

Wege zu funktionalen Vesikelmembranen ohne Proteine

Von Jürgen-Hinrich Fuhrhop* und Joachim Mathieu

Die passende Anordnung von Reaktionspartnern zueinander in richtigen Abständen ist die strukturelle Voraussetzung für vektoriell ablaufende Reaktionen und Reaktionsketten. In biologischen Systemen, z. B. bei der photosynthetisch aktiven Thylakoidmembran oder den Membranrezeptoren, wird die Lage der Reaktionszentren durch Membranprotein-Komplexe festgelegt, über deren Struktur wenig bekannt ist. In synthetischen Vesikelmembranen sind geordnete reaktive Systeme erstmals durch Verwendung von Amphiphilen mit reaktiven Kopfgruppen als Bausteine, durch die regioselektive Einlagerung von Fremdmolekülen in die Membran, durch die Ausrichtung von Bola-Amphiphilen mit zwei Kopfgruppen unterschiedlicher Löslichkeit oder Größe sowie durch Domänenbildung erhalten worden. Auch chirale Überstrukturen in Membranen konnten beobachtet werden, und es gelang, stereoselektive Reaktionen in Vesikelmembranen durchzuführen. Dieser Fortschrittsbericht schließt mit einer Diskussion über Membranen aus nicht-amphiphilen Bausteinen und einer Erörterung ungelöster Probleme.

1. Einleitung

Als Vesikel (lat. *vesicula*, Bläschen) wird eine geschlossene, oft kugelförmige Membran extrem geringer Schichtdicke ($\leq 10 \text{ nm}$) bezeichnet, die einen wäßrigen Innenraum (Volumen etwa $1\text{--}1000 \mu\text{m}^3$) einschließt. Synthetische Vesikel, die durch Aggregation eines einzigen Amphiphils entstehen, können als extrem vereinfachte Modelle hochorganisierter und multifunktionaler biologischer Zellen aufgefaßt werden^[1,2]; seit etwa sieben Jahren wird versucht, ihnen einzelne Eigenschaften von Zellen aufzuprägen. In unserem Übersichtsartikel stellen wir neuartige, reaktive Vesikel ohne Proteine vor, mit denen sich einzelne strukturelle und dynamische Eigenschaften biologischer Zellen nachahmen oder modifizieren lassen sollten.

Zunächst sollen jedoch die Struktureinheiten von biologischen Membranen kurz charakterisiert und deren Wechselwirkungen sowie Funktionsweisen anhand von Modellen erörtert werden. Dabei wird sich zeigen, daß die interessanten Charakteristika von Membranreaktionen (vektoriell, selektiv, schnell) auf zwar beobachtbare, aber unverstandene Eigenschaften von Membranproteinen zurückzuführen sind. Zur Überleitung zum Thema „Synthetische Vesikel“ skizzieren wir dann die Herstellung und die Eigenschaften von proteinfreien Vesikeln aus Phospholipiden. Anschließend werden wir im Hauptteil dieses Beitrags nur diejenigen Eigenschaften von synthetischen Vesikeln betrachten, die man bei Phospholipid-Vesikeln nicht findet.

Biologische Zellmembranen bestehen aus einer molekularen Doppelschicht (bilayer lipid membrane, BLM) von Lipiden (Phospholipide, Glycolipide) und aus Proteinen. Nach dem „fluid mosaic“-Modell von Singer und Nicolson^[3] (vgl. Abb. 1a) bilden die Lipide eine Matrix mit flüssigen und flüssigkristallinen Bereichen, deren hydrophobes Zentrum von Proteinen durchspannt wird („integrale

Proteine“). Proteine, die an den hydrophilen Kopfgruppen angelagert sind („peripherie Proteine“), können von der Zellmembran z. B. durch eine Änderung des pH-Werts reversibel abgelöst werden. Integrale Proteine können aus der Membran unter Erhaltung ihrer biologischen Aktivität nur durch Einwirkung von Detergentien isoliert werden. Die Membran wird dabei zerstört. Integrale Proteine zeichnen sich in der Membran auch dadurch aus, daß sie von wasserlöslichen Reagentien, z. B. Hydrolasen, nicht oder nur partiell angegriffen werden, während peripherie Proteine dem Angriff voll ausgesetzt sind. Die Gesamtheit der hydrophoben Lipid- und Proteinanteile bildet eine vom Wasser streng abgetrennte Phase, obwohl die Abstände zur wäßrigen Umgebung nur wenige Ångström betragen. An der äußeren Zellmembranoberfläche befinden sich häufig Oligosaccharid-Ketten von integralen Glycoproteinen, die für (stereo-)selektive Wechselwirkungen mit in Wasser gelösten Substanzen zuständig sind. Auch zwischen den Proteinen und der Lipidmatrix bestehen selektive Wechselwirkungen; so werden vorwiegend negativ geladene Phospholipide (z. B. Phosphatidylserin) eng an Membranproteine gebunden und bilden „Domänen“ in elektroneutralen Phospholipid-Membranen (vgl. Abb. 1).

Die Funktionen der biologischen Membranen entsprechen den Lebensvorgängen der Zelle: Umwandlung der Sonnenenergie in chemische Energie (Photosynthese), selektive Aufnahme von Naturstoffen (Nahrungsaufnahme), Erzeugung von elektrischen Potentialen und Impulsen (Nervenerregung, Bewegung), Informationsaustausch mit der Umgebung (Rezeptorwirkung) etc. Der Verlauf biologischer Reaktionen an Membranen soll an zwei Modellen deutlich gemacht werden: erstens der Rezeptorwirkung von chiralen Membranoberflächen und zweitens der lichtinduzierten Ladungstrennung an unsymmetrischen Membranen.

1) Das „fluid mosaic“-Modell der Reaktion eines Membranrezeptors mit einem Peptidhormon (Abb. 1a, b) verdeutlicht die Größenverhältnisse und die Beweglichkeit der Membranbausteine^[3]. Abbildung 1a zeigt die BLM mit einer Lipiddomäne um drei integrale Glycoproteinmoleküle, ein peripheres Proteinmolekül sowie ein sich näherndes

[*] Prof. Dr. J.-H. Fuhrhop, Dipl.-Chem. J. Mathieu
Institut für Organische Chemie der Freien Universität
Takustraße 3, D-1000 Berlin 33

Peptidhormon („Signalmolekül“). Die Oligosaccharid- und Proteinketten an der äußeren Membranoberfläche entsprechen langen, beweglichen Armen, die wassergelöste Substanzen aufnehmen können. Diese „Arme“ bestehen aus vielen chiralen Strukturen und bilden das hochspezifische Bindungszentrum des Rezeptors. Die Anlagerung des Signalmoleküls („Membranligand“) an den Rezeptor (Abb. 1b) verändert die Lage der Rezeptorproteine und ihre Tertiärstrukturen. Das „Signal“ wird so mittels der integralen Proteine durch die Membran geleitet („allosterischer Effekt“) und kann an der inneren Oberfläche Folgereaktionen auslösen, z. B. die Aggregation von Actin-Einheiten zu fibrillären Strängen.

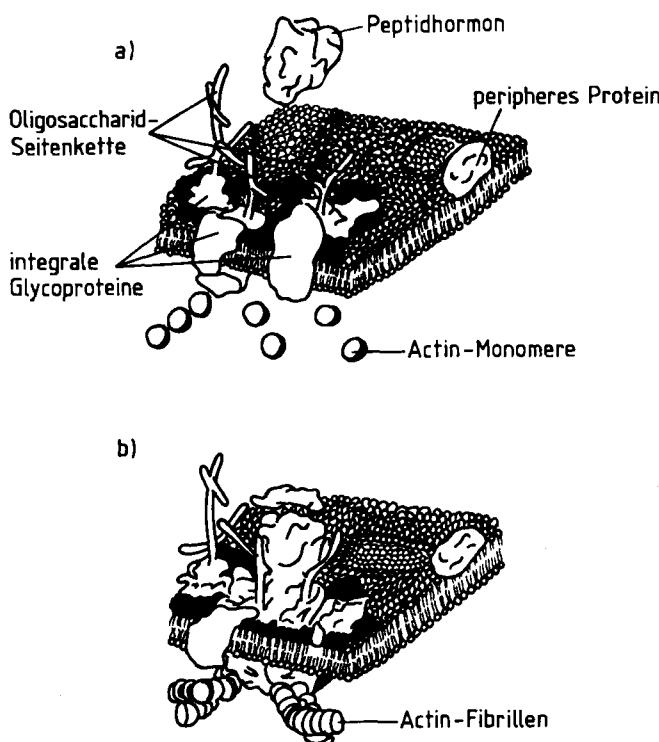
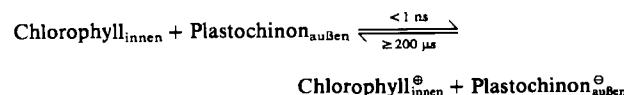


Abb. 1. a) „Fluid mosaic“-Modell eines Membranrezeptors. - b) Die Anlagerung eines Peptidhormons („Signalmolekül“) führt zur Umorientierung der Rezeptorproteine innerhalb einer „Domäne“ der Membran. Das bewirkt Folgereaktionen im Inneren der Zelle (hier: Aggregation von Actinmolekülen). Die molekularen Wechselwirkungen zwischen Signalmolekül und Rezeptorprotein, innerhalb des Rezeptorprotein-Komplexes und zwischen Rezeptorprotein und Actin-Einheiten sind im Detail nicht geklärt [3b].

2) Das schematische Modell der lichtgetriebenen Spaltung von Wasser in Wasserstoff und Sauerstoff, des wichtigsten Teilprozesses der pflanzlichen Photosynthese, umfaßt mehrere Reaktionsketten, deren primäres Resultat die Anreicherung von Elektronen auf der äußeren Membranoberfläche und von Protonen im inneren Wasservolumen einer Pflanzenzelle ist („lichtinduzierte Ladungstrennung“)^[4]. Eine Teilreaktion ist in Abbildung 2 skizziert. Ein durch sichtbares Licht angeregtes Chlorophyll-Molekül an der Innenseite der Membran gibt ein Elektron in weniger als 1 ns über ein benachbartes Phäophorbid-Molekül an ein Plastoquinon-Molekül (X320) an der äußeren Membranseite ab.



Dieser Elektronentransfer ist gerichtet: er läuft nur von innen nach außen ab. Die drei nachgewiesenen Reaktionszentren (Chlorophyll, Phäophorbid, X320) sind in einem Lipoprotein (Molekulargewicht 47000) gebunden und wahrscheinlich während der photochemischen Ladungstrennung in ihrer örtlichen Lage und gegenseitigen Ausrichtung weitgehend fixiert. Das gilt als notwendige Voraussetzung für vektoriell ablaufende Prozesse. Wenigstens zwei weitere Proteine übernehmen den weiteren Elektronentransport und unterbinden die langsame Rückreaktion ($\geq 200 \mu\text{s}$). Ein Chinon-Anion wird schließlich von der äußeren Wasserphase protoniert und ein Proton über einen Plastoquinon-Pool durch die Membran in das innere Wasservolumen transportiert.

