navajas Navarro
A la Unitat de Biofísica i Bioenginyeria
Del departament de Ciències Fisiològiques I;
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

Introducció

En organismes multicel·lulars complexos com els humans, el comportament de cèl·lules individuals ve dictat en gran mesura per les interaccions amb la matriu extracel·lular (ECM) (4). La ECM és una xarxa de proteïnes filamentoses (com ara col·lagen, fibronectina o laminina) que proporciona un substrat físic per l'adhesió cel·lular. L'adhesió a la ECM està mitjançada bàsicament per les integrines, que són un tipus de proteïnes responsable de la transmissió a l'interior de la cèl·lula tant de senyals bioquímiques com de forces (18). El grau d'adhesió entre cèl·lules i el seu substrat, i la forma cel·lular que en resulta, han estat reconeguts com un factor determinant en l'expressió gènica i proteica i en funcions cel·lulars com la diferenciació o la proliferació (3; 5; 11). Remarcablement, s'ha determinat que aquesta regulació de la funció cel·lular depèn de la forma cel·lular independentment del grau d'enllaç entre integrines i ECM (3) (Fig. 1), suggerint que algun factor apart de la senyalització bioquímica és el responsable de llegir la informació associada amb l'adhesió cèl·lula-substrat i de provocar una certa resposta en la funció cel·lular.

Un factor que podria ser responsable de detectar l'adhesió cèl·lula-substrat és la mecànica cel·lular (16). Certament, s'ha vist que un increment en l'extensió cel·lular (àrea que ocupa una cèl·lula sobre un substrat) està associat amb un increment de la polimerització d'actina (22), de la fosforil·lació de la cadena lleugera de la miosina (MLC) (21), de la duresa cel·lular (2) i de la contractilitat (29). Les cèl·lules podrien doncs respondre a canvis en la forma cel·lular incrementant la tensió mecànica del citoesquelet i activant vies de mecanotransducció, probablement involucrant la família de GTPases Rho (4). Tanmateix, aquesta hipòtesi no ha estat directament verificada, i altres paràmetres (com ara la forma del nucli) podrien estar involucrats (28). Addicionalment, encara no existeix un estudi global que analitzi com l'adhesió al substrat (i la forma cel·lular resultant) afecta la mecànica de les cèl·lules, i quines implicacions té això en la funció cel·lular.

L'objectiu d'aquesta tesi ha estat l'estudi del paper de l'adhesió al substrat en la mecànica cel·lular per dos tipus cel·lulars relacionats amb el sistema respiratori, que constitueix l'àrea d'interès del nostre grup de recerca. El primer d'aquests tipus cel·lulars ha estat els neutròfils, un tipus de cèl·lules generalment no adherents però que s'activen i s'endureixen en contacte amb cèl·lules endotelials o amb un substrat com el vidre (33; 34). La mecànica de neutròfils en els seus estats passiu i activat juga un paper clau a l'hora de determinar la funció dels neutròfils en resposta a estímuls inflamatoris (6; 31). Tanmateix, actualment no està clar si la mecànica de neutròfils es correspon a la d'una gota líquida (7; 8) o si exhibeix esmorteïment estructural (10; 35). Els canvis induïts per l'activació en la mecànica de neutròfils tampoc estan clars. Per clarificar aquestes qüestions, es va mesurar la reologia de neutròfils en funció de l'adhesió al substrat, posant èmfasi en les seves implicacions en la funció d'aquestes cèl·lules en els capil·lars de la microvasculatura dels pulmons. El segon tipus cel·lular estudiat va ser el de les cèl·lules endotelials, també provinents de capil·lars de la microvasculatura dels pulmons. En aquest cas, el treball es va orientar a entendre com la forma cel·lular (controlada a través de la tecnologia coneguda com a microestructuració o "micropatterning") afecta la mecànica i la proliferació cel·lular. La comprensió de com

