

DISS. ETH NO. 27934

**Single cell engineering using fluidic force microscopy**

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

Christoph Georg Erich Gäbelein

MSc, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

born on 04.10.1988

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Julia Vorholt

Prof. Dr. Matthias Peter

Prof. Dr. Sophie Martin

2021

## Summary

Cells are the smallest units of life. The study of single cells as the universal building blocks of life is essential to advancing the understanding from cellular evolution to collective behavior of multicellular systems. Increasingly precise tools are being developed to enable insights into patterns and mechanisms governing the behavior of individual cells, which are themselves inherently complex systems. Fluidic force microscopy (FluidFM) unites the high spatial precision of an atomic force microscope (AFM) with the capability to control fluid flows. FluidFM cantilevers are hollow rigid structures that are supported at one end, composed of silicon nitride and with dimensions in the micrometer range. The apex carries a structural element, consisting of a pyramid or a cylinder, which interacts directly with the biological sample. These structural features can be further shaped using focused ion beam technology, allowing removal of material with nanometer precision. The hollow interior acts as a microchannel that is connected to an external pressure controller to regulate fluid flow into -and out of the cantilever through an aperture located at the apex. The aperture is the critical area of the cantilever concerning the ability to perturb fluidic flow and pressure, as it is the connecting point between the sample and the pressure controlled fluidic system. In addition, its size restricts the transported substances by affecting the range of acting fluid forces and forming a steric barrier for objects smaller than its own extent. In the presented work, the position and size of pyramidal and cylindrical cantilevers were tuned to allow injection and extraction from and into various cell types, as well as the extraction and re-injection of organelles from and into cultured mammalian cells and injection of bacteria into cultured mammalian cells.

In the first part of this thesis, minimization of aperture area as well as precise positioning of the aperture was crucial to manipulate fungi. Injection and extraction of fluids in walled fungal cells is challenging and the most common methods for delivery into fungi rely on the generation of protoplasts using cell wall degrading enzymes. This step represents a bottleneck when working with different species, in terms of experimental time and cell viability. Here, it was shown that FluidFM enables the injection of solutions into the cytoplasm of fungal cells as well as the extraction of cytoplasmic fluids from fungal cells, including the unicellular yeasts *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* and the multicellular fungus *Coprinopsis cinerea*. The approach preserves cell viability and allows for the study of cell responses of chemical as well as physical stimuli. Active transport of a fluorescently labelled protein carrying a nuclear localization signal to cell nuclei after injection was observed, as were transcriptional responses following extraction of cytoplasm from the syncytial fungus *C. cinerea*.

In the second step, the aperture area of FluidFM probes and concomitant hydrodynamic forces were optimized towards exertion of larger forces and cylindrical cantilevers were sharpened to allow minimally invasive organelle manipulation in cultured mammalian cells. Mitochondria and the complex endomembrane system are hallmarks of eukaryotic cells, which are difficult to manipulate in a spatially defined fashion. The developed approach allows extraction and transplantation of organelles from, and into, cultured live cells. Impaired mitochondria from HeLa cells were transplanted into primary keratinocytes and the fate of mitochondria after transplantation was followed in real time. The established protocol made it possible to observe subsequent remodeling and rescue of transferred mitochondrial subpopulations. Moreover, mitochondria can be studied in different nuclear backgrounds as their genomic content is propagated without the need for selection pressure. When extracting individual- or groups of mitochondria, their morphology transitions into a pearls-on-a-string phenotype, resulting in fission along tens of micrometers along mitochondria due to locally applied pulling forces. Studying the force induced pearling process, it was shown that the transition is calcium-signaling independent and coincides with recruitment of the canonical mitochondrial fission machinery.

