

Wechselwirkung von hydrophob modifizierten Poly-*N*-isopropylacrylamiden mit Modellmembranen – oder das Spielen einer molekularen Ziehharmonika **

Von Helmut Ringsdorf*, Joachim Venzmer und Francoise M. Winnik

Ein Stabilisierungselement biologischer Membranen ist das Cytoskelett. Im Falle der Erythrocyten handelt es sich dabei um ein zweidimensionales Proteinnetzwerk, welches über Ankerproteine an die Lipidmembran gekoppelt ist^[1]. Ein solches Stützgerüst ist jedoch kein statisches System: durch lokale Kontraktion und Expansion spielt es bei vielen Bewegungsvorgängen und Membranprozessen eine entscheidende Rolle^[2]. Einfache Modellmembranen wie Monoschichten^[3] oder Liposomen^[4] sind überwiegend nur aus Lipiden aufgebaut. Versuche zur Verbesserung ihrer mechanischen Stabilität mit Hilfe von Polymersystemen basieren auf der Verwendung polymerisierbarer Lipide^[5] oder der Fixierung wasserlöslicher Polymere über hydrophobe Ankergruppen^[6] (Abb. 1). Diese Ansätze vernachlässigen meist

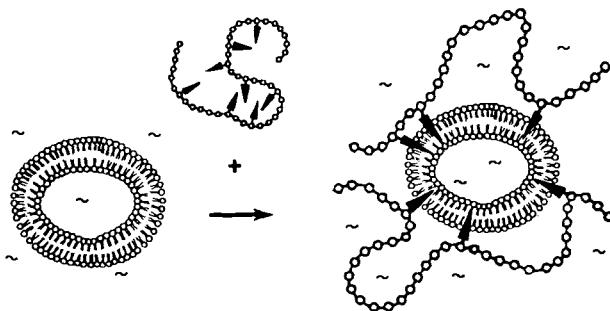


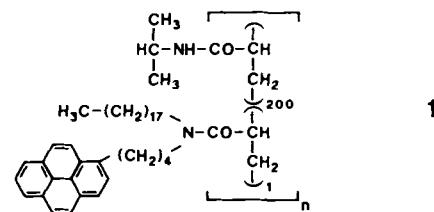
Abb. 1. Schematische Darstellung der Wechselwirkung eines Liposoms mit einem wasserlöslichen Polymer mit hydrophoben Ankergruppen.

den dynamischen Aspekt von Membranen. Ist das adsorbierte Polymer jedoch in der Lage, auf einen äußeren Stimulus wie einen Lichtpuls oder Veränderungen im pH-Wert zu reagieren, kann es zur Veränderung der Eigenschaften des Modellmembransystems verwendet werden^[7]. Hier wird ein System vorgestellt, in dem die Dynamik des Cytoskeletts durch eine thermoreversible Kontraktion und Expansion eines membranverankerten Polymers simuliert wird.

Für die Konstruktion einer solchen „molekularen Ziehharmonika“ muß das wasserlösliche Polymer folgende Eigenschaften haben: Es muß sich fest in Membranen verankern und seine Größe thermoreversibel ändern. Die zweite Eigenschaft ist typisch für Polymere, die sich in kaltem Wasser klar lösen, bei Erwärmung jedoch ausfallen. Ein Beispiel für ein Polymer, das eine solche untere kritische Entmischungstemperatur (lower critical solution temperature, LCST)^[8] aufweist, ist Poly-*N*-isopropylacrylamid (PNIPAM)^[9]. Es wurde für diese Untersuchungen ausgewählt, da 1. seine LCST mit 32 °C in einem Temperaturbereich liegt, der das Arbeiten mit Lipidmembranen erlaubt, 2. eine gerin-

