

DISS. ETH NO. 28296

Interfacial Rheometry: from Lipid Monolayers Towards Bilayers

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. Sc. ETH ZURICH)

presented by

DAMIAN RENGGLI

MSc ETH in Materials, ETH Zürich

born on 22.08.1991

citizen of Luzern LU, Switzerland

and Entlebuch LU, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Jan Vermant, (examiner, doctoral thesis supervisor)

Prof. Dr. Lucio Isa, (co-examiner)

Prof. Dr. Hans-Christian Öttinger, (co-examiner)

Prof. Dr. Todd Squires, (co-examiner)

2022

Abstract

This thesis investigates what is known as fluidity – or more precisely the interfacial rheology – of phospholipid bilayers and monolayers. Bilayers are of interest because they constitute the cell membrane and their fluidity is important in many biological processes for the physiology of the cell, e.g. cell homeostasis, cell signaling, and the formation of the metastatic cancer cells. Phospholipid monolayers have a relevance in itself, e.g. in lung surfactant functioning, and are used in this thesis as model material for a bilayer’s leaflet. First, operating windows for interfacial rheometry are developed. They enable the measurement of these materials with clean kinematics. In a second step, the interfacial rheology of these monolayers is evaluated at conditions to be relevant in biological applications and to be comparable to phospholipid bilayers.

Interfacial rheology becomes important when surface active species such as surfactants, particles or proteins are present in sufficient quantities at liquid-liquid interfaces and interact (laterally) between themselves. Interfacial rheometry is however challenging for various reasons. The mechanical response of the thin interface is often weaker compared to that of bulk materials, simply due to the smaller material volume probed, and so one is often measuring close to the lower force and torque limits of rheometers, hence signal to noise ratios merit close attention. Also the role of both instrument and sample inertia is more important for interfacial, compared to bulk rheometrical methods. Effects of misalignment and imperfections of the measurement geometries lead to effects of surface and line tension. Finally, peculiar for interfacial rheometry is the need to de-convolute the contributions of flow and deformation in the surrounding phases from that at the interface. Whereas some of these aspects have received attention in previous work, a clear and unambiguous view on the operating limits of interfacial rheometers has been missing. In the present work, we investigate the different experimental challenges and develop a generic methodology which provides a clear definition of the operating limits of various interfacial rheometers including the interfacial needle shear rheometer, the double wall ring and the bi-cone geometries. We validate this methodology by investigating the limitations defined intrinsically by the instrument as well as the ones emerging from the properties of the interface of interest for an interface composed of fatty alcohols which represents a challenging test-case. The results provide cautionary examples and clear guidelines for anyone measuring interfacial rheology with these direct rheological

techniques.

Langmuir monolayers of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) phospholipids at the liquid–liquid interface are investigated for their mechanical properties and phase behavior. DPPC monolayers undergo a phase separation between liquid expanded (LE) and liquid compressed (LC) phases because of the efficient packing of the fully saturated palmitic acid tails. The interface was thermally annealed before being compressed to relevant interfacial pressures to arrive at *thermally structured* interfaces due to the high melting temperature of the hydrophobic tails ($T_m = 42\text{ }^\circ\text{C}$). The interfacial needle stress rheometer (ISR) was upgraded with a custom built epi-fluorescent microscope to measure the small amplitude shear rheology and phase morphology of the phase separated monolayer *in situ*.

Interfacial rheology can be carefully measured within the operating windows and the influence of different bulk phases on the interactions between the lipid molecules is investigated. On the one hand, introducing a salt buffer as aqueous bulk phase to the liquid–air system reduces the repulsive dipolar interactions between the headgroups of the phospholipid moieties. As a consequence, compression isotherms show a negative hysteresis during compression and expansion isotherms, and the domains formed by the LC phases are less dendritic which is agreement with the theory by McConnell and coworkers [1]. On the other hand, adding an oil phase as upper bulk phase modifies the van der Waals interactions with oil molecules which most likely leads to a swelling of the interface. The interfacial viscosity increases by orders of magnitude because the lipids spread much better into the liquid expanded phase. Furthermore, relative elastic contributions to the complex interfacial viscosity are large and the interface is strongly viscoelastic with a limited linear regime.