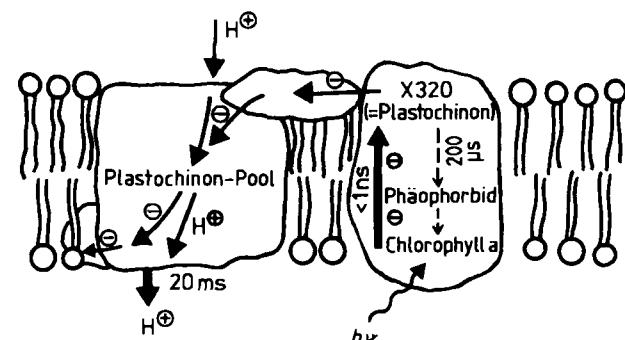
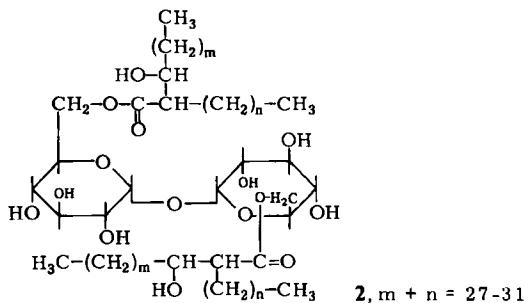
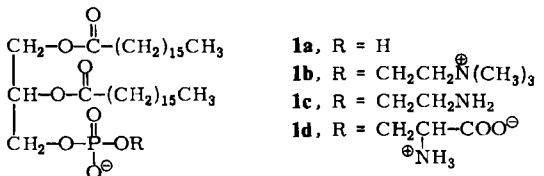


Abb. 2. Ausschnitt eines Modells für das Reaktionszentrum II der Photosynthese. Der schnellen lichtinduzierten Ladungstrennung folgt der langsamere Protonentransport durch die Membran. Über die molekularen Ursachen des vektoriellen Ablaufs (Hinreaktionen viel schneller als Rückreaktionen) ist kaum etwas bekannt.

Die selektive Adsorption von gelösten Molekülen an reaktive Zentren und deren Signalwirkung für das Ablauen von Folgereaktionen sowie die räumliche und zeitliche Organisation von Reaktionszentren und die dadurch erzielte Ausrichtung reversibler Prozesse sind faszinierende Phänomene, die in unbekannter Weise von mehreren zusammenwirkenden Membranproteinen ermöglicht werden und für die es nur wenige, unvollkommene synthetische Analoga gibt.

Im Vergleich zu den schnell und selektiv reagierenden Proteinen sind die Lipidaggregate mehr oder weniger ein chemisch inertes Füllmaterial; sie wirken vor allem als Trennschicht zwischen zwei wäßrigen Phasen und als Lösungsmittel für hydrophobe Proteinanteile. Deshalb waren proteinfreie Vesikeln bisher vor allem Studienobjekte physikalisch orientierter Chemiker^[1]. Die Ergebnisse dieser Arbeiten seien in sechs Punkten zusammengefaßt:

1. Phospholipide (wie 1a-d) oder ähnliche wasserunlösliche amphiphile Naturstoffe wie 2^[5] aggregieren in Wasser zu Doppelschicht-Flüssigkristallen, die sich bei Ultrabeschallung zu kugelförmigen Vesikeln umlagern (Abb. 3). Naturstoffvesikeln heißen auch Liposomen („Fettkörperchen“).
2. Die BLMs der Liposomen sind extrem dünn (Schichtdicke $\approx 5 \text{ nm}$).
3. Die Vesikeln sind langlebig (Stunden oder Tage), sie können chromatographiert und zentrifugiert werden.
4. Die Membran wirkt als effiziente Barriere für wasserlösliche Stoffe, ist für Wasser selbst aber durchlässig (osmotische Aktivität).



5. Wasserunlösliche Verbindungen, z.B. unpolare Farbstoffe, können in der Vesikelmembran aufgelöst werden.
 6. Chemisch einheitliche Vesikelmembranen zeigen reversible Phasenübergänge flüssig \rightleftharpoons flüssigkristallin meist im Temperaturbereich von 20 bis 50°C.

Nach unserer Einschätzung sind weder die Membranproteine noch die Phospholipide zukunftsweisende Forschungsthemen der Organischen Chemie. Die wichtigsten natürlichen Phospholipide sowie die synthetischen Analoga sind bekannt; was die Membranproteine betrifft, so werden die Syntheseprobleme von Molekularbiologen gelöst und die Strukturen von Spektroskopikern aufgeklärt werden. Der Organiker kann, will er sich nicht auf Hilfsdienste für Biophysiker und Biochemiker beschränken (Reinherstellung von Lipiden, gezielte Vernetzung von Membranproteinen zur Strukturaufklärung von Proteinkomplexen etc.), unabhängig von der Natur künstliche Vesikelmembranen mit nützlichen Eigenschaften entwickeln. Um diesen letzten Aspekt geht es im folgenden.

2. Reaktive Vesikelmembranen

2.1. Kopfgruppen

Die natürlichen membranbildenden Lipide sind elektro-neutrale oder negativ geladene Amphiphile mit zwei Fett-säureketten. Der Durchbruch zu andersartigen Membran-bildnern gelang *Kunitake et al.* im Jahre 1977^[6], als sie fan-den, daß Tetraalkylammoniumsalze mit zwei langen Alkyl-resten, z. B. 3, ähnliche Vesikeln wie die Phospholipide bil-den. Dieser Befund war vor allem wegen seiner Einfach-heit von Bedeutung. Er bewies, daß komplexe Wechselwir-kungen zwischen den Kopfgruppen, die bei den Liposo-men mit viel Akribie erforscht worden waren^[7,8], für die Vesikelbildung nicht wesentlich sind. Darüber hinaus wur-den erstmalig positiv geladene Vesikeln zugänglich.

Die Weiterentwicklung der stickstoffhaltigen Kopsgruppen erfolgte unter dem Aspekt, Reaktionszentren in der

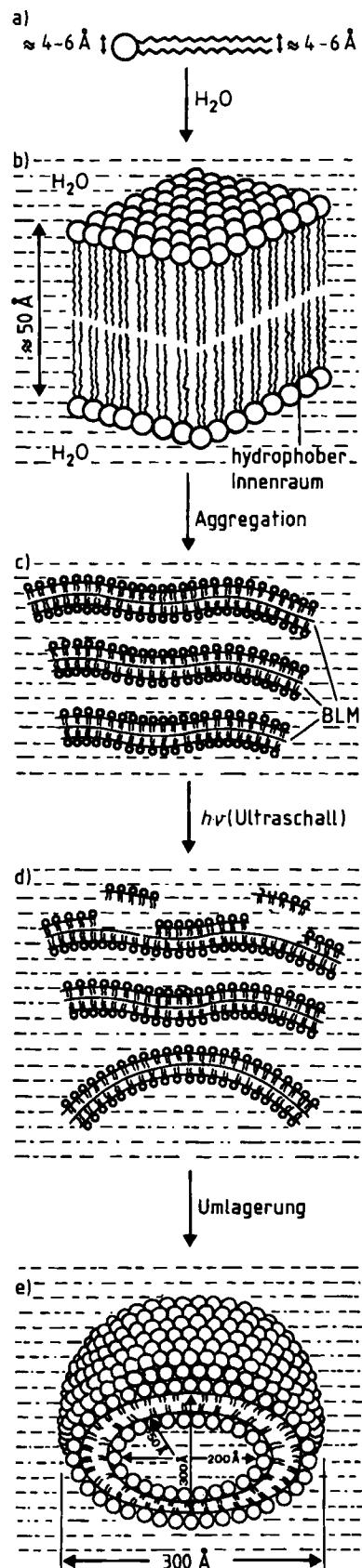
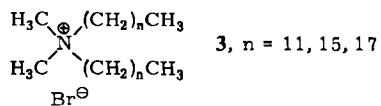
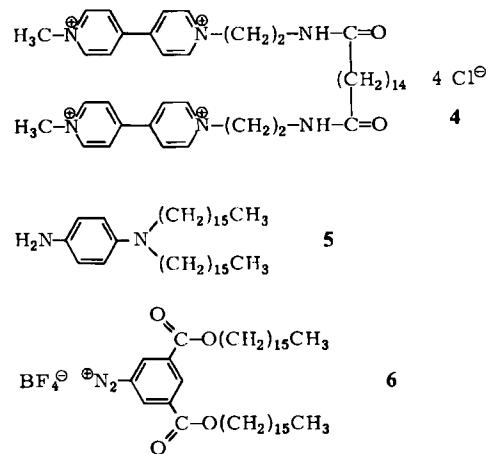


Abb. 3. Bildung von Vesikeln durch Ultraschallbehandlung von Doppelschichtmembran(BLM)-Flüssigkristallen [24].

Peripherie der Vesikelmembranen zu lokalisieren und so einen „Ersatz“ für „innen“- oder „außen“-liegende redoxaktive Chromophore wie Chlorophyll und Plastochinon zu

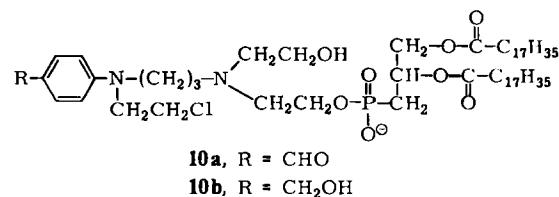
schaffen. Als Elektronenacceptoren wurden die in Modellsystemen zur Wasserreduktion^[9-11] häufig verwendeten Paraquat-Derivate (*N,N'*-Dialkyl-4,4'-bipyridinium-Salze) eingeführt^[12,13]. Zur Vesikelbildung eignet sich z. B. das Amphiphil (vgl. Abschnitt 3) **4** mit zwei Paraquat-Kopfgruppen. In bezug auf die in Abbildung 2 skizzierte biologische Ladungstrennung kann Paraquat die Funktion des Plastochinons übernehmen. Als Elektronendonoren wirken, in loser Analogie zum Chlorophyll in Abbildung 2, *N,N*-Dialkyl-*p*-phenylen diamin-Kopfgruppen z. B. im Vesikelbildner **5**^[14,15]. Schließlich wurden auch lichtzersetzbliche Vesikeln aus Amphiphilen mit Diazonio-isophthalsäure-Kopfgruppen, z. B. **6**, hergestellt^[14].



Alle hier genannten reaktiven Vesikeln zeigen die Besonderheit, mit wasserlöslichen Agentien nur an der äußeren Membranoberfläche zu reagieren. Paraquat-Derivate können mit Dithionit-Anionen zu Viologen-Radikalen reduziert, Phenylenediamin-Derivate mit wasserlöslichen Kupplern oxidativ zu verschiedenen Farbstoffen umge-

setzt, und Benzoldiazonium-Derivate nach Zusatz wasserlöslicher Sensibilisatoren durch sichtbares Licht zersetzt werden (vgl. Abb. 4). In allen Fällen entsteht an der äußeren Oberfläche der Vesikelmembran eine neue Kopfgruppe in nahezu quantitativer Ausbeute, während die innenliegenden Kopfgruppen unverändert bleiben. Auf diese Weise sind erstmals Vesikelmembranen zugänglich geworden, die eine quantitativ unsymmetrische Anordnung der Kopfgruppen aufweisen. Die halb reduzierten Paraquat-Vesikeln enthalten außen nur Elektronendonoren, innen nur -acceptoren, bei der Kupplungsreaktion der Phenylenediamin-Vesikeln wird nur die Außenfläche oxidativ eingefärbt, und bei den Benzoldiazonium-Vesikeln eliminiert zunächst nur die äußere Oberfläche Stickstoff.

Vesikeln mit extrem reaktiven Aziridinium-Kopfgruppen können hergestellt werden, wenn man als desaktivierte Vorstufe das Anilinderivat **10a** benutzt, bei dem die Nucleophilie des zweiten Stickstoffatoms durch den Formylsubstituenten stark erniedrigt ist^[18]. Eine intramolekulare Substitution des Chloratoms durch das Anilin-Stickstoffatom findet nicht statt. Vesikeln aus **10a** werden dann durch Reduktion mit NaBH₄ aktiviert. Das so entstehende Anilinmethanol **10b** reagiert mit Nucleophilen, z. B. cysteinhaltigen Proteinen, was auf die Bildung der reaktiven Aziridinium-Verbindung zurückgeführt werden kann.



