

DISS. ETH NO. 22517

# Microfluidic Tools and Techniques for Artificial Cell Engineering

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZÜRICH

(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

**Dirk van Swaay**

Master of Engineering in Biomedical Engineering with a Year Abroad  
Imperial College of Science, Technology & Medicine

born on 05.01.1980  
citizen of Brazil and the Netherlands

accepted on the recommendation of

*Prof. Dr. Andrew de Mello, examiner*  
*Prof. Dr. Massimo Morbidelli, co-examiner*

2015

# Zusammenfassung

Die Arbeit befasst sich mit der Entwicklung mikrofluidischer Werkzeuge und Techniken zur Herstellung künstlicher Zellen. Es wurde eine „flow focusing“ Geometrie verwendet, um ein koazervierendes chemisches System zu etablieren und „Microdroplets“ zu erzeugen, welche dann weiter zu künstlichen Zellen verarbeitet werden. Die Arbeit ist in acht Kapitel gegliedert.

**Kapitel 1** beinhaltet eine Einführung in die Arbeit und einen Ausblick auf die nachfolgenden Kapitel. Nach einer allgemeinen Vorstellung künstlicher Zellen wird aufgezeigt, warum diese zu einem wichtigen Werkzeug in den Bereichen Biotechnologie und synthetischer Biologie werden. Des Weiteren werden die Herausforderungen, die mit dieser Technik und ihrer Anwendung einhergehen, benannt. Darüber hinaus enthält das Kapitel eine kurze Einführung in das Gebiet der Mikrofluidik und deren wichtigste Eigenschaften, Methoden und Techniken. Zum Schluss werden die wichtigsten Vorteile, der Verwendung mikrofluidischer Methoden beim Arbeiten mit künstlichen Zellen aufgezeigt.

In **Kapitel 2** wird die wissenschaftliche Literatur, welche sich mit der Produktion von Liposomen und künstlichen Zellen mittels mikrofluidischer Methoden beschäftigt, analysiert. Verschiedene Verfahren zur Erzeugung von Liposomen werden evaluiert, wobei der Fokus insbesondere auf den Charakteristiken Liposomengrösse, Grössenverteilung, Stabilität, Membranzusammensetzung Lamellarität, sowie von Anwendbarkeit und Verkapselungseffizienz liegt. Die Literatur-Recherche hat ergeben, dass bis heute keine einzige Methode in der Lage ist, alle genannten Parameter gleichzeitig zu optimieren.

**Kapitel 3** untersucht die Verwendung von Mikrofluidik zur Erzeugung von Protozellen mittels Koazervation. Es wurde ein iterativer Prozess bestehend aus Designing und Prototyping verwendet, um eine funktionierende mikrofluidische Plattform und ein kompatibles koazervierendes chemisches System zu entwickeln. Der verwendete Ansatz erzeugt eine fokussierte Strömung ohne die Verwendung von Düsen oder Kanalerweiterungen, wobei die benötigte hydrophobe Kanaloberfläche durch eine Beschichtung mit Perfluorooctyl Trichlorsilan (PFOS) erhalten wurde. Das koazervierende chemische System der Wahl ist eine Kombination aus Poly (diallyldimethylammoniumchlorid) (PDDA) und entweder Carboxymethyl Dextran (CM-Dextran) oder Adenosintriphosphat (ATP).

**Kapitel 4** befasst sich mit der Messung und Analyse von Tröpfchengrösse und Grössenverteilung, den Schlüsselparametern bei der Herstellung von künstlichen Zellen. Verschiedene Möglichkeiten zur Analyse von Video- und Bilddaten werden evaluiert. Die Analyse von Standbildern gesammelter Protozellen mit einem MATLAB-Algorithmus ist der bevorzugte Ansatz, da hiermit eine hohe Genauigkeit bei schneller Verarbeitungsgeschwindigkeit sowie der Vergleich von Daten zu verschiedenen Zeitpunkten möglich ist.

Aufbauend auf den Analysen der beiden vorangehenden Abschnitte zeigt **Kapi-**

**tel 5** die erfolgreiche und steuerbare Produktion von Koazervattröpfchen mit einer Mikrofluidik-Vorrichtung. Zusätzlich zeigen Studien, dass DNA erfolgreich in solchen Protozellen eingeschlossen werden kann. Durch die parallele Erzeugung zweier Populationen von Protozellen mit unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten DNA-Oligonukleotiden wird gezeigt, dass es kein Austausch von DNA-Material zwischen benachbarten Tröpfchen stattfindet.

