

Kontrolle molekularer Rezeptor-Protein-Erkennung durch laterale Phasenseparation in Lipid-Polymer-Hybridvesikeln^{**}

Matthias Schulz, Stefan Werner, Kirsten Bacia* und Wolfgang H. Binder*

Biologische Membranen^[1] und ihre synthetischen Gegenstücke sind in ihrer Gesamtheit die Folge eines Selbstorganisationsprozesses nieder- bzw. hochmolekularer amphiphiler Moleküle, wie zum Beispiel von Phospholipiden oder von Blockcopolymeren (BCP).^[2] Bei beiden Arten der Membran (Lipid- oder Polymermembranen)^[3,4] können laterale Phasenseparationsprozesse^[5,6] eine wichtige Rolle spielen: im Falle von Lipidmembranen (sowohl als Modell- oder als biologische Zellmembran) übernehmen lateral phasengetrennte Bereiche (Domänen) wichtige biologische Funktionen bei interzellulären Wechselwirkungen wie bei der Bildung von Rezeptorclustern im Zuge der Erkennung und Bindung spezieller Proteine oder in viralen Erkennungs- und Inkorporationsprozessen. Diese so genannten „Lipid Rafts“ oder Lipiddomänen^[7] – Bereiche, die das Ergebnis lateraler Segregation unterschiedlicher Lipidzusammensetzungen sind,^[2] – können durch molekulare Effekte wie Unterschiede in ihren hydrophoben Kettenlängen oder durch Wechselwirkungen mit Cholesterin oder Sphingolipiden (z.B. tensidresistente Membranen, DRMs)^[8] entstehen. Dagegen zeigen Vesikelmembranen aus rein synthetischen Blockcopolymeren (so genannte Polymersome) sowohl horizontale als auch laterale Phasenseparationsprozesse, die ebenfalls auf Entmischungssphänomene innerhalb der Membran zurückzuführen sind. Diese können durch Unmischbarkeiten der einzelnen Polymerblöcke^[9,10] oder durch zusätzliche Wechselwirkungen mit Kationen^[11] oder Nanopartikeln^[12] hervorgerufen werden. Aktuelle Arbeiten haben gezeigt, dass das Mischen von Phospholipiden und Blockcopolymeren zu Lipid-Polymer-Hybridmembranen^[13–15] führt, die die Vorteile der hohen

Biofunktionalität der entsprechenden Lipidmembran mit der erhöhten mechanischen Stabilität und funktionellen Variabilität der Polymermembran vereinen. Es gelang dabei auch, laterale Phasenseparationprozesse zu beobachten, die auf Unmischbarkeiten zwischen den Lipid- und Polymerbestandteilen zurückzuführen waren,^[15,16] aber auch zusätzlich durch einen externen Stimulus, wie die Wechselwirkung eines Clusterbildners mit strukturell modifizierten Membranen, induziert werden konnten.^[14]

Wie würden nun biologische Erkennungsprozesse (Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen) in solch gemischten Lipid-Polymer-Hybridmembranen („Hybridmembran“) ablaufen? Können Glykosphingolipide in einen lateral phasengetrennten Lipid-Polymer-GUV (großer unilamellarer Vesikel) integriert werden und selektiv Proteine erkennen, oder verhindern laterale Domänen in diesen Hybridvesikeln die Proteinerkennung durch Blockierung der Rezeptorfunktion? Führt die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung gar zu zusätzlichen Phasenseparationsphänomenen?

Aufbauend auf der Idee, die Biofunktionalität einer solchen Hybridmembran nachzuweisen und mögliche Einflüsse seitens der Polymerbestandteile auf biologische Bindungsprozesse systematisch zu untersuchen, entwickelten wir unser Konzept, Hybridmembranen aus einem biokompatiblen Polyisobutylene-block-Polyethylenoxid-Copolymer (PIB_{87-b}-PEO₁₇; BCP **1**) und einem Phospholipid dem 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphatidylcholin (DPPC; **2**) herzustellen, welche zusätzlich mit der Rezeptorfunktion des GM1-Gangliosids (**3**; Glykosphingolipid) funktionalisiert sind, das die Erkennung sowie die selektive Bindung des Proteins Cholera-toxin B (CTB) an die Vesikelmembran ermöglicht (Abbildung 1). Aufgrund des nun entweder lateral gemischten oder phasengetrennten Zustands der rezeptorfunktionalisierten Hybridmembran sollte der Bindungsprozess nun konsequent untersucht werden.

Ein derartig maßgeschneidertes amphiphiles BCP (**1**) mit hydrophoben und hydrophilen Blöcken definierter Länge ermöglichte in früheren Untersuchungen eine Kontrolle des Phasenverhaltens von DPPC-Gelphasenvesikeln in Abhängigkeit vom Lipid/Polymer-Mischungsverhältnis. Der Einbau von BCP **1** in DPPC-Vesikelmembranen veränderte die typische Membranmorphologie und erzeugte unter anderem Heterogenitäten^[15] die eine zweidimensionale, laterale Domänenstruktur aufwiesen (siehe Abbildung 1), wobei die laterale Morphologie der Hybridmembran solcherart gezielt über das Mischungsverhältnis der beiden Komponenten eingestellt werden kann. Gemischte Lipid-Polymer-Vesikel, die aus einer Mischung mit weniger als 20 Mol-% oder mehr als 28 Mol-% der Polymerkomponente hergestellt sind, weisen eine einheitliche Membranmorphologie unter Berücksichti-

[*] M. Schulz, Prof. Dr. W. H. Binder
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Naturwissenschaftliche Fakultät II
Institut für Chemie, Makromolekulare Chemie
06120 Halle (Saale) (Deutschland)
E-Mail: wolfgang.binder@chemie.uni-halle.de
Homepage: <http://www.macrochem.uni-halle.de>
S. Werner, Jun.-Prof. Dr. K. Bacia
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, ZIK HALOMEM
06120 Halle (Saale) (Deutschland)
E-Mail: kirsten.bacia@chemie.uni-halle.de
Homepage: <http://www.halomem.de>

[**] Wir danken für die finanzielle Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG BI 1337/6-1 (W.H.B., M.S.)) innerhalb der Forschungsgruppe FOR-1145, für die Förderung durch DFG INST 271/249-1; INST 271/247-1; INST 271/248-1 (W.H.B.) sowie der BMBF (ZIK HALOMEM, FKZ 03Z2HN22 (K.B., S.W.)) und dem EFRE (1241090001).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201204959> zu finden.

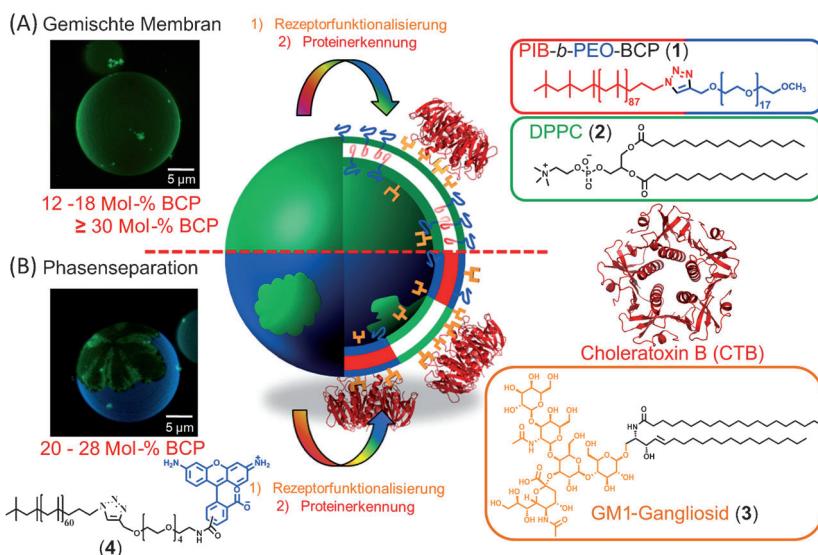


Abbildung 1. Bindung des Proteins Choleratoxin B an gemischte oder phasenseparierte Lipid-Polymer-Hybridmembranen bestehend aus DPPC (2), dem biokompatiblen BCP PIB₈₇-b-PEO₁₇ (1) und Gangliosid GM1 (3). A) Konfokale Mikroskopieaufnahme eines Hybridvesikels, mit entweder 12 bis 18 Mol-% oder mehr als 30 Mol-% BCP 1. B) Phasenseparierter Hybridvesikel, mit 20 bis 28 Mol-% BCP 1. Fluoreszenzmarkiertes BCP 4 (blau) zeigt polymerreiche Phasen an. Lipidreiche Domänen sind durch den Lipidanalogen Farbstoff DiDC₁₈ in grün erkennbar.

gung des Auflösungsvermögens des konfokalen Lasermikroskops auf (ca. 200 bis 300 nm). Dagegen erhält man für Vesikel aus Mischungen mit 20 bis 28 Mol-% BCP 1 eine heterogene (phasenseparierte) Morphologie der Hybridmembran unter Bildung makroskopischer Domänen. Abbildung 1B zeigt eine konfokale Mikroskopieaufnahme eines phasenseparierten GUV (vergleiche auch Abbildung 2), das

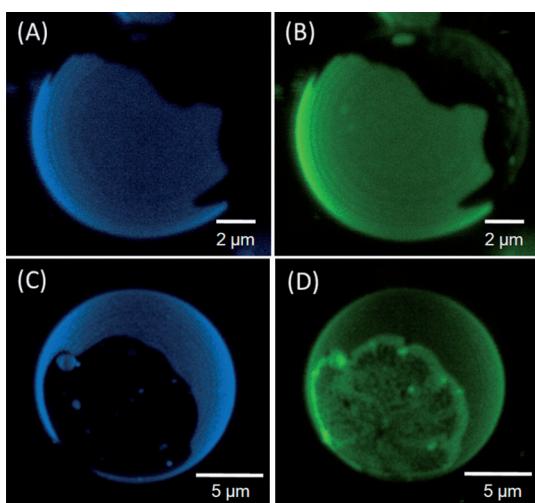


Abbildung 2. Konfokale Mikroskopieaufnahmen von phasenseparierten Hybridvesikeln aus DPPC und PIB₈₇-b-PEO₁₇ (20 Mol-% BCP 1), die Domänenbildung durch das eingelagerten Farbstoffe (Rh-DHPE (B), fluoreszenzmarkiertes BCP 4 (A,C) und DiDC₁₈ (2D)) anzeigen. A,C) Dreidimensionale Rekonstruktion eines Hybridvesikels durch selektive Anregung von 4 bei 488 nm (grün). B) Vesikel aus (A) unter Darstellung des Rh-DHPE (selektiv angeregt bei 561 nm, grün). D) Vesikel aus (C) unter Darstellung des DiDC₁₈ (selektiv angeregt bei 633 nm, grün).

die mischungstypischen makroskopischen Domänen aufweist – 20 Mol-% BCP 1 und 80 Mol-% DPPC (2).

Eine der ersten Herausforderungen bestand nun in der Zuordnung der individuellen Domänen zu der polymer- bzw. lipidreichen Phase. Hierzu wurde das fluoreszenzmarkierte BCP 4 synthetisiert und charakterisiert (siehe die Hintergrundinformationen), das anschließend die Visualisierung der polymerreichen Domänen über eine selektive Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm ermöglichte (blaue Bereiche in Abbildung 1B). Die Verwendung des Lipidanalogen Farbstoffes DiDC₁₈ (selektive Anregung bei 633 nm, grüner Bereich in Abbildung 1B) zeigte eine Anreicherung des Farbstoffes in den Domänen, die vom fluoreszenzmarkierten BCP 4 ausgeschlossen worden sind. Der Phasen separationsprozess führt zur Bildung einer schwach geordneten polymerreichen Phase (siehe Abbildung 2 und die Hintergrundinformationen) und zu Lipiddomänen (schwarze Bereiche in Abbildung 2A,C), die nahezu frei von BCP-Molekülen sind.

Auf Basis früherer Untersuchungen zum Phasenverhalten des Lipidfarbstoffes Rh-DHPE (selektive Anregung bei 561 nm) in Mono- und Doppelschichtmembranen konnte gezeigt werden, dass der Farbstoff weitgehend von geordneten Phasen (z.B. flüssig-kondensierten Phasen)^[15,17] ausgeschlossen wird. Abbildung 2B bestätigt dieses Verhalten und weist auf eine bevorzugte Einlagerung des Rh-DHPE in die polymerreiche Phase hin (vergleiche Abbildung 2A), die aufgrund der hohen Flexibilität der Polymerketten nur einen schwach geordneten Phasenzustand vermuten lässt. Dagegen bestehen die schwarzen Domänen in Abbildung 2A,C, in denen kein Fluoreszenzsignal des BCP-Farbstoffes 4 zu finden ist, aus einer geordneten DPPC-reichen Phase. Zur Untersuchung der Phasen in Hybridmembranen (20 Mol-% BCP 1) zeigten zusätzliche Experimente mit DiDC₁₈ einen unterschiedlichen Grad der Anreicherung des Membranfarbstoffes in den lipidreichen Domänen (vergleiche die schwarzen Domänen in Abbildung 2C mit 2D), womit die Annahme gestützt wird, dass diese Bereiche der Membran aus einer hochgeordneten DPPC-Phase bestehen.^[18a,b]

Die Rezeptorfunktionalisierung der Hybridmembran mit Gangliosid GM1 (3; Zugabe von 0.1 Mol-% 3 zu den entsprechenden Lipid/Polymer-Mischungen) zeigte keine Änderungen der jeweiligen Phasenzustände der Vesikelmembran, was beweist, dass der Einbau geringer Mengen an GM1-Lipiden das Lipid-Polymer-Mischverhalten nicht beeinflusst. Mischungen mit 12 bis 18 Mol-% des BCP 1 ergeben Hybridvesikel mit einer einheitlich gemischten Membran, gefolgt von einem phasenseparierten Zustand – typisch für Hybridvesikel aus Mischungen mit 20 bis 28 Mol-% der Polymerkomponente – und gefolgt von einem einheitlich gemischten Membranzustand oberhalb von 30 Mol-% des BCP 1. Diese unterschiedlichen Hybridvesikel sind über einen

längerer Zeitraum (Beobachtungszeitraum: mehrere Stunden) stabil, und es kann (speziell im Fall der thermisch induzierten Phasenseparation, die beim Abkühlen unterhalb der Phasenübergangstemperatur von DPPC ($T_m = 41.6^\circ\text{C}$) zu makroskopischen Domänenstrukturen führt) ein thermodynamisch stabiler Zustand der Vesikelmembran angenommen werden.

Das bakterielle Protein Choleratoxin B (CTB) bindet selektiv in einem kooperativen Prozess an die Rezeptorfunktion des Gangliosids, wobei das multivalente Toxin aus fünf gleichen Untereinheiten (Pentamer) aufgebaut ist von denen jede in der Lage ist ein GM1-Molekül zu binden, mit einer gesamten Bindungsaaffinität von ungefähr $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ (für Pentamer).^[19] Nach der Zugabe von CTB ([Protein] = $5.3 \mu\text{M}$) in die frisch präparierten Vesikellösungen (siehe Experimentelles) war es möglich, die schnelle und selektive Bindung des fluoreszenzmarkierten Proteins ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, rot gefärbt) an die Rezeptor-funktionalisierten Membranen zu beobachten, und somit konnte auf die laterale Verteilung der CTB-gebundenen GM1-Moleküle in der Hybridvesikelmembran (Abbildung 3) in Abhängigkeit von der Lipid/Polymer-Zusammensetzung geschlossen werden. Anhand erster

Untersuchungen an aus reinem DPPC bestehenden Gelphänsesvesikeln, die ebenfalls mit 0.1 Mol-% GM1 (3) funktionalisiert wurden, ließ sich unter den verwendeten experimentellen Bedingungen keine Proteinbindung (CTB) nachweisen, während ein fluides Membransystem (reine DOPC-Vesikel ($T_m = -20^\circ\text{C}$)) eine einheitliche CTB-Bindung über die gesamte Vesikeloberfläche zeigte (siehe die Hintergrundinformationen). Ein Vergleich der Membranmorphologie vor (visualisiert durch den Membranfarbstoff Rh-DHPE; grün) und nach der Bindung von CTB (Abbildung 3 A) demonstriert, dass Hybridvesikel aus Mischungen mit 12 bis 18 Mol-% BCP 1 im Unterschied zu reinen DPPC-Liposomen eine einheitliche Proteinbindung über die gesamte GUV-Oberfläche aufweisen.

Dagegen zeigten phasenseparierte Membranen (mit einem DPPC/BCP/GM1-Verhältnis von 80:20:0.1), dass die Rezeptor-Protein-Erkennung in einer effektive Bindung des CTB an beide Domänenarten resultiert – Beweis für die einheitliche Verteilung der GM1-Lipide sowohl in der polymerreichen Phase als auch in den lipidreichen Domänen (siehe Abbildung 3 B und die Hintergrundinformationen).

Eine signifikante Änderung der Membranmorphologie konnte nach Inkubation von Hybridvesikeln (DPPC/BCP/GM1 70:30:0.1) mit CTB beobachtet werden. Innerhalb von Minuten nach Zugabe des CTB konnte die Bindung des Proteins an die zuvor einheitlich gemischte Membran verfolgt werden, wobei es zur Bildung makroskopischer GM1-reicher Lipiddomänen kam (Abbildung 3 C/I vor und 3 C/II nach Zugabe des CTB), die auf einen lateraleren Reorganisationsprozess der Hybridmembran hindeuten. Die Kinetik der Domänenbildung war sehr schnell (wenige Minuten nach Proteinkontakt). Daraus kann geschlossen werden, dass der kooperative Effekt der multivalenten Bindung von CTB im Fall der rezeptor-funktionalisierten Hybridmembran mit 30 Mol-% BCP 1 zur Bildung einer höher geordneten GM1-reichen Lipidphase führt, die sich von der umgebenden Hybridmembran (schwach geordneter Zustand) abtrennt.^[20] Die Tatsache, dass in der Regel nur eine oder wenige makroskopische Domänen anstatt vieler kleiner pro Vesikel gebildet werden, die über mehrere Stunden stabil bleiben, spiegelt die Stabilität der Vesikel wider.

Weitere Untersuchungen an Hybridvesikeln aus Mischungen von DPPC mit größeren Mengen an BCP ($\geq 40 \text{ Mol-}\%$ 1), die auch 0.1 Mol-% des GM1-Gangliosids enthielten, wiesen keinerlei Wechselwirkungen zwischen der Rezeptor-funktionalisierten Membranoberfläche und dem multivalenten Protein auf. Als Grund hierfür kann angenommen werden, dass die hohe Dichte an PEO-Ketten an der Oberfläche der Hybridvesikel (17 Ethylenoxid-Einheiten pro BCP) die Rezeptorfunktionen der Membran sterisch abschirmen und somit eine Erkennung zwischen Rezeptor und Protein verhindern.