The interfacial rheology of DPPC at water–air and temperatures of $20\text{ }^\circ\text{C}$ and below shows an increasing norm of the complex interfacial viscosity and an increasing elastic contribution with increasing interfacial pressure, hence the data agrees with Hermans et al. [2]. At higher temperatures, the ratio between viscous and elastic contributions does not depend on surface pressures in a systematic way any more. The same was observed for DPPC at interfaces with an upper oil bulk phase.

The fluorescent images revealed a strong deformation of the LC phases during the compression prior to the rheological measurements. This leads to a mixing of the LE

and LC phases which affects both the elastic contribution as well as the norm of the complex viscosity. In the case of water–air interfaces, the presence of “slip lines” or shear localized banding within the interface was observed. This demonstrates the necessity of preventing pre-shear of the interface during the compression of the interface to relevant surface pressures.

To simulate crowding of the interface, as e.g. by high concentration of embedded proteins in a lipid membrane, the complex interfacial shear viscosity is measured as a function of the area fraction of the solid-like LC phase. For this, suspended monolayers of phospholipid mixtures at a salt buffer–oil interface are investigated as a model material for one leaflet of a phospholipid bilayer. The interfacial pressure is comparable to those normally encountered in a phospholipid bilayer (30 mN m^{-1} to 40 mN m^{-1} [3]). The interface is carefully prepared to avoid pre-shear, by compression at high temperatures, where the LC phase is fully molten. The completely homogeneous monolayer is then cooled at constant interfacial area and undergoes a *temperature induced phase separation*.

The area fraction of the LC phase is varied by changing the temperature and adding the phospholipid and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), which is not able to form the LC phase, to DPPC. With this approach, the large deformation of LC phases and the emergence of shear banding reported previously can be prevented and the norm of the complex interfacial viscosity, as well as its elastic contribution, has a more intuitive dependence on interfacial pressure.

Furthermore, it is shown that the complex interfacial viscosity does not diverge at the highest area fractions of the LC phase (*i.e.* crowding of the interface) in contrast to what would be expected for a hard disk system. The presence of a finite interfacial compressibility of the LE phase could prevent the lubrication pressure from diverging. In bulk systems, the medium is always assumed to be incompressible, which makes it difficult to find a compressible analogue for interfacial systems. Furthermore, the mismatch in compressibility of the interface and the incompressible bulk phases does require complicated recirculating currents, orthogonal to the interface, or the presence of an as yet not measurable slip between the interface and bulk phases.

Preliminary data from microrheological experiments on free-standing and planar bilayers using the LAMBs setup, which was developed in our group [4], are acquired to compare the magnitude of the complex interfacial shear viscosity in phospholipid

monolayers and bilayers. The measured diffusion coefficients were found to be larger than predicted by the Saffman-Delbrück model, which describes the lateral diffusive motion of a cylinder embedded in an incompressible membrane. Further investigation is necessary to identify appropriate hydrodynamic models and to translate the insights on crowded phospholipid monolayer systems acquired in the presented work to bilayer systems.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird die Fluidität – oder Grenzflächenrheologie – von Phospholipid-Doppelschichten untersucht. Dieses Material ist von Interesse, weil es die Zellmembran bildet und seine Fluidität für viele biologische Prozesse wichtig ist, z.B. Zellhomöostase, Zellsignalisierung und die Bildung von metastatischen Krebszellen. Phospholipid-Monoschichten werden als Modellmaterial für eine Seite der Doppelschicht verwendet. Zunächst werden Betriebsfenster entwickelt, die es ermöglichen, diese Materialien mit sauberer Kinematik zu messen. In einem zweiten Schritt wird die Grenzflächenrheologie dieser Monoschichten unter relevanten Bedingungen gemessen, um mit Phospholipid-Doppelschichten zu vergleichen.