**Kapitel 6** befasst sich mit der Frage bezüglich Schnittstellen zwischen Makro- und Mikroskala. Eine neuartige Verbindung zum Injizieren kleiner Probenvolumina in mikrofluidische Kanäle wird beschrieben. Die Schnittstelle wird verwendet, um externe Pumpen und Schläuche mit einer Mikrofluidik-Vorrichtung zu verbinden und enthält darüber hinaus eine leicht zugängliche integrierte Kammer, in die Proben kleiner als  $20 \mu\text{L}$ ; eingefüllt werden können. Dies war eine notwendige Entwicklung in diesem Projekt, welche die Verwendung von teuren und empfindlichen Reagenzien wie das in-vitro-Transkription und Translation (IVTT) kit ermöglicht, während Komplikationen, die typischerweise mit dem Einführen von Proben in Pumpen, Spritzen oder Schläuche verbunden sind vermieden werden können.

In **Kapitel 7**, wird die Bildung von de facto künstlichen Zellen demonstriert. Koazervattröpfchen welche DNA und IVTT Komponenten einschliessen werden hergestellt. Nach einer Inkubationszeit erzeugten diese künstlichen Zellen das fluoreszierende Protein mCherry. Sowohl Epifluoreszenz- als auch Konfokalmikroskopie wurden verwendet, um die erfolgreiche Genexpression nachzuweisen.

Abschliessend werden in **Kapitel 8**, die allgemeinen Schlussfolgerungen der Arbeit zusammengefasst und ein Ausblick für die künftige Forschung und Anwendung zur Verfügung gestellt.

# Summary

The thesis describes the development of microfluidic tools and techniques for engineering artificial cells. For this purpose, a microfluidic flow focusing geometry is used to process a coacervating chemical system and form micro-droplets, which are then further developed into artificial cells. The thesis is organized into eight chapters.

**Chapter 1** provides an introduction to the thesis and a description of the subsequent chapters. The chapter gives a general introduction to artificial cells, describes why they are becoming an important tool in the fields of biotechnology and synthetic biology and details the challenges associated with their engineering and application. **Chapter 1** also provides a brief introduction to the field of microfluidics, its key characteristics, methods, and techniques, and outlines the main benefits associated with its application in artificial cell engineering.

In **Chapter 2**, the scientific literature describing the formation of liposomes and artificial cells using microfluidic methods is reviewed. Different methods for forming liposomes are evaluated, with particular attention being paid to liposome size and size distribution, stability, membrane composition and lamellarity, applicability and encapsulation efficiency. This review highlights that, to date, no single method is able to optimize all these parameters simultaneously.

**Chapter 3** explores the application of microfluidic technology in the formation of protocells through the process of coacervation. Specifically, an iterative process of design and prototyping is used to develop a working microfluidic device and a compatible coacervate chemical system. The chosen device design employs a flow-focusing junction with no nozzle or channel expansion, and with channel surfaces rendered hydrophobic with perfluorooctyl trichlorosilane (PFOS). The coacervate chemical system of choice was a combination of poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA) and either carboxymethyl Dextran (CMDextran) or adenosine triphosphate (ATP).

**Chapter 4** addresses the measurement and analysis of droplet size and size distribution; key parameters in the production of artificial cells. Different methods for analyzing video and image data were evaluated. The analysis of still images of collected protocells using a custom MATLAB algorithm was the preferred approach due to its high accuracy, throughput and ability to make like-for-like comparisons between data obtained at different points in time.

Building upon developments in the two preceding chapters, **Chapter 5** demonstrates the successful and controllable formation of coacervate droplets using a microfluidic device. In addition, studies demonstrate that DNA can be successfully encapsulated within such protocells. By forming two distinct populations of protocells (in parallel) containing different fluorescently labeled DNA oligonucleotides, it is shown that there is no exchange of DNA material between neighbouring droplets.

**Chapter 6** addresses the issue of interfacing the macro- and micro-scales. A

novel connector used for injecting small-volume samples into microfluidic channels is described. The connector is used to interface external pumps and tubing with a microfluidic device, but also contains an easily accessible built-in chamber into which samples smaller than 20  $\mu\text{l}$  can be introduced. This was a necessary development in this project that enabled the use of expensive and delicate reagents such as the in-vitro transcription and translation (IVTT) kit without the complications typically associated with loading samples into pumps, syringes, or tubing.

In **Chapter 7**, the formation of *de facto* artificial cells is demonstrated. Coacervate droplets were formed encapsulating DNA and IVTT components. These artificial cells were then shown to produce the fluorescent protein mCherry after a period of incubation. Both fluorescence and confocal microscopy measurements are employed to establish successful gene expression.

Finally, in **Chapter 8**, the general conclusions of the studies are summarized, and an outlook for future work and applications is provided.