

Polymerinduzierte transiente Poren in Lipidmembranen**

Wolfgang H. Binder*

Amphiphile · Lipiddoppelschichtmembranen ·
Polyelektrolyte · Polymere · Porenbildung

Geschlossene Lipiddoppelschichtmembranen (in Form von Vesikeln oder Liposomen) sind Mimetika von Zellmembranen^[1] und werden dementsprechend für den Austausch von kleinen Molekülen (wie Ionen oder pharmazeutische Wirkstoffe)^[2] und großen Molekülen (wie DNA) für Transfektionszwecke verwendet.^[3] Die Freisetzung von Komponenten vom Innern der Vesikel erfordert kontrollierte Reaktionen, die die Porosität der Membran je nach freizusetzendem Stoff steuern. Als Gegenentwurf zur unkontrollierten Zerstörung der vesikulären Membran^[4] ist die steuerbare Bildung von Poren definierter Größe in den Blickpunkt der Forschungen gerückt, speziell durch die Verwendung synthetischer Membrankanäle oder -poren.^[5] Eine große Vielfalt an supramolekular hochgeordneten Molekülen mit Molekulargewichten M_n unter 2000 Da, die in Analogie zu Biomolekülen wie Gramicidin A, Amphotericin oder Valinomycin entworfen wurden, wurde bezüglich der Porenbildung in Membranen getestet (neuere Übersichten siehe Lit. [5–11]). Häufig wiederkehrende Strukturelemente, die diese Moleküle innerhalb der Membran einnehmen, sind Zylinderformen mit supramolekularen Elementen wie Helices, flüssigkristallinen Stäben,^[7] „Barrel-Hoop“-^[12] und „Barrel-Rosette“-Poren.^[11] Ein häufiges Strukturmerkmal ergibt sich daraus, dass der hydrophobe Teil der Moleküle in der Lipidmembran verankert sein muss, ohne jedoch die Hydrophilie der Membrangrenzen zu stark zu beeinträchtigen, sodass offene Poren ausgebildet werden können.^[13] Auf diese Weise können auch einfache Lipide wie C_2 - und C_{16} -Ceramide unter Bildung großer stabiler Poren in die Membran eingebaut werden.^[14]

Ähnlich wie diese strukturell exakt definierten organischen Moleküle sind auch synthetische Makromoleküle in der Lage, nach Verankerung in Lipiddoppelschichtmembranen

Poren zu bilden; die resultierenden Strukturen sind allerdings weniger gut voraussagbar.^[15] Strukturen, Konformationen und Phasentrennungseigenschaften von Polymeren sind wesentlich komplexer als bei organischen Molekülen kleiner und mittlerer Größe. Dies bedingt, dass Konformation, Form und Ionisationszustand innerhalb der Membran nur eingeschränkt angegeben werden können. Beim Annähern eines (amphiphilen) Polymermoleküls an eine Membran (Abbildung 1) können verschiedenste Wechselwirkungen auftreten,

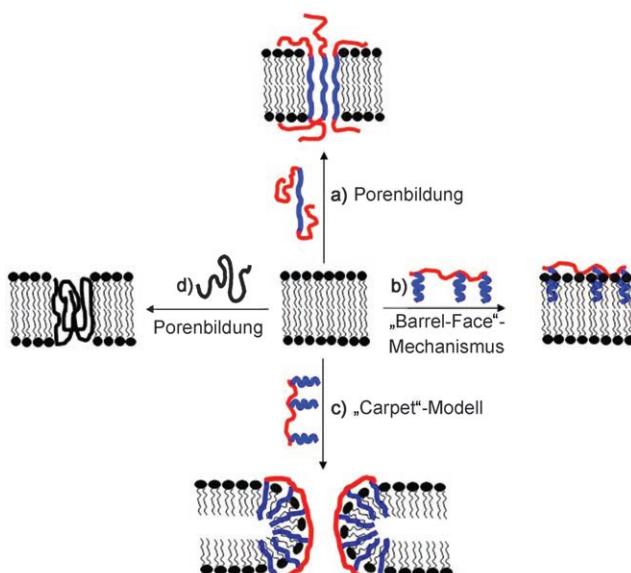


Abbildung 1. Modelle der Porenbildung durch Polymere innerhalb von Lipiddoppelschichtmembranen. a) Porenbildung durch amphiphile Triblockcopolymeren; b) „Barrel-Face“-Mechanismus durch Einschub von hydrophoben Ketten (blau) von Pfpolymeren; c) „Carpet“-Modell für den Einschub von amphiphilen (geladenen) Pfpolymeren; d) Porenbildung durch vollständigen Einschub von Polyelektrolyten.

