

DISS. ETH NO. 25622

# High-Throughput, Quantitative Enzyme Kinetic Analysis in Microdroplets

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCE of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

DAVID PETER HESS  
MSc ETH Zurich

born on 03.04.1988  
citizen of Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Andrew J. deMello  
Prof. Dr. Paolo Arosio  
Prof. Dr. Zbyněk Prokop  
Dr. Stavros Stavrakis

2018

## Abstract

The study of enzyme kinetics is of high significance in understanding metabolic networks in living cells and using enzymes in industrial applications. To gain insight into the catalytic mechanisms of enzymes it is necessary to screen an enormous number of reaction conditions, a process that is typically laborious, time-consuming and costly when using conventional measurement techniques. In recent times, droplet-based microfluidic systems have proved themselves to be of great utility in large-scale biological experimentation, since they consume minimal sample, operate at high analytical throughput, are characterized by efficient mass and heat transfer and offer high levels of integration and automation. Despite these compelling advantages, there is a surprising lack of appropriate platforms for measuring enzyme kinetics in high-throughput. The primary goal of the work described in this thesis is the introduction of novel microfluidic tools and detection methods for use in biological experimentation, with a particular focus on developing state-of-the-art platforms for the high-throughput and sensitive analysis of rapid enzyme kinetics.

We initially present a microfluidic platform for quantitative enzyme analysis in pL-volume droplets using stroboscopic epifluorescence imaging. Briefly, a barcoded series of heterogeneous pL-volume droplets containing varying concentrations of the fluorogenic substrate Resorufin  $\beta$ -D-Galactopyranoside and a constant amount of the enzyme  $\beta$ -Galactosidase is produced at frequencies in excess of 150 Hz, with all droplets being monitored as they rapidly pass through an extended microfluidic channel. By application of short excitation pulses, “blur-free” images containing up to 150 distinguishable droplets per frame are obtained and used to extract kinetic data. To demonstrate the efficacy of this approach, steady-state kinetics experiments are performed, yielding a Michaelis constant,  $K_M$  of 353  $\mu$ M and a dissociation constant,  $K_I$  for the competitive inhibitor Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside of 63  $\mu$ M.

We subsequently describe the development of a microfluidic platform for measuring rapid enzymatic reactions based on the controlled acceleration and deceleration of droplets within segmented flows. The acceleration step allows for sub-millisecond mixing of reagents within droplets through chaotic advection, whilst the subsequent delay step increases the observable reaction time. The sensitivity of the fluorescence-based detection scheme is improved by focusing excitation light into line geometries, resulting in a several hundred times higher local light density. We provide a detailed characterization of the platform’s performance and assay a number of exemplary enzymatic reactions to demonstrate the utility of our methodology. Subsequently, we use the developed microfluidic system to conduct a kinetic study of the dehalogenase *LinBwt* and two engineered mutants (*LinB32* and *LinB86*). Experiments described within this study include temperature dependent single- and multiple-turnover measurements that are used to extract activation energies for the involved catalytic steps. In addition, we successfully identify the rate limiting steps of the catalytic cycle for the three enzyme variants and compare our findings with molecular dynamics simulations for the substrate binding events.

The latter part of the thesis introduces differential detection photothermal interferometry (DDPI) as a novel tool for fast and sensitive single-point absorbance measurements in pico- and femtoliter droplets. Calibration studies with Erythrosin B show a linear dependence of the photothermal signal on the analyte concentration in the droplets. Subsequently, we apply the method to the analysis of fL-

volume droplets and droplets generated at frequencies in excess of 10 kHz. Finally, we perform two colorimetric assays, the first to extract the *Michaelis* constant for the reaction of  $\beta$ -Galactosidase and Chlorophenol-Red- $\beta$ -D-Galactopyranoside and the second one to monitor the metabolic activity of a population of HL-60 cells at the single cell level.

The final chapter addresses strategies to improve the limit of detection for absorbance-based measurements in droplet-based microfluidics. In this regard, we demonstrate the use of DDPI to measure the rapid two-step oxidation reaction of Metmyoglobin by hydrogen peroxide in droplets by detecting the change of the molecular absorption coefficient of the native protein.

## Zusammenfassung

Die Untersuchung der Enzymkinetik ist von großer Bedeutung für das Verständnis metabolischer Netzwerke in lebenden Zellen und für die Verwendung von Enzymen in industriellen Anwendungen. Um einen Einblick in die katalytischen Mechanismen von Enzymen zu erhalten, ist es notwendig, eine große Anzahl von Reaktionsbedingungen zu untersuchen, ein Prozess, der oft mühsam, zeitraubend und mit hohem Probenverbrauch verbunden ist, wenn herkömmliche Messtechniken verwendet werden. In jungster Zeit haben sich tröpfchenbasierte mikrofluidische Systeme als sehr nützlich für biologische Screening-Experimente erwiesen, da sie sich durch geringen Probenverbrauch, hohen Durchsatz, kontrollierte Massen- und Wärmeübertragung und die Fähigkeit zur High-Level-Integration und Automatisierung auszeichnen. Trotz dieser unbestreitbaren Vorteile tröpfchenbasierter Mikrofluidik mangelt es derzeit noch an entsprechenden Plattformen zur Messung der Enzymkinetik. Das primäre Ziel dieser Arbeit ist die Einführung neuartiger mikrofluidischer Werkzeuge und Detektionsmethoden für den Einsatz in biologischen Experimenten und insbesondere das Entwickeln von Plattformen für die empfindliche Messung schneller enzymatischer Reaktionen.

