

Synthetischer Bionanoreaktor: mechanische und chemische Kontrolle der Permeabilität von Polymersom-Membranen**

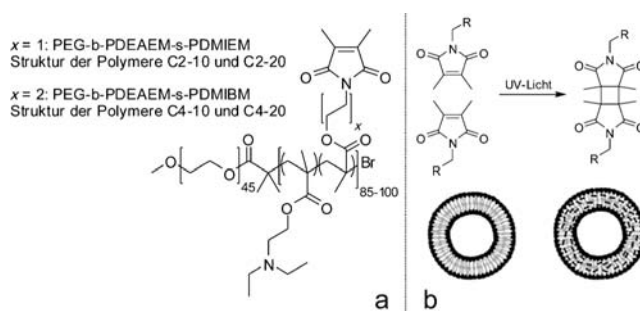
Jens Gaitzsch, Dietmar Appelhans, Linge Wang, Giuseppe Battaglia* und Brigitte Voit*

Die Kombination von Chemie und Biologie hat innerhalb des letzten Jahrzehnts unter Wissenschaftlern eine erhöhte Aufmerksamkeit erfahren. In diesem Zusammenhang haben es sich Chemiker zum Ziel gesetzt, biologische Strukturen mit chemischen Methoden nachzuahmen.^[1] Ein sehr gutes Beispiel hierfür ist die Entwicklung vollsynthetischer Analoga von Lipidvesikeln. Diese sind ein entscheidender Baustein in der Entwicklung des Lebens, da sie die notwendige Trennung von komplexen biochemischen Prozessen in verschiedene Kompartimente erst ermöglichen.^[1,2] Speziell in den letzten Jahren hat sich ein polymerbasiertes Äquivalent, das Polymersom, als vielversprechender Kandidat für diese Zwecke herauskristallisiert.^[3–6] Verschiedene Berichte zeigen, dass Polymersome zum Transport von DNA^[7] und RNA^[8,9] sowie von funktionalen Enzymen genutzt werden können.^[4,5,10–14] Ein großer Vorteil von Polymersomen gegenüber Liposomen ist ihre erhöhte mechanische und chemische Stabilität. Zudem können durch die hohe Variabilität des chemischen Aufbaus viele Eigenschaften, so auch die Permeabilität für Diffusionsprozesse, präzise eingestellt werden.^[15–19] Demgegenüber kann die Permeabilität aber auch durch den Einbau aktiver Molekültransporter (zum Beispiel Transmembranproteine) kontrolliert werden.^[5,20] Bei all diesen Beispielen herrscht jedoch Ungewissheit darüber, ob die Polymersome hohen Scherraten, wie sie möglicherweise bei industriellen Reinigungsprozessen auftreten, widerstehen können.^[16] Dem begegnen wir mit Polymersomen, deren Stabilität und Permeabilität mithilfe eines pH-responsiven und photovernetzbaaren Copolymers moduliert werden können. Unser Ziel sind vernetzte Polymersome, deren einstellbare Stabilität eine Scherraten-induzierte Freisetzung globulärer Makromoleküle (Proteine oder Glycopolymere) verschiedener Größen ermöglicht.^[21] Unser Konzept soll letztlich steuerbare enzyma-

tische Reaktionen unter pH-kontrolliertem Transmembranaustausch ermöglichen; das Ziel ist also ein synthetischer Bionanoreaktor.

Um solche Polymersome zu erhalten, verwenden wir ein amphiphiles Blockcopolymer mit dem bekanntermaßen biokompatiblen und nichtimmunogenen Polyethylenglycol (PEG) als hydrophilem Teil. Der hydrophobe Teil ist ein statistisches Copolymer des pH-responsiven Diethylaminoethylmethacrylats (DEAEM) und eines Photovernetzlers. Dieser ist entweder in Form von polymerisiertem 3,4-Dimethylmaleinimidoethylmethacrylat (DMIEM, C2-Polymere) oder 3,4-Dimethylmaleinimidobutylmethacrylat (DMIBM, C4-Polymere) mit einem Anteil von 10 oder 20 Mol-% im Polymer enthalten (Schema 1 und Tabelle 1).

In früheren Arbeiten^[22] ist es uns bereits gelungen, funktionale Polymersome aus den Copolymeren C2-10 und C2-20 (Schema 1) herzustellen. Beide Polymere ergaben Strukturen mit der gewünschten pH-Responsivität und Photovernetz-



Schema 1. a) Strukturformel des amphiphilen Blockcopolymers mit Ethyl(C2)- und Butyl(C4)-Kette in den jeweiligen Vernetzereinheiten DMIEM und DMIBM, die in 10 oder 20 Mol-% eingebaut werden; daraus resultieren die Bezeichnungen C2-10, C2-20, C4-10 und C4-20. b) die Vernetzungsreaktion, wie sie in der Membran stattfindet.

Tabelle 1: Eigenschaften der verwendeten Polymere und Polymersome (P'some), einschließlich der Vernetzungszeit.

	$M_n^{[a]}$ [kg mol ⁻¹]	Vernetzer ^[b] (Mol-%) ^[c]	Größe der P'some [nm] ^[d]	PDI ^[d]	$t^{[e]}$ [s]
C2-10	19.0	C2 (10)	125	0.2	180
C2-20	21.5	C2 (20)	120	0.2	120
C4-10	20.0	C4 (10)	100	0.2	120
C4-20	22.5	C4 (20)	125	0.2	30

[a] M_n über ¹H-NMR Signalintensitäten ermittelt; der PDI der Copolymere beträgt 1.3 (1.4 für C4-10). [b] Bezeichnung entsprechend der Länge der Kohlenstoffkette (Schema 1 a). [c] In Bezug auf die Länge des hydrophoben Blocks; ermittelt über das Signalverhältnis im ¹H-NMR-Spektrum. [d] Ermittelt über DLS (Durchmesser), PDI = Polydispersität der Polymersome. [e] Vernetzungszeit.

[*] J. Gaitzsch, Dr. D. Appelhans, Prof. B. Voit
Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V.
Hohe Straße 6, 01069 Dresden (Deutschland)
J. Gaitzsch, Prof. B. Voit
Organische Chemie der Polymere
Fachrichtung Chemie und Lebensmittelchemie
Technische Universität Dresden, 01062 Dresden (Deutschland)
E-Mail: voit@ipfdd.de
Dr. L. Wang, Prof. G. Battaglia
Department of Biomedical Science, University of Sheffield
Firth Court, Western Bank, Sheffield S10 2TN (Großbritannien)
E-Mail: g.battaglia@sheffield.ac.uk

[**] Wir danken der Rosa-Luxemburg-Stiftung und der Dresden International Graduate School for Biomedicine and Bioengineering (DIGS-BB) für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201108814> zu finden.

barkeit. Darüber hinaus konnten wir bereits die Transmembrandiffusion eines niedermolekularen Farbstoffs durch die vernetzte Membran über den pH-Wert steuern.^[22] Allerdings vermuteten wir, dass die notwendige Vernetzungszeit von 80 Minuten^[22] jedwede Funktionalitäten einzuschließender Biomoleküle zerstören würde. Daher war eine Optimierung der Vernetzungszeit unser nächstes Ziel. Durch den Wechsel der UV-Quelle und die Verlängerung der Kohlenstoffkette in der Vernetzereinheit konnte die notwendige Dauer der UV-Bestrahlung von über 60 Minuten auf letztlich 30 Sekunden reduziert werden. Der Einfluss der Kohlenstoffkette in der Vernetzereinheit wird beim Vergleich der Vernetzungszeiten innerhalb der Polymerreihe C2-10, C2-20, C4-10 und C4-20 deutlich. Die notwendige Dauer der UV-Bestrahlung konnte hier von 180 s (C2-10) auf nur 30 s (C4-20) gesenkt werden (Tabelle 1). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Butylketten innerhalb eines C4-Polymers (PDMIBM) eine geringere sterische Hinderung mit benachbarten PDEAEM-Einheiten aufweisen als die Ethylkette in einem C2-Polymer (PDMIEM) (Schema 1). Die so erhöhte Vernetzungseffizienz hat zur Folge, dass Polymersome aus C4-20-Polymeren die kürzeste Vernetzungszeit aufweisen. Daher wurden ausschließlich diese Polymersome in den weiteren Studien eingesetzt.

Zunächst wurde die Stabilität der vernetzten Polymersome bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Resultate aus Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Messungen der dynamischen Lichtstreuung (DLS) zeigen, dass die vernetzte Membran einen Zerfall der Vesikel aus C4-20-Polymer im sauren Milieu verhindert (Abbildung 1 a,c). Dagegen ist C4-20 in unvernetzten Polymersomen im sauren Milieu vollständig hydrophil und damit nicht in der Lage, Vesikel zu bilden (Abbildung 2). Zusätzlich zeichnen sich vernetzte Polymersome durch ein definiertes Quell- und Entquellverhalten bei wechselnden pH-Werten über mindestens fünf Zyklen aus (Abbildung 1 a und Abbildung 4-SI in den Hintergrundinformationen). Dies liegt ausschließlich an physiko-chemischen Veränderungen der PDEAEM-Ketten, welche bei sinkendem pH-Wert von einem nichtprotonierten, hydrophoben, verknäuelten Zustand in einen hydrophilen, protonierten, hydratisierten Zustand übergehen. Durch den Wechsel der Membraneigenschaften ändert sich deren Dicke im gleichen Rahmen wie die Gesamtgröße der Vesikel (Abbildung 1).

In der Folge waren wir an der mechanischen Stabilität und der Permeabilität unserer pH-responsiven Polymersome im vernetzten und unvernetzten Zustand interessiert (Abbildung 2). Daher untersuchten wir den Effekt der Scherrate auf Polymersome, die mit globulären Makromolekülen gefüllt waren. Wir nutzten Maltose-dekorierte hochverzweigte Polyethylenimin-Nanopartikel (PEI-Mal)^[21] mit PEI-Kernen von entweder 5000 Da (PEI-Mal 5, Ø 4 nm) oder 25000 Da (PEI-Mal 25, Ø 10 nm). Diese leicht verfügbaren, Fluorescein-markierten organischen Nanopartikel haben eine ähnliche Größe wie Proteine und sind weicher als Silicat- oder Goldnanopartikel, weswegen sie ideale Modellsysteme sind. Ihre Freisetzung aus den Polymersomen wurde nun bei verschiedenen pH-Werten und Scherraten untersucht (Abbildung 2).

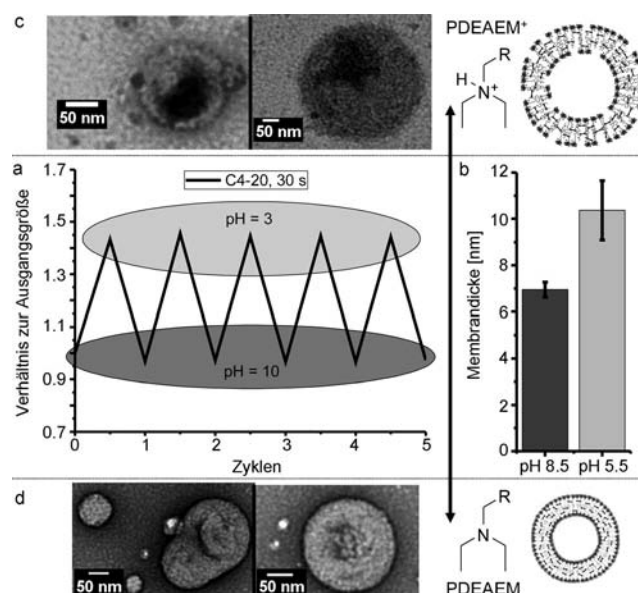


Abbildung 1. Verhalten der Polymersome bei Änderung des pH-Werts: a) Reversible Änderung des Durchmessers von Polymersomen aus dem C4-20-Polymer zwischen pH 3 und pH 10 (durch DLS bestimmt). b) Die Membrandicke ändert sich im gleichen Verhältnis wie die Größe der Vesikel. c,d) Vesikel (vergleiche auch die Skizzen) konnten bei pH 3 (c) und pH 10 (d) mithilfe von TEM visualisiert werden; Maßstabsbalken jeweils 50 nm.

	Unvernetzt (PEI-Mal 25)	Vernetzt (PEI-Mal 25)	Unvernetzt (PEI-Mal 5)	Vernetzt (PEI-Mal 5)
pH = 9 Dialyse		Nicht angewendet		Nicht angewendet
pH = 9 250 mbar TMP				
pH = 9 750 mbar TMP				
pH = 4 250 mbar TMP				

Abbildung 2. Druckabhängige Freisetzung von Fluorescein-markiertem PEI-Mal 25 und PEI-Mal 5 aus vernetzten und unvernetzten Polymersomen bei pH 4 und 9. Die in den Polymersomen zurückgehaltenen Nanopartikel wurden UV/Vis-spektroskopisch über das Absorptionsmaximum von Fluorescein bei 500 nm detektiert. TMP = Transmembrandruck.

Als Startpunkt wählten wir die Dialyse, bei der beide dendritischen Nanopartikel nach Behandlung der unvernetzten Polymersomen bei pH 9 noch vorhanden waren, was den gewollten Einschluss beweist (Abbildung 2). Die Dialyse in klassischen Dialyseschläuchen benötigt allerdings mehrere Tage. Darüber hinaus birgt diese Methode den Nachteil, dass keine Scherrate während des Reinigungsprozesses angewendet werden kann. In diesem Kontext ist es somit sinnvoll, einen Druck auf die Lösung auszuüben, da dies sowohl das

Verfahren beschleunigen als auch verschiedene Scherraten induzieren würde.

Im Zuge dieser Überlegungen haben wir ein „KrosFlo-Research-II“-System eingesetzt (im Weiteren als HFF bezeichnet, kurz für „hollow fibre filtration“). Dieses System übte einen Transmembrandruck (TMP) von entweder 250 mbar oder 750 mbar auf die Lösung aus (Abbildung 2). Die Zeit zur Aufreinigung der Polymersommlösungen konnte so auf 1 Stunde für 250 mbar TMP und sogar auf 30 Minuten für 750 mbar TMP reduziert werden. In einem ersten Experiment wurden unvernetzte Polymersome, die entweder mit PEI-Mal 5 oder PEI-Mal 25 gefüllt waren, bei 250 mbar TMP und pH 9 behandelt. Hier konnten nur große Nanopartikel (PEI-Mal 25) zurückgehalten werden, während die kleineren PEI-Mal 5 nicht mehr nachweisbar waren. Dies impliziert eine Permeabilität der Membran aufgrund der angewendeten Scherrate für die kleineren Nanopartikel PEI-Mal 5, nicht aber für PEI-Mal 25. Wir nehmen an, dass sich durch den angewendeten Druck kleine Poren in der Membran bilden (Poration), durch die kleine Partikel das Polymersom verlassen können. Sobald die Scherrate wegfällt, schließen sich die Poren wieder. Die Poration ist dazu noch mit einer Komprimierung der Polymersome gekoppelt, während die Vesikel unter Druck stehen. DLS-Messungen bestätigen die Rückbildung intakter Polymersome, sobald kein TMP mehr anliegt, was einen automatischen Selbstheilungsprozess nahelegt (siehe die Hintergrundinformationen).

Als nächster Schritt wurden nun 750 mbar bei pH 9 auf die unvernetzten Polymersome ausgeübt. Daraufhin waren beide Nanopartikel nicht mehr nachweisbar, was eine scherkraftabhängige Größe der sich bildenden Poren nahelegt (siehe Abbildung 2 und die Hintergrundinformationen). Die Porenbildung sollte nun durch eine stabilere, also vernetzte, Membran vermindert werden. Daher haben wir den Prozess als nächstes mit vernetzten Polymersomen bei 750 mbar TMP und pH 9 durchgeführt. Während die kleineren PEI-Mal-5-Nanopartikel noch immer die Polymersome verlassen, sind die größeren PEI-Mal-25-Nanopartikel auch nach der Prozedur noch nachweisbar (Abbildung 2). Das beweist, dass vernetzte Polymersome eine deutlich verminderte Porenbildung unter Scherkrafteinwirkung aufweisen als unvernetzte. Unabhängig davon behält die Polymersom-Membran aber ihre charakteristische Eigenschaft der Selbstheilung (siehe die Hintergrundinformationen), sobald kein TMP mehr auf sie einwirkt. Es war nun anzunehmen, dass sich diese Poren wieder vergrößern, wenn gequollene Polymersome zum Einsatz kommen. Zu diesem Zweck wurden unter sauren Bedingungen (pH 4) gequollene, vernetzte Polymersome bei niedrigem TMP (250 mbar) mit der HFF behandelt. Da Nanopartikel der beiden Arten nicht zurückgehalten wurden, wurde die These der größeren Poren im sauren Milieu bestätigt. Aus den beschriebenen Experimenten lässt sich schlussfolgern, dass sowohl vernetzte als auch unvernetzte Polymersome auf einwirkende Scherkräfte mit der Bildung von Poren definierter Größe reagieren (siehe Abbildung 2 und die Hintergrundinformationen). Es ist demnach möglich, Polymersome zu bilden, deren Membranpermeabilität sich über die Parameter Vernetzungsgrad, pH-Wert und Scherrate genau und kontrolliert einstellen lässt.

Um die Responsivität vernetzter Polymersome weiter zu studieren, setzten wir uns als nächstes Ziel die Bildung eines Bionanoreaktors durch den Einschluss von Myoglobin. Dieses Enzym ist sehr gut charakterisiert^[23] und enthält einen Eisenkomplex im Zentrum. Myoglobin ist daher in der Lage, Oxidationsreaktionen, wie die bekannte Reaktion von Guaiacol mit Wasserstoffperoxid, zu katalysieren. Ein Vorteil dieser enzymatisch kontrollierten Reaktion besteht im Absorptionsmaximum des Reaktionsprodukts (oxidiertes Guaiacol) bei 470 nm, was eine UV/Vis-Detektion ermöglicht.^[23] Zunächst aber untersuchten wir, ob Myoglobin der UV-Be-strahlung widerstehen kann, die zur Vernetzung der Polymersome notwendig ist. Die hierzu verwendete reine Enzymlösung zeigte auch nach der UV-Be-strahlung eine hohe katalytische Aktivität (siehe die Hintergrundinformationen). Daher wurde Myoglobin nun in Polymersome eingeschlossen, diese vernetzt und unser Scherkraft-basiertes Reinigungssystem angewendet (200 mbar TMP). Diese Prototypen des Bionanoreaktors wurden nun verschiedenen Bedingungen ausgesetzt (Abbildung 3).

Erste Experimente zeigten, dass Guaiacol bei pH 8 ohne Zugabe von Wasserstoffperoxid nicht reagiert. Bei diesem pH-Wert ist der PDEAEM-Teil der Membran nicht protoniert und damit vollständig hydrophob und undurchlässig. Demzufolge war auch nach Zugabe von Wasserstoffperoxid

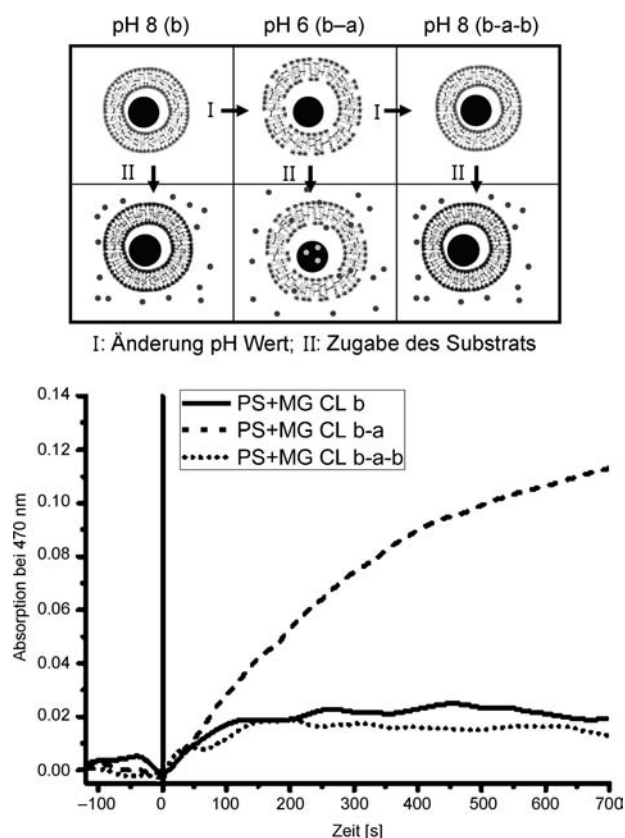


Abbildung 3. Das Reaktionsverhalten der Myoglobin-gefüllten Polymersome mit Guaiacol und Wasserstoffperoxid: zunächst im basischen („b“), dann im sauren („b-a“) und danach wieder basischen Milieu („b-a-b“). Wasserstoffperoxid wurde jeweils 120 s nach der Zugabe von Guaiacol hinzugegeben. Die Graphen zeigen die normalisierte, zeitabhängige Absorption der Lösung bei 470 nm an.

zur Lösung des Bionanoreaktors keine katalytische Aktivität bei pH 8 erkennbar (Zustand „b“ in Abbildung 3) – ein Ergebnis, das so zu erwarten war, da die Reaktionspartner hier nicht ins Innere des Polymersoms diffundieren können, wo das Enzym lokalisiert ist. Dagegen ist ein längerer und stärkerer Anstieg der Absorption des Reaktionsprodukts bei pH 6 erkennbar, was als Nachweis für die katalysierte Reaktion von Guaiacol mit Wasserstoffperoxid innerhalb des Bionanoreaktors dient (Zustand „b-a“ in Abbildung 3). Die Polymersom-Membran ist nun in einem gequollenen Zustand und somit vollständig hydrophil und permeabel, eine Transmembrandiffusion daher möglich. Guaiacol und Wasserstoffperoxid können das eingeschlossene Myoglobin erreichen, welches dann die Reaktion katalysiert. Wird der pH-Wert der Lösung nun erneut auf 8 eingestellt, induziert die Zugabe der Reaktionspartner keine Katalyse der Reaktion mehr (Zustand „b-a-b“ in Abbildung 3). Da der Ausgangszustand wieder hergestellt wurde, ist wiederum eine undurchlässige Membran vorhanden. Das Myoglobin ist also wieder abgeschottet gegenüber den Reaktanten außerhalb des Polymersoms. Das beweist zusätzlich, dass bei pH 8 kein Myoglobin aus dem Polymersom austreten kann, wenn keine Scherrate anliegt.

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass bei Polymersomen eine kontrollierte Porenbildung induziert werden kann. Die Größe der Poren kann über den pH-Wert, die Scherrate und den Vernetzungsgrad gesteuert werden, was eine selektive Freisetzung von Nanopartikeln unterschiedlicher Größe ermöglicht. Es handelt sich dabei um eine scherkraftinduzierte Freisetzung von Molekülen, die während des Selbstorganisationsprozesses von amphiphilen Blockcopolymeren simultan eingeschlossen wurden. Ein solch spezifischer Ansatz steht nur mit unseren pH-responsiven und photovernetzten Polymersomen zur Verfügung. Basierend auf diesen Erkenntnissen konnten wir einen synthetischen Bionanoreaktor herstellen, der ohne Transmembranproteine auskommt. Dies wird möglich, da die Versorgung des Enzyms im Inneren des Polymersoms über die erwähnte Porenbildung gesteuert wird. Porengröße und Membrandurchtritt der zur Reaktion notwendigen Moleküle werden durch reproduzierbares pH-induziertes Quellen und Entquellen der Membran der pH-stabilen Vesikel dirigiert.

Eingegangen am 13. Dezember 2011
Online veröffentlicht am 21. März 2012

Stichwörter: Bionanoreaktoren · Membranen · Polymersome · Poration · Scherkraft

- [1] J. W. Szostak, D. P. Bartel, P. L. Luisi, *Nature* **2001**, 409, 387.
- [2] V. Noireaux, A. Laibacher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 17669.
- [3] C. LoPresti, H. Lomas, M. Massignani, T. Smart, G. Battaglia, *J. Mater. Chem.* **2009**, 19, 3576.
- [4] J. C. M. van Hest, K. T. Kim, S. A. Meeuwissen, R. J. M. Nolte, *Nanoscale* **2010**, 2, 844.
- [5] K. Renggli, P. Baumann, K. Langowska, O. Onaca, N. Bruns, W. Meier, *Adv. Funct. Mater.* **2011**, 21, 1241.
- [6] D. E. Discher, A. Eisenberg, *Science* **2002**, 297, 967.
- [7] H. Lomas, I. Canton, S. MacNeil, J. Du, S. P. Armes, A. J. Ryan, A. L. Lewis, G. Battaglia, *Adv. Mater.* **2007**, 19, 4238.
- [8] Y. H. Kim, M. Tewari, J. D. Pajerowski, S. S. Cai, S. Sen, J. Williams, S. Sirsi, G. Lutz, D. E. Discher, *J. Controlled Release* **2009**, 134, 132.
- [9] A. Lewis, G. Battaglia, I. Canton, P. Stratford, A61K 47/48 ed., Biocompatibles UK Ltd., United Kingdom, **2009**.
- [10] D. E. Discher, B. M. Discher, Y. Y. Won, D. S. Ege, J. C. M. Lee, F. S. Bates, D. A. Hammer, *Science* **1999**, 284, 1143.
- [11] W. Meier, P. Tanner, S. Egli, V. Balasubramanian, O. Onaca, C. G. Palivan, *FEBS J.* **2011**, 278, 32.
- [12] P. Broz, S. Driamov, J. Ziegler, N. Ben-Haim, S. Marsch, W. Meier, P. Hunziker, *Nano Lett.* **2006**, 6, 2349.
- [13] S. F. M. van Dongen, M. Nallani, J. L. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, J. C. M. van Hest, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 1107.
- [14] S. F. M. van Dongen, W. P. R. Verdurmen, R. J. R. W. Peters, R. J. M. Nolte, R. Brock, J. C. M. van Hest, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 7371; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 7213.
- [15] G. Battaglia, A. J. Ryan, S. Tomas, *Langmuir* **2006**, 22, 4910.
- [16] J. F. Le Meins, O. Sandre, S. Lecommandoux, *Eur. Phys. J. E* **2011**, 34, 1.
- [17] O. Onaca, P. Sarkar, D. Roccatano, T. Friedrich, B. Hauer, M. Grzelakowski, A. Guven, M. Fioroni, U. Schwaneberg, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 7137; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 7029.
- [18] J. C. M. van Hest, K. T. Kim, J. H. Zhu, S. A. Meeuwissen, J. J. L. M. Cornelissen, D. J. Pochan, R. J. M. Nolte, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 12522.
- [19] J. F. Le Meins, A. C. Carlsen, A. N. Glaser, S. Lecommandoux, *Langmuir* **2011**, 27, 4884.
- [20] J. C. M. van Hest, R. P. Brinkhuis, F. P. J. T. Rutjes, *Polym. Chem.* **2011**, 2, 1449.
- [21] D. Appelhans, H. Komber, M. A. Quadir, S. Richter, S. Schwarz, J. van der Vlist, A. Aigner, M. Muller, K. Loos, J. Seidel, K. F. Arndt, R. Haag, B. Voit, *Biomacromolecules* **2009**, 10, 1114.
- [22] J. Gaitzsch, D. Appelhans, D. Grafe, P. Schwille, B. Voit, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 3466.
- [23] T. Hayashi, T. Matsuo, D. Murata, Y. Hisaeda, H. Hori, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 12906.