

Vloeibare patronen

Hoe vindt fasescheiding plaats in complexe geometrieën?

Fasescheiding is een manifestatie van een faseovergang die alomtegenwoordig is in de natuur. Alledaagse voorbeelden van fasescheiding zijn de wolken aan de hemel of de druppeltjes olie in vinaigrette. Het lijkt een zeer eenvoudig proces. Toch weten wij nog steeds niet hoe fasescheiding plaatsvindt in complexe omgevingen. Bijvoorbeeld in biologische systemen waarin allerlei tweedimensionale structuren met verschillende vormen aanwezig zijn. Wij stellen daarom de volgende vraag: hoe beïnvloedt geometrie fasescheiding? Om dit mysterie op te lossen hebben wij interdisciplinair onderzoek uitgevoerd en nieuwe technologieën zoals 3D-microprinten toegepast. Wij hebben de fysische kenmerken ontdekt van gebogen vloeibare patronen en beschrijven een nieuwe membraantoestand, de antigemengde toestand.

Fasescheiding: van natuurkunde tot biologie

Fasescheiding in vloeistoffen en vloeistofmengsels treedt op bij de overgang van één naar meerdere naast elkaar bestaande vloeibare toestanden. Het is een verschijnsel dat plaatsvindt op een breed spectrum van lengteschalen, zowel in de klassieke natuurkunde als in de quantummechanica. Een voorbeeld op de nanometerschaal is de fasescheiding van de elektronische vloeistof die cruciaal is in supergeleiders. Op een grotere schaal, die van kilometers, kun je denken aan de dodelijke olievlekken die op oceanen drijven. Deze olievlekken kunnen niet met water mengen en vormen daarom een dun laagje op het oppervlak. Hetzelfde verschijnsel kun je zelf ook zien als je vinaigrette bereidt of als je een lavalamp aanzet. De reden voor de fasescheiding is dat oliemoleculen hydrofoob zijn, daarom willen ze niet dicht bij watermoleculen komen. Ze vormen ronde druppels omdat een bolletje de kleinst mogelijke oppervlakte heeft voor een gegeven aantal moleculen. In twee dimensies geldt net zo dat een cirkel voor een gegeven oppervlak de omtrek minimaal maakt, zie figuur 1a. Dit fenomeen heet 'minimalisatie van de lengte van het grensvlak'. De scheiding van water en olie kan natuurkundig beschreven worden door de thermodynamica van vloeistofmengsels waaraan Josiah Willard Gibbs [1] en Johannes Diderik van der Waals [2] aan het einde van de negentiende eeuw een grote bijdrage hebben geleverd. In hun klassieke beschrijving wordt fasescheiding gekarakteriseerd

