

Diss. ETH No. 29049

Mechanical manipulation and characterization of single cells with nanotools

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Sophie Roberta Herzog

M.Sc. in Biotechnology, ETH Zurich

born 04.03.1993

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Daniel J. Müller

Prof. Dr. Christoph Gerber

Prof. Dr. Timm Schroeder

2023

Zusammenfassung

Nanotools werden für verschiedene Bereiche entwickelt um Materie in molekularen oder sogar atomaren Dimensionen zu manipulieren oder zu charakterisieren. In der Biologie werden Nanotools oftmals angewendet um Zellen unter physiologischen Bedingungen mit hoher Genauigkeit abzubilden, nachzuverfolgen oder präzise zu beeinflussen. Insbesondere 'single-cell technologies' werden immer häufiger genutzt um auf singulärer Zellbasis zu untersuchen welche Mechanismen Zellen benutzen um ihre biophysikalischen oder mechanischen Eigenschaften (z.B. aufgrund von äusseren Einwirkungen wie mechanischen Signalen) anzupassen oder wie Zellen mit anderen Zellen oder ihrem natürlichen Lebensraum interagieren. Anwendungsmethoden, die einzelne Zellen untersuchen oder manipulieren können, gewähren einen umfassenden Einblick was die Variationen zwischen einzelnen Zellen anbelangt und erlauben es Mechanismen von bestimmten zellulären Prozessen zu untersuchen. Zum Beispiel können Zelleigenschaften bestimmt werden und mit Zellfunktionen oder unter Umständen auch Fehlfunktionen (welche wiederum zu Krankheiten führen können) korreliert werden. Längerfristig können solche Erkenntnisse bei der Entwicklung von klinischen Anwendungen von Nutzen sein, wie zum Beispiel bei der Diagnose von Krankheiten oder um die Entwicklung von Medikamenten zu beschleunigen.

Die Neuentwicklung und Anwendung von single-cell technologies erfordert oftmals eine Kombination von verschiedenen Naturwissenschaften, wie zum Beispiel von Biologie und Physik. Das kombinierte Wissen diverser wissenschaftlicher Gebiete ist notwendig um das Untersuchen komplexer biologischen Proben zu ermöglichen da dies oft technische Schwierigkeiten birgt. Leider führten diese Schwierigkeiten in der Vergangenheit oft dazu, dass Methoden limitiert sind in ihrer Anwendung und zum Beispiel sehr invasiv sind, nur für gewisse Zelltypen oder Zellformen geeignet sind, oder nicht unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden können. Ausserdem sind technische Limitationen meist auch mit Einschränkungen in der Messauflösung und der Genauigkeit der Messung verbunden.

Diese Arbeit beschreibt daher die Überarbeitung und Weiterentwicklung von zwei zuvor entwickelten Technologien im Feld der Biophysik. Die erste Anwendung konzentriert sich dabei auf die mechanische Charakterisierung von einzelnen Zellen mithilfe einer Zellwaage die 'Picobalance' genannt wird und auf einem schwingenden Federbalken basiert. Die zweite Methode zielt darauf ab einzelne Zellen mit Viren zu infizieren. Dies wird sowohl für Zellen in Zellkultur wie auch in lebenden Organismen ermöglicht und erlaubt es daher mitzuverfolgen

wie, von einer einzelnen infizierten Zelle ausgehend, Nervenzellen miteinander verbunden sind und bietet daher die Möglichkeit neurale Netzwerke abzubilden.

Der erste Teil dieser Dissertation beschäftigt sich mit den facettenreichen Einflüssen auf die Messung der totalen Masse einzelner Zellen und umfasst daher kurze Einführungen in verschiedene, zum Verständnis relevante, Bereiche. Zellmasse und andere verwandte biophysikalische Messgrößen, wie Zellvolumen oder Zelldichte, sind wichtige physiologische Parameter. Beispielsweise sind Unregelmässigkeiten in der Zellgrösse (oft verwendet als austauschbarer Begriff für Zellmasse, -volumen oder -dichte) ein bekanntes Merkmal von kranken Zellpopulationen, wohingegen Zellen vom selben Typ in gesundem Gewebe normalerweise eine erstaunliche Einheitlichkeit aufweisen. Trotz dieser relativ simplen phänomenologischen Erkenntnis ist es aber grösstenteils noch unklar wie Zellen diese fundamentalen Eigenschaften regulieren. Dies liegt zu einem wesentlichen Teil auch daran, dass es bisher kaum Technologien mit genügend Auflösung gab um die dynamischen Veränderungen einzelner Zellen unter physiologischen Bedingungen zu verfolgen und daraufhin die zugrunde liegenden regulatorischen Mechanismen besser zu verstehen.

