

Controlled displacement of microorganisms by FluidFM technology

A dissertation submitted to the
ETH Zürich

for the degree of
Doctor of Sciences
(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

Philipp Stiefel

MSc ETH Biology
born on May 11th, 1983
citizen of Zurich, ZH

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Julia Vorholt

PD Dr. Tomaso Zambelli

Prof. Dr. Martin Ackermann

Thesis summary

The Fluidic Force Microscope (FluidFM) technology has been developed at the Laboratory of Biosensors and Bioelectronics at ETH Zurich in collaboration with the Swiss Center for Electronics and Microtechnology (CSEM SA, Neuchâtel, Switzerland). The FluidFM is a modified atomic force microscope which includes the sensitive force feedback for accurate control of the force exerted to the substrate. The particularity of FluidFM is a microchannel which is incorporated into the cantilever and the cantilever chip. This channel is continued through the probeholder into a tubing system and is connected to a pressure controller with which positive and negative pressures can be applied to the aperture at the cantilever tip. The FluidFM can be used in air, but is so far mainly used in liquid which is enabled by the closed microchannel of the device. The cantilever can be filled with virtually any fluid that can be released from the cantilever or used to suck liquid or particles into or onto the tip.

In the presented work the FluidFM technology was exploited for new biological applications which were subsequently applied to biological questions. The focus was put on blunt end cantilevers for spatial manipulation.

In a first step the feasible applications of blunt end probes were demonstrated. Different types of cells (bacteria, yeast and mammalian cells) were targeted and lifted from suspensions in liquid environment. The chosen cells were spatially manipulated, followed by deposition at a new location. Using the force feedback of the atomic force microscope these manipulation steps are sensitive. No visible harm to cells was observed and subsequent growth was unaffected. The location to deposit the cell could be chosen with a precision in the few micrometer range. When microorganisms were fixed to the probe aperture it not only enabled moving them in liquid but also they were lifted out of the liquid. By depositing them on a different substrate single cell isolation was achieved. Additionally, the laser signal also allowed acquiring the deflection of the cantilever while lifting up an adhering mammalian cell. Thereby, the force feedback allowed determining adhesion forces of cells with the substrate. Besides, it was observed that any virus or bacteria small enough to fit into the cantilever microchannel could be used in suspension to be loaded into the channel. This allowed then to locally release them.

In a second step the developed applications were applied to answer biological questions and to show the potential of FluidFM as technology to perform unprecedented experiments. In a first biological project, the cantilever was filled with a suspension of fluorescently tagged vaccinia viruses (VACV) to release them individually and locally onto targeted HeLa cells. This allowed following the fate of an individual virus without the interplay of other viruses on the same or other cells. Exploiting fluorescence enabled to monitor different stages of the infection (virion binding, entry, early/late gene expression, virion assembly and spreading). By following a large number of deposited single viruses insights were gained that all steps of VACV infection are critical. Furthermore, exposing a single cell to multiple viruses revealed that the probability of VACV infection was increasing more than deterministically with the number of viruses. This suggests that VACV infection is a cooperative process. In another biological project, the isolation procedure was applied to bacteriochlorophyll

producing bacteria from the phyllosphere of clover. Bacteriochlorophyll is the light absorbing pigment in the photosynthetic reaction center of aerobic anoxygenic phototrophs that occur in this habitat. A custom-made filter set was used to identify these bacteria by their specific autofluorescence in the infrared range. Bacteria were washed from clover leaves and individually transferred to R2A medium for growth and subsequent identification by their 16S rRNA. To verify that the method is not biased this was first applied for random isolation and afterwards infrared fluorescent bacteria were picked. While a broad diversity of bacteria could be isolated by random picking, exclusively different species of *Methylobacterium* were obtained exhibiting infrared fluorescence. This suggests that only Methylobacteria produce bacteriochlorophyll to a detectable amount in significant number in the phyllosphere of the analyzed samples.

Taken together, FluidFM technology has proven to be a useful tool in biology for a number of applications such as spatial manipulation and single particle release.

Zusammenfassung

Die Fluidic Force Microscope (FluidFM) Technologie wurde im Labor für Biosensoren und Bioelektronik der ETH Zürich in Zusammenarbeit mit dem Schweizer Zentrum für Elektronik und Mikrotechnology (CSEM SA, Neuchâtel, Schweiz) entwickelt. Es besteht aus einem umgebauten Rasterkraftmikroskop, das präzise Kraftmessungen erlaubt. Die Besonderheit des FluidFM ist ein in den Cantilever eingebauter mikroskopisch kleiner Kanal. Dieser Kanal führt durch den Probenhalter in einen Schlauch, der an einen Druckregulierer angeschlossen ist. Dadurch lassen sich Über- und Unterdruck an der Öffnung am Ende des Cantilevers aufbauen. Dies lässt sich in Luft verwenden, viel wichtiger sind bisher jedoch die Anwendungen in Flüssigkeit, welche durch den geschlossenen Kanal ermöglicht werden. Dazu kann der Cantilever mit diversen Flüssigkeiten gefüllt werden und ermöglicht es somit diese durch die Öffnung freizusetzen oder Partikel und Flüssigkeit aus der Umgebung anzusaugen.

