

DISS. ETH Nr. 20975

**Transport across lipid bilayers:
Permeation and fusion studies using microfluidic devices**

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER WISSENSCHAFTEN

der

ETH ZÜRICH

vorgelegt von

Phillip Kuhn

Dipl. Ing. Mikrosystemtechnik, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

geboren am 22.12.1982

aus

Deutschland

Angenommen auf Antrag von

Prof. Petra S. Dittrich

Prof. Peter J. Walde

2013

Abstract

The cell membrane represents the boundary between the cytosol and the extracellular environment. It maintains the integrity of the cell by forming a barrier for most substances while it controls the transduction of information and the exchange of molecules. Microfluidic devices are under current investigation as platforms for cell membrane research because experimental conditions can be controlled much more precisely as in bulk assays. However, the integration of cell models, like liposomes, for these studies into microfluidic devices is still challenging and thereby not many devices have been used for studying the transport across lipid bilayers.

The work presented herein discusses the development and fabrication of microfluidic devices with integrated lipid membranes and their use for permeation and fusion studies. Such integration of membranes usually involves an immobilization step, therefore protocols were developed which allow the tethering of artificial liposomes inside microchannels either by tagging the liposome or by a newly developed strategy based on hydrophobic interactions with a modified surface. Three applications of such devices for membrane transport studies are discussed in this work.

First, a microfluidic platform was used to study the kinetics of drug permeation across liposome membranes. Drugs of the tetracycline family were used because these molecules form a fluorescent drug-europium complex inside the liposomes. The permeation rates of various tetracyclines were investigated and the results were compared to conventional methods. The microfluidic method was fast enough to study the permeation of unstable tetracyclines and also allowed the investigation of the influence of membrane composition on the permeation rate.

Second, in order to study the transport of molecules by membrane fusion, single cells were positioned above immobilized liposomes. Fusion was triggered by low pH, simulating the fusion of pH-sensitive liposomes with endosomal membranes. The setup was tested with fluorescent dyes and also used to deliver β -galactosidase enzymes into the cytosol of the cells.

In a third set of experiments, a similar microfluidic device was used to study viral fusion. The acid-dependent fusion of single virions on individual cells was analyzed to obtain more information about the fusion mechanism of vaccinia virus particles. The kinetics of single hemifusion events initiated by a fast low-pH trigger could be measured and revealed unexpectedly long lag phases between pH change and hemifusion.

Besides a more fundamental understanding of the permeation and fusion processes, microfluidic-based studies were shown to be suitable for screening of permeation rates and lipofection efficiency.

Keywords: microfluidics, liposomes, immobilization, permeation, fusion

Zusammenfassung

Die Zellmembran ist die Begrenzung zwischen Zytosol und der extrazellulären Umgebung. Während die Weiterleitung von Informationen und den Austausch von Molekülen kontrolliert wird, hält die Membran die Unversehrtheit der Zelle aufrecht indem sie eine Barriere für die meisten Substanzen bildet. Mikrofluidische Systeme werden momentan als Plattformen für die Zellmembranforschung untersucht, weil experimentelle Bedingungen viel präziser kontrolliert werden können, als in konventionellen Experimenten. Die Integration von Zellmodellen, wie zum Beispiel Liposomen, in mikrofluidische Systeme ist allerdings immer noch sehr anspruchsvoll und somit wurden bis jetzt nicht viele mikrofluidische Chips für Transportstudien eingesetzt. Diese Doktorarbeit diskutiert in diesem Zusammenhang die Entwicklung und die Herstellung von Mikrofluidiken, und deren Anwendung in Permeations- und Fusionsstudien. Da eine solche Integration von Membranen normalerweise mit einem Immobilisierungsschritt verbunden ist, wurden Protokolle entwickelt die es erlauben Liposomen in Mikrokanälen anzubinden. Dies wurde entweder durch eine gezielte Veränderung der Liposomen erreicht oder mit einer neuartigen Strategie die auf hydrophoben Interaktionen mit einer behandelten Oberfläche beruht. Drei Anwendungen von solchen mikrofluidischen Systemen für Transportstudien werden in dieser Arbeit vorgestellt. Als erstes wurde die mikrofluidische Plattform eingesetzt um die Kinetik der Permeation von Medikamenten über Lipidmembranen zu untersuchen. Moleküle der Tetracyclinfamilie wurden dabei benutzt, weil diese einen fluoreszierenden Komplex mit Europium formen. Die Permeationsraten verschiedener Tetracycline wurden untersucht und die Ergebnisse mit konventionellen Methoden verglichen. Die mikrofluidische Methode war schnell genug um Permeation von instabilen Tetracyclinen zu messen, und erlaubte zusätzlich die Untersuchung des Einflusses der Membranzusammensetzung auf das Permeationsverhalten. Zweitens wurden einzelne Zellen über immobilisierten Liposomen positioniert um den Transport von Molekülen durch Membranfusion zu erforschen. Die Fusion wurde durch niedrigen pH ausgelöst, was die Fusion von pH-sensitiven Liposomen im Endosom simuliert. Das System wurde mit Fluoreszenzfarbstoffen getestet und danach dazu verwendet Enzyme in das Zytosol der Zellen zu bringen. In einem dritten Experiment wurde ein ähnliches mikrofluidisches System verwendet um virale Fusion zu untersuchen. Es wurde die Protonen-abhängige Fusion von einzelnen Virionen auf individuellen Zellen analysiert um mehr Informationen über den Fusionsmechanismus von Vaccinia Virus Partikeln zu erhalten. Die Kinetik von einzelnen Hemifusionsereignissen, die durch niedrigen pH ausgelöst wurden, konnte gemessen werden und enthüllte unerwartet lange Verzögerungen zwischen der pH Änderung und der Hemifusion. Es wurde gezeigt dass Studien die auf Mikrofluidik basieren, neben einem grundsätzlichen Verständnis der Permeations- und Fusionsprozesse auch dazu verwendet werden können um Permeationsraten und Lipofektionseffizienzen zu überprüfen.

Stichwörter: Mikrofluidik, Liposom, Immobilisierung, Permeation, Fusion