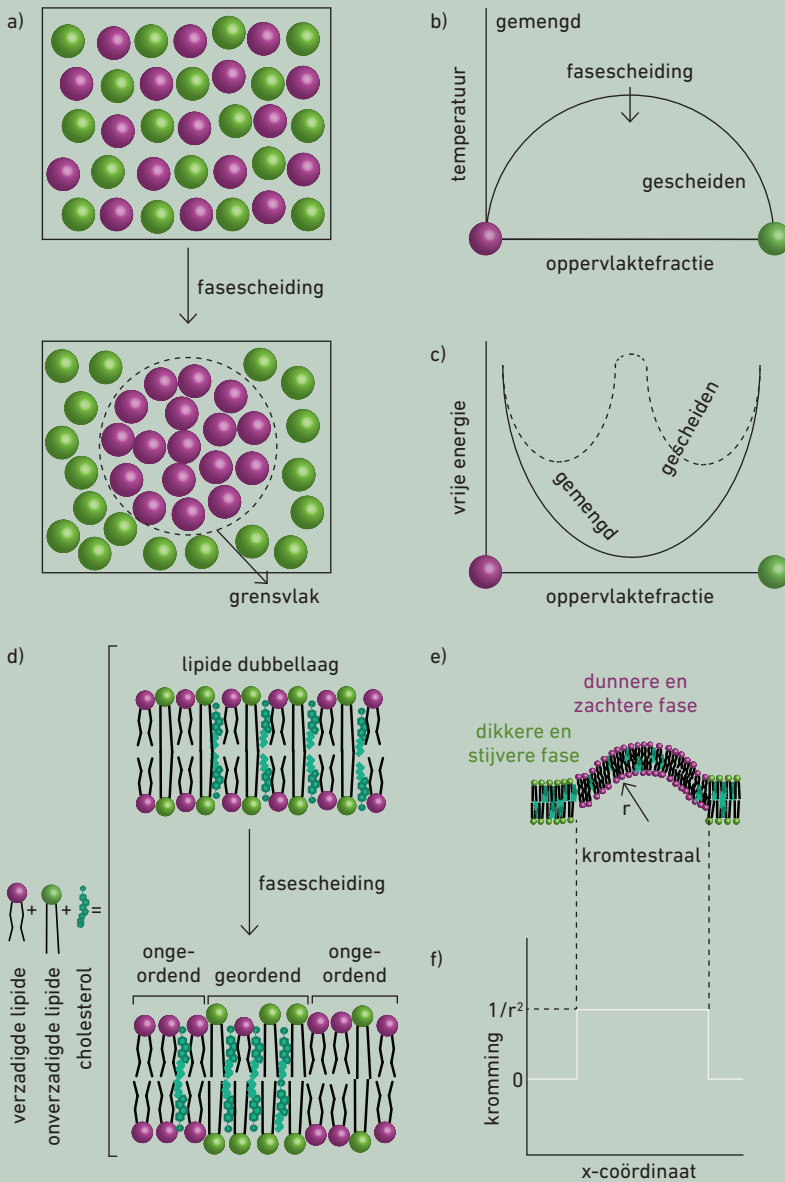
door een fasediagram dat laat zien of een mengsel gemengd of gescheiden (ontmengd) is bij een bepaalde temperatuur en fractie moleculen, zie figuur 1b. De samenstelling van de gemengde en gescheiden fasen komt overeen met minima van de vrije energie, zie figuur 1c. Rond diezelfde tijd raakten ook biologen geïnteresseerd in fasescheiding. William Bate Hardy schreef dat globuline, een type eiwit, zich kan scheiden van water. Hij stelde het concept van fasescheiding voor als een organisatorisch mechanisme in de biologie. Meer dan honderd jaar later is fasescheiding een onderwerp dat steeds meer aandacht trekt in de biologie. Het is aangetoond dat fasescheiding moleculen en biochemische reacties overal in cellen, van de kern tot het cytoplasma, kan lokaliseren [3]. Dat is cruciaal voor de normale processen in cellen, maar ook de oorzaak van verschillende ziektes, bijvoorbeeld alzheimer, kanker en parkinson.

Lipidemembranen als tweedimensionale vloeistoffen

Fasescheiding kan ook optreden in tweedimensionale biologische systemen, zoals lipidemembranen. In een lipidemembraan assembleren lipiden zich in dubbellen. Deze dubbellen zijn in feite tweedimensionale vloeistoffen, die zichzelf kunnen scheiden in twee fasen. In figuur 1d wordt een schema van een kunstmatig lipidemembraan getoond. Het membraan bestaat uit drie soorten lipiden, verzadigde en onverzadigde vetzuren en cholesterol. De lipiden zijn willekeurig verdeeld bij



Melissa Rinaldin studeerde natuurkunde aan de Università di Padova (Italië). In 2019 promoveerde zij aan de Universiteit Leiden op het proefschrift: *On the geometry of demixing*. Daarna ging zij naar Brandeis University (Verenigde Staten) en sinds oktober werkt zij als postdoc aan het Max-Planck-Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik in Duitsland. Voor haar postdoctoraal onderzoek kreeg zij een Human Frontier of Science-beurs. rinaldin@mpi-cbg.de