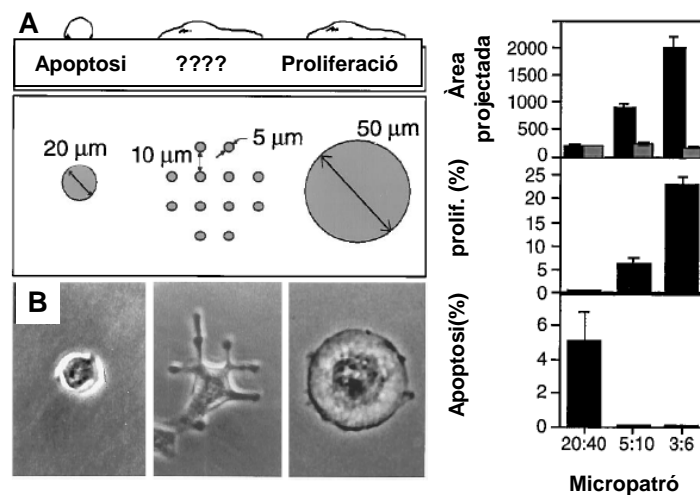


Fig. 1 La proliferació cel·lular depèn de la forma (caracteritzada per l'extensió de les cèl·lules) independentment del grau d'enllaç entre integrines i ECM. (A) Gràfic mostrant micropatrons utilitzats per controlar l'àrea d'adhesió cel·lular. A través d'una tècnica de microestructuració, es van obtenir àrees en un substrat recobertes de fibronectina on les cèl·lules podien adherir-se (marcades en gris), envoltades d'una àrea que impossibilitava l'adhesió cel·lular. (B) Exemples de cèl·lules creixent sobre aquests substrats. (C) Gràfics mostrant l'extensió cel·lular (barres negres, gràfic superior), l'àrea de contacte entre cèl·lula i ECM (barres grises, gràfic superior), la proliferació (gràfic del mig), i l'apoptosi (gràfic inferior) per cèl·lules creixent en micropatrons diferents. Tot i que l'àrea de contacte entre cèl·lules i ECM es manté aproximadament constant, el creixement cel·lular (proliferació) augmenta amb l'extensió cel·lular. Imatge adaptada de (3).

la forma cel·lular controla la proliferació es crucial per entendre el procés de l'angiogènesi o formació de nous vasos sanguinis, el qual es dona essencialment durant la formació embrionària i en processos patològics com la formació de tumors (14). Aquest estudi ens va permetre avaluar el paper de la mecànica cel·lular en la proliferació de cèl·lules endotelials i determinar la seva importància relativa.

En ambdós estudis, la mecànica cel·lular va ser avaluada mitjançant la mesura del mòdul complex elàstic G^* amb microscopia de forces atòmiques (AFM) seguint un procediment ja descrit (1). G^* proporciona informació tant sobre l'elasticitat cel·lular (duresa) com sobre la viscositat, i pot ser mesurat amb AFM per un ampli rang de freqüències. Això permet una caracterització precisa de la reologia cel·lular i una avaluació de la tensió interna del citoesquelet a través de la mesura de duresa.

Materials i mètodes

Cultiu cel·lular

Els neutròfils van ser aïllats de rates Sprague-Dawley de sexe masculí (Charles River, Wilmington, MA) seguint un procés de gradient en tres passos (1.083mg/ml / 1.119mg/ml) (24). Les cèl·lules endotelials microvasculars de pulmó humanes (HMVEC-L, Clonetics, East Rutherford, NJ) van ser cultivades en medi EGM-2MV (també de Clonetics), completament suplementat amb el kit proporcionat pel proveïdor. Un dia abans de les mesures, les cèl·lules van ser despreses de flascons de cultiu amb una solució de tripsina (Clonetics) i plantades en plaques de petri microestructurades.

Fabricació de substrats microestructurats.

Es van fabricar substrats microestructurats amb illes recobertes de fibronectina. Per fer-ho, primer es van fer forats en un substrat de silici (master) de 3 μm de profunditat i de la forma desitjada utilitzant tecnologia de feix d'ions focalitzats (FIB) (FEI Co., Hillsboro, OR). Seguidament, es va abocar prepolímer de poli(dimetilsiloxà) (PDMS) (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI) sobre el master, es va calentar a 80 $^{\circ}\text{C}$ durant una hora per polimeritzar-lo, i finalment es va separar del master. Després de la separació, la rèplica de PDMS obtinguda (amb estructures elevades en comptes de forats) va ser utilitzada per estampar fibronectina en plaques de Petri utilitzant un procediment conegut (26). Les formes finals que es van obtenir van ser circulars i el·líptiques de diferents àrees (Fig. 2A).