ge Anzahl hydrophober Ankergruppen leicht über eine radikalische Copolymerisation eingeführt werden kann und 3. sich der hydrodynamische Radius der einzelnen PNIPAM-Makromoleküle beim Ausfallen bei der LCST verringert^[10]. Außerdem ist ein Detektionssystem notwendig, um die Konformationsänderungen des Polymers zu verfolgen. Als Methode wurde hierfür die Fluoreszenzspektroskopie von pyrenmarkierten Polymeren gewählt, da Pyren sich durch zwei unterschiedliche Emissionen auszeichnet: Ein isoliertes Pyrenmolekül zeigt eine strukturierte Monomeremission mit Maxima bei $\lambda = 379$ und 399 nm. Kollidiert jedoch ein angeregtes Pyren mit einem Pyren im Grundzustand, so bildet sich ein Excimer, das durch eine breite Emission bei $\lambda \approx 485$ nm^[11] charakterisiert ist. Das Intensitätsverhältnis von Monomer- und Excimeremission ist daher ein Maß für das Verhältnis von isolierten zu eng benachbarten Pyrenresten.

Für diese Untersuchungen wurde das pyrenmarkierte Polymer **1** verwendet, ein statistisches Copolymer aus *N*-Isopropylacrylamid und *N*-[4-(1'-Pyrenyl)-butyl]-*N*-*n*-octadecylacrylamid in einem molaren Verhältnis von etwa 200/1^[12]. In Wasser bei 20 °C zeigt das Emissionspektrum von **1** sowohl die Fluoreszenz vereinzelter Pyrene (Monomerintensi-



tät I_M) als auch eine breite Excimeremission um 480 nm (Excimerintensität I_E) (Abb. 2 A). Der große Anteil der Excimerfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz von **1** ($I_E/I_M = 1.10$) in wässriger Lösung ist ein Hinweis auf die Existenz von Mikrodomänen mit einer hohen lokalen Pyrenkonzentration. Diese wurden als das Innere unimolekulare micellarer Bereiche identifiziert, die durch die Octadecylketten und die Pyrengruppen gebildet werden. Diese sind umgeben von der polareren PNIPAM-Hauptkette, die dem Polymer seine Wasserlöslichkeit verleiht^[12]. Wird eine Lösung von **1** über seine LCST erwärmt, resultiert eine deutliche Veränderung im Fluoreszenzspektrum: Die Monomeremission steigt auf Kosten der Excimeremission stark an ($I_E/I_M = 0.45$), was die Zerstörung der hydrophoben Mikrodomänen zeigt.

Gibt man kleine unilamellare Liposomen aus Dimyristylolethithin (DMPC, 1 g L⁻¹) zu einer Lösung von **1** (20 ppm) bei 26 °C, so hat dies einen dramatischen Effekt auf die Konfiguration des Polymers, was durch eine drastische Reduktion der Excimerfluoreszenz deutlich wird ($I_E/I_M = 0.04$, Abb. 2 B). Der Abfall von I_E/I_M von 1.10 auf 0.04 zeigt, daß die Octadecyl/Pyren-Ankergruppen in die DMPC-Membran inseriert sind. Innerhalb der Lipiddoppelschicht befinden sie sich in einer hydrophoben Umgebung, so daß die Triebkraft für eine micellare Aggregation nicht mehr vorhanden ist. Die Pyrenchromophore sind daher voneinander separiert, und die Excimerbildung wird fast vollständig verhindert.^[13] Wird immer mehr Polymerlösung zu einer Liposomenpräparation zugegeben, dann wird eine Polymerkonzentration erreicht, ab der das Intensitätsverhältnis I_E/I_M wieder ansteigt. Dies ist der Punkt, an dem die Oberfläche der Liposomen vollständig mit Polymeren bedeckt ist (35 Makromoleküle pro Liposom oder 1 Pyren pro 110 Lipide).

[*] Prof. Dr. H. Ringsdorf, Dr. J. Venzmer
Institut für Organische Chemie der Universität
J.-J.-Becherweg 18–20, W-6500 Mainz 1

Dr. F. M. Winnik
Xerox Research Centre of Canada

[**] Diese Arbeit wurde vom kanadischen NSERC (Prof. M. A. Winnik) und von der „New Energy and Industrial Technology Development Organization of Japan“ gefördert.