die zu einer großen Vielfalt an Strukturphänomenen innerhalb der Lipiddoppelschichtmembran führen.^[16–18] Neben einer kompletten Auflösung der Membran (nicht gezeigt)^[4] können nichtionische amphiphile Blockcopolymeren (z.B. PEO-PPO-PEO-Triblockcopolymeren) nach dem „Barrel-Stove“-Mechanismus in die Membran eingebaut werden und Poren bilden. Dieser Mechanismus umfasst eine supramolekulare Anordnung von einigen wenigen Polymermolekülen,

[*] Prof. Dr. W. H. Binder
Fakultät für Naturwissenschaften II (Chemie und Physik)
Institut für Chemie, Makromolekulare Chemie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Heinrich-Damerow-Straße 4, TGZ III
06120 Halle/Saale (Deutschland)
Fax: (+49) 3455-527-392
E-Mail: wolfgang.binder@chemie.uni-halle.de
Homepage: <http://www.chemie.uni-halle.de/>
<http://www.polymers.uni-halle.de/>

[**] Mein Dank gilt dem FWF-Projekt 18740B03 für finanzielle Unterstützung und Dipl.-Ing. Robert Sachsenhofer für die ausgezeichnete Übersetzung des Manuskripts ins Deutsche.

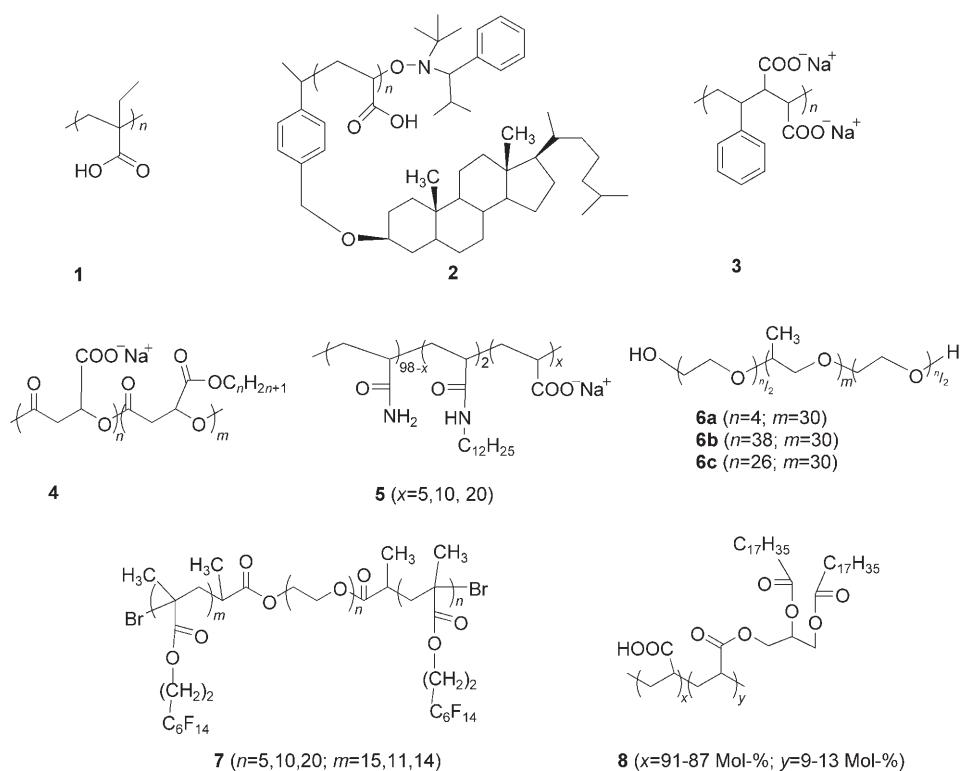
die einen transportfähigen Kanal quer durch die Membran erzeugen (Abbildung 1a). Hydrophile Polymere mit aufgepropften hydrophoben Seitenketten können entweder direkt in die Membran eingebaut werden (Abbildung 1b) oder nach dem „Carpet“-Mechanismus (Abbildung 1c) transiente Poren bilden. Dem „Carpet“-Mechanismus liegt zugrunde, dass die Einbettung des Polymers eine große Änderung der Membrankrümmung bedingt, die die Porenbildung induziert. Auch Polymere mit ionisierbaren Gruppen (Polyelektrolyte) können durch Clustering im nichtionisierten Zustand Poren bilden (Abbildung 1d), die abhängig von der Konformation des Polymers modulierbar sind. Dies ähnelt der Wirkung niedermolekularer Tenside, deren Fähigkeit zur Porenbildung auf Membrankrümmungseffekten^[19] oder der vorübergehenden Bildung von Micellen innerhalb der Lipiddoppelschichtmembran beruht.