In the third chapter, the use of sharpened cylindrical cantilevers was extended to facilitate the injection of bacteria into mammalian cells. By creating a synthetic merger of a cell-within-a-cell, a defined starting point for an emerging endosymbiosis can be initiated. Here, two heterotrophic organisms, mammalian HeLa cells and *Escherichia coli* bacterial cells were brought together. The intracellular growth behavior was analyzed using fluorescence microscopy and rapid growth of *E. coli* observed, leading to an unstable relationship. In order to impede this excessive growth behavior, auxotrophic mutants of *E. coli* were created. Intracellular growth was robust towards mutational load in amino acid synthesis and prone to pleiotropic effects when creating bottlenecks in purine metabolism. Hence, the system requires further engineering towards a stable synthetic merger.

In summary, the technological advances introduced in this work were translated towards the use in relevant biological systems beyond the establishment of technical proof of principles. Additionally, they provide powerful tools for single cell research across fields of biological research.

## Zusammenfassung

Zellen sind die kleinsten Einheiten des Lebens. Die Untersuchung einzelner Zellen als universelle Bausteine des Lebens ist für das Verständnis der zellulären Evolution und des kollektiven Verhaltens multizellulärer Systeme von wesentlicher Bedeutung. Es werden immer präzisere Werkzeuge entwickelt, die Einblicke in die Muster und Mechanismen ermöglichen, die das Verhalten einzelner Zellen bestimmen, die ihrerseits komplexe Systeme sind. Die Fluidkraftmikroskopie (FluidFM) vereint die hohe räumliche Präzision eines Rasterkraftmikroskops (AFM) mit der Fähigkeit, Flüssigkeitsströme zu kontrollieren. FluidFM-Cantilever sind hohle, starre Strukturen, die an einem Ende gestützt werden, aus Siliziumnitrid bestehen und Maße im Mikrometerbereich haben. Die Spitze trägt ein Strukturelement, bestehend aus einer Pyramide oder einem Zylinder, das direkt mit der biologischen Probe interagiert. Diese Strukturelemente können mit der fokussierten Ionenstrahltechnologie weiter geformt werden, was einen Materialabtrag mit Nanometerpräzision ermöglicht. Der hohle Innenraum fungiert als Mikrokanal, der mit einem externen Druckregler verbunden ist, um den Flüssigkeitsstrom in den und aus dem Cantilever durch eine Öffnung an der Spitze zu regulieren. Die Öffnung ist der kritische Bereich des Cantilevers in Bezug auf die Fähigkeit, den Flüssigkeitsstrom und den Druck zu beeinflussen, da sie der Verbindungspunkt zwischen der Probe und dem druckgesteuerten Flüssigkeitssystem ist. Darüber hinaus schränkt ihre Größe die transportierten Substanzen ein, indem sie den Bereich der wirkenden Fluidkräfte beeinflusst und eine sterische Barriere für Objekte bildet, die kleiner als ihre eigene Ausdehnung sind. In der vorliegenden Arbeit wurden Position und Größe von pyramidalen und zylindrischen Cantilevern so abgestimmt, dass sie die Injektion und Extraktion aus und in verschiedene Zelltypen sowie die Extraktion und Re-Injektion von Organellen aus und in kultivierte Säugetierzellen und die Injektion von Bakterien in kultivierte Säugetierzellen ermöglichen.

Im ersten Teil dieser Arbeit war die Minimierung der Öffnungsfläche sowie die präzise Positionierung der Öffnung entscheidend für die Manipulation von Pilzen. Die Injektion und Extraktion von Flüssigkeiten in wandständige Pilzzellen ist eine Herausforderung, und die gängigsten Methoden zur Substanzeinbringung in Pilze beruhen auf der Erzeugung von Protoplasten unter Verwendung von zellwandabbauenden Enzymen. Dieser Schritt stellt bei der Arbeit mit verschiedenen Arten einen Engpass in Bezug auf die Versuchsdauer und die Lebensfähigkeit der Zellen dar. Hier wurde gezeigt, dass FluidFM die Injektion von Lösungen in das Zytoplasma von Pilzzellen sowie die Extraktion von Zytoplasmaliquiden aus Pilzzellen ermöglicht, einschließlich der einzelligen Hefen *Schizosaccharomyces pombe* und *Saccharomyces cerevisiae* und des mehrzelligen Pilzes *Coprinopsis cinerea*. Der Ansatz erhält die Lebensfähigkeit der Zellen und ermöglicht die Untersuchung der Zellreaktionen auf

