

DISS. ETH NO. 26848

***Microfluidic Formation of Artificial Cell  
Membranes and Compartments for Permeation  
Studies and Cascade Reactions***

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

presented by

SIMON BACHLER

MSc in Pharmaceutical Sciences, University of Basel

BSc in Life Science Technologies, FHNW

Konstrukteur EFZ

born on 11<sup>th</sup> January 1989

citizen of Stäfa (ZH)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Petra S. Dittrich (Examiner, ETH Zurich)

Prof. Dr. Stefanie D. Krämer (Co-Examiner, ETH Zurich)

Prof. Dr. Martin Kuentz (Co-Examiner, FHNW)

2020

# Abstract

Lipid membranes serve as dynamic boundaries between the extracellular environment and the cytosol, allowing cells to compartmentalize their biochemical functions. These lipid borders are effective barriers that maintain the composition and internal compartments of cells. Lipid membranes are selectively permeable to small molecules, enabling specific transport processes that control the selective passage of substances. In the field of bottom-up synthetic biology, lipid membranes are the scaffold to create minimal cells and to mimic reactions and processes at or across their membrane. Vesicles and droplet interface bilayers are generally used to study cells as simplified models, where microfluidic platforms can improve the creation and investigation of artificial cell membranes and their compartments. Using microfluidics, it is possible to control the experimental conditions more precisely than in bulk assays, and to generate artificial membranes that are very close to the thickness and composition of cellular lipid membranes. The integration of artificial cells in microfluidic systems is still challenging and existing methods have some shortcomings.

The focus of this work was first to improve current platforms for the hydrodynamic trapping of vesicles created by swelling or electroformation. We used microfluidic devices to study the interaction of both peptides and toxins with lipid membranes, observing their permeation, membranolytic effects, and pore formation. These artificial cells, however, were largely polydisperse and the encapsulation of substances remained challenging. We therefore developed a method based on microfluidic droplet arrays to address this issue, where droplets were precisely placed with a spotting device in close proximity on the surface of a plate with micro-fabricated cavities. Droplets were coated with a phospholipid monolayer and droplet interface bilayers formed when two or more droplets were brought into contact. These artificial cells were monodisperse, allowing straightforward encapsulation of substances, and enabling the tailoring of the membrane composition. We initially analyzed the artificial cell membranes and compartments through an integrated fluorescence microscope. Subsequently, we developed a protocol to separate and extract the droplets, and to interface our platform with label-free matrix-assisted laser desorption/ionization and liquid chromatography mass spectrometry analysis. Translocation of molecules across membranes was tailored by the addition of the pore-forming toxin alpha-hemolysin to selected droplets. Our method delivered the automated formation of one- and two-dimensional multi-compartmental droplet networks. We demonstrated the effectiveness of our approach by connecting droplets containing different compounds and enzyme solutions, and performing both translocation experiments and multistep enzymatic cascade reactions across the droplet network. Moreover, we investigated the permeation of molecules across the lipid membranes, an important component in drug

development to predict the absorption of substances. Example model permeants were added to donor droplets, and the permeation across symmetric and asymmetric lipid bilayer membranes to acceptor droplets was monitored. With this approach, we were able to identify the permeability coefficients.

Our platform has the potential to become a tool for the screening of drug membrane permeability in the future. The embedding of membrane proteins and the fusion of cell-derived vesicles with the membrane are feasible research directions. Finally, the platform may prove useful for other studies such as the three-dimensional assembling towards artificial cell colonies and creating complex artificial systems for bottom-up synthetic biology.

# Zusammenfassung

Lipidmembranen dienen Zellen als dynamische Barriere zwischen der extrazellulären Umgebung und dem Zytosol welches ihnen ermöglicht, ihre biochemischen Funktionen in Kompartimente zu unterteilen und diese aufrechtzuerhalten. Zellmembranen sind selektiv permeabel für kleine Moleküle und erlauben den Austausch von Substanzen durch spezifische Transportprozesse. Im Feld der synthetischen Biologie werden mithilfe von Lipiddoppelschichten vereinfachte Zellen und Kompartimente erzeugt, wodurch zellspezifische Reaktionen und Prozesse simplifiziert nachgestellt werden können. Dabei werden zum Beispiel Vesikel und spezifische Wasser-in-Öl Emulsionen zur Herstellung von Zellmodellen verwendet. Zur Untersuchung und Erzeugung von künstlichen Zellmembranen und -kompartimenten können mikrofluidische Systeme eingesetzt werden. Dies ermöglicht eine bessere Kontrolle von experimentellen Bedingungen im Vergleich zu konventionellen Versuchsaufbauten. Zudem können Modellzellmembranen generiert werden, welche ähnliche Dicken und Zusammensetzungen aufweisen, wie Lipiddoppelschichten von realen Zellen. Die Eingliederung von künstlichen Zellen in mikrofluidische Systeme ist auch zur heutigen Zeit eine Herausforderung und bestehende Methoden besitzen noch Schwachstellen, welche optimiert werden müssen.