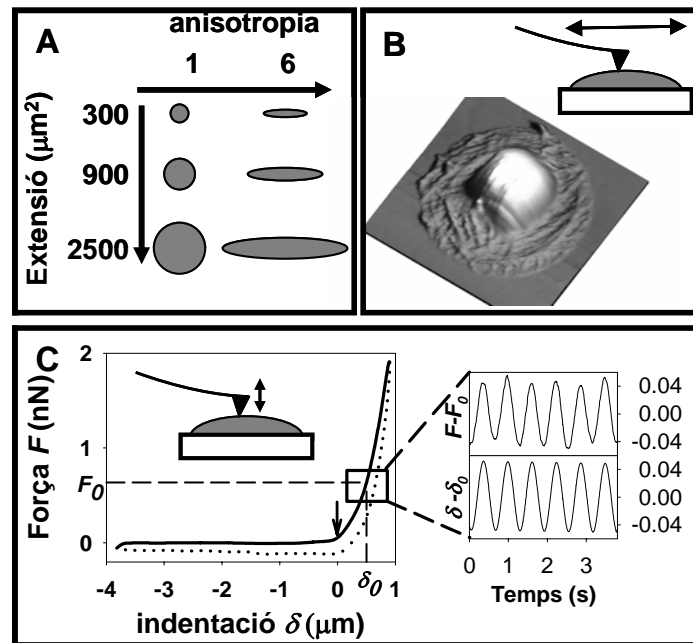


Fig. 2 Control de l'adhesió cel·lular mitjançant substrats microestructurats i mesures d'AFM. (A) Illes microestructurades i recobertes de fibronectina amb formes circulars i el·líptiques van ser usades per controlar l'extensió i l'anisotropia de cèl·lules endotelials. (B) Rastrejant les cèl·lules horitzontalment amb la micropalanca de l'AFM, es pot obtenir un mapa topogràfic de la cèl·lula a partir del qual es poden visualitzar els filaments d'actina i es pot mesurar el volum cel·lular. (C, esquerra) La mecànica cel·lular es pot avaluar indentant una cèl·lula i aplicant petites oscil·lacions. Primer, s'obté una corba de força-indentació ($F-\delta$) mentre la punta de la micropalanca s'aproxima i contacta la cèl·lula (línia contínua) i seguidament es retira (línia discontinúta). Aquesta corba s'utilitza seguidament per determinar el punt de contacte entre cèl·lula i punta (fletxa). A partir de la fletxa, els valors positius de δ indiquen indentació, mentre que els negatius indiquen la distància entre cèl·lula i punta. Un cop es determina el punt de contacte, la micropalanca es situa a una indentació d'operació δ_0 de ~ 500 nm i s'aplica un petit senyal sinusoidal. (C, dreta) Senyals sinusoidals corresponents de força (gràfic superior) i indentació (gràfic inferior), utilitzats per calcular G^* per una cèl·lula endotelial concreta. En el cas de les mesures en neutròfils, es van utilitzar senyals multifreqüencials en comptes de sinusoidals per obtenir $G^*(\omega)$ en funció de la freqüència.

Mesures d'AFM

La magnitud G^* de les cèl·lules va ser mesurada amb un AFM construït al laboratori acoblat a un microscopi òptic invertit (Zeiss Axiovert S 100) utilitzant un mètode prèviament descrit (1; 23), (Fig. 2C). Les cèl·lules van ser indentades amb micropalanques de nitrur de silici amb forma de V prèviament recobertes d'or (constant de molla nominal $k=0.01$ nN/m). Per fer mesures, una imatge de camp brillant obtinguda amb el microscopi òptic acoblat a l'AFM va ser utilitzada per posicionar la punta de la micropalanca sobre les cèl·lules. Aleshores, es van obtenir 10 corbes de força-desplaçament (F - z , on $F=kd$ i d és la deflexió de la micropalanca) a base de moure la micropalanca en la direcció vertical a una velocitat constant (amplitud de 2.5 μm , freqüència d'1 Hz, indentació ~ 1 μm). Amb aquestes corbes es va determinar el punt de força zero i el punt de contacte (F_c , z_c) entre la cèl·lula i la punta de la micropalanca. La punta va ser posicionada a una indentació $\delta = (z-z_c)-d$ de ~ 0.5 μm , i es va aplicar una petita oscil·lació vertical a la freqüència desitjada. El càlcul de G^* va ser efectuat a partir de les mesures d'AFM seguint un procediment descrit (1; 23). En el cas de les cèl·lules endotelials, l'AFM també va ser utilitzat per calcular el volum nuclear (Fig. 2B)

Modelització

La dependència freqüencial de G^* en neutròfils va ser analitzada amb el model Kelvin de gota líquida i amb el model d'esmoreïment estructural. Per un cos de Kelvin, (amb dos molles elàstiques k_{S1} i k_{S2} i un element viscos μ_S) G^* es pot expressar com (12):

$$G_K^*(\omega) = k_{S1} + \frac{\mu_S^2 k_{S2} \omega^2}{k_{S2}^2 + \mu_S^2 \omega^2} + i \frac{\mu_S k_{S2}^2 \omega}{k_{S2}^2 + \mu_S^2 \omega^2} \quad (1)$$

on ω és la freqüència angular. El model d'esmoreïment estructural descriu $G^*(\omega)$ com (9):

$$G_{SCR}^* = G_0 \left(\frac{\omega}{\Phi_0} \right)^{x-1} (1 + i\eta) \Gamma(2-x) \cos \frac{\pi}{2}(x-1) + i\omega\mu \quad (2)$$

on G_0 i Φ_0 són factors d'escala per la duresa i la freqüència respectivament, $\eta = \tan((x-1)\pi/2)$ és la histeresivitat o coeficient d'esmoreïment estructural, $\alpha = x-1$ és l'exponent de dependència potencial i $i\omega\mu$ és un terme viscos newtonià addicional.

Taula 1 Comparació dels paràmetres ajustats del model d'esmoreïment estructural per les diferents condicions utilitzades (negreta). El text en cursiva mostra els intervals de confiança del 95% per cada paràmetre.

