

**MICROFLUIDICS ENABLE QUANTITATIVE PHYSIOLOGY OF INDIVIDUAL
MICROORGANISMS IN CONTROLLED EXTRACELLULAR ENVIRONMENTS**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Dr.-Ing.

von der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen

der Technischen Universität Dortmund

genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Christian Dusny

aus

Lippstadt

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2015

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Schmid
2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Norbert Kockmann
3. Gutachter: Prof. Dr. Petra Dittrich

Dortmund 2015

Chemical Biotechnology
Prof. Dr. Andreas Schmid (ed.)

Christian Dusny

**Microfluidics enable quantitative physiology
of individual microorganisms in controlled
extracellular environments**

Volume 21

D 290 (Diss. Technische Universität Dortmund)

Shaker Verlag
Aachen 2015

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Zugl.: Dortmund, Technische Univ., Diss., 2015

Copyright Shaker Verlag 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-3884-2

ISSN 1868-0283

Shaker Verlag GmbH • P.O. BOX 101818 • D-52018 Aachen

Phone: 0049/2407/9596-0 • Telefax: 0049/2407/9596-9

Internet: www.shaker.de • e-mail: info@shaker.de

A microbial population is more than the sum of its cells

Danksagung

Zu allererst möchte ich meinem Doktorvater Herr Prof. Andreas Schmid danken. Er hat mir die Möglichkeit gegeben meine Doktorarbeit am Lehrstuhl für Biotechnologie an der TU Dortmund und am Leibniz Institut für Analytische Wissenschaften – ISAS – e.V. auf einem interessanten und zukunftsweisenden wissenschaftlichen Thema durchzuführen. In vielen Diskussionen, Seminaren und auch abseits des akademischen Betriebes habe ich viel von Ihm lernen können. Ein besonderer Dank geht an Prof. Lars Blank, welcher mir in der Anfangsphase meiner Arbeit durch viele konstruktive und inspirierende Gespräche ein solides Fundament für meine folgenden Arbeiten gelegt hat. Ich möchte auch Dr. Oliver Frick für seine Unterstützung während meiner Doktorarbeit danken.

Besonderer Dank gilt ausdrücklich Herrn Prof. Norbert Kockmann für die Bereitschaft meine Doktorarbeit als Gutachter zu bewerten und den Vorsitz der Prüfungskommission zu stellen. Ebenso möchte ich hier meinen Dank an Frau Prof. Petra Dittrich zum Ausdruck bringen, welche meine Doktorarbeit als externe Gutachterin beurteilt hat. Bei Herrn Prof. Rolf Wichmann und Herrn Prof. Oliver Kayser bedanke ich mich für die Abnahme meiner Promotionsprüfung und die wertvollen Kommentare zu meiner Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Hans-Detlev Kühl für die Moderation meiner Promotionsprüfung bedanken.

Meine Doktorarbeit hatte ihre Anfänge im Einzelzelllabor des Lehrstuhls für Biotechnologie, welches zunächst am Leibniz Institut für Analytische Wissenschaften – ISAS – e.V. lokalisiert war. Ich bedanke mich an dieser Stelle bei allen Mitarbeitern des ISAS für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre, sowie die sehr gute fachliche Unterstützung. Im Speziellen möchte ich mich bei JuliBu, Rene, Jens, Ingo, Marc, Saskia, Herrn Wiltfang, Florian, Christian, Yvonne, Albert, Joachim, Raffael und Dirk bedanken. Ein besonderer Dank geht an Freddy, der mich sehr gut in das Institut und die Arbeit mit dem Envirostat eingebunden hat. Wenn ich an Euch alle so denke, erinnere ich mich an die furiosen Duelle am Kickertisch, die vielen tiefgehenden wissenschaftlichen Diskussionen, die aufreibende Evaluierung, die fantastischen Summer Schools und so manch unvergesslichen Abend in Dortmund. Die Zeit am ISAS war wirklich klasse!

Danach ging es dann mit dem Einzelzelllabor im Lehrstuhl BT weiter und auch so richtig los. Und das nicht zuletzt dank des exzellenten Zusammenhalts und der hervorragenden Arbeitsatmosphäre dort. Ganz herzlichen Dank für die Unterstützung, Motivation, Austausch und Freundschaft an Bruno und Katja, Mani und Linde, Mattijs, Christine, Anja, Steffi, Reto,

Pfützchen, Dani, Kerstin, Frank, Sabine, Birgitta, Jana, Özde, Sjef, Suresh, Jochen, Jon, die Hoschrodts, Kamila, Karo, Marcel, Christian David, Starvin Marvin, Rohan, Nadine, Patty, Matze und Peti von der BMP, Bart, Rainer, Volki, Thomas, Francesco, Eleni, Babu und Anders.