Der Fokus dieser Doktorarbeit war zunächst, bestehende Methoden der Herstellung von Vesikeln und deren hydrodynamische Immobilisierung mittels mikrofluidischer Plattformen zu verbessern. Anhand derer wurde die Interaktion von Peptiden und Toxinen mit der Lipiddoppelschicht von Vesikeln untersucht. Dabei konnte deren Einfluss an verschiedenen Effekten, wie die Zerstörung der Membran, auftretende Permeation oder die Ausbildung von Poren beobachtet werden. Allerdings waren die künstlichen Zellen polydispers und die Einschliessung von Substanzen war eine Herausforderung. Aus diesem Grund haben wir eine mikrofluidische Methode entwickelt, welche auf Wasser-in-Öl Emulsionen basiert. Wassertropfen im Nanoliter-Bereich konnten unter Öl, spezifisch und genau, auf einer mit Kavitäten mikrostrukturierten Platte platziert werden, was eine Immobilisierung der Wassertropfen ermöglichte. Dem Öl wurden Phospholipide hinzugegeben, welche sich zu einer Lipidmonoschicht um die Wassertropfen anlagerten. Durch ein automatisiertes sehr nahes Platziere von zwei oder mehr Wassertropfen entstand ein Kontakt durch den sich aus der Lipidmonoschicht eine Lipiddoppelschicht bildete. Diese Modellzellen waren monodispers und erlaubten eine direkte Einkapselung von Substanzen, sowie eine einfache Anpassung der Membranzusammensetzung. Zunächst wurden die künstlichen Zellmembranen und -kompartimente durch ein integriertes Fluoreszenzmikroskop analysiert. Anschliessend wurde ein Protokoll entwickelt um die einzelnen Kompartimente zu separieren und zu

extrahieren. Die entnommenen Kompartimente konnten danach mit Label-freien Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation und Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung analysiert werden. Ein Transfer von Molekülen über die Membranen wurde durch die Ausbildung von Poren mithilfe des Toxins alpha-Hämolyisin, auf unsere Bedürfnisse zugeschnitten und gesteuert. Mit der entwickelten mikrofluidischen Methode war es möglich, automatisiert, ein- und zweidimensionale Netzwerke mit multiplen Kompartimenten zu formieren. In dem wir verschiedene Kompartimente, welche unterschiedliche Substanzen und Enzyme beinhalten, zu einem Verbund anordneten, konnte die Leistungsfähigkeit der Plattform demonstriert werden. Wir beobachteten zum einen den Transfer von Substanzen durch die Poren, und zum anderen war es möglich eine mehrstufige Kaskadenreaktion durchzuführen. Weiterführend untersuchten wir die Permeation von Molekülen über die Lipiddoppelschicht. Dies ist ein wichtiger Faktor in der Erforschung und Entwicklung neuartiger Arzneistoffe, und ermöglicht die intestinale Absorption von Substanzen abzuschätzen. Wir verwendeten Fluorophore als Beispielarzneimittel und untersuchten die Permeation von einem Kompartiment in das andere, durch symmetrische und asymmetrische Lipidmembranen. Dadurch war es möglich die Permeabilitätskoeffizienten zu ermitteln.

Unsere Plattform könnte in der Zukunft ein etabliertes Hilfsmittel werden, um die Permeabilität von Wirkstoffen im grösseren Massstab zu testen. Andere mögliche zukünftige Forschungsrichtungen wären Membranproteine einzubauen und die künstlichen Membranen mit Vesikeln (welche aus Zellenmembranen gewonnen wurden) zu fusionieren. Weiterführend, wäre die Plattform auch einsetzbar für die Formierung von dreidimensionalen künstlichen Zellnetzwerken und die Generierung von komplexen Systemen im Bereich der synthetischen Biologie.