Die Picobalance basiert auf einem photo-thermisch angeregten Federbalken und wurde ursprünglich dazu entwickelt das Wachstum von eukaryotischen Zellen mit hoher Zeit- und Massenauflösung zu messen. Die zu untersuchende Zelle wird dazu an den Federbalken angeheftet, was die Gesamtmasse des Systems verändert und sich in einer Veränderung der Eigenfrequenz oder natürlichen Resonanzfrequenz widerspiegelt. Indem man die Eigenfrequenz des Federbalkens vor und nach der Zellaufnahme misst und von der invers proportionalen Relation zwischen Eigenfrequenz und Wurzel der Masse Gebrauch macht, kann man die totale Masse der aufgenommenen Zelle bestimmen. Den Nachweis, ein hochsensitives Tool zu sein, hat die Picobalance einerseits damit erbracht Massenfluktuationen innert Sekunden zu detektieren. Andererseits konnten damit auch Langzeitmessungen von bis zu drei Tagen gemacht werden. Für diese Arbeit war es ursprünglich geplant die Picobalance zur Untersuchung des Substrat-abhängigen Wachstums von Zellen zu nutzen, und zwar indem man die Massenakkumulierung von einzelnen Zellen beobachtet während sie an verschiedene Proteine anhaften. Dazu wurden die Federbalken mit vier spezifischen Substraten funktionalisiert: Kollagen Typ 1, Matrigel, Laminin Mix und Concanavalin A. Dabei wurde das Augenmerk auf die ersten zwei Stunden nach Anhaftung der Zelle gelegt. In diesem Zeitraum durchläuft die Zelle eine Transition von der anfänglichen Anhaftung bis zur abgeflachten Zelle, welche substantielle morphologische Veränderungen mit sich bringt.

Allerdings implizieren solche Übergänge nicht nur Umgestaltungen der Zellform, sondern gehen einher mit Veränderungen der Zellmechanik. Diese wiederum können sich auf die Dynamik der Massenauslesung auswirken und müssen daher berücksichtigt werden bezüglich der Richtigkeit von Massenmessungen. Um die korrekte Zellmasse zu messen, sollte daher ein Federbalken mit ausreichend tiefer Resonanzfrequenz gewählt werden, sodass die Zelle in jedem Zustand in der Lage ist den Schwingungen des Federbalkens zu folgen.

Zu diesem Zweck haben wir mit der Eigenfrequenz der Zelle einen neuen Parameter eingeführt, welcher die intrinsische Oszillationsdynamik der Zelle reflektiert, die wiederum von der Morphologie und den mechanischen Eigenschaften der Zelle abhängig ist und daher als repräsentativer Marker des Zellzustandes dienen kann. Wir haben die Eigenfrequenz von einer Zellpopulation dann als Referenz verwendet und konnten nachweisen, dass die Eigenfrequenz des Federbalkens bedeutend tiefer sein sollte als die Eigenfrequenz der Zellen, um die Masse von Zellen akkurat zu bestimmen. Des Weiteren konnten wir neben der Approximation einer Zell-Eigenfrequenz, und der damit einhergehenden technischen Spezifizierung für genauere Massenmessungen, auch den durchschnittlichen Wert für die mechanische Zelldämpfung (auch Q-Faktor genannt) ableiten. Auf diese Weise konnten wir den Anwendungsrahmen der Picobalance erweitern und sehen es nun als Nanotool für die mechanische Charakterisierung von Zellen. Zudem versprechen wir uns zukünftig auch eine bedeutende Rolle der Eigenfrequenz als mechanisch-biologischer Marker zur Charakterisierung, Identifizierung und Ansteuerung von einzelnen Zellen.

Der zweite Teil dieser Arbeit konzentriert sich auf eine Technologie, die einzelne Zellen durch hochpräzises mechanisches Ansteuern mit Viren infizieren und dadurch manipulieren kann. Damit können einzelne Zellen beispielsweise genetisch modifiziert und infolgedessen, deren Struktur und Funktion in ihrer natürlichen Umgebung studiert werden.