Auf Basis dieser Ergebnisse versuchten wir, die Rolle der Lipid/Polymer-Zusammensetzung und die daraus resultierende laterale Mobilität der Membran hinsichtlich der Wechselwirkungen zwischen CTB und GM1 zu verstehen. Ausgangspunkt war die Beobachtung, dass Unterschiede in der Zusammensetzung zu verschiedenen lateralen Verteilungszuständen des Proteins führen. Hierzu untersuchten wir

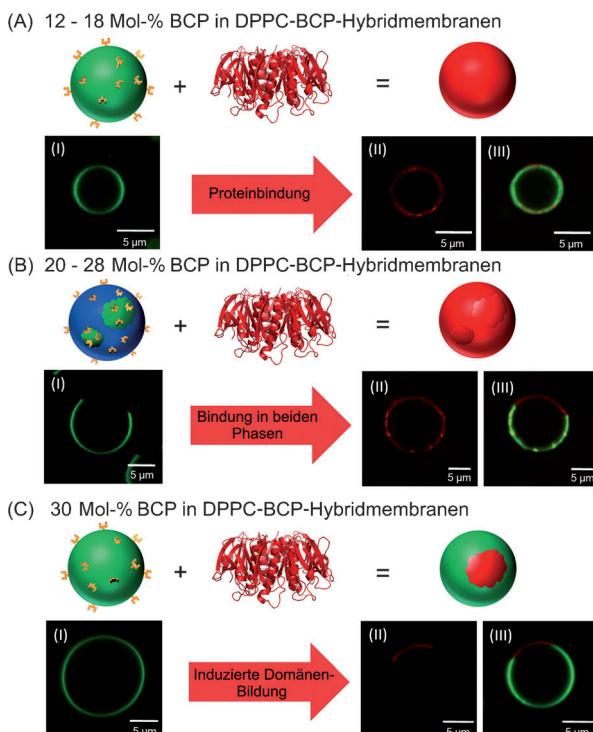


Abbildung 3. Einfluss der Morphologie der Hybridmembranen auf das Bindungsverhalten des Proteins CTB: Rh-DHPE (grün, selektiv angeregt bei 561 nm) zeigt die Phasenheterogenitäten; Alexa488-markiertes CTB (rot, selektiv angeregt bei 488 nm) visualisiert die Bindung des Proteins an die Vesikelmembran. A) Bindung von CTB an Hybridvesikel (Mischungen mit 12 bis 18 Mol-% BCP 1) B) Bindung des Proteins an phasenseparierte Vesikelmembranen (20 Mol-% BCP 1). C) Bildung von makroskopischen GM1-reichen Lipiddomänen (rote Domäne, siehe C/II) in Hybridvesikeln (30 Mol-% BCP 1), die ursprünglich vor Zugabe des CTB (siehe C/I) eine einheitliche Membranmorphologie aufwiesen. Überlagerte Aufnahmen der beiden Farbstoffe in A/III, B/III und C/III zeigen die Unterschiede im Phasenverhalten.

laterale Diffusionsprozesse in nichtmodifizierten DPPC/PIB₈₇-*b*-PEO₁₇-Hybridmembranen mithilfe der Fluoreszenzbasierten Messmethoden FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) und FCS (fluorescence correlation spectroscopy).^[21,22] Um die Diffusionsprozesse in den Hybridmembranen zu beobachten und messtechnisch zu erfassen, wurde bei beiden Methoden der Lipidfarbstoff Rh-DHPE als Fluoreszenzmarker eingesetzt, dessen Lokalisierung in den ungeordneteren Phasen aufgrund seines Phasenverhaltens sichergestellt war. Die beiden unterschiedlichen Messtechniken (siehe die Hintergrundinformationen) lieferten wichtige Informationen über ablaufende dynamische Prozesse sowohl in reinen DPPC- als auch in Hybridmembranen und ermöglichten es damit, den Einfluss der eingelagerten BCP-Moleküle auf die Organisation der Lipidmembran zu verstehen (Abbildung 4).

Um die Dynamiken in solchen Lipid-Polymer-Hybridsystemen besser zu verstehen, wurden zuerst laterale Diffusionsanalysen zu reinen DPPC-Vesikelmembranen unter Verwendung der FRAP-Methode durchgeführt (Abbildung 4A). Dabei kam es im Fall von reinen DPPC-Membranen (bei Raumtemperatur in der Gelphase ($T_m = 41.6^\circ\text{C}$)) zu irreversiblem Photobleichen der untersuchten Membranbereiche, die auf eine hohe Starrheit der Membran hinweisen (sehr geringe Mobilität). Dagegen wiesen Hybridmembranen

eine signifikante Zunahme der lateralen Membranmobilität auf, die anhand der schnelleren Erholung der Fluoreszenz mit steigender Menge an BCP in der Lipidmembran deutlich zu sehen war (Abbildung 4A und die Hintergrundinformationen). Der Einbau der amphiphilen Blockcopolymeren (**1**) in Gelphasenmembranen (DPPC) führt damit zu einer signifikanten Erhöhung der lateralen Mobilität der Lipidmoleküle innerhalb der Doppelschicht.

Eine detailliertere Analyse der dynamischen Prozesse in Membranen ist durch FCS möglich.^[22,23] Bei dieser Methode wird die Diffusion eines Fluoreszenzmarkers in einem definierten Detektionsvolumen verfolgt, wobei erzeugte Intensitätsschwankungen des Fluoreszenzsignals eine Aussage über die Diffusionseigenschaften des untersuchten Moleküls zulassen. Eine Autokorrelationsanalyse der aufgenommenen Fluktuationen in der Fluoreszenz-Zeit-Spur (Abbildung 4B) liefert Informationen über die Diffusionszeit (τ_D), welche wiederum in einen für jede Hybridmembran typischen Diffusionskoeffizienten (D) umgerechnet werden kann.

FCS-Experimente an reinen DPPC-Vesikeln bestätigten die zuvor gewonnenen Erkenntnisse über die hohe Starrheit von Gelphasenmembranen. Abbildung 4B (oben) zeigt eine typische Fluoreszenz-Zeit-Messung reiner DPPC-Membranen, die einen schnellen und drastischen Abfall des Fluoreszenzsignals in kürzester Zeit wiedergibt. Die sehr geringe laterale

Mobilität des Fluoreszenzmarkers (Rh-DHPE) in der DPPC-Doppelschicht führt zu einem irreversiblen Photobleichen der untersuchten Moleküle innerhalb des Detektionsvolumens, mit der Konsequenz, dass die Auswertung der aufgenommenen Fluoreszenz-Zeit-Spur mit Standard-FCS-Modellen nicht möglich ist.

Im Unterschied zu den reinen Lipidmembranen wiesen Hybridmembranen sehr unterschiedliche laterale Mobilitäten auf, die sich deutlich von den starren Gelphasenmembranen (DPPC) unterschieden. Die durch FCS untersuchten Fluktuationen des Fluoreszenzsignals (siehe Fluoreszenz-Zeit-Spuren in Abbildung 4B), welche jeweils typisch für die ausgewählten Hybridmembranen mit 18 und 40 Mol-% BCP waren, ermöglichen eine Standardauswertung der Autokorrelationsfunktionen (siehe Abbildung 4C), die eine Zunahme der molekularen Mobilität in den gemischten Membranen ergab. Der geringe, aber signifikante Unterschied zwischen den beiden Korrelationsfunktionen der Probe mit 18 Mol-% BCP (schwarze Kurve) und der Probe mit 40 Mol-% BCP (rote Kurve in Abbildung 4C) veranschaulicht, dass eine höhere Menge an BCP (40 Mol-%) in der Hybridmembran zu einer erhöhten lateralen Mobilität führt, die sich wiederum an der gemessenen kürzeren Diffusionszeit ($\tau_D = (89.5 \pm 2.5) \text{ ms}$; $D = 1.6 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$) bemerkbar machte. Für die Probe mit 18 Mol-% BCP wurden eine Diffusionszeit von $(120 \pm 10) \text{ ms}$ und ein Dif-

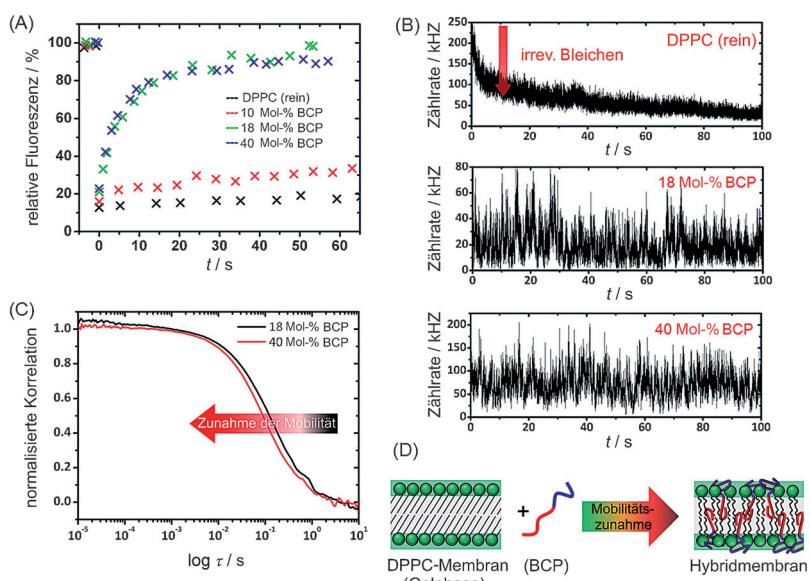


Abbildung 4. FRAP- und FCS-Untersuchungen an DPPC- und Hybridmembranen unterschiedlicher Lipid/Polymer-Zusammensetzungen (0 bis 40 Mol-% BCP), die dynamische Prozesse in den Rh-DHPE-markierten Vesikelmembranen zeigen. A) Normalisiertes Fluoreszenz-Zeit-Diagramm der durchgeführten FRAP-Experimente (Erholung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Membranzusammensetzung). Bei reinen DPPC-Membranen (schwarze Kurve) bis hin zu geringen Mengen an BCP (10 Mol-%) wurden nur sehr geringe Fluoreszenzerholungen innerhalb der Messzeit beobachtet. Hybridmembranen mit 18 Mol-% BCP (grüne Kurve) und mit 40 Mol-% BCP (blaue Kurve) wiesen eine Halbwertszeit der Erholung der Fluoreszenz von ca. 4 s auf. B) Fluoreszenz-Zeit-Spuren von reinen DPPC-Membranen (oben) und gemischten Membranen mit 18 und 40 Mol-% an BCP (1). C) Fluoreszenz-Autokorrelationsfunktionen der ausgewählten Zusammensetzungen mit 18 (schwarz) und 40 Mol-% BCP (rot). D) Darstellung des Effektes der eingebrachten BCP auf die Membranorganisation.

fusionskoeffizient (D) von $1.2 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$ bestimmt. Abbildung 4D veranschaulicht schematisch den Effekt der eingelagerten PIB₈₇-b-PEO₁₇ (**1**) BCP-Moleküle auf die Organisation der Lipiddoppelschicht. Der Einbau der BCP-Moleküle führt zu einer Störung der Gelphasenbereiche (hohe Starrheit) in der Lipidmembran, wobei die laterale Mobilität im Vergleich zu reinen DPPC-Vesikeln stark zunimmt.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass die Lipid/Polymer-Zusammensetzung von Hybridvesikeln und die daraus resultierende Membranmorphologie eine wichtige Rolle für die Erkennung und Bindung des multivalennten Proteins CTB an die rezeptorfunktionalisierten Vesikeloberflächen spielen. Das Zusammenspiel zwischen der multivalennten Bindung des CTB und der dadurch induzierten Reorganisation der Hybridmembran führt im Fall von gemischten Lipid-Polymer-Vesikeln mit 30 Mol-% BCP zur Bildung GM1-reicher Lipiddomänen und damit zu einer nicht einheitlichen Bindung von CTB an die Vesikeloberfläche induziert durch den Bindungsprozess selbst. Diese spezifische Zusammensetzung ist besonders angesichts einer phasenspezifischen Bindung zwischen Membranproteinen und rezeptorfunktionalisierten Hybridmembranen interessant, die sowohl die vorteilhaften Eigenschaften von Polymer- als auch von Lipidmembranen in sich vereinen. Demnach können Hybridmembranen als „vollwertige“ Lipidmembranen gesehen werden, da die Biofunktionalität im Fall der einheitlich gemischten und phasenseparierten Hybridmembranen aufrechterhalten werden kann. Das hier beschriebene biomimetische Modell trägt zum tieferen Verständnis von biologischen Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen an gemischten Lipid-Polymer-Membranen bei, die in ihrer lateralen Organisation und Mobilität durch Variation ihrer Zusammensetzung stufenlos abgestimmt werden können.

Experimentelles

Materialien und Methoden, die für diese Untersuchungen genutzt wurden, werden in den Hintergrundinformationen näher beschrieben. Unter anderem werden dort die Synthese und Charakterisierung des fluoreszenzmarkierten PIB-b-PEO-BCP **4** und Proteinbindungsstudien an reinen DOPC-Vesikeln sowie an Hybridmembranen gezeigt.

Die Herstellung von reinen Lipidvesikel sowie von Hybridvesikeln aus DPPC (**2**) und dem BCP PIB₈₇-b-PEO₁₇ (**1**) erfolgte durch Elektroformation.^[15,24] Zur Visualisierung der erhaltenen Vesikel und der Heterogenitäten ihrer Membranen kamen verschiedene Membranfarbstoffe (z.B. DiDC₁₈, Rh-DHPE oder das fluoreszenzmarkierte BCP **4**) zum Einsatz.

Für die Oberflächenfunktionalisierung der gemischten Membranen aus DPPC (**2**) und dem BCP **1** mit GM1-Lipiden (**3**) wurden zu allen Lipid/Polymer-Zusammensetzungen zusätzlich 0.1 Mol-% **3** gegeben. Die ternären Mischungen wurden aus Chloroformlösungen der Einzelbestandteile hergestellt, die unter Stickstoff eingetrocknet und anschließend in einem definierten Lösungsmittelvolumen aufgenommen wurden (Endkonzentration 10 mg mL^{-1}). Schließlich wurden die Mischungen benutzt, um einen dünnen Hybridfilm auf optisch transparente Deckgläser, welche mit elektrisch leitendem Indiumzinnoxid (ITO) beschichtet waren, aufzubringen. Um einen gleichmäßigen Film zu erzeugen, wurde ein Rotationsbeschichter verwendet. Nach der Beschichtung der Deckgläser mit den jeweiligen Mischungen wurden diese nach Art eines Kondensators im Abstand von 2 mm in eine Flusskammer eingebaut. Zum Schluss erfolgte die

Füllung der Flusskammer mit einer Saccharoselösung (96 mosmol L⁻¹) und der Start des Elektroformationsprozesses.^[15]

Alle Untersuchungen zur Bindung zwischen Choleratoxin B (CTB) und den GM1-funktionalisierten Liposomen (DPPC oder DOPC) und Lipid-Polymer-Hybridvesikeln wurden bei Raumtemperatur (20°C) unter Zugabe von 5 µg CTB, gelöst in 100 µL Saccharoselösung, durchgeführt. Für die unterschiedlichen Experimente wurde die Proteinlösung jeweils frisch hergestellt. Nach der Herstellung der GM1-funktionalisierten Vesikel durch Elektroformation (bei 60°C) wurden diese auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend mit einem konfokalen Lasermikroskop untersucht, wobei vor allem die Vesikelform und die Membranmorphologie erfasst wurden. Nachdem der Ausgangszustand experimentell aufgezeichnet war, wurden die unterschiedlichen Vesikellösungen mit der Proteinlösung inkubiert und über mehrere Stunden beobachtet. Alle Proteinbindungsexperimente wurden mit dem fluoreszenzmarkierten Choleratoxin B (selektiv angeregt bei 488 nm) durchgeführt.

Eingegangen am 25. Juni 2012,
veränderte Fassung am 13. August 2012
Online veröffentlicht am 28. Dezember 2012

Stichwörter: Blockcopolymere · Hybridmembranen · Proteinerkennung · Selbstorganisation · Vesikel

- [1] T. Kunitake, *Physical Chemistry of Biological Interfaces* (Hrsg.: A. Baszkin, W. Norde), Marcel Dekker, New York, **2000**, S. 283.
- [2] W. H. Binder, V. Barragan, F. M. Menger, *Angew. Chem. **2003**, 115*, 5980; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 5802.
- [3] D. E. Discher, A. Eisenberg, *Science* **2002**, 297, 967.
- [4] V. Malinova, S. Belegrinou, D. de Bruyn Ouboter, W. Meier, *Adv. Polym. Sci.*, Springer, Berlin/Heidelberg, **2011**.
- [5] M. Schulz, A. Olubummo, W. H. Binder, *Soft Matter* **2012**, 8, 4849.
- [6] W. H. Binder, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 3136; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 3092.
- [7] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, 387, 569.
- [8] K. Simons, E. Ikonen, *Science* **2000**, 290, 1721.
- [9] C. LoPresti, M. Massignani, C. Fernyhough, A. Blanazs, A. J. Ryan, J. Madsen, N. J. Warren, S. P. Armes, A. L. Lewis, S. Chirasatitsin, A. J. Engler, G. Battaglia, *ACS Nano* **2011**, 5, 1775.
- [10] L. Luo, A. Eisenberg, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1043; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1001.
- [11] D. A. Christian, A. Tian, W. G. Ellenbroek, I. Levental, K. Rajagopal, P. A. Janmey, A. J. Liu, T. Baumgart, D. E. Discher, *Nat. Mater.* **2009**, 8, 843.
- [12] A. Olubummo, M. Schulz, B.-D. Lechner, P. Scholtysek, K. Bacia, A. Blume, J. Kressler, W. H. Binder, *ACS Nano* **2012**, 6, 8713.
- [13] W. Meier, T. Ruysschaert, A. F. P. Sonnen, T. Haefele, M. Winterhalter, D. Fournier, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 6242.
- [14] J. Nam, P. A. Beales, T. K. Vanderlick, *Langmuir* **2011**, 27, 1.
- [15] M. Schulz, D. Glatte, A. Meister, P. Scholtysek, A. Kerth, A. Blume, K. Bacia, W. H. Binder, *Soft Matter* **2011**, 7, 8100.
- [16] M. Chemin, P.-M. Brun, S. Lecommandoux, O. Sandre, J.-F. Le Meins, *Soft Matter* **2012**, 8, 2867.
- [17] M. Dyck, M. Löschke, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 22143.
- [18] a) J. Korlach, P. Schwille, W. W. Webb, G. W. Feigenson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 8461; b) C. H. Spink, M. D. Yeager, G. W. Feigenson, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1023, 25.
- [19] S. Lauer, B. Goldstein, R. L. Nolan, J. P. Nolan, *Biochemistry* **2002**, 41, 1742.
- [20] A. T. Hammond, F. A. Heberle, T. Baumgart, D. Holowka, B. Baird, G. W. Feigenson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 6320.

- [21] K. Bacia, D. Scherfeld, N. Kahya, P. Schwille, *Biophys. J.* **2004**, 87, 1034.
[22] K. Bacia, P. Schwille, *Methods Mol. Biol.* **2007**, 398, 73.
[23] K. Bacia, P. Schwille, T. Kurzchalia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 3272.
[24] Die Methode der Elektroformation wurde zuerst von der Gruppe um Angelova im Jahre 1986 beschrieben: M. I. Angelova, D. S. Dimitrov, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1986**, 81, 303.
-