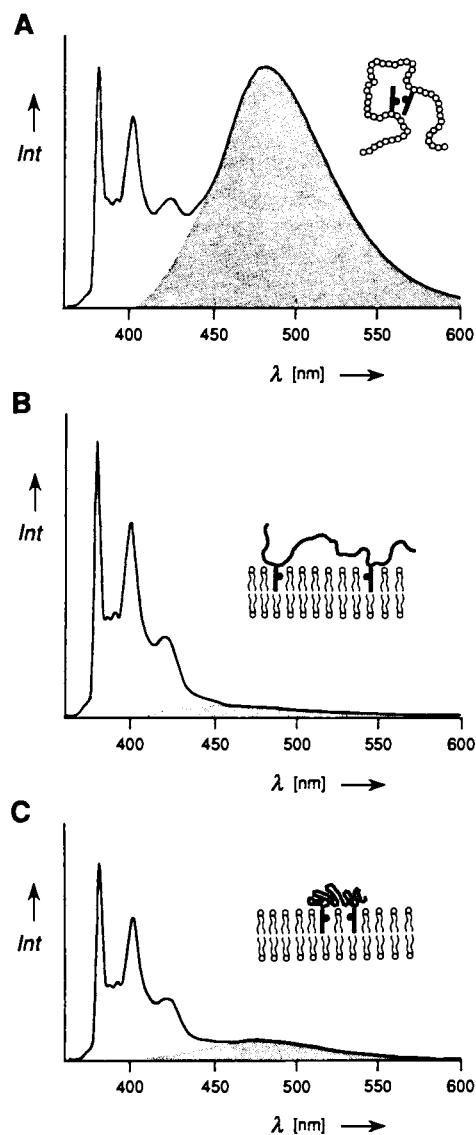


Abb. 2. Fluoreszenzspektren und schematische Darstellung der Wechselwirkung von 1 mit Liposomen aus DMPC ($\lambda_{\text{Anr.}} = 347 \text{ nm}$): A) Polymer ohne Liposomen ($I_E/I_M = 1.10$); B) Polymer mit DMPC-Liposomen bei 26°C ($I_E/I_M = 0.04$); C) gleiches System bei 34°C ($I_E/I_M = 0.12$).

Das überschüssige Polymer liegt dann wieder in einer micelären Struktur vor.

Erwärmst man nun eine Lösung solcher funktionalisierter Liposomen auf 34°C , d. h. über die LCST des Polymers hinaus, hat dies einen kleinen aber signifikanten Anstieg der Excimeremission zur Folge ($I_E/I_M = 0.12$, Abb. 2C). Dieser Effekt ist vollkommen reversibel: Nach Abkühlen der Lösung unter die LCST von PNIPAM wird wieder der ursprüngliche Wert von $I_E/I_M = 0.04$ erreicht. Der Anstieg der Excimerfluoreszenz kann durch die folgende Sequenz molekularer Ereignisse erklärt werden: An der LCST kollabiert das in der Wasserphase befindliche PNIPAM. Die Ankergruppen des Polymers werden dadurch gezwungen, sich durch laterale Diffusion innerhalb der Membran aufeinander zu zu bewegen. Die Anzahl der eng benachbarten Pyrengruppen, die ein Excimer bilden können, steigt damit, was in einer erhöhten Excimerfluoreszenz resultiert. Nach dem Abkühlen expandiert das Polymer wieder, und die Ankergruppen werden wieder auseinander getrieben; die Excimerfluoreszenz nimmt wieder ab. Denkbar wäre auch eine andere Erklärung für den Anstieg der Excimerfluoreszenz oberhalb der LCST: Ein Teil der Ankergruppen könnte aus der Mem-

bran herausgezogen und im ausgefallenen Polymer solubilisiert werden. Auch hier wäre eine Erhöhung der Excimerfluoreszenz zu erwarten. Daher war ein Kontrollexperiment notwendig, um zwischen diesen beiden Fällen zu unterscheiden.