Tractament	Adhesió	G_0 (Pa)	x	μ (Pa.s)	r^2
Sense tractament	No	11071	1.184	0.616	0.996
		<i>7940 – 14203</i>	<i>1.167 – 1.201</i>	<i>0.461 – 0.771</i>	
Sense tractament	Si	13596	1.148	2.321	0.991
		<i>10389 – 16802</i>	<i>1.134 – 1.163</i>	<i>1.951 – 2.690</i>	
Citocalasina D	No	2368	1.139	0.376	0.982
		<i>1752 – 2985</i>	<i>1.123 – 1.155</i>	<i>0.301 – 0.451</i>	
Citocalasina D	Si	2785	1.112	0.743	0.978
		<i>1649 – 3921</i>	<i>1.092 – 1.143</i>	<i>0.515 – 0.971</i>	

Resultats

Els neutròfils tant passius com adherits segueixen un comportament de tipus esmoreïment estructural.

La reologia de neutròfils tant passius (no adherits a cap substrat) com adherits (a un substrat de vidre) va mostrar un comportament sense escales de temps característiques

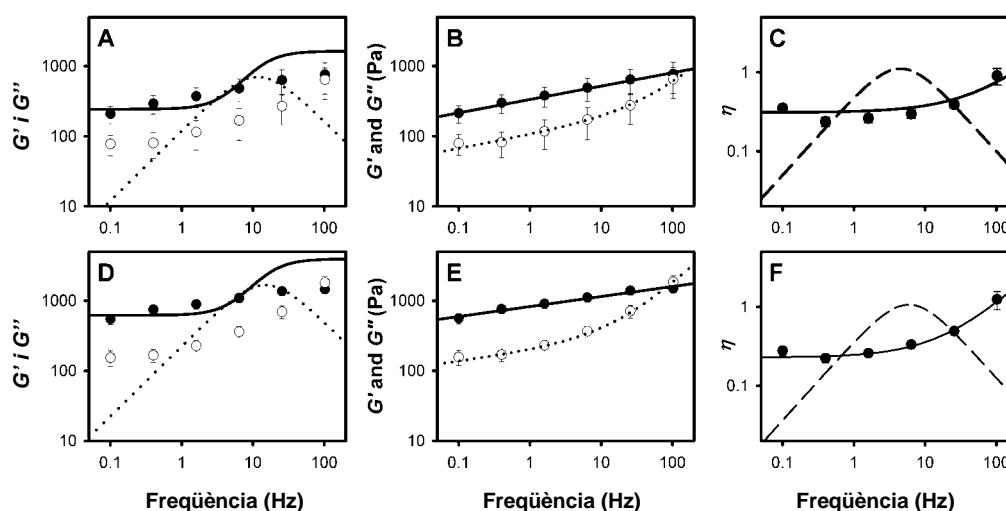


Fig. 3 Dependència de $G^*(\omega)$ en la freqüència i l'activació. (A-B) Mesures de G' (símbols tancats) i G'' (símbols oberts) per neutròfils no adherits. Les línies contínues i discontinues representen respectivament el millor ajust per G' i G'' del model de Kelvin (A) i del model d'esmoreïment estructural (B). (C) Valors corresponents de η per les dades mesurades (símbols tancats), l'ajust del model de Kelvin (línia discontinua) i l'ajust del model d'esmoreïment estructural (línia contínua). (D-F) Gràfics equivalents per neutròfils adherits.

de $G^*(\omega)$, que va augmentar amb la freqüència seguint un comportament potencial feble i va mostrar un acoblament entre els mòduls elàstic i viscos (Fig. 3). El mòdul elàstic dels neutròfils passius a baixes freqüències va ser de ~ 350 Pa, amb un mòdul viscos aproximadament 4 vegades més petit i un exponent de la llei potencial de ~ 0.2 . Els neutròfils adherits van ser 2 vegades més durs, amb un exponent de la llei potencial més petit (indicatiu d'un comportament més semblat al d'un sòlid). El trencament del citoesquelet d'actina amb citocalasina D va fer a les cèl·lules més toves, però amb un exponent més petit (Taula 1). El model de Kelvin no va poder explicar el comportament sense escales de temps observat. En contrast, el model d'esmoreïment estructural va reproduir les característiques més importants de la reologia dels neutròfils.

La duresa i la proliferació augmenten amb l'adhesió cel·lular en cèl·lules endotelials isotròpiques.