Stickstoffhaltige Kopfgruppen, die Protonen oder Metallionen reversibel aufnehmen, wurden ebenfalls entwickelt. Das Ylid **11a** bildet gelbe ($\lambda_{\max} = 399$ nm) Vesikeln,

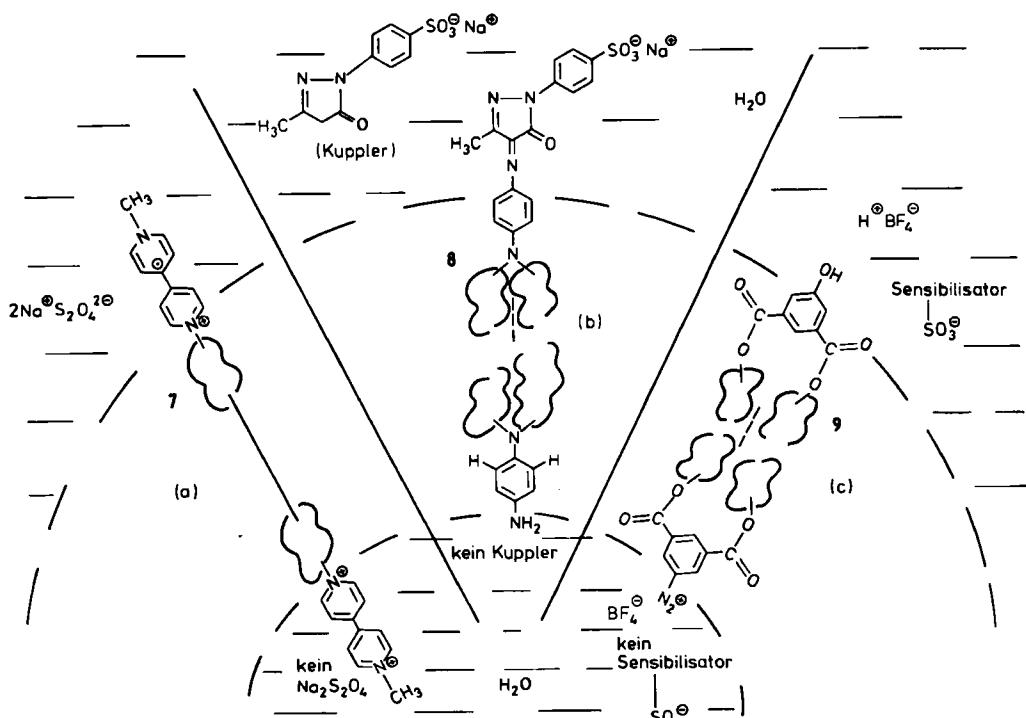
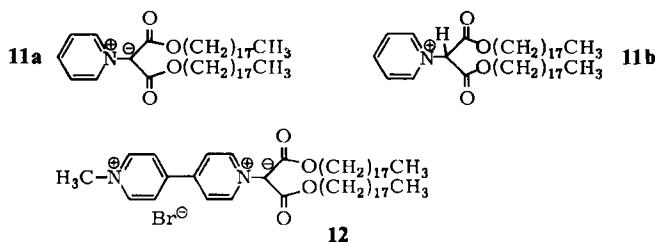
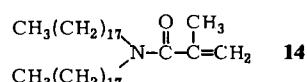
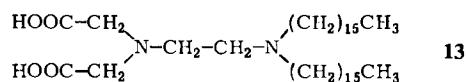


Abb. 4. Beispiele für Reaktionsprodukte (7-9) der „exovesikulären“ Kopfgruppen der Amphiphile 4-6. Die ebenfalls reaktionsfähigen „endovesikulären“ Kopfgruppen werden von membranunlöslichen Reagentien (Beispiele a, b) oder Sensibilisatoren (Beispiel c) nicht erreicht.

die nach Säurezugabe farblos (**11b**, $\lambda_{\max} = 256 \text{ nm}$) werden. Das Bipyridinium-Derivat **12** ist rot ($\lambda_{\max} = 470 \text{ nm}$). Da diese Verbindungen wasserunlöslich sind, eignen sie sich auch zum Einbau in Fremdvesikeln, wobei sich dann der positiv geladene Pyridinium-Rest neben den Kopfgruppen der Wirtmembran befindet. Der pK_a -Wert für die Protonierung des Ylids **11a** wird von der Ladung der umgebenden Wirtgruppen sehr stark beeinflußt: In elektroneutralen Vesikeln wird er nahe pH 6 erreicht, in elektropositiven Vesikeln bei pH 4, in elektronegativen Vesikeln bei pH 8^[16]. Diese amphiphilen pH-Indikatoren können zum Nachweis von Domänen (vgl. Abschnitt 6) verwendet werden.



Das vesikelbildende Ethylen diamindiessigsäure-Derivat **13** komplexiert Metallionen, z. B. Cu^{2+} , aus der wäßrigen Phase^[17]. Da Metallionen hydrophobe Vesikelmembranen im allgemeinen nicht durchdringen können, lassen sich so an den inneren und/oder äußeren Membranoberflächen nahezu beliebige redoxaktive Ionen fixieren.



Kopfgruppen vesikelbildender Amphiphile wurden auch mit reaktiven CC-Doppelbindungen ausgestattet^[19–23]. Solche Endgruppen wie in **14** können wahlweise mit wasserlöslichen Radikalbildnern nur an der äußeren Vesikeloberfläche oder mit UV-Licht an beiden Oberflächen polymerisiert werden. Dadurch erhält die Vesikel zwar keine neue Funktionalität, sie wird aber stabilisiert gegen Detergentien und organische Lösungsmittel (Abb. 5).

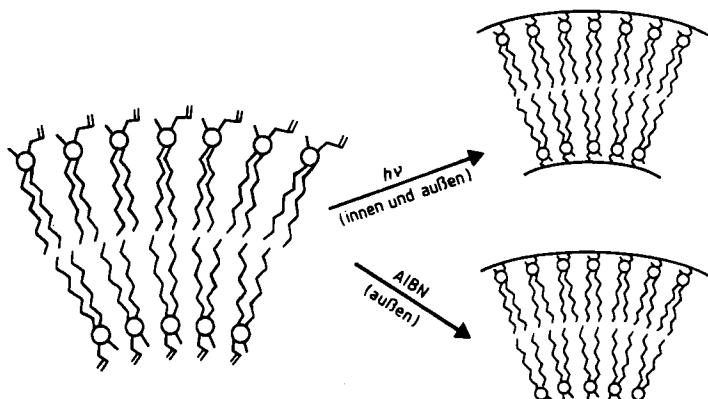
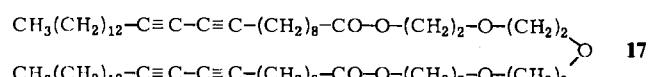
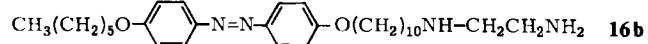
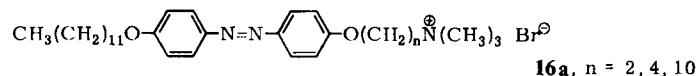
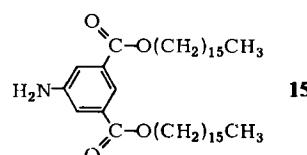


Abb. 5. Polymerisation von monomeren Amphiphilen an den Vesikeloberflächen. AIBN = Azobisisbutyronitril (wasserlöslicher Radikalinitiator).

2.2. Hydrophobe Zentren

Die meisten synthetischen Vesikelbildner enthalten in Analogie zu den Phospholipiden zwei Oligomethylenketten ($n > 8$) pro Kopfgruppe. In diesen Amphiphilen entsprechen die Querschnitte der hydratisierten Kopfgruppen denen der hydrophoben Ketten mit etwa je 6 Å. Die Doppelschichtmembranen in wäßrigen Medien haben deshalb eine geringe Krümmung (Kurvatur), was als Voraussetzung für die Bildung von Vesikeln angesehen wurde^[24] (vgl. Abb. 3). Von Fettsäuresalzen mit nur einer Oligomethylenkette und Ammoniumsalzen mit drei Oligomethylenketten war bekannt, daß sie Micellen ohne wäßrigen Innenraum mit starker Kurvatur bilden^[25–27]. Es ist jedoch auch über Vesikeln aus Gemischen von Stearinsäure und ihren Salzen^[28] und aus Trihexadecyl(methyl)ammonium-Salzen^[29] berichtet worden. Nach heutigen Erkenntnissen sind zuverlässige Voraussagen über die Struktur des Aggregats einer neuen amphiphilen Verbindung in wäßrigen Medien nicht möglich (vgl. Abschnitt 8).

Während die Kopfgruppen mit wasserlöslichen Säuren oder Basen, Reduktions- oder Oxidationsmitteln sowie Nucleophilen oder Elektrophilen rasch reagieren, sind reaktive Gruppen innerhalb der hydrophoben Membran für wasserlösliche Reagentien praktisch unzugänglich. Das zeigt sich z. B. in der Säurestabilität von Vesikelmembranen, bei denen Kopfgruppen und hydrophobe Ketten über Esterbindungen verknüpft sind. Vesikel aus den Amphiphilen **15**^[14] und **22**^[40] sind wochenlang in wäßriger Salzsäure bei pH 1.5 stabil. Ebenso werden basische Farbstoffe ($pK_a \approx 5$) in vesikulären Lösungen selbst bei pH 1 nicht protoniert^[30].



Für Reaktionen in synthetischen hydrophoben Membranen wurde deshalb bisher nur Licht als „Reagens“ verwendet. Als reaktive Zentren wurden Azomethin-^[31], Azobenzol-^[45], Dien- oder Diin-Chromophore^[20, 32–34] untersucht, die mit den membranbildenden Oligomethylenketten verknüpft waren. Die *trans*-Azobenzol-Gruppe in Vesikeln aus **16a** isomerisiert bei UV-Bestrahlung zu 50% in die *cis*-Form, wobei sich sphärische Vesikel in Lamellen umwandeln. Nach der thermischen Rückisomerisierung liegen wieder Vesikel vor, d.h. das eingeschlossene Wasservolumen und der Aggregationszustand der Vesikel ändern sich reversibel bei Bestrahlung. Im Falle des Diin-Amphiphils **17**^[33] (?; siehe Abschnitt 8) beobachtet man bei UV-Bestrahlung von flüssigkristallinen BLMs, also unterhalb der Schmelztemperatur der Membran, die Bildung

von farbigen Polyen-in-Ketten in den Zentren der beiden Hälften der Doppelschicht (Abb. 6). In ungeordneten Aggregaten findet keine Farbstoffbildung statt.

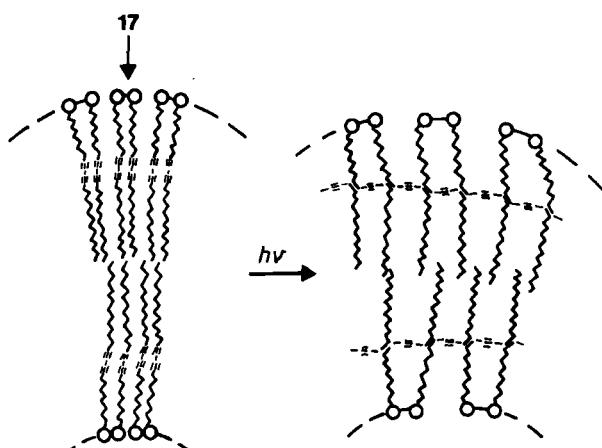


Abb. 6. Polymerisation des monomeren Amphiphils 17 zu farbigen Polyeninen in der hydrophoben Vesikelmembran.

Weitere Möglichkeiten, das Membranninnere gezielt zu modifizieren, sind die von außen gesteuerte Domänenbildung (vgl. Abschnitt 6) und die regioselektive Einlagerung von Fremdmolekülen (vgl. Abschnitt 3).

3. Periphere und integrale Porphyrine in den neun Regionen von Vesikellösungen

Wäßrige Vesikellösungen weisen neun Regionen oder Kompartimente auf (vgl. Abb. 7):

- ① das äußere Wasservolumen (Hauptvolumen, besser bekannt unter engl. bulk),
- ② die wäßrige Umgebung der Kopfgruppen (Hydratationssphäre, Gouy-Chapman-Schicht),
- ③ die äußeren Kopfgruppen,
- ④ die hydrophobe Membran nahe den äußeren Kopfgruppen,
- ⑤ das Innere der hydrophoben Membran (bei Doppelschichtmembranen lässt sich diese Region wiederum in eine innere ⑤_{innen} und eine äußere Hälfte ⑤_{außen} unterteilen),
- ⑥–⑨ die inneren Regionen, die den äußeren Regionen ④–① entsprechen.