chemische und physikalische Reize. Nach der Injektion eines fluoreszierend markierten Proteins, das ein Kernlokalisierungssignal trägt, wurde ein aktiver Transport zu den Zellkernen beobachtet, ebenso wie transkriptionelle Reaktionen nach der Extraktion von Zytoplasma aus dem synzytialen Pilz *C. cinerea*.

Im zweiten Schritt wurden die Öffnungsfläche der FluidFM-Proben und die damit verbundenen hydrodynamischen Kräfte optimiert und die Öffnung der zylindrischen Ausleger geschärft, um eine minimal invasive Manipulation von Organellen in kultivierten Säugetierzellen zu ermöglichen. Mitochondrien und das komplexe Endomembransystem sind charakteristische Merkmale eukaryontischer Zellen, die nur schwer räumlich definiert manipuliert werden können. Der entwickelte Ansatz ermöglicht die Extraktion und Transplantation von Organellen aus und in kultivierte lebende Zellen. Beeinträchtigte Mitochondrien aus HeLa-Zellen wurden in primäre Keratinozyten transplantiert, und das Verhalten der Mitochondrien nach der Transplantation wurde in Echtzeit verfolgt. Das etablierte Protokoll ermöglichte es, den anschließenden Umbau und die Rettung der übertragenen mitochondrialen Subpopulationen zu beobachten. Darüber hinaus können Mitochondrien in verschiedenen Kernhintergründen untersucht werden, da ihr genomischer Inhalt ohne Selektionsdruck vermehrt wird. Bei der Entnahme von einzelnen Mitochondrien oder Gruppen von Mitochondrien geht deren Morphologie in einen Perlen-auf-einer-Schnur-Phänotyp über, was zu einer Spaltung entlang von mehreren Mikrometern entlang der Mitochondrien aufgrund von lokal angelegten Zugkräften führt. Bei der Untersuchung des kraftinduzierten Perlbildungsprozesses konnte gezeigt werden, dass der Übergang kalziumunabhängig ist und mit der Rekrutierung der kanonischen mitochondrialen Spaltungsmaschinerie zusammenfällt.

Im dritten Kapitel wurde die Verwendung von geschliffenen zylindrischen Cantilevern erweitert, um die Injektion von Bakterien in Säugetierzellen zu erleichtern. Durch die Schaffung einer künstlichen Verschmelzung einer Zelle mit einer Zelle kann ein definierter Ausgangspunkt für eine entstehende Endosymbiose geschaffen werden. Hier wurden zwei heterotrophe Organismen, HeLa-Säugetierzellen und *Escherichia coli*-Bakterienzellen, zusammengebracht. Das intrazelluläre Wachstumsverhalten wurde mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie analysiert und ein schnelles Wachstum von *E. coli* beobachtet, was zu einer instabilen Beziehung führte. Um dieses exzessive Wachstumsverhalten zu unterbinden, wurden auxotrophe Mutanten von *E. coli* eingesetzt. Das intrazelluläre Wachstum war robust gegenüber Mutationen in der Aminosäuresynthese und anfällig für pleiotrope Effekte, wenn Engpässe im Purinstoffwechsel entstehen. Daher muss das System weiter entwickelt werden, um eine stabile künstliche Fusion zu erreichen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit vorgestellten technologischen Fortschritte über den funktionellen Nachweis hinaus auf die Anwendung in relevanten

biologischen Systemen übertragen wurden. Zusätzlich bieten sie wirksame Werkzeuge für die Einzelzellforschung in verschiedenen Bereichen der Biologie.