Struktur und Fluidität von Liposomen sind abhängig von der Temperatur^[14]. Oberhalb einer für jedes Lipid charakteristischen Phasenübergangstemperatur befindet sich eine Lipiddoppelschicht in der flüssiganalogen Phase, in der die Alkylketten der Lipide „aufgeschmolzen“ sind. In dieser Phase ist eine laterale Diffusion innerhalb der Membran möglich. Unterhalb dieser Temperatur ist das Liposom in der festanalogen Phase, in der die Alkylketten in einer *all-trans*-Konfiguration kristallisiert sind. In diesem Zustand ist eine laterale Diffusion stark eingeschränkt. Im oben beschriebenen Experiment waren die Liposomen aus DMPC (Phasenübergangstemperatur 23°C)^[15] immer in der flüssiganalogen Phase. Die nächste Serie von Experimenten wurde mit Liposomen aus Distearoyllecithin (DSPC) durchgeführt, bei denen die Phasenübergangstemperatur mit 54°C ^[15] weit oberhalb der LCST von PNIPAM liegt. Zwischen 26 und 56°C können deshalb die Vorgänge an der LCST von PNIPAM und am Phasenübergang der Liposomen getrennt beobachtet werden.

Abbildung 3 zeigt die Ergebnisse dieses Experiments mit Liposomen aus DSPC (1 g L^{-1}) und 1 (20 ppm). Bei 26°C besteht die Fluoreszenz wieder fast ausschließlich aus der Pyren-Monomeremission ($I_E/I_M = 0.03$, Abb. 3A). Die Ankergruppen inserieren also in die festanaloge Membran aus DSPC ebenso wie in die flüssiganalogen aus DMPC. Erwärmen auf 34°C ergibt keine Veränderung im Fluoreszenzspektrum ($I_E/I_M = 0.03$, Abb. 3B). Die Ankergruppen können sich also nicht näher kommen, obwohl das Polymer kollabiert ist. Dies kann durch die Tatsache erklärt werden, daß in der festanalogen Phase keine laterale Diffusion möglich ist. Bei 56°C , oberhalb der Phasenübergangstemperatur von DSPC, erhöht sich schließlich der Anteil der Excimerfluoreszenz deutlich ($I_E/I_M = 0.28$, Abb. 3C). Bei dieser Temperatur ist eine laterale Diffusion möglich, und die Ankergruppen werden zusammengezogen.

Danach wurde das System wieder auf 26°C abgekühlt. Dabei änderte sich das Fluoreszenzspektrum nicht: das Intensitätsverhältnis I_E/I_M blieb bei dem hohen Wert von 0.28 (Abb. 3D). Die Membran hat bei dieser Temperatur wieder ihre Fluidität verloren, und die Ankergruppen können nicht mehr separiert werden, obwohl das Polymer wieder expandiert ist. Das Durchlaufen dieses Temperaturzyklus führt also nicht zum Ausgangszustand zurück. Während die Ankergruppen zu Beginn voneinander separiert in die Membran eingeschoben sind, werden sie am Ende des Experiments in der Position festgehalten, die sie in der flüssiganalogen Phase erreicht haben. Diese Beobachtung liefert den Beweis für die Funktionsfähigkeit der „molekularen Ziehharmonika“: Wenn die Ankergruppen zu irgendeinem Zeitpunkt während des Experiments aus der Membran herausgezogen worden wären, würde ihre erneute Insertion in die Membran unterhalb der LCST zu einem Zustand mit separierten Ankergruppen führen.

Führt die Kontraktion des membranverankerten PNIPAMs zu einer Formänderung der Liposomen? Dies würde den natürlichen Prozeß der Formänderung eines Erythrocyten durch Kontraktion des Cytoskeletts simulieren. Die Formänderung der Liposomen ist aus zwei Gründen unwahrscheinlich: Einerseits sind kleine, unilamellare Liposomen nicht formflexibel; die Kugel ist für ein gegebenes Verhältnis von Oberfläche und Volumen die einzige mögliche Form. Andererseits kann nicht erwartet werden, daß ein zu lateraler Diffusion befähigtes lineares Polymer Membran-

