



Doctoral Thesis

Magnetic field assisted biomaterials processing

Author(s):

Beck, Paul

Publication Date:

2009

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005902030> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Dissertation ETH Number 18292

Magnetic Field Assisted Biomaterials Processing

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

Paul Beck

Dipl.-Ing. ETH Zurich

born March, 29, 1979

citizen of Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Erich J. Windhab, examiner

Prof. Peter Walde, Dr. Peter Fischer and Dr. Joachim Kohlbrecher, co-examiner

2009

Abstract

Within the scope of this work, a magnet rheometer laboratory was set up and used to investigate the influence of strong magnetic fields on biomolecular assemblies formed by two types of glycerol based lipids. The first was the triacylglyceride mixture of cocoa butter, the second was phosphatidylcholine forming vesicles and bicelles. The experiments made in the magnet rheometer laboratory were complemented by SANS measurements under magnetic field, ^{31}P -NMR, differential scanning calorimetry (DSC), dynamic light scattering (DLS), and cryo transmission electron microscopy (cryo-TEM). Molecular assemblies are more promising to react to magnetic fields than individual molecules, because the randomizing thermal fluctuation, kT , is much larger than the magnetic energy acting on a single molecule.

The magnet rheometer set up consisted of a superconductive magnet with a shear cell in the bore. A rheometer was positioned above the magnet and connected to the shear cell over a prolonged shaft. A laser beam was passed through the shear gap and the intensity was logged.

In the first part of this work, the crystallization dynamics of cocoa butter under shear were investigated with and without magnetic field by monitoring the decrease of laser intensity as well as the increase in viscosity. Additionally, crystal transformation of unsheared samples with and without magnetic field was investigated with differential scanning calorimetry (DSC). At the conditions tested, no significant magnetic field effect on cocoa butter was found. Possible reasons are discussed.

The second part of this work deals with magnetic field effects on two different phospholipid structures, vesicles and bicelles. Phospholipids are amphiphilic molecules forming self-assembly systems in water and are important components of biological membranes. Vesicles are self-closed phospholipid bilayers with a spherical shape, and are used as a model system to study physico-chemical properties of lipid membranes. In particular lipid rafts and domain formation on vesicles have received a lot of attention in recent research. Bicelles, which have the shape of small disks, are usually formed by mixtures of long and short chain phospholipids and are of interest as membrane mimics for the study of membrane proteins with NMR-spectroscopy.

In this work magnetic fields were used as a structuring force on such phospholipid systems using paramagnetic lanthanide ions as magnetic handles. Different lipid mixtures in concentration of 15 mM were studied with SANS in magnetic fields of up to 8 T and temperatures from 2.5 °C to 30 °C. The same samples were analyzed with Cryo-TEM, and were frozen from two different temperatures (5 °C and 22 °C). Additional information was gained by ³¹P-NMR spectroscopy, DLS, and permeability measurements with and without magnetic fields of calcein, a water soluble fluorescence marker.

A number of different vesicle formulations was investigated. The basic sample consisted of a mixture of the phospholipid 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) and a chelator lipid, 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-ethanolamine-diethylene-triamine-pentaacetate (DMPE-DTPA) with complexed lanthanides. In addition to the commercially available DMPE-DTPA, two other chelator lipid were synthesized in house and used to form vesicles: 1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-ethanolamine-diethylene-triamine-pentaacetate (SOPE-DTPA), and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-ethanolamine-diethylene-triamine-pentaacetate (POPE-DTPA). Domain formation was observed on small unilamellar vesicles consisting of POPC and a chelator lipid, DMPE-DTPA with complexed lanthanides. Lipid segregation was temperature dependent and the solid domains were orientable in magnetic fields. Parallel orientation of the domain normal to the magnetic field was observed if thulium was used and perpendicular orientation if dysprosium was used. The orientation of phospholipid domains could help to examine such domains with SANS without the need of chain-deuterated phospholipids.

One formulation consisting of a mixture of 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) and DMPE-DTPA with complexed lanthanides did not yield vesicles, but formed bicelles. The bicellar system reported here formed without the need of a short chain lipid to cover the edges. In order to obtain bicelles with a diameter of about 40 nm, extrusion through membranes with a pore size of 100 nm was important. Cooling the sample for several hour to about 5 °C caused an increased monodispersity of the bicelle size. It is assumed that DMPC builds the planar center of such bicelles, whereas DMPE-DTPA with a complexed lanthanide forms the highly curved edge of the disk, due to the large head group of this molecule. SANS fits with a model for partly aligned flat cylinders indicate that bicelles containing thulium are slightly orientable in a magnetic field of 8 T with the bilayer normal parallel to the magnetic field.

Kurzfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Magnet-Rheometer-Labor aufgebaut und verwendet, um den Einfluss starker Magnetfelder auf Biomoleküle zu untersuchen. Es wurden Versuche mit zwei verschiedenen Arten von Glycerin-basierten Lipiden durchgeführt. Als Erstes wurde ein Gemisch von Triacylglyceriden in der Form von Kakaobutter und als Zweites Vesikel und Bicellen bestehend aus Phosphatidylcholin untersucht. Die Experimente, welche mit dem Magnet-Rheometer durchgeführt wurden, wurden ergänzt durch Kleinwinkel-Neutronenstreuung im Magnetfeld (SANS), ^{31}P -NMR-Spektroskopie, Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC), Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Cryo-TEM). Magnetfelder haben praktisch keinen Einfluss auf einzelne Moleküle, da die thermische Fluktuation, kT , viel höher ist als die magnetische Energie des Einzelmoleküles. Aus diesem Grund wurden Molekülaggregate untersucht.