Les cèl·lules isotròpiques (amb formes rodones o quadrades) amb $2500 \mu\text{m}^2$ d'extensió

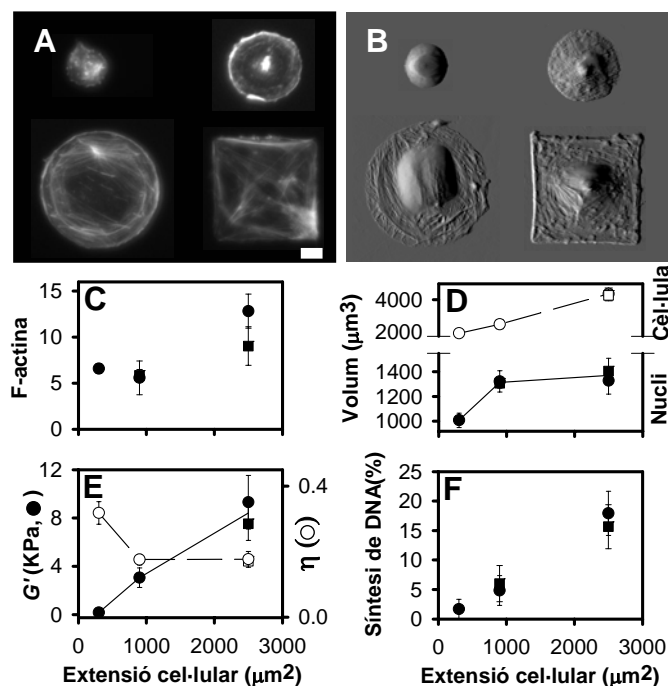


Fig. 4 Tots els paràmetres mesurats augmenten amb l'extensió cel·lular en cèl·lules isotròpiques. (A) Imatges d'immunofluorescència i (B) imatges d'AFM en mode d'error de cèl·lules isotròpiques amb diferents extensions. Els microfilaments d'actina estan absents en les cèl·lules menys esteses, i clarament presents i distribuïts al voltant de la regió nuclear en les cèl·lules més esteses. Degut a l'efecte de convolució de punta observat en les cèl·lules més petites, la imatge de la cèl·lula petita a B és una reconstrucció obtinguda a partir de mostrar només la part superior de la imatge i la seva reflexió especular. (C-F) Efecte de l'extensió cel·lular en el contingut de F-actina, G' , η , volum nuclear i cel·lular, i síntesi de DNA per cèl·lules circulars (símbols rodons) o quadrades (símbols quadrats). L'efecte de l'extensió cel·lular en tots els paràmetres va ser significatiu. La barra d'escala indica $10 \mu\text{m}$.

van ser més de 50 vegades més dures ($G' \sim 9000$ Pa) que les cèl·lules amb $300 \mu\text{m}^2$ d'extensió (Fig. 4). L'increment d'extensió de 300 a $2500 \mu\text{m}^2$ també va anar associat amb un increment en ordre estructural (disminució de η), un increment en el volum dels nuclis (36%) i de les cèl·lules (130%), un increment de ~ 2 vegades en el contingut de F-actina, i l'aparició de fibres d'estrès. Les cèl·lules amb $2500 \mu\text{m}^2$ d'extensió també van proliferar més (18%, mesurant per incorporació de BrdU) que aquelles amb només $300 \mu\text{m}^2$ d'extensió (2%)

L'anisotropia de les cèl·lules endotelials indueix un estovament cel·lular i un increment de volum cel·lular però no afecta el volum nuclear o la síntesi de DNA.

La duresa de les cèl·lules amb anisotropia (relació entre llargada i amplada) de 6 va ser marcadament més baixa que la de cèl·lules isotròpiques amb la mateixa extensió (9 i 3 vegades més baixa en cèl·lules amb 2500 i $900 \mu\text{m}^2$ d'extensió, respectivament, Fig. 5). En canvi, el contingut d'actina de les cèl·lules anisotròpiques va ser més alt (20% i 80%

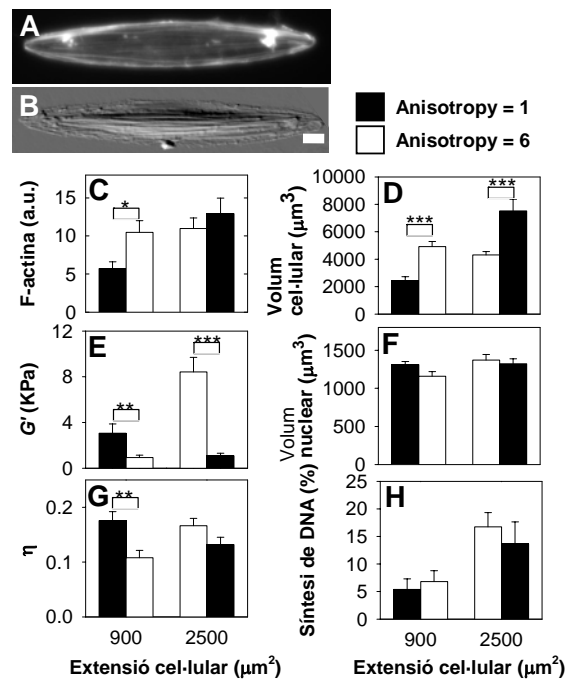


Fig. 5 L'anisotropia cel·lular indueix un estovament de la cèl·lula i un increment de volum però no afecta al volum nuclear o a la síntesi de DNA. (A) Imatge de immunofluorescència d'actina i (B) imatge en mode error d'AFM de cèl·lules anisotròpiques el·líptiques de $2500 \mu\text{m}^2$ d'extensió. Els microfilaments d'actina estan clarament alineats seguint l'eix llarg de les cèl·lules. (C-H) Comparació de paràmetres mesurats per cèl·lules isotròpiques (barres tancades) i cèl·lules anisotròpiques (barres obertes) per cèl·lules amb extensions de 900 i $2500 \mu\text{m}^2$. La barra d'escala indica $10 \mu\text{m}$. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$.