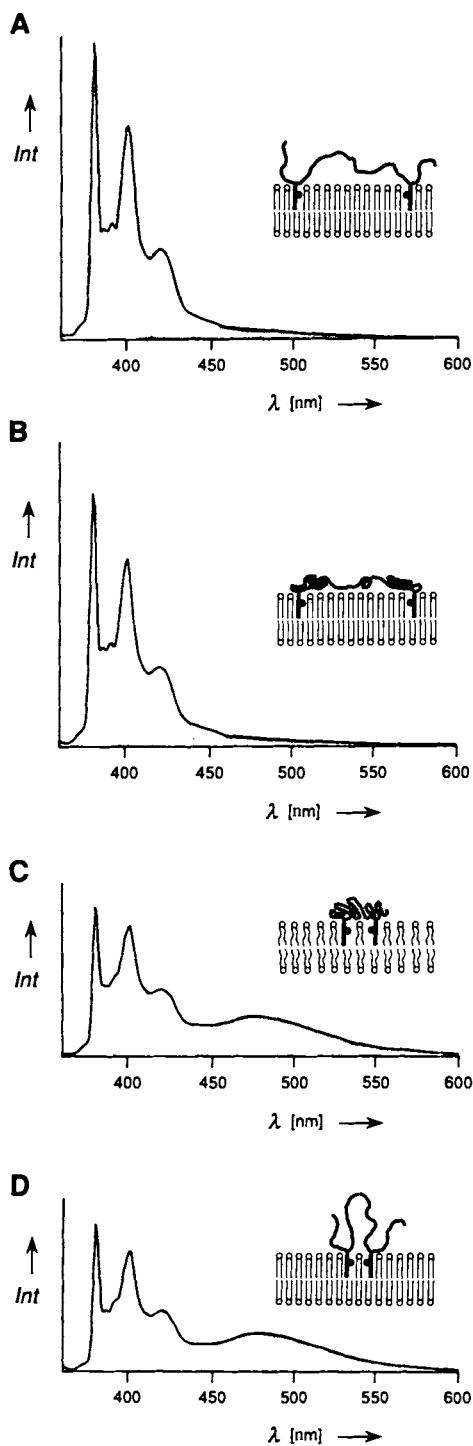


Abb. 3. Fluoreszenzspektren und schematische Darstellung der Wechselwirkung von 1 mit Liposomen aus DSPC ($\lambda_{\text{Amp}} = 347 \text{ nm}$): A) Polymer mit DSPC-Liposomen bei $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($I_E/I_M = 0.03$); B) gleiches System bei $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($I_E/I_M = 0.03$); C) gleiches System bei $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($I_E/I_M = 0.28$); D) gleiches System wieder auf $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt ($I_E/I_M = 0.28$).

ausstülpungen hervorrufen kann. Solche Formänderungen könnten vielleicht durch Verwendung eines Polymerenetzwerkes erreicht werden.

Experimentelles

Synthese und Charakterisierung von 1 (LCST = $30.6 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $M_V = 360\,000$, im Durchschnitt 16 Octadecyl/Pyren-Gruppen pro Makromolekül) sind beschrieben [12]. Die Liposomen ($d = 100 \text{ nm}$, B190 Particle Sizer, Brookhaven Instrument Corp.) wurden durch Ultrabeschallung einer Lipiddispersion in deionisiertem Wasser oberhalb der Phasenübergangstemperatur des Lipids hergestellt (1 g L^{-1} , 40 W, Ultrasonic Homogenizer, Series 4710, Cole and Parmer Instru-

ment Corp.). Die Proben für die Fluoreszenzspektroskopie wurden durch Zufügung einer Vorratslösung von 1 ($50 \mu\text{L}$, 1 g L^{-1}) zur Liposomenlösung (2.5 mL) präpariert. Die Fluoreszenzspektren wurden mit einem SPEX-Spektrometer aufgenommen wie beschrieben [12]. Das Verhältnis von Excimer- zu Monomerintensität (I_E/I_M) wurde aus dem Verhältnis der Emissionsintensität bei 480 nm und dem Mittelwert der Emissionsintensitäten bei 379 nm und 399 nm berechnet. Für die temperaturabhängigen Messungen wurden die Proben mit 0.2 K min^{-1} erwärmt.