Der Magnet-Rheometer-Aufbau besteht aus einem Supraleitmagneten mit einer Scherzelle in der Bohrung. Ein Rheometer wurde über der Magnetbohrung positioniert und über einen verlängerten Schaft mit der Scherzelle verbunden. Ein Laserstrahl passiert den Scherspalt und die Intensität wird aufgezeichnet. Als Erstes wurde die Kristallisationskinetik von Kakaobutter unter Scherung mit und ohne Magnetfeld untersucht, indem die Abnahme der Laserintensität, sowie die Zunahme der Viskosität über der Zeit verfolgt wurde. Zusätzlich wurde die Umkristallisation von Kakaobutter mit und ohne Magnetfeld mit DSC untersucht. Unter den untersuchten Bedingungen wurde kein signifikanter Effekt des Magnetfeldes beobachtet. Mögliche Gründe dafür werden diskutiert.

Der zweite Teil dieser Arbeit behandelt Magnetfeld-Effekte auf Phospholipid-Strukturen. Phospholipide sind amphiphile Moleküle, die sich in Wasser zu Aggregaten zusammenlagern und den Hauptbestandteil von biologischen Membranen ausmachen. Zwei Arten von Phospholipid-Aggregaten- Vesikel und Bicellen- wurden in dieser Arbeit untersucht. Vesikel sind in sich geschlossene Lipid-Doppelschichten, die als Modellsysteme zur Untersuchung der physikalisch-chemischen Eigenschaften von Lipidmembranen dienen. Insbesondere die Domänenbildung in Vesikeln findet grosse Beachtung in der aktuellen Forschung. Bizellen sind scheibenförmige Phospholipidaggregate, welche in der Regel aus einer Mischung kurz- und langkettiger Phospho-

lipide bestehen. Sie werden in der NMR-Spektroskopie als Membranimitation zur Untersuchung von Membranproteinen verwendet.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob magnetische Felder solche Phospholipidsysteme, versetzt mit paramagnetischen Lanthaniden, beeinflussen können. Verschiedene Lipidmischungen in einer Konzentration von 15 mM wurden mit Kleinwinkelneutronenstreuung (SANS) in einem magnetischen Feld von bis zu 8 T und Temperaturen von 2.5°C bis 30°C untersucht. Von den selben Proben wurden Cryo-TEM-Aufnahmen gemacht, wofür die Proben bei zwei verschiedenen Temperaturen (5°C und 30°C) eingefroren worden waren. Zusätzliche Informationen wurden durch Permeabilitätsmessungen mit und ohne Magnetfeld, ³¹P-NMR Spektroskopie und DLS gewonnen.

Es wurde eine Reihe von Vesikel-Formulierungen untersucht. Die Grundformulierung war Vesikel bestehend aus den Phospholipiden 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (POPC) und 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamin-Diethylentriaminpentaessigsäure (DMPE-DTPA). Zusätzlich zum käuflichen Chelator-Lipid DMPE-DTPA wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei weitere Chelator-Lipide synthetisiert und für die Herstellung von Vesikeln verwendet: 1-Stearoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamin-Diethylentriaminpentaessigsäure (SOPE-DTPA) und 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamin-Diethylentriaminpentaessigsäure (POPE-DTPA). In Vesikeln bestehend aus POPC und DMPE-DTPA mit komplexierten Lanthaniden wurde Domänenbildung beobachtet. Die Domänen bildeten sich durch temperaturabhängige Lipid-Entmischung und waren in magnetischen Feldern orientierbar. Mit komplexiertem Thulium war die Orientierung der Domänen-Normalen parallel, mit Dysprosium senkrecht zum magnetischen Feld. Diese Orientierung von Phospholipid-domänen könnte deren Untersuchung mit SANS vereinfachen, weil auf den Einsatz von deuterierten Lipiden verzichtet werden kann.

Eine der untersuchten Formulierungen, eine Mischung aus DMPC und DMPE-DTPA mit komplexierten Lanthaniden, bildete keine Vesikel, sondern Bizellen. Dieses bizelläre System benötigt keine kurzkettigen Lipide, um die Ränder abzudecken. Für die Herstellung entscheidend war eine Extrusion durch Membranen mit einer Porengröße von 100 nm. Eine mehrstündige Abkühlung der Probe auf 5°C führte zu einer erhöhten Monodispersität der Bizellengröße. Es wird vermutet, dass DMPC das planare Zentrum der Bizellen bildet, während sich DMPE-DTPA mit komplexierten Lanthaniden aufgrund der grossen Kopfgruppe in den stark gekrümmten Rändern befindet. SANS-Kurven konnten mit einem Modell für teilweise ausgerichtete flache Zylinder gefittet werden. Dies zeigt, dass Bizellen mit Thulium in einem magnetischen Feld von 8 T leicht orientiert sind, mit der Flächennormalen parallel zum magnetischen Feld.