Eines der ältesten, jedoch effektivsten Homopolymere, das transiente Poren innerhalb einer Lipiddoppelschichtmembran erzeugt, ist der Polyelektrolyt Poly(2-ethylacrylsäure) (**1**, PEAA; Schema 1).^[20] Bei pH-Werten um 7.0 ändert sich die Konformation von einer gestreckten hydrophilen Form im basischen Milieu zu einer kompakten Kugelform mit amphiphilen Eigenschaften im sauren Milieu.^[21] Die Bildung von Poren wird bei einem Polymeranteil von 10 Mol-% relativ zum (neutralen) Lipid DOPC (Dioleylphosphatidylcholin) oder DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholin) beobachtet. Die Polymermoleküle mit ihren amphiphilen Eigenschaften adsorbieren an die Membran und werden dann in die Membran eingebaut.^[22] Die gebildeten PEAA-Kanäle sind kationenselektiv (mit einem Verhältnis $[\text{Na}^+]/[\text{Cl}^-]$ von 2–11).^[23] Anionische Lipide und reine Polyacrylsäuren bilden

keine Poren,^[24] während die hydrophobere Poly(2-propylacrylsäure) einen starken lytischen Effekt auf die Membran hat.^[25] Die pH-abhängige Konformationsänderung wurde kürzlich beim Einbau der mit Cholesterin funktionalisierten Polyacrylsäure **2** in Liposomen genutzt.^[26] Die Liposomen zeigten einen steuerbaren Calcein-Fluss bei Änderung des pH-Werts von 7.4 auf 7.5, hervorgerufen durch die Konformationsänderung des Polymers von einer gestreckten Spiral- zu einer kompakten Kugelstruktur und der damit einhergehenden Bildung von transienden Poren.

Eine wesentlich stärkere Porenbildung tritt auf, wenn Polyelektrolytcopolymere oder Ppropfcopolymere, die oftmals auch mit hydrophoben Seitenketten versehen sind, für die Anbindung der Polyelektrolytkette innerhalb der Lipiddoppelschichtmembran verwendet werden. Es gibt eine große Vielfalt an hydrophoben Ppropfcopolymeren, die die Porenbildung innerhalb der Membran verstärken; Beispiele sind Poly(styrol-*alt*-methacrylsäure) (PS-*alt*-MAA, **3**),^[27] Polymaleinsäurecopolymere (**4**),^[28] Octyl-substituierte Polyacrylsäuren,^[29,30] Octadecyl-substituierte Dextrane^[31] und diverse Acrylamide.^[32] Normalerweise reicht ein geringer hydrophober Anteil (von einigen wenigen Mol-%) innerhalb des Polymers aus, um eine effiziente Porenbildung zu gewährleisten, wobei höhere Anteile an Polyelektrolyt zu einer effizienteren Zerstörung der Membran führen. Effekte zur Porenbildung wurden eingehend von Wang et al.^[33] an Copolymeren **5** aus Acrylamid und Polyacrylsäure untersucht. Die meisten Untersuchungen zielen auf eine Einbettung der hydrophoben Anteile der Copolymeren in die Lipiddoppelschichtmembran (Abbildung 1b) und die anschließende Porenbildung nach dem „Carpet“-Modell ab (Abbildung 1c).