Eingegangen am 20. September 1990 [Z 4193]

- [1] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson: *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, New York 1983, S. 268; *Molekulärbiologie der Zelle*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1986.
- [2] E. Sackmann, H. P. Duwe, K. Zeman, A. Zilker in E. Clementi, S. Chin (Hrsg.): *Structure and Dynamics of Nucleic Acids, Proteins and Membranes*, Plenum, New York 1986, S. 251.
- [3] G. L. Gaines: *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, Wiley Interscience, New York 1966.
- [4] a) M. J. Ostro (Hrsg.): *Liposomes*, Dekker, New York 1983; b) *Liposomes: From Biophysics to Therapeutics*, Dekker, New York 1987; c) G. Gregoriadis (Hrsg.): *Liposome Technology. Vol. I-III*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA 1984.
- [5] a) H. Bader, K. Dorn, B. Hupfer, H. Ringsdorf, *Adv. Polym. Sci.* **64** (1985) 1; b) S. L. Regen in [4b], S. 73.
- [6] a) M. Takada, T. Yuzuriha, K. Katayama, K. Iwamoto, J. Sunamoto, *Biochim. Biophys. Acta* **802** (1984) 237; b) G. Decher, E. Kuchinka, H. Ringsdorf, J. Venzmer, D. Bitter-Suermann, C. Weisgerber, *Angew. Makromol. Chem.* **166/167** (1989) 71; c) Übersicht: H. Ringsdorf, B. Schlarb, J. Venzmer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **27** (1988) 113.
- [7] D. A. Tirrell, *J. Controlled Release* **6** (1987) 15.
- [8] L. D. Taylor, L. D. Cerankowsky, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **13** (1975) 2251.
- [9] M. Heskins, J. E. Guillet, *J. Macromol. Sci. Chem.* **A2(8)** (1968) 1441.
- [10] a) I. Yamamoto, K. Iwasaki, S. Hirotsu, *J. Phys. Soc. Jpn.* **58** (1989) 210; b) F. M. Winnik, *Polymer* **31** (1990) 2125.
- [11] J. B. Birks: *Photophysics of Aromatic Molecules*, Wiley Interscience, London 1970, Kap. 7.
- [12] a) H. Ringsdorf, J. Venzmer, F. M. Winnik, *Polym. Prepr. Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.* **3/1** (1990) 568; b) H. Ringsdorf, J. Venzmer, F. M. Winnik, *Macromolecules* **24** (1991), im Druck.
- [13] Die Zugabe von 1 zu Liposomen führte nicht in allen Fällen zu einer vollständigen Reduktion der Excimerfluoreszenz. Bei Liposomen aus Eieli- cithin (hoher Anteil an ungesättigten Fettsäureketten) erreichte das System einen Gleichgewichtszustand bei $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$ mit $I_E/I_M = 0.43$. Die Mischbarkeit der $C_{18}\text{Pyr}$ -Ankergruppen mit den Lipidketten spielt also eine wichtige Rolle bei der Verteilung der Ankergruppen in der Membran.
- [14] E. Sackmann in W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, H. Ziegler (Hrsg.): *Biophysik*, Springer, Berlin 1982, S. 439.
- [15] S. Mabrey, J. M. Sturtevant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73** (1976) 3862.

Intermediate in Nitrogenase-Modellen: N_2H_3 und N_2H_4 als η^2 -koordinierte Liganden**

Von Sabine Vogel, Annette Barth, Gottfried Huttner*, Thomas Klein, Laszlo Zsolnai und Reinhard Kremer

Professor Dieter Sellmann zum 50. Geburtstag gewidmet

Distickstoffliganden des Typs N_2H_X sind in allen Modellen, welche die Aktivität von Nitrogenase zu erklären versuchen, wichtige Intermediates^[1]. Eine Schlüsselrolle kommt dabei dem Hydrazido(1-)Liganden $\text{N}_2\text{H}_3^{\ominus}$ zu. Nur in ei-

[*] Prof. Dr. G. Huttner, Dipl.-Chem. S. Vogel, Dipl.-Chem. A. Barth, Dipl.-Chem. T. Klein, Dr. L. Zsolnai
Anorganisch-chemisches Institut der Universität
Im Neuenheimer Feld 270, W-6900 Heidelberg

Dr. R. Kremer [+]
Max-Planck-Institut für Festkörperforschung
Heisenbergstraße 1, W-7000 Stuttgart 80

[+] Magnetische Messungen

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert.