

## Vesikelbildung aus reaktiven Tensiden\*\*

Helmut H. Zepik,\* Peter Walde\* und Takashi Ishikawa

In den letzten Jahren ist die Synthese von künstlichen Zellen im Labor zu einem realistischen Forschungsziel geworden.<sup>[1]</sup> Man kann zwei komplementäre Ansätze unterscheiden: Der Bottom-up-Ansatz versucht, eine synthetische Zelle auf der molekularen Ebene zu konstruieren. Inspiriert vom Szenario einer RNA-Welt, die zur Entstehung des Lebens führte, stellen sich viele Wissenschaftler eine RNA-Replikase vor, die sich im Innern eines replizierenden Vesikels selbst repliziert.<sup>[2]</sup> Beim umgekehrten Top-down-Ansatz versuchen die Forscher eine Minimalzelle zu rekonstituieren, indem sie die Komplexität des biologischen Organismus zu einem minimalen Bausatz aus DNA, RNA und Proteinen reduzieren. Dieser muss jedoch ausreichend sein, um die Vermehrung und Evolution der Zelle zu gewährleisten.<sup>[3]</sup> In diesen Untersuchungen zu künstlichem Leben sind die Lipidkomponenten entweder natürlich vorkommende Phospholipide<sup>[4]</sup> oder Fettsäuresysteme.<sup>[5]</sup> Letztere haben die besondere Eigenschaft, bei hohem pH-Wert als Micellen vorzuliegen, während eine einfache Senkung des pH-Werts zu einer Umwandlung in Vesikel führt.<sup>[6]</sup> Darauf aufbauend wurde vor kurzem die Bildung von Vesikeln aus Micellen und deren kontrolliertes und kontinuierliches Wachstum erreicht.<sup>[7]</sup> Allerdings sind Vesikel aus Fettsäuren nur innerhalb eines engen pH-Bereichs und nur bei niedrigen Salzkonzentrationen stabil.<sup>[8]</sup> Dagegen sind Phospholipidmembranen unter verschiedensten Bedingungen stabil, jedoch erfordern ihre Bildung und ihr Wachstum einen anspruchsvollen Biosyntheseapparat mit mehreren Enzymen.<sup>[9]</sup> Wegen ihrer sehr niedrigen kritischen Vesikelbildungskonzentration (critical vesicle concentration, cvc) im submikromolaren Bereich können Phospholipide nicht als Monomere oder Micellen zu bereits vorhandenen Vesikeln zugegeben werden, um deren Wachstum zu induzieren. Zudem kommt es beim Wachstum durch Fusion von Vesikeln in vielen Fällen zu einem massiven Verlust des Vesikelinhals.<sup>[10]</sup> Deshalb wäre die Entwicklung eines Systems sehr nützlich, das die Vorteile von Phospholipiden mit dem einfachen Aufbau von Tensiden ohne den Rückgriff auf Enzyme verbindet.

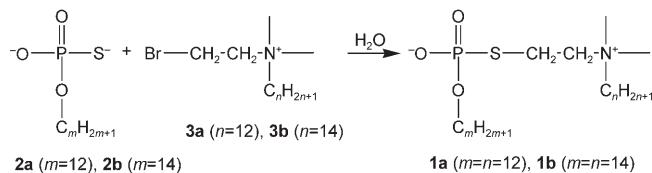
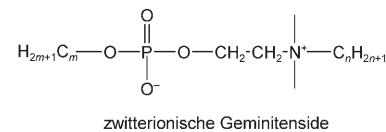
[\*] Dr. H. H. Zepik, Prof. Dr. P. Walde  
Departement Materialwissenschaft, ETH Zürich  
8093 Zürich (Schweiz)  
Fax: (+41) 446-321-265  
E-Mail: hzepik@mat.ethz.ch  
peter.walde@mat.ethz.ch

Dr. T. Ishikawa  
Departement Biologie, ETH Zürich  
8093 Zürich (Schweiz)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der EU COST action D27 „Prebiotic Chemistry and Early Evolution“ unterstützt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Johnsson et al. haben kürzlich Geminitenside auf Kohlenhydratbasis eingeführt, deren Aggregation pH-abhängig ist.<sup>[11]</sup> Sugawara und Mitarbeiter haben ein neues chemisches System von selbstreplizierenden Riesenvesikeln vorgestellt. Die Vorstufen sind ein amphiphiler Benzaldehyd und ein lipophiles Anilinderivat, die über Iminbildung zu einem langketigen Amphiphil reagieren, das Vesikel bildet und eine quartäre Ammoniumkopfgruppe trägt.<sup>[12]</sup> Wir waren jedoch an biomimetischen Lipiden interessiert, die wie Phospholipide mit zwitterionischer Kopfgruppe und zwei aliphatischen Ketten ausgestattet sind. Menger und Peresypkin haben kürzlich über eine neue Tensidstruktur mit diesen Charakteristika berichtet.<sup>[13]</sup> Sie zeigten, dass so genannte zwitterionische Geminitenside (Schema 1) in Abhängigkeit von den