Seit jeher beschäftigt die Frage, ob tatsächlich regelmäßige Poren in der Membran entstehen oder ob die Wechselwirkung der Membran mit dem Polymer nur undefinierte Poren bzw. undichte Stellen („zufällige Löcher“) erzeugt. Das Vorliegen von definierten Poren wurde nun in einer kürzlichen Studie von Tribet et al. bewiesen,^[29] die die Wechselwirkung zwischen Amphipolen (polydispersen Copolymeren aus Acrylsäure/*N*-Octylacrylamid/*N*-Naphthylacrylamid im molaren Verhältnis 0.71:0.25:0.4) und Schwarzen Lipidmembranen (black lipid membranes) durch Messungen der Membranpermeabilität (Patch-Clamp-Technik) untersuchten. In Abhängigkeit von der Polymerkonzentration wurden diskrete Ströme gemessen, die in direktem Zusammenhang mit der Porengröße standen. Bei



Schema 1. Chemische Strukturen porenbildender Homo- und Copolymeren.

sehr geringen Konzentrationen betrug die Porengröße ca. 0.3 nm, während bei höheren Konzentrationen letztlich ein konstanter Porenradius von ca. 4 nm erreicht wurde. Der Wert von 0.3 nm spricht klar für ein individuelles Polymermolekül in der Membran, das Auftreten der 4 nm großen Pore ist hingegen ein starker Beleg für das in Abbildung 1c erläuterte „Carpet“-Modell.

In aktuellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass auch nichtionische Blockcopolymere die Porenbildung in Lipiddoppelschicht- und Lipideinzelschichtmembranen bewirken. Das Hauptaugenmerk galt ABA-Triblockcopolymeren mit Polypropylenoxid (PPO) oder Polyethylenoxid (PEO) als zentralem B-Block. Krylova und Pohl^[34] führten zahlreiche Experimente mit dem Triblockcopolymer Pluronic L61 (**6a**) durch und wiesen in Membranpermeabilitätsmessungen eine eindeutige Porenbildung an Schwarzen Lipidmembranen nach. Anhand ihrer Beobachtungen schlugen sie eine Anordnung von einigen wenigen Polymeren oder auch größeren Polymeraggregaten („Carrier“-Modus, siehe Abbildung 1a) quer durch die Membran vor. Krylova et al. kamen zu dem Schluss, dass die Wechselwirkungen von Pluronics des Typs **6** und von PEO-PPO-Amphiphilen mit dendritischen Kopfgruppen die Flip-Flop-Bewegungen der einzelnen Lipidmoleküle in der Membran verstärken, wodurch die Membranstruktur gestört wird und demzufolge die Permeabilität ansteigt.^[35] In weiteren Studien wurde die Wechselwirkung der Pluronics **6b,c**^[36,37] und des Triblockcopolymers **7**, das fluorierte hydrophobe Endblöcke enthält, mit Langmuir-Filmen untersucht.^[38] Die Einbettung der Polymere in die Membran wurde anhand von Oberflächendruck/Fläche-Isothermen, In-situ-Kleinwinkelneutronenstreuung (SANS)^[37] und Infrarotreflexionsspektroskopie (IRRAS) analysiert. Nach Einbettung der hydrophoben Blöcke bilden sich zum Lösungsmittel gerichtete hydrophile PEO-Schleifen aus, die auf diese Weise Poren in der Membran erzeugen. Pluronic L64 (**6c**) wurde hinsichtlich des Ionentransports in einem perforierten Gefäß bei unterschiedlichen Konzentrationen untersucht.^[37] Ähnlich wie bei den geladenen Amphipolen wurde durch elektrische Messungen die Bildung von Poren bei geringen und mittleren Konzentrationen nachgewiesen. Die beschriebenen Polymere könnten Anwendung beim Gentransport finden,^[3] denn sie bieten den Vorteil, dass sie die Membran nicht auseinanderreißen und die Bildung klassischer DNA-Lipoplexe vermeiden, wie dies bei kationischen Polymeren wie Polyethylenimin (PEI) beobachtet wird.^[39]