Die Volumina der hydrophoben Membran (⑤) und des eingeschlossenen Wasserraums sind bei Mikrovesikeln (Durchmesser $\approx 500 \text{ Å}$, Konzentration des Amphiphils $\leq 10^{-3} \text{ M}$) wenigstens hundertmal kleiner als das „bulk“.

Wenn es gelänge, die neun genannten Regionen oder auch nur einige davon selektiv mit Reaktionszentren zu besetzen, wäre eine der Voraussetzungen zur Synthese organisierter Systeme ohne Verwendung von Membranproteinen gegeben. Wie in Abschnitt 2 erörtert, ist das für die Kopfgruppen ③ und ⑦ schon möglich, und im Spezialfall photochemischer Reaktionen auch für das hydrophobe Kompartiment ⑤. Die übrigen Regionen können durch die regioselektive Einlagerung von Fremdmolekülen funktionalisiert werden. In Vesikeln aus Amphiphilen mit reaktiven Kopfgruppen ist die gesamte Oberfläche ein Reaktionszentrum; dadurch ist der kürzeste Abstand zu regiose-

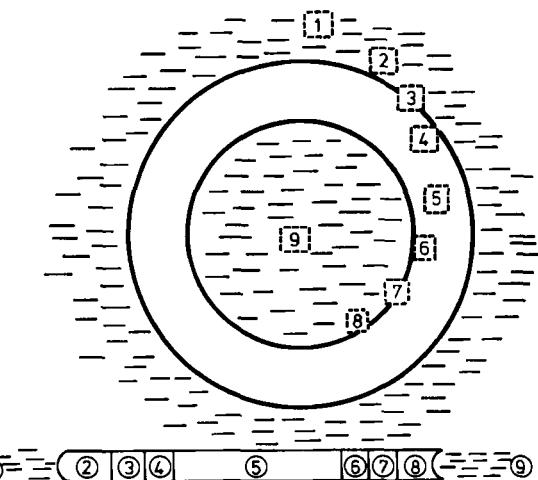


Abb. 7. Die neun Regionen in Vesikellösungen (vgl. Text).

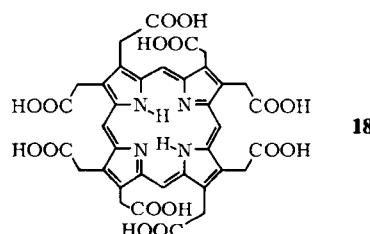
lektiv in der Membran gelösten Fremdmolekülen festgelegt, und es besteht keine Notwendigkeit mehr, Domänen zu bilden, um vektorielle Reaktionen durchführen zu können.

Als Beispiele für die regioselektive Einlagerung von Fremdmolekülen beschreiben wir Experimente mit zwei wasser- und membranlöslichen Porphyrinen; das eine – „Octaessigsäureporphyrin“ 18 – wird peripher in den Regionen ② oder ④ „angelagert“, das andere – „Viologenporphyrin“ 19 – integral in Vesikeln eingebaut.

„Octaessigsäureporphyrin“ 18^[35] liegt bei pH 7 als Oligoacetat-Anion vor und ist wasserlöslich. Die längstwellige Absorptionsbande (α -Bande) erscheint bei 616 nm. In Gegenwart von elektroneutralen oder negativ geladenen Vesikeln ist es im „bulk“ ① gelöst; Gelchromatographie trennt das Porphyrin von der Vesikelfraktion. In Lösungen mit positiv geladenen Vesikeln wird das Porphyrin-Oligoanion an die Oberfläche der Vesikelmembran, Region ②, gebunden; Gelchromatographie führt zu keiner Trennung der Vesikel vom Porphyrin. Das Elektronenspektrum des Porphyrins ist in beiden Fällen identisch (α -Bande bei 616 nm).

Säuert man wäßrige Lösungen von 18 an (pH 4.5), so fällt das Porphyrin aus. Diese Fällung findet in Gegenwart von Vesikeln beliebiger Oberflächenladung nicht statt, sondern die Vesikelmembran saugt das Porphyrin auf. Beim Ansäuern bis pH 5.2 beobachtet man zunächst die Umwandlung des vierbandigen VIS-Spektrums des neutralen Porphyrinchromophors in das dreibandige Spektrum des Monokations des Porphyrins, d. h. eines der beiden Pyrrolenin-Stickstoffatome wird protoniert. Von den acht Acetatsubstituenten sollte etwa die Hälfte protoniert sein. Das Porphyrin-Monokation ist wahrscheinlich noch immer in ① oder ② gelöst. Bei pH 5 wird das dreibandige Kationenspektrum wieder durch ein vierbandiges Spektrum der nicht-protonierten Porphyrinbase ersetzt. Die α -Bande des VIS-Spektrums erscheint jetzt bei 625 nm, was dem Spektrum des „Octaessigsäureporphyrins“ in Trichlormethan entspricht^[36]. Aus der spektralen Verschiebung ist zu schließen, daß das Porphyrin aus den wäßrigen Regionen in die hydrophobe Membranregion ④ gewandert ist. Es handelt sich hier um den unseres Wissens erstmalig beobachteten Effekt, daß eine protonierte Stickstoff-

base bei Säurezugabe deprotoniert wird. Der Vorgang ist vollständig reversibel, d.h. bei Zugabe von Natronlauge tritt wiederum das dreibandige Kationenspektrum auf. Schließt man das wasserlösliche Porphyrinoctaacetat in die innere Region ⑨ ein, so findet beim Ansäuern die gleiche spektrale Verschiebung 616→625 nm mit einer Verzögerung statt, weil der pH-Ausgleich über die Membran Zeit braucht (bei cholesterinhaltigen Lecithinmembranen z.B. 15 min).



Aus der Reversibilität der Porphyrineinlagerung schließen wir, daß **18** peripher in der Membran gelöst ist (Abb. 8). Daß dieses Porphyrin in Region ④ und nicht in Region ② lokalisiert ist, folgt sowohl aus dem VIS-Spektrum als auch aus der Tatsache, daß in stark sauren Medien die Porphyrinbase nicht protoniert wird. Bei pH 1 wird noch das vierbandige Spektrum der freien Porphyrinbase beobachtet. In micellaren Lösungen variiert der pK_a -Wert von Porphyrinen zwischen 4 und 5. Bei pH 3 wurde in allen bisher untersuchten Fällen die vollständige Bildung des diprotonierten Porphyrin-Dikations beobachtet.

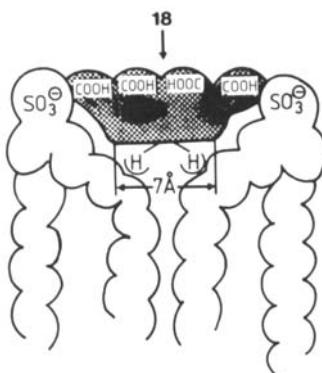
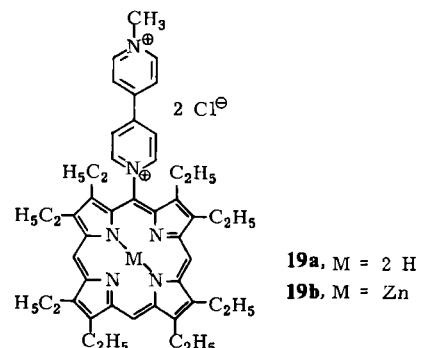


Abb. 8. „Octaessigsäureporphyrin“ **18** schwimmt auf der hydrophoben Oberfläche der Vesikel mit Sulfonsäure-Kopfgruppen. Die „unteren“ H-Atome gehören zu den zentralen NH-Gruppen des Porphyrins.

Ein Beispiel für ein integrales Fremdmolekül in Vesikelmembranen ist das „Viologenporphyrin“ **19a**^[37]. Dessen Zinkkomplex **19b** löst sich in Wasser besser als in Trichlormethan. In Lösungen mit Vesikeln sollte deshalb **19b** in den Regionen ① und ② lokalisiert sein. Die mangelnde Reaktivität des Porphyrinchromophors gegenüber wasserlöslichen Reagentien deutet jedoch darauf hin, daß er vollständig von der Vesikelmembran aufgesaugt worden sein muß. So ließen sich z.B. **19a** durch Zugabe von Säure nicht zum Kation protonieren und der Zinkkomplex **19b**



nicht entmetallieren. Da andererseits der Viologenstituent von **19a** in elektroneutralen oder negativ geladenen Vesikeln mit Natriumdithionit zum Radikal reduziert werden konnte, ist seine Lokalisierung an der Vesikeloberfläche ③ wahrscheinlich (vgl. Abb. 9). Der Porphyrinchromophor befindet sich dementsprechend in den Regionen ④ und ⑤. Er läßt sich – in Analogie zu den integralen Proteinen^[1,4] – aus der Vesikelmembran nur herauslösen, wenn diese durch Detergentien oder Lösungsmittel zerstört wird.

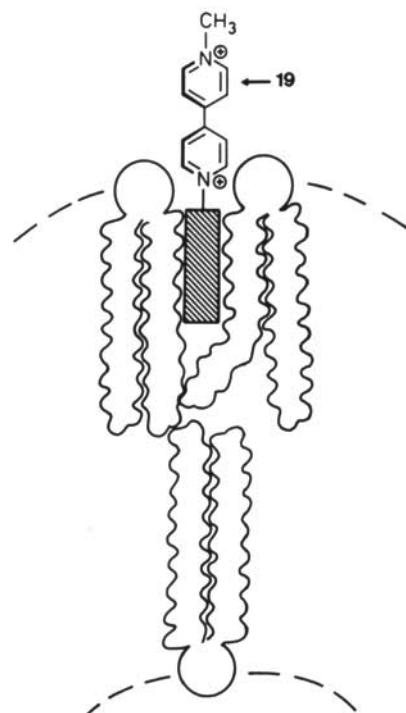


Abb. 9. „Viologenporphyrin“ **19** taucht in die hydrophobe Membran der Vesikel ein.

Das spezielle Lösungsverhalten der beiden Porphyrine **18** und **19** demonstriert, daß vesikuläre Lösungen sich grundsätzlich anders verhalten können als micellare Lösungen oder Zweiphasensysteme: Gelöste Moleküle können ausschließlich in der Membran oder im wäßrigen Medium lokalisiert werden; eine Verteilung zwischen beiden Phasen kann unterdrückt werden. Eine weitere Voraussetzung zum Aufbau organisierter Systeme ohne Proteine ist damit gegeben.

4. Monoschicht-Vesikelmembranen (MLM-Vesikeln)

Verwendet man zur Vesikelbildung Amphiphile mit hydrophilen Kopfgruppen an beiden Enden der hydrophoben Ketten (Trivialname: Bola-Amphiphile^[38], abgeleitet von der einem südamerikanischen Schleudergerät ähnlichen Form), so werden Membranen aus einer einzigen Molekülschicht (monolayer lipid membrane, MLM) erhalten. Die MLM-Vesikeln weisen gegenüber den üblichen BLM-Vesikeln drei Vorteile auf:

1. BLM-Vesikeln wachsen durch Fusion und fallen aus der Lösung meist nach einigen Tagen aus. Bei MLM-Vesikeln ist die Fusionierung erschwert, weil der innere hydrophile Kopf die hydrophobe Membran kaum durchdringen kann, und deshalb die Wanderung der Amphiphile von einer Vesikel zur anderen kaum möglich ist (vgl. Abb. 10). MLM-Vesikellösungen sind unter geeigneten Bedingungen langzeitstabil.