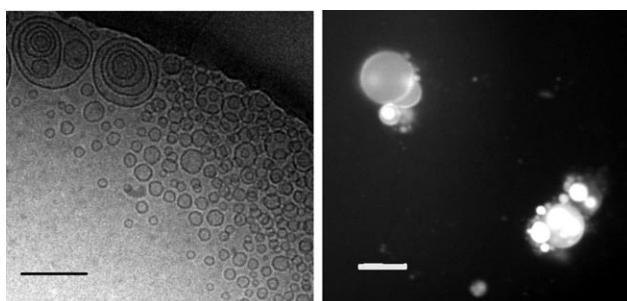


**Schema 1.** Oben: Allgemeine Struktur der zwitterionischen Geminitenside. Unten: Bildung des zwitterionischen Geminitensids **1** aus funktionalisierten Vorstufen.

Kettenlängen  $m$  und  $n$  zu Micellen, Koazervaten, Vesikeln oder Gelen aggregieren. Zwitterionische Geminitenside mit  $m, n > 10$  bilden vorwiegend Vesikel. Wir postulierten, dass ein Schwefelatom anstelle der Sauerstoffbrücke in **1** das Aggregationsverhalten nicht beeinträchtigen sollte. Zusätzlich sollte die Schwefelbrücke die konvergente Synthese der zwitterionischen Geminitenside in wässriger Lösung ausgehend von entsprechend funktionalisierten einkettigen Tensiden ermöglichen.

Als das S-analoge zwitterionische Geminitensid **1a** ( $m = n = 12$ ) in Wasser dispergiert wurde, bildete es wie erwartet Vesikel. Daraufhin mischten wir die einkettigen Tenside **2a** ( $m = 12$ ) und **3a** ( $n = 12$ ), um **1a** in situ herzustellen. Phosphorthioat **2a** und das quartäre Ammoniumsalz **3a** wurden jeweils in wässrigem Puffer gelöst und dann langsam gemischt (2–4 h). Nach einigen Minuten wurde die Lösung trübe, was auf die Bildung von größeren Aggregaten hinwies. Nach vollständiger Mischung wurde die Suspension eine weitere Stunde lang gerührt und danach mit Cryo-Transmissions-elektronenmikroskopie (Cryo-TEM) untersucht. Es wurde eine heterogene Ansammlung von großen multilamellaren

und kleinen unilamellaren Vesikeln beobachtet (Abbildung 1, links). Die oberflächenaktiven Substanzen **2** und **3** wurden bei äquimolaren Konzentrationen von je 2–8 mm gemischt. Dies ist unterhalb der veröffentlichten kritischen



**Abbildung 1.** Links: Cryo-TEM-Aufnahme von Vesikeln aus **1a**, in situ gebildet durch Reaktion einer äquimolaren Mischung aus **2a** und **3a**. Maßbalken: 200 nm. Rechts: Fluoreszenzaufnahme von FITC-Dextranhaltigen Vesikeln aus **1b**, gebildet durch Mischen von **2b** mit **3b** in Gegenwart von FITC-Dextran. Maßbalken: 5 µm.

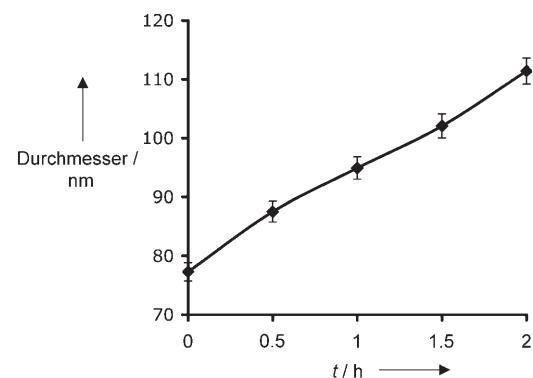
micellaren Konzentration (critical micellar concentration, cmc) für ähnliche Verbindungen. Die cmc der Stammverbindung Dodecyltrimethylammoniumbromid (DTAB) ist mit 15 mm<sup>[14]</sup> angegeben, und die cmc von *N*-(2-Chlorethyl)-*N,N*-dimethyldodecylammoniumbromid mit 13.9 mm.<sup>[15]</sup> Für *n*-Dodecylphosphat wurde eine cmc zwischen 10 und 42 mm gemessen, abhängig vom pH-Wert und den Gegenionen.<sup>[16]</sup> Deshalb gehen wir davon aus, dass zu Beginn Monomere vorliegen, die beim Mischen zuerst gemischte Micellen bilden, um sich dann mit fortschreitender Reaktion zu Vesikeln umzuwandeln.