Figuur 1. a) Bovenaan staat de gemengde fase waarin groene en magenta moleculen willekeurig zijn gerangschikt. Onder scheiden de moleculen. De magenta moleculen bevinden zich in een cirkel die is aangeduid als grensvlak. b) Fasediagram van een mengsel van twee vloeistoffen dat gemengde en gescheiden fasen afbeeldt. Fasescheiding gebeurt als je de zwarte dikke lijn oversteekt. c) Vrije energie als functie van de oppervlaktefractie van magenta moleculen. De minima van de functies komen overeen met de oppervlaktefractie van de gemengde fase (grijze lijn) en gescheiden fase (stippellijn). d) Mengsels van verzadigde en onverzadigde vetzuren en cholesterol kunnen zich scheiden in ongeordende en geordende fasen. e) De geordende fase is dikker, en dus stijver, dan de ongeordende fase. De dickere fase heeft voorkeur voor vlakke gebieden waar de kromming nul is (f).

hoge temperatuur, maar scheiden zich in twee fasen bij lage temperatuur. Belangrijk voor de mechanica is dat de ene fase meer geordend, dikker en daardoor stijver is dan de andere. Als het membraan vlak is, zal een van de twee fasen in de membranen een patroon van cirkels vormen. Voor gebogen membranen, zoals het geval is voor de langwerpige neuronen in hersenen en de schijfachtige rode bloedcellen, is het niet bekend welk patroon de twee fasen aannemen. De reden hiervan is dat de fasen verschillende stijfheden hebben. Om de elastische energie te minimaliseren verkiest de flexibele fase het gebied met hogere kromming, zie figuur 1e. Dit verschijnsel heet in het Engels *geometric pinning*, oftewel geometrisch vastzetten, en het moet concurreren met de minimalisatie van de lengte van het grensvlak.

Toch is het verhaal nog ingewikkelder. Als er fasescheiding optreedt, kan de vorm van het membraan veranderen door de combinatie van geometrisch pinning en minimalisatie van het grensvlak. De vorm van het membraan hangt dus af van de geometrie van de fasepatronen en vice versa. Deze verstrikking tussen fasepatronen en membraanvormen lijkt een beetje op het kip-en-eipprobleem. Om dit mysterie te ontrafelen, gebruiken wij kunstmatige membranen [5]. Kunstmatige membranen zijn handig omdat de lipidesamenstelling vrij kan worden gekozen en omdat hun fasescheiding kan worden gevisualiseerd met behulp van fluorescentiemicroscopie. Op deze manier kunnen de vorm en de locatie van de druppeltjes worden bestudeerd. Bovendien kunnen wij controle uitoefenen over de vorm van het membraan door gebruik te maken van een stellage van micrometerbollen, -kubussen en -halters, zie figuur 2a. Deze deeltjes – colloïden genaamd – hebben een doorsnede die honderd keer kleiner is dan die van een haar en worden gemaakt door middel van chemische synthese. Doordat de geometrie van een dergelijk membraan niet meer