Die Grenzflächenrheologie wird wichtig, wenn oberflächenaktive Stoffe wie Tenside, Partikel oder Proteine in ausreichender Menge an Flüssig-Flüssig-Grenzflächen vorhanden sind und wechselwirken. Messungen der Grenzflächenrheometrie sind aus verschiedenen Gründen eine Herausforderung. Die mechanische Reaktion der dünnen Grenzfläche ist oft schwächer als die von Bulk-Materialien, so dass man oft in der Nähe der unteren Kraft- und Drehmomentgrenzen von Rheometern misst und das Signal-Rausch-Verhältnis grössere Aufmerksamkeit verdient. Auch die Rolle der Trägheit von Instrument und Probe ist bei der Grenzflächenrheometrie wichtiger als bei der Volumenrheometrie. Auswirkungen von Ausrichtungsfehlern und Unzulänglichkeiten der Messgeometrien führen zu Auswirkungen der Oberflächen- und Linienspannung. Eine Besonderheit der Grenzflächenrheometrie ist schliesslich die Notwendigkeit, die Beiträge des Fliessens und der Verformung in den umgebenden Phasen von denjenigen an der Grenzfläche zu trennen. Während einige dieser Aspekte in früheren Arbeiten bereits berücksichtigt wurden, fehlte bisher eine klare und eindeutige Aussage über die Einsatzgrenzen von Grenzflächenrheometern. In der vorliegenden Arbeit untersuchen wir die verschiedenen experimentellen Herausforderungen und entwickeln eine generische Methodik, die eine klare Definition der Betriebsgrenzen verschiedener Grenzflächenrheometer, einschliesslich des Grenzflächen-Nadelscherrheometers, des Doppelwandrings und der Bi-Konus-Geometrie, ermöglicht. Wir validieren diese Methodik, indem wir die durch das Instrument selbst definierten Grenzen sowie die Grenzen, die sich aus den Eigenschaften der interessierenden Grenzfläche ergeben, für eine aus Fettalkoholen bestehende Grenzfläche untersuchen, die einen schwierigen Testfall darstellt. Die Ergebnisse liefern warnende Beispiele und klare Richtlinien für alle, die die

Grenzflächenrheologie mit diesen direkten rheologischen Techniken messen.

Langmuir-Monoschichten aus 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC) Phospholipiden an der Flüssig-Flüssig-Grenzfläche werden auf ihre mechanischen Eigenschaften und ihr Phasenverhalten untersucht. DPPC-Monoschichten durchlaufen eine Phasentrennung zwischen flüssigen expandierten (LE) und flüssigen komprimierten (LC) Phasen aufgrund der effizienten Packung der vollständig gesättigten Palmitinsäureschwänze. Die Grenzfläche wurde vor dem Komprimieren auf relevante Grenzflächendrücke temperiert, um aufgrund der hohen Schmelztemperatur der hydrophoben Schwänze ($T_m = 42^\circ\text{C}$) zu *thermisch strukturierten* Grenzflächen zu gelangen. Das Grenzflächen-Nadel-scherrheometers (ISR) wird mit einem speziell angefertigten Epifluoreszenzmikroskop aufgerüstet, um die Scherrheologie mit kleiner Amplitude und die Phasenmorphologie der phasenseparierten Monoschicht *in situ* zu messen.

Die Grenzflächenrheologie wird innerhalb des Betriebsfensters sorgfältig gemessen und der Einfluss der verschiedenen volumetrischen Phasen auf die Wechselwirkungen zwischen den Lipidmolekülen untersucht. Einerseits reduziert die Einführung eines Salzpuffers als wässrige Bulkphase in das Flüssig-Luft-System die abstossenden dipolaren Wechselwirkungen. Infolgedessen zeigen die Kompressionsisothermen eine negative Hysterese bei Kompression, die LC-Phasen sind weniger dendritisch, was mit der Theorie von McConnell übereinstimmt, und die Phasen aggregieren. Andererseits können die Lipidmoleküle durch das Hinzufügen einer Ölphase als obere Massephase von der Waals-Wechselwirkungen mit Ölmolekülen eingehen, was zu einer Quellung der Grenzfläche führt. Die Grenzflächenviskosität nimmt um Größenordnungen zu, da sich die Lipide viel besser in der flüssigen expandierten Phase ausbreiten. Darüber hinaus ist der relative elastische Beitrag zur komplexen Grenzflächenviskosität gross und die Grenzfläche ist stark viskoelastisch mit einem begrenzten linearen Bereich.