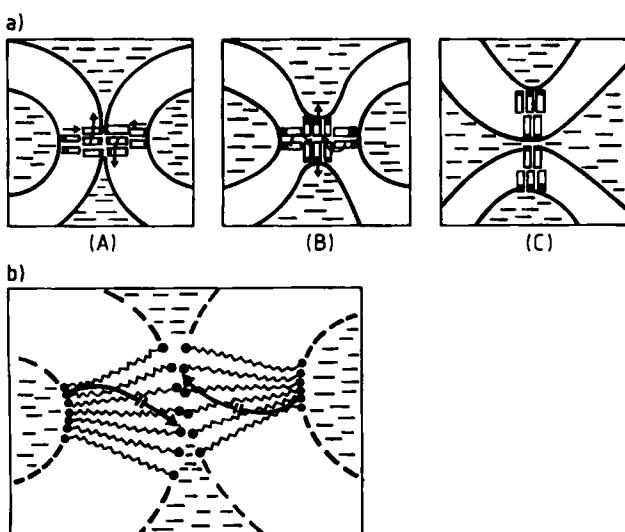


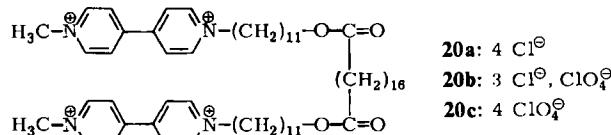
Abb. 10. a) Die Verschmelzung (Fusion) von Vesikelmembranen setzt die Rotation (oder Diffusion) von Molekülen der BLM voraus: (A) Aggregat zweier Vesikel, (B) Brückenbildung, (C) Passagenbildung (= Fusion). - b) Bei monoschichtigen Vesikeln folgt auf die Aggregation keine oder eine sehr langsame Fusion.

2. Monoschichtige Membranen können wesentlich dünner sein als doppelschichtige Membranen. Die Schichtdicke der dünnsten bekannten MLM mit beiden Kopfgruppen beträgt 28 Å, der hydrophobe Anteil ist weniger als 20 Å dick. Solche dünnen Membranen sind von Interesse, weil sie mit 15–20 Å langen Porenbildnern überbrückt werden können. Kurze Porenbildner sind wiederum besser zugänglich als 30–40 Å lange Porenbildner für BLMs. Viele Naturstoffe (z. B. Porphyrine, Carotin, Steroide) haben eine Molekülänge von 15–20 Å. Geeignete Derivate und ihre Molekülkomplexe^[2,39] können zum Bau von selektiven Leitungssystemen für Elektronen, Ionen und wasserlösliche Moleküle benutzt werden.
3. α,ω -Bisamphiphile mit zwei unterschiedlichen Kopfgruppen können vollständig unsymmetrische Vesikel-

membranen bilden: Die großen Kopfgruppen bilden bei MLM-Mikrovesikeln (Durchmesser ≤ 500 Å) die äußere Oberfläche, die kleinen Kopfgruppen die innere Oberfläche^[40]. Bei BLM-Vesikeln aus zwei unterschiedlichen Amphiphilen kann hingegen nur eine partielle Anreicherung einer Molekülsorte in einer Hälfte der Doppelschicht erreicht werden^[41].

4.1. MLM-Vesikelbildung durch „einseitige Füllung“

Aggregate des symmetrischen Bola-Amphiphils **20a** mit zwei Vilogenkopfgruppen werden unsymmetrisch und erhalten Kurvatur, wenn man seine Gegenionen partiell austauscht^[13]. Titriert man z. B. das wasserlösliche Tetrachlorid **20a** mit einem Moläquivalent Natriumperchlorat, so bilden sich spontan Mikrovesikeln einheitlicher Größe. Aus dem Monoperchlorat **20b** wird mit drei Äquivalenten Perchlorat das wasserunlösliche Tetrapерchlorat **20c** erzeugt, und die Kurvatur der Vesikeln geht erwartungsgemäß wieder verloren. Elektronenmikroskopisch werden jetzt monoschichtige Kristalle beobachtet (Abb. 11).



4.2. Unsymmetrische Vesikel-MLMs

Die säure- und lichtbeständigen Membranen des Archaeabakteriums *Caldariella acidophila* enthalten den makrocyclischen Tetraether **21** mit einer (kleinen) Glycerin- und einer (großen) Nonitol-Kopfgruppe. Messungen von asymmetrischen Strom-Spannungskurven und spezifischen Kapazitäten an sogenannten schwarzen Lipidmembranen (planaren Lipidmembranen mit Schichtdicken < 100 Å) deuten darauf hin, daß die künstlich aus **21** gebildeten Membranen aus einer einzigen Molekülschicht bestehen, in der die großen Köpfe auf der einen, die kleinen Köpfe auf der anderen Seite angeordnet sind^[43]. Man kann diesen Befund einfach erklären, wenn man berücksichtigt, daß das Nonitolende mit sechs Hydroxygruppen aus *n*-Alkan-Dispersionen, wie sie bevorzugt zur Präparation von schwarzen Membranen verwendet werden, auskristallisieren sollte. Ähnlich wie bei der in Abschnitt 4.1 beschriebenen Vesikelherstellung durch partielle Bildung unlöslicher Salze beginnt auch hier die Bildung einer unsymmetrischen Membran mit der einseitigen Aggregation der Kopfgruppen von Bola-Amphiphilen.

Eine synthetische Membran, in der das gleiche Syntheseprinzip für unsymmetrische Membranen verwirklicht wurde, besteht aus dem Makrotetrolid **22** mit einer (kleinen) Sulfonsäure- und einer (großen) Thiobernsteinsäure-Kopfgruppe^[40]. An Vesikeln aus diesem unsymmetrischen Bola-Amphiphil wurde nachgewiesen, daß sich mehr als 98% der Sulfonsäure-Kopfgruppen auf der Innenseite der Vesikeln befinden (vgl. Abb. 12).

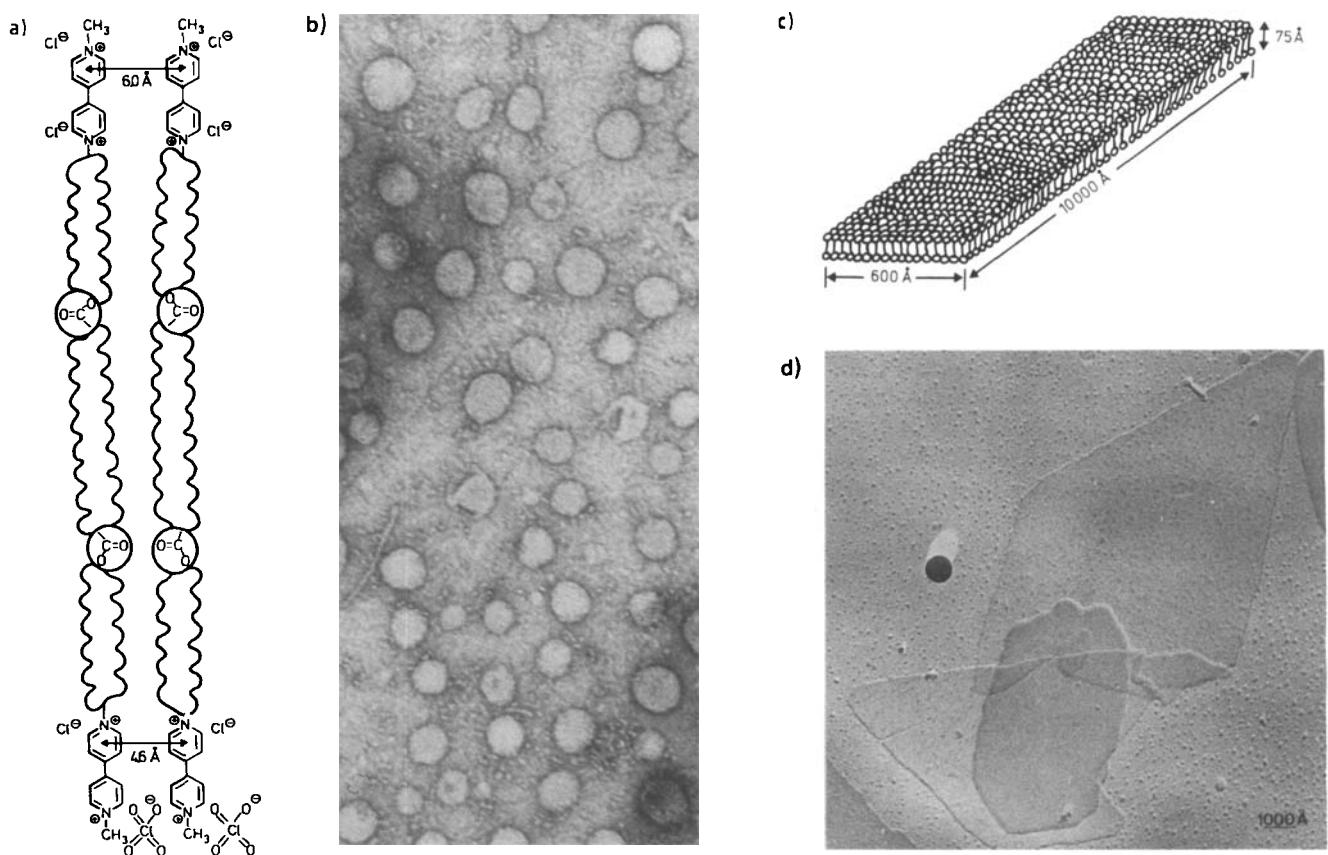
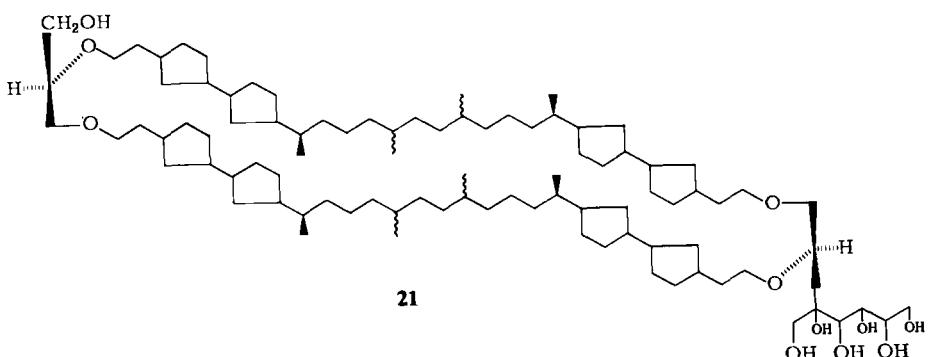


Abb. 11. a) Die Kurvatur in monoschichtigen Vesikeln aus **20b** wird durch partielle Bildung von unlöslichen Salzen (Perchloraat innen) erzeugt. – b) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Vesikeln aus **20b**. – c) Das Tetraperchlorat **20c** bildet monoschichtige Kristalle. – d) Elektronenmikroskopische Aufnahme der schrägbedampften monoschichtigen Kristalle. Der weiße Schatten ist ein Maß der Schichtdicke. Durchmesser Latexkügelchen: 900 Å; Schichtdicke der Kristalle: < 100 Å.



Damit ist auch bewiesen, daß diese Membran als eine Monoschicht vorliegt^[42]. Kleinwinkelstreuungsmessungen

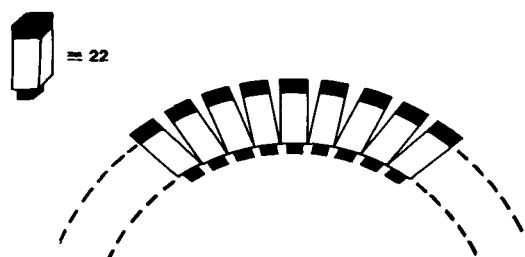
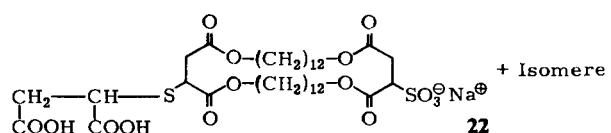


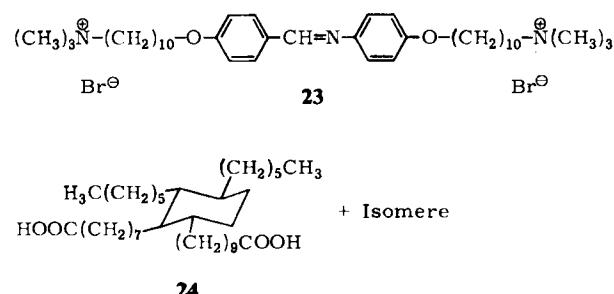
Abb. 12. Eine unsymmetrische monoschichtige Vesikelmembran aus dem Bola-Amphiphil **22**.

am Feststoff **22** ergaben eine Schichtdicke der gesamten MLM von 28 Å, was exakt der all-anti-Konformation des Makrocyclus entspricht. Merkwürdigerweise deuten erste $^1\text{H-NMR}$ -Messungen an den monoschichtigen Vesikeln auf eine außergewöhnlich große Beweglichkeit der Oligomethylenketten bei Raumtemperatur hin. Dieses Phänomen wird zur Zeit im Detail untersucht.