més alt en cèl·lules amb 2500 i 900 μm^2 d'extensió). El volum cel·lular va ser ~ 2 vegades més gran en cèl·lules anisotròpiques que en cèl·lules isotròpiques. Tanmateix, no es va detectar cap efecte significatiu en volum nuclear o en síntesi de DNA.

Discussió

L'adhesió al substrat pot ser modelitzada com a una disminució de la temperatura efectiva en neutròfils.

La reologia de neutròfils va mostrar un comportament caracteritzat per l'absència d'escala de temps. Aquest comportament es va poder descriure correctament amb un model d'esmoreïment estructural, però no amb els models de gota líquida o de Kelvin. Addicionalment, els canvis mecànics causats per l'activació induïda per adhesió van poder ser interpretats com una disminució de la temperatura efectiva x , indicativa de la pendent de la llei potencial. Aquesta troballa està d'acord amb la predicció feta per la teoria de la reologia de materials vitris tous (25), la qual interpreta el comportament d'esmoreïment estructural com a una relaxació complexa dels elements estructurals de la cèl·lula. Aquestes dades suggereixen que la reologia de neutròfils i de cèl·lules adherents (les quals també mostren un comportament del tipus esmoreïment estructural (1; 9; 30)), podria ser més semblant del que es creia prèviament, tot i que l'efecte de la citocalasina D en x sembla ser diferent en neutròfils i cèl·lules adherents (9). El coneixement de l'increment observat de $G^*(\omega)$ en funció de la freqüència (corresponent a un enduriment d'aproximadament quatre vegades en el rang de tres dècades mesurat) podria ajudar a comprendre com els neutròfils es deformen en el moment d'entrar en els microcapil·lars. Aquest procés es du a terme en una escala de temps que pot ser tant curta com uns pocs milisegons o tant llarga com uns pocs minuts, i és crucial per l'adhesió de neutròfils a l'endoteli i la seva extravasació subseqüent.

Les diferents formes de cèl·lules endotelials donades per la seva adhesió al substrat tenen un important efecte en la duresa cel·lular

La duresa cel·lular va mostrar una associació positiva amb l'extensió cel·lular i una associació negativa amb l'anisotropia cel·lular. D'una banda, l'increment de duresa observat a mesura que s'augmentava l'extensió és consistent amb la formació de fibres d'estrès i l'increment del contingut de F-actina cel·lular, mostrant la importància de les

fibres d'estrès i de la presència d'un citoesquelet organitzat en la determinació de la duresa cel·lular. D'altra banda, la reducció de duresa mesurada en cèl·lules anisotròpiques suggereix que, una vegada format el citoesquelet, és la organització del mateix i no el contingut de F-actina el que determina les propietats mecàniques. Certament, les cèl·lules anisotròpiques van ser marcadament més toves que les isotròpiques, tot i que el seu contingut de F-actina va ser més alt. En conjunt, les importants diferències mecàniques observades en funció tant d'extensió cel·lular com d'anisotropia suggereixen que la tensió mecànica augmenta amb l'extensió, però disminueixen amb l'anisotropia. D'acord amb aquests resultats, s'ha mostrat que la contractilitat de diferents tipus cel·lulars s'incrementa amb l'extensió cel·lular (29; 32)