Die Grenzflächenrheologie von DPPC bei Wasser-Luft und Temperaturen von 20°C und darunter zeigt eine zunehmende Norm der komplexen Grenzflächenviskosität und einen zunehmenden elastischen Beitrag mit zunehmendem Grenzflächendruck, so dass die Daten mit Hermans et al. [2] übereinstimmen. Bei höheren Temperaturen hängt das Verhältnis zwischen viskosen und elastischen Beiträgen nicht mehr systematisch von den Oberflächendrücken ab. Das Gleiche wurde für DPPC an Grenzflächen mit einer oberen Öl-Phase beobachtet.

Die Fluoreszenzbilder zeigten eine starke Verformung der LC-Phasen während der Kompression vor den rheologischen Messungen. Dies führt zu einer Vermischung der LE- und LC-Phasen, was sich sowohl auf den elastischen Beitrag als auch auf die Norm der komplexen Viskosität auswirkt. Im Fall von Wasser-Luft wurde das Vorhandensein von "Gleitlinien" oder Scherbändern an der Grenzfläche beobachtet. Dies zeigt, dass eine Vorscherung der Grenzfläche während der Kompression der Grenzfläche auf relevante Oberflächendrücke verhindert werden muss.

Um dichte Grenzfläche zu simulieren, wie sie z.B. durch eine hohe Konzentration von eingebetteten Proteinen in einer Lipidmembran entsteht, wird die komplexe Grenzflächenscherviskosität als Funktion des Flächenanteils der feststoffartigen LC-Phase gemessen. Dazu wurden Phospholipid-Monoschichten aus 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC) und 1, 2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC), die an einer Salzpuffer-Öl-Grenzfläche suspendiert sind, bei Grenzflächendrücken untersucht, die mit dem Zustand in einer Phospholipid-Doppelschicht (30 mN m^{-1} bis 40 mN m^{-1}) als Modellmaterial für eine Seite einer Phospholipid-Doppelschicht vergleichbar sind. Die Grenzfläche wird sorgfältig präpariert, um eine Vorscherung zu vermeiden, indem sie bei hohen Temperaturen komprimiert wird, bei denen die flüssige kondensierte Phase vollständig geschmolzen ist. Die vollständig homogene Monoschicht wird dann bei konstanter Grenzfläche abgekühlt und erfährt eine *temperaturinduzierte* Phasentrennung.

Der Flächenanteil der LC-Phase wird durch Änderung der Temperatur und Zugabe des Phospholipids DOPC variiert, das nicht in der Lage ist, die LC-Phase zu bilden. Mit diesem Ansatz kann die starke Verformung der LC-Phasen und das Auftreten von Scherbändern, über die zuvor berichtet wurde, verhindert werden, und die Norm der komplexen Grenzflächenviskosität sowie ihr elastischer Beitrag haben eine intuitivere Abhängigkeit vom Grenzflächendruck.

Darüber hinaus wird gezeigt, dass die komplexe Grenzflächenviskosität im Gegensatz zu einem Festplattensystem nicht als Funktion des Flächenanteils der LC-Phase (d.h. der Belegung der Grenzfläche) divergiert. Das Vorhandensein einer endlichen Kompressibilität der LE-Phase könnte verhindern, dass der Schmierungsdruck divergiert. In volumetrischen Systemen wird das Medium immer als inkompressibel angenommen, was es schwierig macht, ein kompressibles Analogon für Grenzflächensysteme zu finden. Ausserdem erfordert die unterschiedliche Kompressibilität der Grenzfläche und der inkompressiblen

volumetrischen Phasen komplizierte Zirkulationsströme orthogonal zur Grenzfläche oder Schlupf zwischen der Grenzfläche und den Bulk-Phasen.

Vorläufige Daten aus mikrorheologischen Experimenten an freistehenden und planaren Doppelschichten unter Verwendung des LAMBS-Aufbaus, der in unserer Gruppe entwickelt wurde [4], werden zum Vergleich der komplexen Grenzflächen-Scherviskosität in Phospholipid-Monoschichten und Doppelschichten herangezogen. Die gemessenen Diffusionskoeffizienten sind grösser als vom Saffman-Delbrück-Modell vorhergesagt, das die laterale Diffusionsbewegung eines in eine inkompressible Membran eingebetteten Zylinders beschreibt. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um geeignete hydrodynamische Modelle zu finden und die Erkenntnisse über überfüllte Phospholipid-Monoschichten auf Doppelschichten zu übertragen.