In dieser Arbeit wurden neue biologische Anwendungen der FluidFM Technologie getestet und anschliessend für konkrete Fragestellungen angewandt. Der Fokus richtet sich dabei auf Cantilever ohne Pyramide und deren Anwendungen für die örtliche Manipulation von Zellen.

In einem ersten Schritt wurden die möglichen Einsatzbereiche für die Spitzen getestet. Verschiedene Zelltypen (Bakterien, Hefen und Säugerzellen) wurden aus Flüssigkeit an den Cantilever gesaugt. Diese konnte daraufhin lokal verschoben werden, um sie an einer anderen Stelle mit einer Genauigkeit von wenigen Mikrometern wieder abzulegen. Dabei wurde die Kraftmessung des Rasterkraftmikroskops dafür genutzt, um die auf die Zelle wirkenden Kräfte minimal zu halten, wodurch Beschädigungen an der Zelle verhindert werden sollten. Dies wurde zusätzlich durch Wachstum der Zellen nach der Manipulation bestätigt. Das FluidFM erlaubte es, mit der gleichen Spitze viele Manipulationen nacheinander durchzuführen. Wenn die Zelle festgesaugt war, war es zudem möglich, diese nicht nur die Manipulation in Flüssigkeit, sondern auch das Herausheben aus der Flüssigkeit und das anschliessende Ablegen auf einem anderen Substrat, zu verwenden. Dadurch konnte eine spezifische Zelle von anderen getrennt werden. Zusätzlich konnte mit Hilfe des Lasersignals auch die Verbiegung des Cantilevers gegen die Oberfläche während der Loslösung einer anhaftenden Zelle gemessen werden. Dies erlaubte die Berechnung von Adhäsionskräften der Zellen an die Oberfläche. Ebenfalls wurde festgestellt, dass Objekte in den Cantilever geladen werden können, wenn sie klein genug sind, um durch den Kanal zu passen. Dies ermöglichte es diese, an spezifischen Orten einzeln freizusetzen.

In einem zweiten Schritt wurden die entwickelten Anwendungen dazu verwendet, konkrete biologische Fragestellungen zu beantworten um das Potenzial der FluidFM Technologie als Verbesserung und Zusatz zu existierenden Techniken aufzuzeigen. In einer ersten Anwendungsstudie wurde der Cantilever mit einer Suspension von fluoreszenzmarkierten Vaccinia Viren (VACV) gefüllt, welche dadurch individuell auf eine HeLa Zelle abgelegt werden konnten. Dies ermöglichte es, das Schicksal eines einzelnen Virenpartikels ohne den Einfluss anderer Viren zu verfolgen. Mit Hilfe von Fluoreszenz konnten verschiedene Stadien der Infektion sichtbar gemacht werden (Binden des Virenpartikels, frühe/späte Genexpression, Bildung neuer Virenpartikel und Ausbreitung auf

Nachbarzellen). Ein Einblick in die kritischen Schritte der Infektion wurde gewonnen durch das Verfolgen von einer grossen Anzahl von einzelnen VACV. Zusätzlich wurde durch das Ablegen von mehreren Viren pro Zelle herausgefunden, dass die Infektionseffizienz gegenüber der Anzahl Viren stärker ansteigt, als die erwartete deterministische Rate ausgehend von der eines einzelnen Virus. Dadurch wurde aufgedeckt, dass sich die VACV während der Infektion gegenseitig unterstützen.

In einer anderen Fragestellung wurde die Anwendung zur Isolation von einzelnen Bakterien auf Produzenten von Bacteriochlorophyll aus der Phyllosphäre von Klee angewandt. Bacteriochlorophyll ist das Licht absorbierende Pigment im Reaktionszentrum der anoxygenen Photosynthese von Bakterien, die in diesem Habitat vorkommen. Ein speziell angefertigter Filtersatz ermöglichte die Identifikation dieser Bakterien anhand der spezifischen Fluoreszenz im infraroten Bereich. Bakterien wurden von Kleeblättern abgewaschen und dann einzeln in R2A Medium isoliert, um sie anschliessend anhand der 16S rRNA zu identifizieren. Zunächst wurden zufällig ausgewählte Bakterien isoliert, wodurch ein weites Spektrum an Arten erhalten wurde. Die erhaltene Diversität deckt gut diejenige aus Wachstums-unabhängigen Studien ab, was die Machbarkeit und Unverfälschtheit der Methode zeigt. Durch das Auswählen von infrarot fluoreszierenden Bakterien konnten verschiedene Spezies von Methylobakterien gefunden werden, was die Schlussfolgerung nahelegt, dass lediglich diese Bacteriochlorophyll in signifikanter Anzahl zu detektierbaren Mengen produzieren.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die FluidFM Technologie ein brauchbares Instrument für die Biologie mit einem vielseitigen Einsatzbereich ist, was unter anderem die räumliche Manipulation und das gezielte Absetzen von Partikeln beinhaltet.