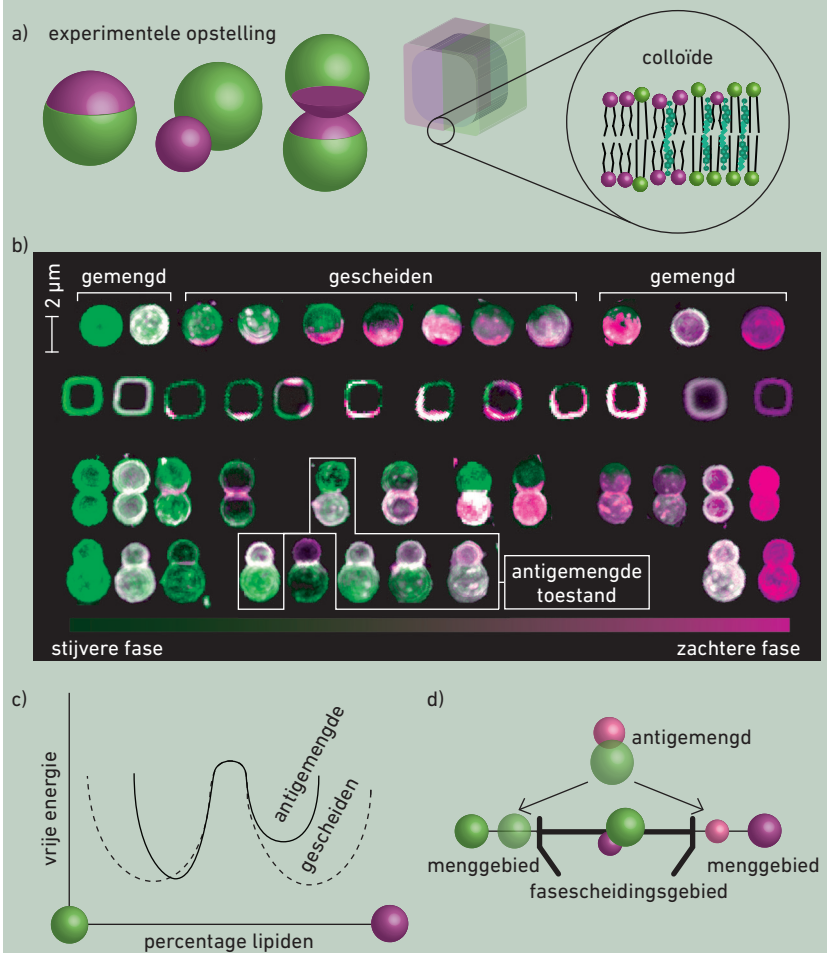
kan veranderen, kunnen wij bestuderen hoe de druppelvormen afhankelijk zijn van de samenstelling en geometrie van het membraan.

Lipidemembranen op deeltjes

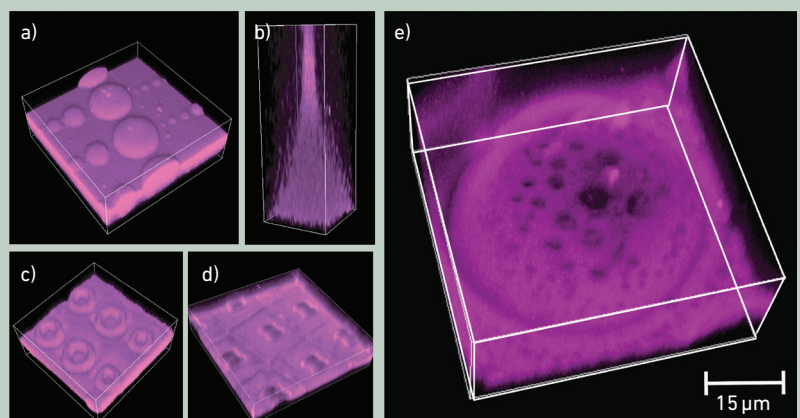
Om inzicht in de fasescheiding op gebogen oppervlakken te krijgen, hebben we een eendimensionaal fase-diagram opgesteld, zoals te zien is in figuur 2b. De fysische variabele in het diagram is het percentage lipiden dat behoort tot de zachtere fase. Deze fase wordt gevisualiseerd door een magenta kleurstof en de stijvere fase wordt gevisualiseerd in het groen. Laten we beginnen met bollen die een constante kromming hebben. Als we van links naar rechts over het diagram bewegen, zien we dat het membraan op de bollen gemengd is, dan gescheiden en uiteindelijk weer gemengd. Dit gedrag is te verwachten op basis van het fase-diagram in figuur 1b. Indien gescheiden, heeft het membraan op bollen twee druppels (figuur 2b, rij 1). Vanwege de constante kromming is de minimalisatie van het grensvlak de enige factor die een rol speelt. Deze situatie is hetzelfde als bij het voorbeeld van cirkelvormige olievlekken op water.