4.3. MLM-Vesikel mit gelösten, raumfüllenden Komponenten („spacer“)

Die ersten Vesikel aus einem symmetrischen Bola-Amphiphil, dem Bisammoniumbromid **23**, wurden von *Kunitake et al.*^[31] nur erhalten, wenn der Emulsion bei der Beschallung Cholesterin zugesetzt worden war. Das wasserunlösliche Steroid ist in der Membran gelöst und bewirkt dort die Kurvatur der Vesikel. Ein ähnlicher Effekt wurde bei dem billigsten Bola-Amphiphil, der handelsüblichen „Dimersäure“ **24**, beobachtet. Diese bildet beim Beschallen keine Vesikel, die milchige Suspension von **24** in



Wasser klärt sich auch im Falle extrem niedriger Konzentrationen ($\approx 10^{-5}$ M) nicht. Wird jedoch Cyclohexylamin in geringem Überschuß als „spacer“ (vgl. Abb. 13) hinzugegeben, so erhält man ohne Schwierigkeiten klare Vesikellösungen oder klare Gele bis zu Konzentrationen von 10^{-2} M^[44].

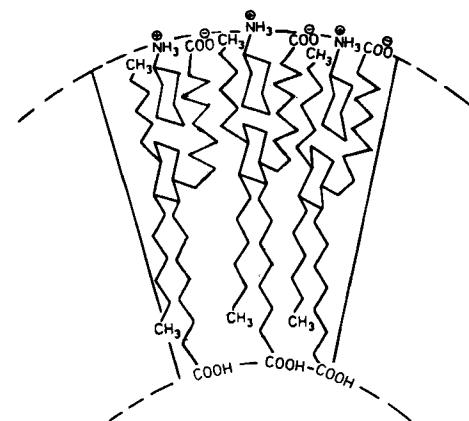


Abb. 13. Ein Beispiel für die „Keil“-Wirkung von Zusatzstoffen (hier: Cyclohexylamin) bei der Bildung von monoschichtigen Membranen (hier aus „Dimersäure“ **24**).

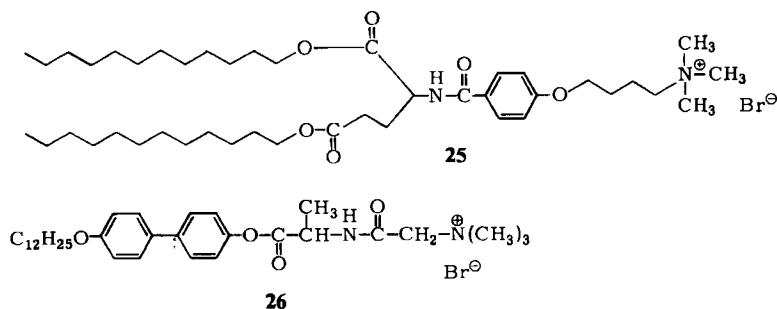
5. Chirale Überstrukturen

Vesikelmembranen aus Amphiphilen mit chiralen Kopfgruppen sind von besonderem Interesse, weil zu erwarten ist, daß chirale Überstrukturen auf der Membranoberfläche stereoselektiv mit Fremdmolekülen reagieren können. Der flüssigkristallinen Vesikeloberfläche wäre damit eine der Eigenschaften von biologischen Rezeptorproteinen aufgeprägt worden.

Einen Hinweis auf eine chirale Überstruktur fanden *Kunitake et al.*^[45] bei Vesikeln aus dem amphiphilen Gluta-

minsäurederivat **25** mit zwei Oligomethylenketten und einem aromatischen Chromophor in der Kopfgruppe. Circulardichroismus(CD)-Messungen zeigen bei Raumtemperatur Maxima mit extrem hohen spezifischen Drehwerten ($\Theta_{220} = 360\,000$, $\Theta_{260} = -400\,000$). Beim Erwärmen der Vesikellösung wird oberhalb der Phasenübergangstemperatur von 32°C nur ein einziges Maximum mit viel geringerer Intensität ($\Theta_{245} = 6000$) beobachtet. Für nicht-vesikuläre Aggregate, die unterhalb einer kritischen Vesikelkonzentration von $5 \cdot 10^{-6}$ M auftreten, werden nur wenig höhere Werte ($\Theta_{260} = -22\,000$) gemessen. Ähnliche Effekte ließen sich bei dem Alaninderivat **26** mit Tetraalkylammonium-Kopfgruppe und Biphenylchromophor nachweisen, das zwar keine Vesikel, aber flüssigkristalline, plättchenförmige Aggregate bildet^[46].

In chiralen Vesikeln gelöstes Methylorange, das mit einer hydrophoben Seitenkette in der Membran verankert ist, zeigt intensive induzierte CD-Spektren^[47]. Wahrscheinlich ist hier die Azofarbstoff-Kopfgruppe in das Aminosäure-Oberflächengitter eingewängt. Merkwürdigerweise beobachtet man bei dem in die Vesikel aus **25** eingelagerten Methylorange **27** (vgl. Abb. 14) auch eine extrem große



bathochromic Verschiebung der Absorption^[48]. Unterhalb des Membranschmelzpunkts (20–25°C) findet man ein Maximum bei $\lambda = 488$ nm, das bei 28–29°C schon bei $\lambda = 424$ nm erscheint. Diese 64 nm-Verschiebung tritt nur auf, wenn der „hydrophobe Abstandshalter“ zwischen dem positiv geladenen Teil der Kopfgruppe und dem Chromophor in der Membran aus **25** eine Tetramethylenegruppe enthält. Wahrscheinlich ist das Methylorange-Molekül **27** in diesem schwer zu definierenden Zwischenraum (Region ② oder ④?) lokalisiert und füllt die Lücken, die der schmale „spacer“ offenläßt.

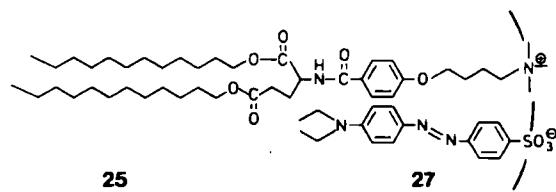
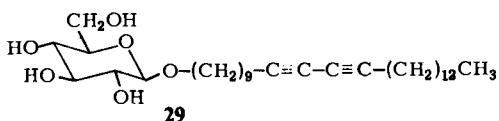
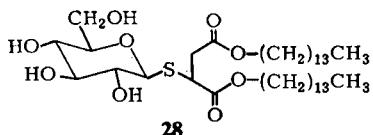


Abb. 14. Regioselektive Anlagerung von Methylorange **27** an die chirale Vesikeloberfläche aus dem Glutaminsäure-Amphiphil **25**.

Vesikel mit Kohlenhydrat-Kopfgruppen erscheinen als chirale Rezeptoren besonders geeignet, weil die cyclisch-starre Konformation und die Anwesenheit von wenigstens vier Asymmetriezentren hohe Selektivität verspricht. Solche Vesikel wurden aus **28**^[49] sowie **29**^[50] bereits herge-



stellt, aber über ihre Wechselwirkungen mit wasserlöslichen Verbindungen ist unseres Wissens noch nichts bekannt.

6. Domänenbildung

Der Verzicht auf Proteine beim Aufbau funktionalisierter Vesikelmembranen macht es auch erforderlich, Membranbausteine zu entwickeln, die sich innerhalb einer inerten Membran zu reaktiven Domänen zusammenfügen lassen. Nur wenn das gelingt, wird es möglich sein, auch in synthetischen Membranen zwei oder mehr Reaktionen miteinander in einer vektoriellen Reaktionskette zu koppeln. Bisher konnten *Kunitake* et al. zwei Typen der Domänenbildung verwirklichen.

Die erste Möglichkeit, Teile des Membraninneren gezielt zu organisieren, ist die von außen gesteuerte Verschiebung von Membranbausteinen. In heterogen zusammengesetzten BLM-Vesikeln aus (inertem) Dihexadecyl(dimethyl)ammoniumbromid und (reaktivem) Azobenzol-Amphiphil **16b** liegt letzteres bei pH 4 als protoniertes Monomer vor ($\lambda_{\max} = 355 \text{ nm}$). Bei pH 7 aggregiert **16b** in der Vesikel aus **3**, $n=15$, und das Absorptionsmaximum verschiebt sich zu 312 nm – es bilden sich Domänen. Gibt man bei pH 4 Kupfersulfat zur Lösung, so beobachtet man das Ab-

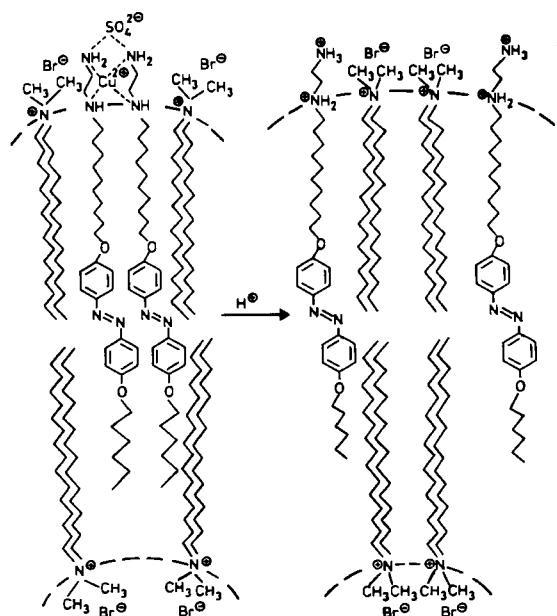
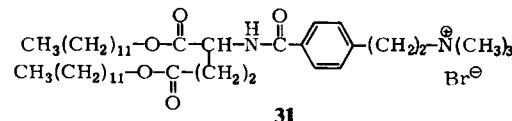
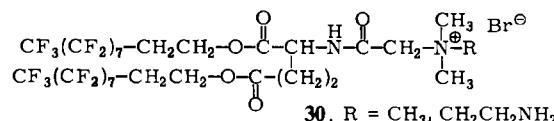


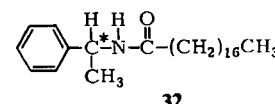
Abb. 15. Bildung einer Domäne durch die Wechselwirkung zweiwertiger Ionen mit Ethylenediamin-Kopfgruppen. Der Zusatz starker Säure zerstört die Domäne.

sorptionsmaximum ebenfalls bei 312 nm^[51]. Natriumsulfat hat einen analogen Effekt, Kupferchlorid ist wirkungslos. Diese durch äußere Protonen oder zweiseitige Anionen gesteuerte Bildung und Auflösung von Aggregaten eines Amphiphils in einer Vesikelmembran ist ein erstes Beispiel für die (reversible) Erzeugung von Domänen, wobei die Kopfgruppen als Rezeptoren wirken (vgl. Abb. 15).

Auch Vesikelmembranen aus Mischungen von Amphiphilen mit Oligomethylen- und Oligoperfluormethylenketten bieten interessante Möglichkeiten. So wurde nachgewiesen, daß Vesikel aus **30** und aus **31** nicht miteinander fusionieren^[52]. Der Grund dafür ist die bekannte „Lipophobie“ der fluorierten Kohlenwasserstoffe^[53]. Es ist zu erwarten, daß perfluorierte Domänen in Kohlenwasserstoffmembranen eingeführt werden können, wobei in diesem Fall die hydrophoben Ketten eine (irreversible) Aggregation bewirken.



Schließlich sei auf eine Arbeit von *Arnett* et al.^[54] aufmerksam gemacht, die bei einer racemischen monomolekularen Oberflächenschicht aus **32** die Bildung von Domänen aus den reinen Enantiomeren durch die Bestimmung des Oberflächendrucks nachgewiesen haben. Ähnliche Phänomene sind bei Vesikeln mit chiralen Kopfgruppen zu erwarten (vgl. Abschnitt 5), bisher gibt es dafür aber keine Nachweismethode.

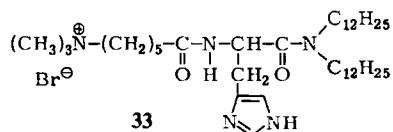


7. Vesikelspezifische Reaktionen

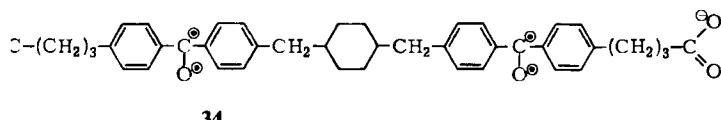
Noch sind Beispiele für Reaktionen, die durch die geordnete Struktur von Vesikelmembranen entscheidend beeinflußt werden, selten. Der Cholesterylester der 4-Imidazolcarbonsäure katalysiert die Hydrolyse von *p*-Nitrophenylpalmitat, wenn der Katalysator und das Substrat gemeinsam in Tetraalkylammonium-Vesikeln eingeführt werden. Mischt man Vesikel, die den Katalysator enthalten, mit Vesikeln, in denen das Substrat gelöst ist, so findet keine Katalyse statt^[55]. Solche Geschwindigkeitsunterschiede zwischen inter- und intravesikulären Reaktionen kommen allgemein bei Reaktionspartnern vor, die aus der Vesikelmembran nur langsam herausdiffundieren können.

p-Nitrophenylacetat wird von Vesikeln mit SH-haltigen Kopfgruppen bei pH 7.6 hydrolysiert und etwa 1600mal fester gebunden als von vergleichbaren Micellen^[56]. Die „Härte“ der Vesikelmembran als Reaktionsmatrix im Vergleich zu den „weichen“ Micellen wird auch durch die

enantioselektive Hydrolyse von membrangelösten Phenylalaninestern durch chirale Histidin-Kopfgruppen in 33 bestätigt. Die Enantioselektivität $k_{\text{exp(L)}}/k_{\text{exp(D)}}$ beträgt bei Vesikeln 4.4, bei Micellen 2.7^[57]. Fixiert man das zu hydrolysierende Substrat mittels Oligomethylenketten in der Membran, so werden Enantioselektivitäten bis zu 5.7 erreicht^[58].



Entgegengesetzte Schlußfolgerungen über die „Härte“ der Vesikelmembran lassen sich aus den Ergebnissen der photochemischen Addition des Benzophenonderivats 34 an die Oligomethylenketten in Vesikeln ableiten. Der angeregte Triplett-Zustand des Benzophenons greift wahllos die Kohlenstoffatome C6-C12 einer Phosphorsäuredodecylester-Vesikel an, d.h. 34 nimmt eine ebenso durch statistische Verteilung bestimmte Position ein wie in Micellen. Nur in planaren Doppelschichten konnte die erwartete Regioselektivität erreicht werden^[59]. Eine plausible Erklärung für die ungeordnete Verteilung von 34 in Vesikeln steht noch aus.



8. Zur Struktur von membranbildenden Molekülen

Thermodynamische und kinetische Modellbetrachtungen zur Bildung von Vesikelmembranen^[1, 25, 60] sowie vergleichende Betrachtungen zur Struktur von Molekülen und ihren Aggregaten in wäßrigen Medien^[61] setzen voraus, daß nur Amphiphile sphärische Membranen bilden. Wir wollen auf diese vorläufigen, nicht verallgemeinerungsfähigen „Zusammenhänge“ hier nicht eingehen. Vielmehr soll gezeigt werden, daß schon die erste Einschränkung („nur Amphiphile bilden Vesikelmembranen“) nicht zutreffend ist.

Chang untersucht seit vielen Jahren „künstliche Zellen“ mit Membranen aus beliebigen wasserunlöslichen Polymeren^[62-64]. Zu ihrer Herstellung schüttelt man die Lösung eines Polymers (Nylon, Polystyrol, Cellulosenitrat) in organischen Lösungsmitteln zusammen mit einer relativ konzentrierten wäßrigen Hämoglobinlösung. In der Wasserphase befinden sich dann wohldefinierte kugelförmige Membranen mit Schichtdicken von etwa 200 Å und Durchmessern bis etwa 0.1 mm. Im Inneren des zellartigen Gebildes ist Hämoglobin eingeschlossen. Nach Abtrennen der organischen Lösungsmittel sind die kugelförmigen Aggregate lange Zeit stabil. Künstliche Zellen aus Nylon lassen kleine polare Moleküle wie Harnstoff, nicht aber Proteine, die Zellwand passieren. Wegen ihrer großen Membranoberfläche eignen sich die „künstlichen Zellen“ gut als Dialysemembran.

Der Bildungsmechanismus der „künstlichen Zellen“ wird unseres Wissens in der Literatur nicht diskutiert. Wir

nehmen an, daß die hydrophoben Bereiche des Hämoglobins die Polymere aufnehmen und so in die Wasserphase überführen. Dort aggregieren die hydrophobierten Polymerkomplexe, und es entstehen geschlossene Häutchen. Sind diese einmal vorhanden, so nehmen sie wegen des inneren kolloid-osmotischen Drucks, den das eingeschlossene Hämoglobin erzeugt, sphärische Gestalt an: Die Oberfläche des Aggregats wird größer, die Membran entsprechend dünner. Das innere Hämoglobin bleibt eingeschlossen, das Hämoglobin in der äußeren Wasserphase nimmt weiteres Polymer auf, und der Prozeß wiederholt sich (vgl. Abb. 16).

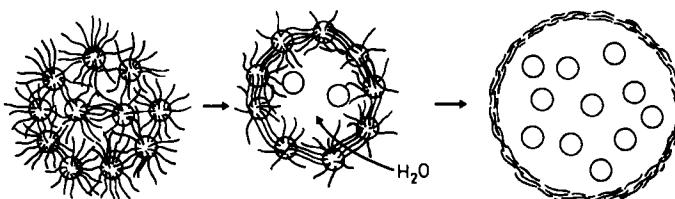
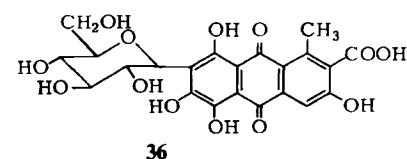
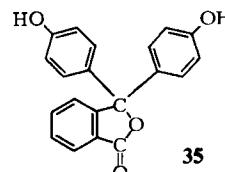


Abb. 16. Hypothetischer Mechanismus der Bildung von „künstlichen Zellen“ aus wasserlöslichen (○) und wasserunlöslichen (~~) Polymeren.

Analog aufgebaut sind die „Mikrosphären“ von Fox. Sie bestehen aus „Proteinoiden“ und sehen unter dem Mikroskop ähnlich aus wie die „künstlichen Zellen“^[65]. Ein „Proteinoid“ ist ein statistisch zusammengesetztes Polyamid, das entsteht, wenn α -Aminosäuregemische in wässriger Phosphorsäure auf 100°C erhitzt werden. Beim langsamem Abkühlen fallen diese Proteinide nicht aus, sondern bilden spontan Mikrosphären von etwa 0.1 mm Durchmesser. Diese Proteinoid-Aggregate sind ebenfalls osmotisch aktiv und gelten als einfachstes Modell für die „Urzelle“^[66]. Sie entstehen möglicherweise durch die Aggregation von hydrophoben Proteinoiden miteinander und mit hydrophileren, ionenhaltigen Komponenten; die hydrophoben Anteile könnten in Analogie zum Mechanismus in Abbildung 16 an die Oberfläche der Aggregate schwimmen und dort eine geschlossene hydrophobe Haut bilden. Durch das Eindringen von Wasser in die innere Elektrolytlösung könnte diese Haut sodann zu einer Membran gedehnt werden.

Eigene Beobachtungen zeigen^[67], daß auch niedermolekulare, in Wasser schwer lösliche Nichtamphiphile bei Ultraschallung in Lösung gehen können und bei Betrachtung mit dem Elektronenmikroskop als kugelförmige Membranen erscheinen. Beispiele dafür sind Phenolphthalein 35 und Carminsäure 36 (vgl. auch 17).



Man mag einwenden, daß „künstliche Zellen“ aus Nichtamphiphilen von untergeordnetem Interesse sind, weil ihre Membranen wahrscheinlich ungeordnet sind. Markante Unterschiede zwischen der Membranoberfläche und dem Inneren werden hier nicht erwartet. Zur Organisation von mehreren reaktiven Zentren sind diese Membranen wahrscheinlich nicht geeignet. Trotzdem ist es wichtig zu wissen, daß die Bildung kugelförmiger Membranen unter Phasentransfer-Bedingungen oder bei Ultrabeschallung wäßriger Suspensionen eine inhärente Eigenschaft vieler wasserunlöslicher Verbindungen ist.

9. Zusammenfassung und Ausblick

Manche Zwischenstationen auf dem Weg zum Ziel, das wir als „Synthesen von funktionalen Vesikeln ohne Proteine“ definieren, sind erreicht worden:

- Elektronenacceptoren und -donoren (Kopfgruppen, Metallionen) lassen sich in definierten Abständen zu redoxaktiven Farbstoffen in der Membran (Metallporphyrine) fixieren.
- Licht kann zur Strukturänderung der hydrophoben Membran benutzt werden (*trans*→*cis*-Isomerisierung von Azobenzol-Einheiten).
- Unsymmetrische Vesikelmembranen sind zugänglich („monolayer lipid membranes“, MLM).
- Vesikel mit chiralen Kopfgruppen unterscheiden Enantiomere, die sich zwischen der Wasserphase und der Membran verteilen (stereoselektive Hydrolyse).
- Domänen lassen sich ohne die Einwirkung von Proteinen erzeugen (komplexierende Kopfgruppen).
- Mit der „Dimersäure“ 24 steht ein billiges Amphiphil zur Synthese von Vesikeln in großer Menge zur Verfügung (ca. DM 5.— pro kg).

Die Aussicht von diesen Zwischenstationen auf weiter gesteckte Ziele sind vielversprechend. Über einzelne komplexe, funktionale Vesikelmembranen wurde schon berichtet: Im Shilovschen System zur Wasserspaltung mit sichtbarem Licht^[9-11] wurden das kolloidale Platin, das „sakrifielle“ Reduktionsmittel, der Farbstoff und das Paraquat in unterschiedlichen Vesikelregionen (vgl. Abschnitt 3) lokalisiert und der Einfluß auf das Reaktionsverhalten untersucht^[68, 69]. Die Effizienz und Stabilität dieser Systeme ist jedoch bisher unbefriedigend. Modifizierte Lecithin-Vesikel wurden im Hinblick auf den organoselektiven Transport von Pharmaka in der Blutbahn getestet^[70]. Über ihre Verwendung in kommerziellen Präparaten ist noch nichts bekannt. Beide Problemkreise – die lichtinduzierte Wasserspaltung und der Transport von Pharmaka – werden zur Zeit intensiv bearbeitet. Es ist zu hoffen, daß die neuen synthetischen Systeme zu praktischen Lösungen führen.

Noch interessanter erscheinen einige neue Aspekte, die sich aus den Ergebnissen der in unserem Fortschrittsbericht diskutierten Arbeiten ergeben:

- In positiv geladene Vesikeln sollten sich negativ geladene Polyelektrolyt-Kerne einlagern lassen. Vesikel mit einem Nucleinsäure-Kern könnten z. B. für den Transport von genetischem Material durch Zellmembranen nützlich sein.