Die begrenzte Stabilität der Lipidmembran warf die Frage auf, ob auch Polymermembranen (Polymersome) in der Lage wären, Porenbildungen einzugehen, die durch äußere Einflüsse wie pH-Wert oder Temperatur steuerbar sind? Die Zerstörung von Polymersomen durch äußere Einwirkungen ist in der Literatur beschrieben worden,^[40] über die Bildung klar definierter Poren hatte man bis vor kurzem jedoch nicht berichtet. Chiu et al.^[41] fanden nun in einer neueren Studie, dass das Ppropfcopolymer **8**, bestehend aus Polyacrylsäure (PAA) und einem geringen Anteil (9–13 Mol %) von Stearylseitenketten, die Bildung definierter Poren in Polymermembranen bewirkt (Abbildung 2). Mithilfe eines speziellen Emulsionsprozesses gelang die Herstellung von Polymerso-

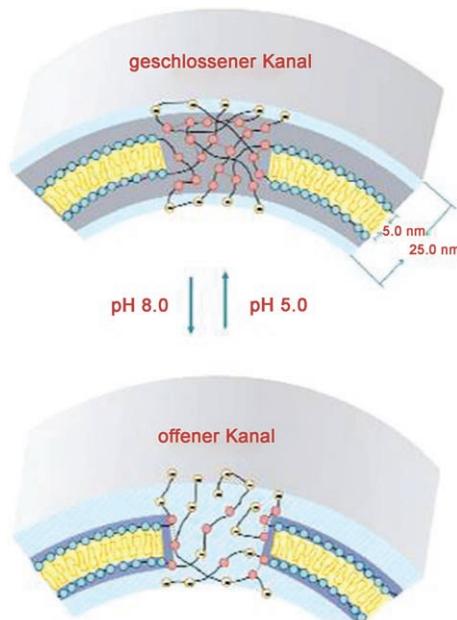


Abbildung 2. Porenbildung in Polymersomen durch das Ppropfcopolymer **8**, bestehend aus Polyacrylsäure und einem geringen Anteil (9–13 Mol %) von Stearylseitenketten. Die Poren können durch Umschalten des pH-Werts von 5.0 auf 8.0 reversibel geöffnet und geschlossen werden. Aus Lit. [41] mit Genehmigung.

men, deren Membran dieses Copolymer enthält. Die Polyacrylsäureketten schieben in die hydrophoben Bereiche innerhalb der Membran ein und zeigen in Abhängigkeit vom pH-Wert den oben erwähnten Konformationsübergang von der freien in die komprimierte Kette. Eine Änderung des pH-Werts von 5.0 auf 8.0 induziert die Konformationsänderung und führt zur Bildung von Poren, die als Transportkanäle für diverse Komponenten fungieren können.

Ähnlich wie die wesentlich höher geordneten Moleküle der supramolekularen Chemie sind auch Polymere in der Lage, Poren und Kanäle innerhalb von Lipidmembranen zu bilden. Vielfältige Polymerisationsmethoden stehen zur Verfügung, um Polymere mit maßgeschneiderten und definierten Strukturen zu erhalten, was für einen gezielten Einbau in Membranen von großer Bedeutung ist. Die supramolekulare Anordnung der Polymere innerhalb oder an der Phasengrenze strukturierter Lipiddoppelschichtmembranen ist noch weitgehend unerforscht und wird zweifellos Gegenstand zu künftiger Studien sein.

Online veröffentlicht am 12. März 2008

- [1] W. H. Binder, V. Barragan, F. M. Menger, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5980–6007; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5802–5827.
- [2] L. Yang, P. Alexandridis, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2000**, *5*, 132–143.
- [3] A. Kabanov, J. Zhu, V. Alakhov, M.-C. H. Leaf Huang, W. Ernst in *Adv. Genet.* **2005**, *53*, 231–261.
- [4] M. le Maire, P. Champeil, J. V. Möller, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2000**, *1508*, 86–111.
- [5] N. Sakai, J. Mareda, S. Matile, *Mol. BioSyst.* **2007**, *3*, 658–666.