Kubussen hebben echter verschillende krommingen omdat ze hoeken en randen hebben. Op de tweede rij zien wij daarom dat het membraan op kubussen meer dan twee druppels heeft. Bovendien observeren wij in sommige gevallen dat de zachtere fase gelokaliseerd is op de hoek van de kubus. De reden hiervoor is dat de stijvere fase moeilijk te buigen is, deze fase heeft daarom een voorkeur voor het vlakke gebied. Het verrassendste verschijnsel vindt echter plaats in het membraan van de halteres. Op de derde rij van figuur 2b zijn er halteres die bestaan uit twee bollen met dezelfde straal. Indien er slechts een kleine hoeveelheid van de zachtere fase is, lokaliseert de zachtere fase op de nek, daar waar de kromming hoog is.

Bij een grotere hoeveelheid lipiden van de zachtere fase bestaat het



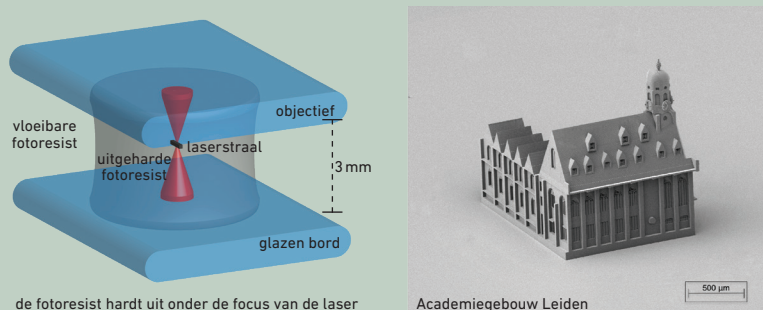
Figuur 2. a) Micrometerbollen, -kubussen en -halteres worden gefunctionaliseerd met een lipidemembraan dat ongeveer vier nanometer dik is. b) 3D-reconstructies van de membranen georganiseerd in een eendimensionaal fase-diagram. De bollen en kubussen kunnen gemengd of gescheiden zijn. Toch hebben halteres ook een antigemengde toestand. Deze toestand is de vereniging van twee gemengde bollen. c) Het verschil in kromming van de twee bollen verandert de positie van de minima van de vrije energie. d) Hierdoor verschuiven de minima uit het fasescheidingsgebied naar het menggebied.



Figuur 3. Lipidemembraan op a) halve bollen b) een gaussische bult, c) halve torussen en d) halve pindaoppervlakken. e) Gescheiden membraan op een halve bol. Hier is de stijvere fase in donker getoond.

3D-MICROPRINTEN

3D-printen is een nieuwe en opwindende technologie. Met deze techniek kan zo goed als elk 3D-object dat iemand kan bedenken, ontworpen worden op een computer en daarna een-op-een worden geprint. Op dit moment wordt 3D-printen niet alleen gebruikt in onderzoek, maar ook in de geneeskunde om protheses te fabriceren, in de bouwindustrie om goedkope huizen te bouwen en in kunst om sculpturen en juwelen te creëren. Zeer onlangs is 3D-printen uitgebreid naar de microschaal door gebruik te maken van twee-fotonpolymerisatie. Twee-fotonpolymerisatie is een fotochemisch proces waarin een femtoseconde-laserstraal door een objectief is gefocust op een vloeibare fotoresist (figuur 4 links). Een motor beweegt de positie van de laserstraal en de laserstraal verhardt blokjes fotoresist. Op deze manier kunnen structuren gemaakt worden met een resolutie van honderd nanometer. Rechtsonder kun je bijvoorbeeld een beeld zien van het academiegebouw van de Universiteit Leiden dat wij hebben ontworpen, geprint en daarna gevisualiseerd met een elektronenmicroscop (figuur 4 rechts).