Dazu wurde eine Methode namens ‘Virus stamping’ (*d.h.*, einen Virus stempeln) verwendet, welche einzelne Zellen mittels Virusinfektion ansteuert. Diese Technologie wurde primär dazu entwickelt neurale Netzwerke abzubilden, welche von einzelnen oder mehreren anfänglich infizierten Zellen ausgehen und dabei ausgebildete Verbindungen innerhalb funktionell definierter Netzwerke zu verfolgen. Zur Anwendung in Zellkultur oder in Gewebeschnitten wurden Glaspipetten, welche mit Viren funktionalisiert wurden, in mechanischen Kontakt mit der zu infizierenden Zelle gebracht. Die Methode wurde dann leicht modifiziert um die Technologie auch in lebenden Organismen oder tieferliegenden Geweben zu ermöglichen. Dazu wurden Viren mit magnetischen Nanopartikeln assoziiert und dann in

eine Glaspipette gefüllt. Die ‘geladene’ Glaspipette schützt dabei die Virus-gebundenen Nanopartikel während sie durchs Gewebe gesteuert wird. Wenn die Pipette über dem zu infizierenden Ort platziert ist, können die Nanopartikel durch das Anschalten eines elektromagnetischen Feldes aus der Pipette und in Kontakt mit der Zielzelle gelotst werden.

Wir haben die Methode des Virus stamping systematisch beschrieben und gehen auf die Anwendungsmöglichkeiten, Limitationen und den experimentellen Ablauf ein, welcher beispielsweise die Vorbereitung, das Ansteuern oder auch die Erfolgskontrollen beschreibt. Darüber hinaus wurden kritische Schritte und mögliche Fehlerquellen hervorgehoben. Dies betrifft zum Beispiel das Herstellen von Pipetten mit den (zur Grösse der Nanopartikel) passenden Pipettenöffnungen oder die Bestimmung des richtigen Virus-Nanopartikel Verhältnis’ um Aggregationen der Nanopartikel und infolgedessen Verstopfungen der Pipette zu verhindern. Diese Details wurden Schritt für Schritt protokolliert und dienen daher als eine Anleitung um Virus stamping in neuen Bereichen anzuwenden und ein besseres Verständnis von neuronalen Netzwerkverbindungen zu erlangen.

Summary

Nanotechnological tools are being developed for various fields to manipulate or characterize structures at molecular or even atomic scales. In biology, nanotools are often used to image, monitor or precisely target cells under physiological conditions with high accuracy. In particular, single-cell technologies are increasingly used to study the mechanisms which allow cells to adapt their biophysical or mechanical properties (*e.g.*, in response to mechanical cues) or to interact with adjacent cells and their native environment. Studies at the single-cell level provide a comprehensive understanding of cell-to-cell variations and allow the investigation of fundamental cellular processes. Characteristic features such as cellular mechanical properties, for instance, may be correlated with cellular functions or dysfunctions. In the long run, such insights can contribute to the development of clinical applications, such as the early detection or diagnosis of diseases or accelerate drug discovery and development.

The development and application of single-cell technologies typically involves interdisciplinary sciences, for example compounding the fields of biology and physics. The combination of knowledge, stemming from different scientific fields, is necessary in order to tackle the challenges that arise when the probed subjects consist of complex biological structures. While on one hand this has led to a variety of distinct technological systems, unfortunately on the other hand, such challenges have also led to a variety of limitations in application, such as being too invasive, restricted to certain cell types or cell states (*e.g.*, suspended cells) or to non-physiological environments. Moreover, technical limitations usually not only lead to a limited application range but might also imply compromises in measurement resolution and the accuracy of readout.

To this end, this work systematically revisits and refines two previously developed technologies in the field of biophysics. The first application is devoted to the mechanical characterization of entire single cells *via* a cantilever-based measurement tool called ‘picobalance’. The second application is directed towards single-cell virus infection in culture or *in vivo*, which allows single-cell initiated viral tracing and thus mapping of connected neural circuits.

The first part of this doctoral thesis looks at the manifold aspects that have to be considered when attempting to measure the total mass of single cells and therefore contains brief introductions to various associated areas relevant to understanding. Cell mass, like other related biophysical measures such as cell volume or density, are physiologically important parameters.