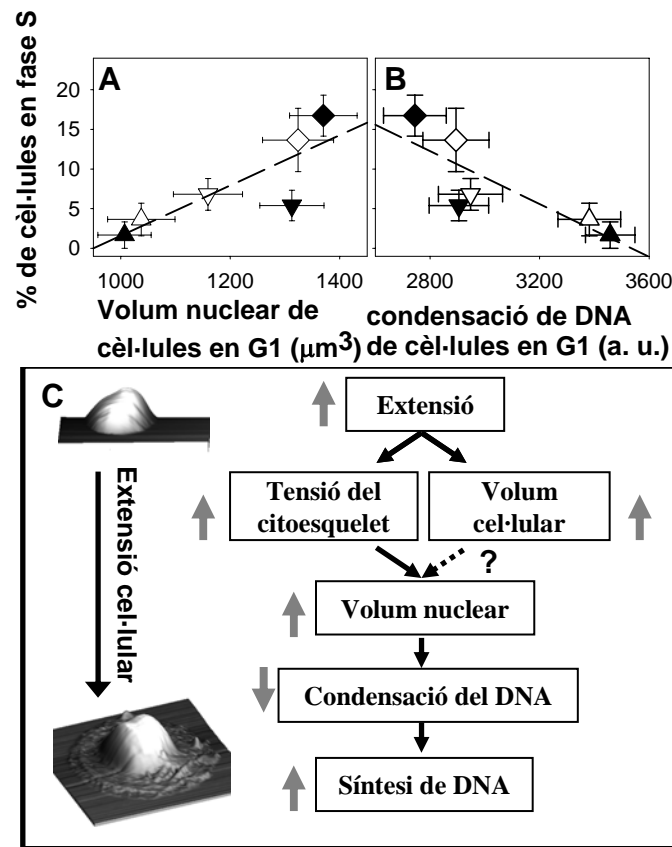


Fig. 6 El volum nuclear i la condensació del DNA de cèl·lules en fase G1 correlacionen fortament amb la proliferació cel·lular. Gràfiques mostrant la proliferació cel·lular en funció del volum nuclear (A) o de la condensació del DNA (B) de cèl·lules en G1 per cada forma. Les correlacions mostrades a cada gràfic van ser significatives ($p < 0.05$). Els símbols tancats i oberts representen cèl·lules isotròpiques i anisotròpiques, respectivament. Els triangles cap amunt, triangles cap avall, i els rombes representen cèl·lules amb 300, 900, i 2500 μm^2 d'extensió, respectivament. (C) Model de treball de la regulació de la proliferació per la forma i adhesió cel·lular (veure text). Les fletxes grises mirant cap a dalt o cap a baix indiquen augment o disminució de les magnituds corresponents.

(27) i disminueix quan l'anisotropia cel·lular augmenta (29).

La proliferació en cèl·lules endotelials està associada amb el volum nuclear però no amb la mecànica

Els resultats d'aquest treball no van mostrar cap relació directa entre mecànica i proliferació en cèl·lules endotelials individuals. Certament, tot i que les cèl·lules el·líptiques i circulars amb la mateixa extensió van mostrar organitzacions del citoesquelet i propietats mecàniques molt diferents, no es van detectar diferències significatives de proliferació entre elles. Aquest resultat podria semblar sorprenent a primera vista considerant la quantitat de treballs que han relacionat mecànica i proliferació (2; 3; 15; 20). Tanmateix, tot i que sembla clar que les propietats mecàniques de les cèl·lules tenen un impacte en el cicle cel·lular, el mecanisme pel qual la tensió mecànica d'una cèl·lula podria enviar senyals a la maquinària de replicació de les cèl·lules podria funcionar de forma indirecta a través de la modificació de la forma nuclear. Certament, mesures experimentals han mostrat una connexió mecànica entre el citoesquelet cel·lular i el nucli (17; 19), pel qual canvis en l'organització del citoesquelet donats per la forma cel·lular podrien traduir-se en canvis en la forma nuclear. La forma nuclear (i específicament el volum del nucli) podria regular la proliferació, i en general la funció cel·lular, a través de la modificació del grau de condensació del DNA i l'exposició de gens promotors específics (28), o a través de la regulació de l'àrea de contacte entre la cromatina i la làmina nuclear (la qual es creu que té un paper en la síntesi del DNA (13)). De forma consistent amb aquesta hipòtesi, els resultats d'aquest treball van mostrar una forta i significativa associació entre proliferació, volum nuclear, i condensació de la cromatina (Fig. 6).

En conclusió, es va observar que l'adhesió al substrat va determinar en gran mesura les propietats mecàniques tant de cèl·lules generalment no adherents com els neutròfils com de cèl·lules adhesives endotelials. L'increment de duresa mediat per l'adhesió podria ser determinant en la resposta de neutròfils a estímuls inflamatoris, però podria afectar la proliferació de cèl·lules endotelials només de forma indirecta, a través d'un increment del volum nuclear.