Figuur 4. Links: diagram van het twee-fotopolymersatieproces zoals gebruikt voor het 3D-printen van microstructuren. Rechts: elektronenmicroscopisch beeld van een 3D-microprint van het Academiegebouw van de Universiteit Leiden.

membraan echter uit twee druppels. Dit betekent dat de hoeveelheid zachtere fase het fasescheidingspatroon bepaalt. Iets soortgelijks gebeurt ook in het membraan op de haltes die bestaan uit twee bollen met verschillende straal, de zogenaamde ‘sneeuwman’-vorm. In de derde en vijfde sneeuwman vanaf links lokaliseert de zachtere fase zich respectievelijk op de nek en op de bol met een kleinere straal (hogere kromming). Toch gebeurt er iets onverwachts. De zachtere fase beslaat niet grotere delen van de halter, zoals je wellicht wel zou verwachten. In plaats daarvan is de grotere bol een beetje groener en de kleinere bol is een beetje meer magenta. Oftewel: het membraan heeft hetzelfde meetkundige patroon maar een verschillende chemische samenstelling. We noemen dit nieuwe fenomeen de antigemengde toestand

omdat het een combinatie is van twee bollen die zich op antipoden, dat wil zeggen tegenoverliggende uiteindes, van het fasescheidingsgebied bevinden, zoals in figuur 2d. De verschillende krommingen van de twee bollen veranderen de positie van de minima van de vrije energie, wat resulteert in de antigemengde toestand, zie figuur 2c.

Nauwkeurig design van lipidemembranen

Wij hebben tot nu toe eenvoudige vormen zoals bollen en kubussen gebruikt om een fundamenteel fysisch inzicht te verkrijgen. Maar hoe zit het met de ingewikkelde vormen van cellen die in de introductie werden genoemd? Dergelijke complexe structuren kunnen niet worden geproduceerd door chemische synthese. Daarom hebben wij een nieuwe techniek gebruikt om mem-

branen met elke denkbare geometrie te verkrijgen: 3D-microprinten (zie kader). Micrometerstructuren die worden gemaakt met het behulp van microprinten vormen hier de stellingen voor het membraan. Doordat wij met microprinten vrijwel alle structuren kunnen bouwen, kunnen wij nieuwe en biofysisch interessante membraanvormen op een nauwkeurige manier verkrijgen, bijvoorbeeld gaussische bulten, tori en pindavormige oppervlakken (figuur 3a-d). Als we dan een fasescheidingsexperiment uitvoeren, zien we dat de stijvere fase zichzelf organiseert in cirkels, zie figuur 3e. Wij denken

“We 3D-printen gaussische bulten, tori en pindavormige oppervlakken”

dat de lipidemembranen op geprinte structuren onze kennis van cellulaire fenomenen die afhankelijk van geometrie zijn kunnen verbeteren. Bovendien kunnen deze oppervlakken worden gekoppeld aan levende cellen en nanostructuren om de weg vrij te maken voor nieuwe toepassingen op het gebied van biotechniek en materiaalkunde.

REFERENTIES

- 1 J. W. Gibbs, On the Equilibrium of Heterogeneous Substances, *Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences*, **3**, 343-524, (1876).
- 2 J. D. van der Waals, *Theory of Binary Solutions*, *Archives Néerlandaises* (1890).
- 3 A.A. Hyman, C. A. Weber en F. Jülicher, *Liquid-Liquid Phase Separation in Biology*, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **30**, 39-58 (2014)
- 4 S. Veatch en S. Keller, *Separation of Liquid Phases in Giant Vesicles of Ternary Mixtures of Phospholipids and Cholesterol*, *Biophysical Journal* **85**:5, 3074-3083 (2003).
- 5 M. Rinaldin, P. Fonda, L. Giomi en D. J. Kraft, *Geometric pinning and antimixing in scaffolded lipid vesicles*, *Nature Communications* **11**, 4314 (2020).