For example, disparities in cell size (cell size is often used liberally as an interchangeable term for cell mass, volume or density) is a well-known feature of diseased cell populations, whereas in healthy tissues cells of the same type typically display striking regularity. However, despite this relatively simple phenomenological insight, it is still largely unclear how cells regulate these fundamental cellular properties. To a large extent, this is also due to a lack of technologies providing sufficient resolution to monitor the dynamic changes of single cells under physiological conditions, which would subsequently allow a better understanding of the underlying regulatory mechanisms.

The picobalance, which is based on a photo-thermally actuated microcantilever, was originally developed to measure the total mass of eukaryotic cells with high time and mass resolution. Hereby, attaching a cell to a microcantilever changes the mass of the system and thus shifts the eigenfrequency or natural resonance frequency of the microcantilever. The total mass of single cells can be derived by measuring the eigenfrequency of the cantilever before and after cell attachment and making use of the inversely proportional relationship between eigenfrequency of the cantilever and square root of the cantilever mass. To this end, the picobalance has shown to be a highly sensitive tool, on one hand capable of detecting mass fluctuations within seconds and on the other hand applicable to long-term mass measurements of up to 3 days. The original aim of this work was to use the picobalance to study the substrate-specific cell growth by monitoring the mass accumulation of individual cells as they adhere to different proteins. For this purpose, the microcantilevers were functionalized with four specific substrates: collagen type I, matrigel, laminin mix and concanavalin A. Thereby, the emphasis was placed on the first two hours after cell attachment, during which the cell undergoes a transition from initial attachment (*i.e.*, early adhesion) to a more flattened cell, which involves substantial morphological changes. However, such transitions not only imply changes of the cell shape but are accompanied by alterations in cell mechanics. These in turn can affect mass readout dynamics and must therefore be taken into account with respect to the accuracy of mass measurements. Therefore, we found that in order to measure the correct cell mass, a microcantilever with a sufficiently low eigenfrequency should be chosen so that despite the changes in shape and mechanical properties, the cell is able to follow the oscillations of the microcantilever in any state.

To this end, we introduced a new parameter, the eigenfrequency of the cell, which reflects the internal oscillation dynamics of the cell, which in turn depend on the morphology and the mechanical properties of the cell, and can therefore serve as a representative marker of the cell

state. We then used the eigenfrequency from a population of cells as a reference and were able to demonstrate that the eigenfrequency of the cantilever should be considerably lower than the eigenfrequency of the cells in order to accurately determine the total mass of single cells. Furthermore, in addition to the approximation of a cell eigenfrequency and the associated technical specifications for more accurate mass measurements, we were also able to derive a population average for the mechanical cell damping (also called Q-factor). In this way, we have been able to expand the application scope of the picobalance and now see it as a nanotool for the mechanical characterization of cells. In addition, we also envision a significant role for the cell eigenfrequency as a mechanobiological marker for the characterization, identification and targeting of individual cells in the future.

The second part of this work focuses on a technology that can infect and thereby manipulate individual cells with viruses through high-precision mechanical targeting. This allows for instance to genetically modify, and consequently study, the structure and function of individual cells in their natural environment.

For this purpose, a nanotool called ‘virus stamping’ was developed, which targets single cells *via* virus infection (*i.e.*, stamping a virus on the cell) for in-culture or *in vivo* application. This technology was primarily designed to map neural networks originating from single or multiple initially infected neurons and thereby trace formed connections within functionally defined networks. For application in cell culture or in tissue sections, virus-functionalized glass pipettes were brought into mechanical contact with the neuron to be infected. To enable the infection of single cells *in vivo*, the procedure was slightly modified and cells were targeted *via* virus-bound magnetic nanoparticles. The virus-associated magnetic nanoparticles were loaded into a glass pipette and thus protected during tissue penetration. Subsequently, when the pipette was placed over the site to be infected, the nanoparticles can be pulled out and into contact with the target cell by turning on an electromagnet.

We have systematically described the method of virus stamping and address possible applications, limitations and the experimental procedure, which describes, for example, the preparation, targeting or the post-stamping assessment. We further highlighted critical steps and possible sources of error. This concerns, for example, the pulling of glass pipettes with the appropriate pipette openings for the size of the nanoparticles or the determination of the correct virus-to-nanoparticle ratio to prevent aggregations and clogging of the pipette. These details were documented in a step-by-step instruction of the methodology and therefore serve as a

template to apply this technique in new areas, in the pursuit of a better understanding of neural circuit connectivity.