Wie auch ein Kollege vor mir schon angemerkt hat, war besonders unser „Großraumbüro“ ein steter Quell der Inspiration und Motivation. Danke Jan, Martin, Jianan und Kiki! Hervorheben möchte ich an dieser Stelle besonders Karsten, welcher mit meisterhafter Niveaulosigkeit auch die dunkelsten Stunden zu erhellen vermochte. Meinen beiden tapferen Mitstreiterinnen Katrin und Verena wünsche ich viel Erfolg beim Abschluss ihrer Arbeiten und bedanke mich für den tollen Zusammenhalt innerhalb des Einzelzellabors. In Erinnerung bleiben mir viele, viele tolle Momente, die langen Gespräche im Kaffeeraum, der geniale (sehr oft wissenschaftliche) Austausch im Raucherturm, die tollen Reisen (auch nach Berlin), eiskaltes Camping, die gemeinsamen Trips zum Meer und in die Schweiz, die erhabenen Nächte in Dortmund und die immer schönen Weihnachtsfeiern.

In der aufregenden Zeit des Verfassens dieser Doktorarbeit, mitten im Umzug nach Leipzig, hat mir Magdalena selbstlos Unterschlupf gewährt. Danke für die tolle Zeit als Untermieter!

Besonderer Dank geht auch an meine Studenten, Galina Parolina, Martin Lindmeyer, Matthias Millhoff und Nicolas Szepan, welche durch Ihre durchweg exzellenten Beiträge zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben; das Martin kurze Zeit später ein geschätzter Kollege geworden ist, freut mich dabei umso mehr.

Meinen Eltern Erika und Helmut sowie meinen Großeltern Oma Annemarie und Opa Franz-Josef danke ich von ganzem Herzen. Ihr habt mich in jeder Hinsicht bei meinem langen Weg unterstützt und mir immer den nötigen Rückhalt gegeben. Ohne Euch hätte ich es nicht geschafft! Danke auch an meine ganze Familie Dusny-Luig, welche mich, auch nach langen Zeiten der Abwesenheit, immer wieder herzlich willkommen geheißen haben. Das trifft auch auf meine so treue Freundin Bina zu.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner lieben Maja; für all Deine Geduld, Dein Verständnis in so manch schwieriger Situation und Deine unentwegte Unterstützung.

Vielen Dank an Euch alle!

Besonderer Dank für Publikationen

Herrn Dr. Alexander Grünberger, Herrn Dr. Christopher Probst und Herrn Prof. Dietrich Kohlheyer und Herrn Prof. Wolfgang Wiechert danke ich für die erfolgreiche transinstitutionelle Zusammenarbeit bei der Untersuchung der verschiedenen mikrofluidischen Einzelzellkultivierungssysteme.

Ich bedanke mich bei Simon Küster für die Aminosäureanalysen via MALDI-MS.

Dank gilt zudem Herr Dr. Michael Piontek für die Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten *H. polymorpha* Mutanten.

Table of Contents

Danksagung	IV
Summary	IX
Zusammenfassung	X
List of Abbreviations.....	XI
List of Symbols.....	XIV
List of Cells.....	XV
Chapter 1: Introduction	1
General introduction	2
The single cell as the basic biological unit.....	3
Single-cell analysis requires environmental control	4
Physiological consequences of environmental gradients and implications for microfluidic single-cell analysis	7
The single-cell continuum	10
Hydrodynamics shape the physical architecture of the single-cell boundary environment	11
Microfluidic single-cell analysis enables environmental control	14
Single-cell cultivation in controlled environments with the Envirostat.....	16
The catalytic black box: How to assess single cells in a biotechnological context?.....	20
Conclusions.....	22
Scope of the thesis	23
Chapter 2: Time-resolved single-cell analysis reveals elevated specific growth rates of isolated microbes and micropopulations in controlled environments	25
Summary.....	26
Introduction.....	27
Materials and Methods	29
Results and Discussion	34
Conclusions.....	40
Chapter 3: Microfluidic control of single yeast microenvironments discloses ultrasensitivity of the mox promoter to carbon catabolite repression	41
Summary.....	42
Introduction.....	43
Materials and Methods	46
Results	53
Discussion	68
Conclusions.....	71
Chapter 4: Quantitative measurement of glucose uptake at a single-cell level	73

Summary.....	74
Introduction.....	75
Materials and Methods	79
Results	85
Discussion	104
Conclusions.....	108
Chapter 5: The flux probe concept - secreted protein as a non-disruptive information carrier for ¹³C-based metabolic flux analysis	111
Summary.....	112
Introduction.....	113
Materials and Methods	116
Results	121
Discussion	135
Conclusions.....	138
Chapter 6: Technical bias of microcultivation environments on single-cell physiology	139
Summary.....	140
Introduction.....	141
Materials and Methods	146
Results	149
Discussion	157
Conclusions.....	160
Chapter 7: General discussion	161
Introduction.....	162
Beyond the bulk: Analytical concepts for single-cell analysis.....	163
Pivotal descriptors for single-cell physiology: linking cell and environment	175
Conclusions.....	188
Chapter 8: Concluding remarks and outlook.....	189
Challenging biological limits with microfluidic single-cell analysis	190
Outlook	193
Chapter 9: Appendix	195
Chapter 10: References	207
<i>Curriculum vitae</i>	229