Zunächst präsentieren wir eine mikrofluidische Plattform zur quantitativen Enzymanalyse in pL-Volumen-Tröpfchen mittels stroboskopischer Epifluoreszenz-Bildgebung. Kurz gesagt wird eine Reihe von heterogenen pL-großen Tröpfchen, die variierende Konzentrationen des fluorogenen Substrats Resorufin  $\beta$ -D-Galactopyranosid und eine konstante Menge des Enzyms  $\beta$ -Galactosidase enthalten, bei Frequenzen oberhalb von 150 Hz erzeugt. Alle diese Tröpfchen werden dann verfolgt, während sie einen langen mikrofluidischen Kanal passieren. Durch die Verwendung kurzer Lichtpulse werden "verwacklungsfreie" Bilder mit bis zu 150 unterscheidbaren Tröpfchen pro Bild erzeugt, welche die Extraktion von kinetischen Messungen für jedes einzelne Tröpfchen ermöglichen. Um die Effizienz dieses Ansatzes zu demonstrieren, werden kinetische Experimente durchgeführt, welche eine Michaelis-Konstante,  $K_M$  von 353  $\mu$ M, und eine Dissoziationskonstante,  $K_I$  für den kompetitiven Inhibitor Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid von 63  $\mu$ M ergeben.

Anschliessend beschreiben wir die Entwicklung einer mikrofluidischen Plattform zur Messung schneller enzymatischer Reaktionen, basierend auf der kontrollierten Beschleunigung und Entschleunigung von Tröpfchen. Der beschleunigende Schritt ermöglicht ein schnelles Mischen von Reagenzien in den Tröpfchen in weniger als einer Millisekunde durch chaotische Advektion, während der nachfolgende Verzögerungsschritt hilft, die beobachtbare Reaktionszeit zu erhöhen. Die Empfindlichkeit des fluoreszenzbasierten Detektionsprinzips wird durch Fokussierung des Anregungslichts in Liniengeometrien verbessert, was zu einer mehrere hundertmal höheren lokalen Lichtdichte führt. Wir präsentieren eine detaillierte Charakterisierung der Plattform und testen eine Reihe von beispielhaften enzymatischen Reaktionen, um den Nutzen unserer Methodik zu demonstrieren. Danach verwenden wir das entwickelte mikrofluidische System zur Durchführung einer kinetischen Studie der Dehalogenase *LinBwt* und zweier Mutanten (*LinB32* und *LinB86*). Die in dieser Studie beschriebenen Experimente umfassen temperaturabhängige Single- und multipletturnover-Messungen, die verwendet werden um die Aktivierungsenergien für die beteiligten katalytischen Schritte zu bestimmen.

Der letzte Teil der Arbeit stellt die Detektion mittels differentieller photothermischer Interferometrie (DDPI) als neues Werkzeug für schnelle und empfindliche absorptionsbasierte Einzelpunktmessungen in pL-fL-Tröpfchen vor. Kalibrierungsstudien mit Erythrosin B zeigen eine lineare Abhängigkeit des photothermischen Signals von der Analytkonzentration in den Tröpfchen. Anschließend wenden wir die Methode auf die Analyse von fL-Volumen-Tröpfchen, sowie von Tröpfchen die bei Frequenzen von mehr als 10 kHz erzeugt werden, an. Schließlich führen wir zwei kolorimetrische Assays durch, wobei wir mit dem ersten die Michaelis-Konstante für die Reaktion von  $\beta$ -Galactosidase und Chlorophenol-Red- $\beta$ -D-Galactopyranosid extrahieren und mit dem zweiten die metabolische Aktivität einer Population von HL-60-Zellen auf der Ebene einzelner Zellen messen.

Das letzte Kapitel befasst sich mit Strategien zur Verbesserung der Nachweisgrenze für Absorptionsmessungen in tröpfchenbasierten mikrofluidischen Systemen. Darüber hinaus demonstrieren wir die Verwendung von DDPI, um die schnelle zweistufige Oxidationsreaktion von Metmyoglobin durch Wasserstoffperoxid in Tröpfchen zu messen, indem wir die Änderung des molekularen Absorptionskoeffizienten des nativen Proteins verfolgen.