- Für Vesikel mit dünnen Membranen (Schichtdicke <20 Å) lassen sich einfache Porenbildner^[2] konzipieren, deren Aggregation zu einer ionendurchlässigen Pore durch den pH-Wert oder durch Signalmoleküle kontrolliert werden kann. Über modifizierte Poren in den Membranen sollten nicht nur das innere Wasservolumen der Vesikel, sondern auch die die Pore umgebende hydrophobe Membranregion für wasserlösliche Reagentien zugänglich werden. Man könnte dann z. B. protonierbare Basen reversibel aus der Membran heraustreiben. Vesikel würden als extrem kleine, verschließbare Gefäße wirken.

- Die neuartigen wasserunlöslichen Amphiphile sollten die Bedeckung hydrophober Oberflächen, z. B. von Kunststoffen, mit monomolekularen, polaren Schichten ermöglichen.

Die Verwirklichung dieser beispielhaft genannten Möglichkeiten obliegt weiteren Forschungsbemühungen. In den meisten Fällen ist über die Eigenschaften der neuen Amphiphile und ihrer Aggregate noch zu wenig bekannt, um damit komplexe Systeme konstruieren zu können. Es läßt sich jedoch schon heute feststellen, daß die von Kunitake zugänglich gemachten synthetischen Membranen ein interdisziplinäres Arbeitsgebiet mit verheißungsvollen Perspektiven eröffnet haben.

Die eigenen Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie, der Kommission für die Förderung der Forschung und des wissenschaftlichen Nachwuchses der Freien Universität Berlin und den Henkel-Werken unterstützt. Dazu beigetragen haben tüchtige und einfallsreiche junge Chemiker: Den Damen und Herren Dr. H. Bartsch, Dr. E. Baumgartner, H. H. David, K. Ellermann, D. Fritsch, W. Grabow, D. Hosseinpour, W. Kaufmann, V. Koesling, W. Krüger, F. Kühl, T. Lehmann, A. Link, Dr. U. Meding-Angrick, G. Penzlin, G. Pöschl, J. Rosenberg, G. Schönberger, U. Wanja und W. Weimann, die im Rahmen von Examensarbeiten, Diplomarbeiten und Dissertationen wissenschaftliches Neuland erschlossen haben, sei hierfür herzlich gedankt.

Eingegangen am 6. Juni,
in veränderter Fassung am 5. Dezember 1983 [A 485]

- [1] J. H. Fendler: *Membrane Mimetic Chemistry*, Wiley, New York 1982.
- [2] J.-H. Fuhrhop: *Bioorganische Chemie*, Thieme, Stuttgart 1982.
- [3] a) S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* 175 (1972) 720; b) G. Brunner in A. Benninghoff, K. Goerttler: *Lehrbuch der Anatomie des Menschen*, Urban und Schwarzenberg, München 1978, S. 44ff.; c) M. K. Jain, R. C. Wagner: *Introduction to Biological Membranes*, Wiley, New York 1980.
- [4] H. T. Witt, *Biochim. Biophys. Acta* 505 (1979) 355; E. Schlodder, P. Gräber, H. T. Witt in J. Barber: *Electron Transport and Photophosphorylation*, Elsevier, Amsterdam 1982, S. 107.
- [5] P. Rapp, H. Bock, E. Urban, F. Wagner, W. Gebetsberger, W. Schulz, *DECHEMA Monogr.* 81 (1977) 177.
- [6] T. Kunitake, Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 3860; T. Kunitake, Y. Okahata, T. Tanaki, F. Kumamaru, M. Takayangi, *Chem. Lett.* 1977, 387.
- [7] G. Büldt, H. U. Gally, J. Seelig, G. Zaccai, *J. Mol. Biol.* 134 (1979) 673.
- [8] H. Hauser, I. Pascher, R. H. Pearson, S. Sundell, *Biochim. Biophys. Acta* 650 (1981) 21.
- [9] B. V. Koriakin, T. S. Dzhabier, A. E. Shilov, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 233 (1977) 620.
- [10] P.-A. Brugger, P. P. Infelta, A. M. Braun, M. Grätzel, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 320.
- [11] W. Krüger, J.-H. Fuhrhop, *Angew. Chem.* 94 (1982) 132; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21 (1982) 131; *Angew. Chem. Suppl.* 1982, 193.

- [12] E. Baumgartner, J.-H. Fuhrhop, *Angew. Chem.* 92 (1980) 564; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19 (1980) 550.
- [13] J.-H. Fuhrhop, D. Fritsch, B. Tesche, H. Schmiady, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.
- [14] J.-H. Fuhrhop, H. Bartsch, D. Fritsch, *Angew. Chem.* 93 (1981) 797; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 804; zur kinetischen Analyse der Azokupplung an Vesikeloberflächen vgl. R. A. Moss, J.-S. Shin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1983, 1027.
- [15] J.-H. Fuhrhop, H. Bartsch, *Liebigs Ann. Chem.* 1983, 802.
- [16] J.-H. Fuhrhop, G. Penzlin, unveröffentlicht.
- [17] V. Koesling, Diplomarbeit, Freie Universität Berlin 1982; J.-H. Fuhrhop, V. Koesling, G. Schönberger, *Liebigs Ann. Chem.*, im Druck.
- [18] V. G. Budker, A. A. Mustaev, E. K. Pressmann, V. V. Roschke, T. E. Vakrusheva, *Biochim. Biophys. Acta* 688 (1982) 541.
- [19] A. Akimoto, K. Dorn, L. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp, *Angew. Chem.* 93 (1981) 108; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 90.
- [20] L. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp, *Angew. Chem.* 93 (1981) 311; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 305.
- [21] D. Kippenberger, K. Rosenquist, L. Odberg, P. Tundo, J. H. Fendler, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 1129 und zit. Lit.
- [22] S. L. Regen, A. Singh, G. Oehme, M. Singh, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 791.
- [23] Aus polymerisierten Vesikeln in Ethanol-Wasser (1:1) lassen sich perfekt kugelförmige Membranen für elektronenmikroskopische Untersuchungen herstellen. Es wurde unseres Wissens jedoch bisher nicht untersucht, inwieweit die physikalischen Eigenschaften der hydrophoben Membran durch Einwirkung von Ethanol verändert werden.
- [24] J.-H. Fuhrhop, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 28 (1980) 792.
- [25] J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, B. W. Ninham, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* 72 (1976) 1525.
- [26] J. H. Fendler, E. J. Fendler: *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems*, Academic Press, New York 1975.
- [27] Y. Okahata, R. Ando, T. Kunitake, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 3067.
- [28] W. R. Hargreaves, D. W. Deamer, *Biochemistry* 17 (1978) 3759.
- [29] T. Kunitake, N. Kimizuka, N. Higashi, N. Nakashima, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.
- [30] J.-H. Fuhrhop, T. Lehmann, *Liebigs Ann. Chem.*, im Druck.
- [31] Y. Okahata, T. Kunitake, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 5231; vgl. auch T. Kunitake, N. Nakashima, M. Shimomura, Y. Okahata, *ibid.* 102 (1980) 6642.
- [32] D. F. O'Brien, T. H. Whitesides, R. T. Klingbiel, *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.* 19 (1981) 95.
- [33] H. H. Hub, B. Hupfer, H. Koch, H. Ringsdorf, *Angew. Chem.* 92 (1980) 962; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19 (1980) 938.
- [34] R. Benz, W. Praß, H. Ringsdorf, *Angew. Chem.* 94 (1982) 388; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21 (1982) 368; *Angew. Chem. Suppl.* 1982, 869.
- [35] B. Franck, G. Bringmann, C. Wegner, U. Spiegel, *Liebigs Ann. Chem.* 1980, 263.
- [36] U. Meding-Angrick, Dissertation, Freie Universität Berlin 1983; J.-H. Fuhrhop, U. Meding-Angrick, T. Lehmann, unveröffentlicht.
- [37] J.-H. Fuhrhop, U. Wanja, *Liebigs Ann. Chem.*, im Druck.
- [38] R. Zana, S. Yiv, K. M. Kale, *J. Colloid Interface Sci.* 77 (1980) 456.
- [39] J.-H. Fuhrhop, *Angew. Chem.* 88 (1976) 704; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 15 (1976) 648.
- [40] J.-H. Fuhrhop, K. Ellermann, H. H. David, J. Mathieu, *Angew. Chem.* 94 (1982) 444; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21 (1982) 440; *Angew. Chem. Suppl.* 1982, 980.
- [41] S. Massari, D. Pascolini, *Biochemistry* 16 (1977) 1189.
- [42] J.-H. Fuhrhop, J. Mathieu, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1983, 144.
- [43] A. Gliootti, R. Rolandi, M. De Rosa, A. Gambacorta, B. Nicolau, in R. Antolini et al.: *Transport in Biomembranes, Model Systems and Reconstitution*, Raven Press, New York 1982.
- [44] J.-H. Fuhrhop, W. Kaufmann, W. Schambil, *Dtsch. Pat.-Anm. D*:6771 (1983), Fa. Henkel.
- [45] T. Kunitake, N. Nakashima, M. Shimomura, Y. Okahata, T. Kano, T. Ogawa, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 6642.
- [46] T. Kunitake, N. Nakashima, K. Morimitsu, *Chem. Lett.* 1980, 1347.
- [47] T. Kunitake, N. Nakashima, S. Hayashida, K. Yonemori, *Chem. Lett.* 1979, 1413.
- [48] N. Nakashima, H. Fukushima, T. Kunitake, *Chem. Lett.* 1981, 1555.
- [49] J.-H. Fuhrhop, H. H. David, unveröffentlicht.
- [50] H. Bader, H. Ringsdorf, J. Skura, *Angew. Chem.* 93 (1981) 109; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 91.
- [51] M. Shimomura, T. Kunitake, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 1757.
- [52] T. Kunitake, Y. Okahata, S. Yasunami, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 5547.
- [53] H. Ihara, Y. Hashiguchi, T. Kunitake, *Chem. Lett.* 1983, 733.
- [54] E. M. Arnett, J. Chao, B. J. Künzig, M. V. Stuart, O. Thompson, R. J. Verbiar, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 389.
- [55] T. Kunitake, T. Sakamoto, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 4615.
- [56] R. A. Moss, G. Bizzigotti, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 6512.
- [57] Y. Murakami, A. Nakano, A. Yoshimatsu, K. Fukuya, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 728.
- [58] K. Ohkubo, K. Sugahara, K. Yoshinaga, R. Ueoka, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1980, 637.
- [59] M. F. Czarnecki, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 3675.
- [60] J. N. Israelachvili, S. Marcelja, R. G. Horn, *Q. Rev. Biophys.* 13 (1980) 121.
- [61] T. Kunitake, Y. Okahata, M. Shimomura, S. Yasunami, K. Takarabe, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 5401.
- [62] T. M. S. Chang: *Artificial Cells*, Thomas, Springfield, Ill. 1972; *Introduction to Artificial Kidney, Artificial Liver, Artificial Cells*, Plenum Press, New York 1978.
- [63] T. M. S. Chang, *J. Macromol. Sci. Chem. A* 10 (1976) 245.
- [64] Doppelschichtmembranen aus wasserlöslichem Polyvinylalkohol und Dimethyl(dioctadecyl)ammoniumbromid (1:1) wurden ebenfalls beschrieben: S. Hayashida, H. Sato, S. Sugawara, *Chem. Lett.* 1983, 625.
- [65] S. W. Fox, *Naturwissenschaften* 56 (1969) 1.
- [66] A. L. Lehninger: *Biochemistry*, Worth, New York 1970, S. 783 ff.; vgl. auch *Biochemie*, 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1979.
- [67] J.-H. Fuhrhop, J. Mathieu, unveröffentlicht.
- [68] M. Calvin, *Acc. Chem. Res.* 11 (1978) 369.
- [69] M. S. Tunuli, J. H. Fendler, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 2507.
- [70] G. Gregoridis, A. C. Allison: *Liposomes in Biological Systems*, Wiley, New York 1980.