Schon allein die Mischung von kationischen und anionischen Tensiden kann zu Vesikeln führen, ohne dass dabei eine chemische Reaktion zwischen den Amphiphilen stattfindet. Dieser Typ von Vesikeln ist bekannt als katanionische Vesikel.<sup>[17]</sup> Er kann aus einer Vielzahl von Tensiden hergestellt werden, allerdings muss eines der Tenside im Überschuss vorliegen, da äquimolare Mischungen dazu neigen auszufallen.<sup>[18]</sup> Um zu bestätigen, dass die Vesikel in Abbildung 1 tatsächlich hauptsächlich aus **1a** bestanden, wurde zuerst eine negative Kontrolle mit den entsprechenden nichtfunktionalisierten Tensiden durchgeführt. Als das nichtfunktionalisierte Tensid DTAB mit **2a** gemischt wurde, wurden keine Trübung und keine Partikel größer als 10 nm festgestellt. In dem verwandten katanionischen System DTAB-Dinatrium-dodecanphosphonat wurden nur gemischte Micellen, aber keine Vesikel beobachtet.<sup>[19]</sup> Als die Mischung von **2** und **3** durch Extraktion und Umkristallisation aufgearbeitet wurde, konnte das zwitterionische Geminilipid wiederholt in quantitativer Ausbeute (> 90%) isoliert werden. Diese hohe Ausbeute ist vermutlich auf die Ausrichtung der reaktiven Gruppen an der Grenzfläche zwischen Aggregat und Wassertase zurückzuführen.

Die funktionelle Stabilität der Vesikel wurde durch Einschluss eines fluoreszierenden Farbstoffs im Innenraum untersucht. Fluoresceinisothiocyanat-markiertes Dextran (FITC-Dextran,  $M = 20\,000$ ) wurde in einem kleinen Volu-

men Pufferlösung gelöst und über zwei Stunden kontinuierlich mit äquimolaren Mengen von **2b** ( $m = 14$ ) und **3b** ( $n = 14$ ) versetzt. Nicht eingeschlossenes Dextran wurde durch Gelfiltration abgetrennt. In den Lipidfraktionen konnten anschließend im Fluoreszenzmikroskop stabile Vesikel, die FITC-Dextran enthielten, beobachtet werden (Abbildung 1, rechts). Ähnliche Experimente mit den Dodecylverbindungen schlugen wegen starker Membrandurchlässigkeit fehl. Dieser Befund ist in Einklang mit früheren Berichten, denen zufolge wasserlösliche Moleküle in 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin-Vesikeln (DMPC) eingeschlossen werden können, nicht hingegen in 1,2-Dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin-Vesikeln (DLPC).<sup>[20,21]</sup> Auch in anderen physikalischen Eigenschaften ähneln die zwitterionischen Geminilipide den entsprechenden Phosphatidylcholinen sehr. Für hydratisierte Doppelschichten von **1a** liegt die Hauptphasenübergangstemperatur ( $T_m$ ) unter 0°C, verglichen mit –3°C für DLPC. Für **1b** beträgt  $T_m = 28^\circ\text{C}$ , vergleichbar mit 24°C für DMPC. Die cvc für **1a** ist  $(180 \pm 30)$  nm, gegenüber 25 nm für DLPC<sup>[22]</sup> und  $(65 \pm 20)$  nm für **1b**. Der niedrigere Wert für das entsprechende Phospholipid mag darauf zurückzuführen sein, dass dort die zwitterionische Kopfgruppe von den hydrophoben Ketten durch das Glycerolrückgrat getrennt ist. Ebenso ist die kritische Aggregatkonzentration (critical aggregation concentration, cac) in katanionischen Systemen um 2–3 Größenordnungen niedriger als die der einzelnen Komponenten.<sup>[23]</sup> Dagegen verursacht die kovalente Bindung im vorliegenden zwitterionischen Geminisystem eine  $10^5$ -fache Reduktion der cac.

Abschließend wollten wir untersuchen, ob die Reaktion von **2** mit **3** auch das Wachstum von Vesikeln unterstützt, die schon im Medium vorgelegt sind. Dafür stellten wir eine Suspension von **1a**-Vesikeln her, die durch 100-nm-Poren zu einer Größe von  $(77 \pm 3)$  nm extrudiert wurden. Diese versetzten wir über einen Zeitraum von zwei Stunden mit je einem Äquivalent von **2a** ( $m = 12$ ) und **3a** ( $n = 12$ ). Die Größe der Vesikel wurde periodisch mithilfe der dynamischen Lichtstreuung gemessen. Dabei fanden wir, dass der Durchmesser der Partikel bis zum Schlusswert von  $(111 \pm 4)$  nm stetig zunahm (Abbildung 2). Dies entspricht einer Verdopplung der Oberfläche  $(111^2/77^2 \approx 2)$  durch den quantitativen Einbau der zugegebenen Tenside **2** und **3** in die



**Abbildung 2.** Wachstum von Vesikeln aus **1a** nach Zusatz von je einem Äquivalent **2a** und **3a** über einen Zeitraum von zwei Stunden. Die Größenbestimmung wurde mit dynamischer Lichtstreuung vorgenommen.

vorgelegten Vesikel, gefolgt von der Reaktion zu **1** in der Doppelschicht.