Referències

1. **Alcaraz J, Buscemi L, Grabulosa M, Trepas X, Fabry B, Farre R and Navajas D.** Microrheology of Human Lung Epithelial Cells Measured by Atomic Force Microscopy. *Biophys J* 84: 2071-2079, 2003.
2. **Bhadriraju K and Hansen LK.** Extracellular matrix- and cytoskeleton-dependent changes in cell shape and stiffness. *Exp Cell Res* 278: 92-100, 2002.
3. **Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM and Ingber DE.** Geometric control of cell life and death. *Science* 276: 1425-1428, 1997.
4. **Chen CS, Tan J and Tien J.** Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts. *Annu Rev Biomed Eng* 6: 275-302, 2004.
5. **Dike LE, Chen CS, Mrksich M, Tien J, Whitesides GM and Ingber DE.** Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates. *In Vitro Cell Dev Biol -Anim* 35: 441-448, 1999.
6. **Doerschuk CM.** Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs. *Microcirculation* 8: 71-88, 2001.
7. **Dong C, Skalak R, Sung KLP, Schmid-schonbein GW and Chien S.** Passive Deformation Analysis of Human-Leukocytes. *J Biomech Eng* 110: 27-36, 1988.
8. **Evans E and Yeung A.** Apparent Viscosity and Cortical Tension of Blood Granulocytes Determined by Micropipet Aspiration. *Biophys J* 56: 151-160, 1989.
9. **Fabry B, Maksym GN, Butler JP, Glogauer M, Navajas D and Fredberg JJ.** Scaling the microrheology of living cells. *Phys Rev Lett* 87: 148102, 2001.
10. **Fabry B, Maksym GN, Butler JP, Glogauer M, Navajas D, Taback NA, Millet EJ and Fredberg JJ.** Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells. *Phys Rev E* 68: 041914, 2003.
11. **Folkman J and Moscona A.** Role of Cell-Shape in Growth-Control. *Nature* 273: 345-349, 1978.
12. **Fung YC.** *Biomechanics*. New York: Springer-Verlag, 1993.
13. **Goldman RD, Gruenbaum Y, Moir RD, Shumaker DK and Spann TP.** Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes & Development* 16: 533-547, 2002.
14. **Hanahan D and Folkman J.** Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364, 1996.
15. **Huang S, Chen CS and Ingber DE.** Control of cyclin D1, p27(Kip1), and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and

cytoskeletal tension. *Mol Biol Cell* 9: 3179-3193, 1998.

16. **Ingber DE.** Mechanical signalling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circ Res* 91: 877-887, 2002.
17. **Jean RP, Gray DS, Spector AA and Chen CS.** Characterization of the nuclear deformation caused by changes in endothelial cell shape. *J Biomech Eng -Trans ASME* 126: 552-558, 2004.
18. **Katsumi A, Orr AW, Tzima E and Schwartz MA.** Integrins in mechanotransduction. *J Biol Chem* 279: 12001-12004, 2004.
19. **Maniotis AJ, Chen CS and Ingber DE.** Demonstration of mechanical connections between integrins cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *PNAS* 94: 849-854, 1997.
20. **Nelson CM, Jean RP, Tan JL, Liu WF, Sniadecki NJ, Spector AA and Chen CS.** Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *PNAS* 102: 11594-11599, 2005.
21. **Polte TR, Eichler GS, Wang N and Ingber DE.** Extracellular matrix controls myosin light chain phosphorylation and cell contractility through modulation of cell shape and cytoskeletal prestress. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C518-C528, 2004.
22. **Reinhart-King CA, Dembo M and Hammer DA.** The dynamics and mechanics of endothelial cell spreading. *Biophys J* 89: 676-689, 2005.
23. **Rico F, Roca-Cusachs P, Gavara N, Farre R, Rotger M and Navajas D.** Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips. *Phys Rev E* 72: 021914, 2005.
24. **Russo-Carbolante EMS, Azzolini AECS, Polizello AMC and Lucisano-Valim YM.** Comparative study of four isolation procedures to obtain rat neutrophils. , *441 (11), 71-76. Comparative Clinical Pathology* 441: 71-76, 2002.
25. **Sollich P.** Rheological constitutive equation for a model of soft glassy materials. *Phys Rev E* 58: 738-759, 1998.
26. **Tan JL, Liu W, Nelson CM, Raghavan S and Chen CS.** Simple approach to micropattern cells on common culture substrates by tuning substrate wettability. *Tissue Eng* 10: 865-872, 2004.
27. **Tan JL, Tien J, Pirone DM, Gray DS, Bhadriraju K and Chen CS.** Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force. *PNAS* 100: 1484-1489, 2003.
28. **Thomas CH, Collier JH, Sfeir CS and Healy KE.** Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape. *PNAS* 99: 1972-1977, 2002.
29. **Tolic-Norrelykke IM and Wang N.** Traction in smooth muscle cells varies with cell spreading. *J Biomech* 38: 1405-1412, 2005.

-
30. **Trepat X, Grabulosa M, Buscemi L, Rico F, Farre R and Navajas D.** Thrombin and histamine induce stiffening of alveolar epithelial cells. *J Appl Physiol* 98: 1567-1574, 2005.
 31. **Vicente-Manzanares M and Sanchez-Madrid F.** Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol* 4: 110-122, 2004.
 32. **Wang N, Ostuni E, Whitesides GM and Ingber DE.** Micropatterning tractional forces in living cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 52: 97-106, 2002.
 33. **Wang Q, Chiang ET, Lim M, Rogers R, Janmey PA, Shepro D and Doerschuk CM.** Changes in the biomechanical properties of neutrophils and endothelial cells during adhesion. *Blood* 97: 660-668, 2001.
 34. **Worthen GS, Schwab B, Elson EL and Downey GP.** Mechanics of Stimulated Neutrophils - Cell Stiffening Induces Retention in Capillaries. *Science* 245: 183-186, 1989.
 35. **Yanai M, Butler JP, Suzuki T, Sasaki H and Higuchi H.** Regional rheological differences in locomoting neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C603-C611, 2004.