- [6] A. L. Sisson, M. R. Shah, S. Bhosale, S. Matile, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 1269–1286.
- [7] S. Bhosale, A. L. Sisson, P. Talukdar, A. Fürstenberg, N. Banerji, E. Vauthey, G. Bollot, J. Mareda, C. Röger, F. Würthner, N. Sakai, S. Matile, *Science* **2006**, *313*, 84–86.
- [8] T. M. Fyles, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 335–347.
- [9] U. Koert, L. Al-Momani, J. R. Pfeifer, *Synthesis* **2004**, 1129–1146.
- [10] G. W. Gokel, *Chem. Commun.* **2000**, 1–9.
- [11] S. Matile, A. Som, N. Sorde, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 6405–6435.
- [12] A. Cazacu, C. Tong, A. van der Lee, T. M. Fyles, M. Barboiu, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9541–9548.
- [13] R. Pajewski, J. Pajewska, R. Li, M. M. Daschbach, E. A. Fowler, G. W. Gokel, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 1960–1972.
- [14] L. J. Siskind, M. Colombini, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 38640–38644.
- [15] M.-A. Yessine, J.-C. Leroux, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 999–1021.
- [16] C. Tribet, F. Vial, *Soft Matter* **2008**, *4*, 68–81.
- [17] V. Bulmus, *Aust. J. Chem.* **2005**, *58*, 411–422.
- [18] P. Lundberg, Ü. Langel, *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16*, 227–233.
- [19] J. Simon, M. Kühner, H. Ringsdorf, E. Sackmann, *Chem. Phys. Lipids* **1995**, *76*, 241–258.
- [20] J. L. Thomas, H. You, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2949–2950.
- [21] J. G. Linhardt, J. L. Thomas, D. A. Tirrell, *Macromolecules* **1999**, *32*, 4457–4459.
- [22] K. Seki, D. A. Tirrell, *Macromolecules* **1984**, *17*, 1692–1698.
- [23] J. C. Chung, D. J. Gross, J. L. Thomas, D. A. Tirrell, L. R. Opsahl-Ong, *Macromolecules* **1996**, *29*, 4636–4641.
- [24] M.-A. Yessine, C. Meier, H.-U. Petereit, J.-C. Leroux, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, *63*, 1–10.
- [25] R. A. Jones, C. Y. Cheung, F. E. Black, J. K. Zia, P. S. Stayton, A. S. Hoffmann, M. R. Wilson, *Biochem. J.* **2003**, *372*, 65–75.
- [26] S.-M. Lee, H. Chen, C. M. Dettmer, T. V. O'Halloran, S. T. Nguyen, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15096–15097.
- [27] Y. Luan, L. Ramos, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14619–14624.
- [28] S. Osanai, K. Nakamura, *Biomaterials* **2000**, *21*, 867–876.
- [29] F. Vial, A. G. Oukhaled, L. Auvray, C. Tribet, *Soft Matter* **2007**, *3*, 75–78.
- [30] C. Ladavière, M. Toussou, T. Gulik-Krzywicki, C. Tribet, *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *241*, 178–187.
- [31] V. Frette, I. Tsafir, M.-A. Guedea-Boudeville, L. Jullien, D. Kandel, J. Stavans, *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *83*, 2465–2468.
- [32] F. Vial, S. Rabhi, C. Tribet, *Langmuir* **2005**, *21*, 853–862.
- [33] Y. Fan, Y. Han, Y. Wang, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 10123–10129.
- [34] O. O. Krylova, P. Pohl, *Biochemistry* **2004**, *43*, 3696–3703.
- [35] T. Demina, I. Grozdova, O. O. Krylova, A. Zhirnov, V. Istratov, H. Frey, H. Kautz, N. Melik-Nubarov, *Biochemistry* **2005**, *44*, 4042–4054.
- [36] L.-C. Chang, C.-Y. Lin, M.-W. Kuo, C.-S. Gau, *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *285*, 640–652.
- [37] J. Gau-Racine, J. Lal, M. Zeghal, L. Auvray, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 9900–9907.
- [38] H. Hussain, A. Kerth, A. Blume, J. Kressler, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 9962–9969.
- [39] E. Wagner, *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 8–14.
- [40] M. Yotaro, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1392–1394; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1370–1372.
- [41] H.-C. Chiu, Y.-W. Lin, Y.-F. Huang, C.-K. Chuang, C.-S. Chern, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1901–1904; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1875–1878.