Vesikel aus dem zwitterionischen Geminilipid **1** können in Lösungen von pH 5–10 und bis 1M NaCl hergestellt werden. Das vorteilhafte Stabilitäts- und Wachstumsverhalten stimmt uns optimistisch, dass dieser neue Zugang zur Vesikelbildung aus reaktiven Lipiden die Entwicklung von künstlichen Zellen im Labor voranbringen wird. Ein anderer interessanter Aspekt ist die Ähnlichkeit mit natürlichen Phospholipiden, allerdings ohne deren Flexibilität bei Verknüpfung und Austausch von Fettsäuren und Kopfgruppen. Man kann spekulieren, dass gerade diese Flexibilität eine der wesentlichen Kräfte hinter der natürlichen Selektion von Phospholipiden gegenüber alternativen Strukturen wie den zwitterionischen Geminitensiden ist.

Eingegangen am 31. August 2007  
Online veröffentlicht am 4. Januar 2008

**Stichwörter:** Amphiphile · Künstliche Zellen · Liposomen · Micellen · Phospholipide · Vesikel

- 
- [1] D. Deamer, *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 336.
  - [2] J. W. Szostak, D. P. Bartel, P. L. Luisi, *Nature* **2001**, *409*, 387.
  - [3] P. L. Luisi, F. Ferri, P. Stano, *Naturwissenschaften* **2006**, *93*, 1.
  - [4] V. Noireaux, A. Libchaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17669.
  - [5] P. L. Luisi, P. Walde, T. Oberholzer, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1999**, *4*, 33.
  - [6] K. Morigaki, P. Walde, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2007**, *12*, 75.
  - [7] M. M. Hanczyc, S. M. Fujikawa, J. W. Szostak, *Science* **2003**, *302*, 618.
  - [8] P. A. Monnard, C. L. Apel, A. Kanavarioti, D. W. Deamer, *Astrobiology* **2002**, *2*, 139.
  - [9] P. K. Schmidli, P. Schurtenberger, P. L. Luisi, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8127.
  - [10] R. A. Parente, S. Nir, F. C. Szoka, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 4724.
  - [11] M. Johnsson, A. Wagenaar, J. B. F. N. Engberts, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 757; M. Johnsson, A. Wagenaar, M. C. A. Stuart, J. B. F. N. Engberts, *Langmuir* **2003**, *19*, 4609.
  - [12] K. Takakura, T. Toyota, T. Sugawara, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8134.
  - [13] F. M. Menger, A. V. Peresypkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5614.
  - [14] J. H. Fendler, *Membrane mimetic chemistry*, Wiley, New York, 1982.
  - [15] J. Beger, R. Jacobi, U. Süssmatt, T. Müller, A. Stöhr, V. Schmidt, *Tenside Surfactants Deterg.* **1992**, *29*, 271.
  - [16] J. Arakawa, B. A. Pethica, *J. Colloid Interface Sci.* **1980**, *75*, 441; P. Walde, M. Wessicken, U. Rädler, N. Berclaz, K. Conde-Frías, P. L. Luisi, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 7390.
  - [17] E. W. Kaler, A. K. Murthy, B. E. Rodriguez, J. A. N. Zasadzinski, *Science* **1989**, *245*, 1371.
  - [18] C. Tondre, C. Caillet, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2001**, *93*, 115; T. Zemb, M. Dubois, *Aust. J. Chem.* **2003**, *56*, 971.
  - [19] P. C. Schulz, R. M. Minardi, B. Vuano, *Colloid Polym. Sci.* **1999**, *277*, 837.
  - [20] H. Hauser, M. D. Barratt, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, *53*, 399; T. Kitagawa, K. Inoue, S. Nojima, *J. Biochem.* **1976**, *79*, 1147.
  - [21] A. C. Chakrabarti, R. R. Breaker, G. F. Joyce, D. W. Deamer, *J. Mol. Evol.* **1994**, *39*, 555.
  - [22] J. T. Buboltz, G. W. Feigenson, *Langmuir* **2005**, *21*, 6296.
  - [23] E. H. Lucassen-Reynders, J. Lucassen, D. Giles, *J. Colloid Interface Sci.* **1981**, *81*, 150.
-