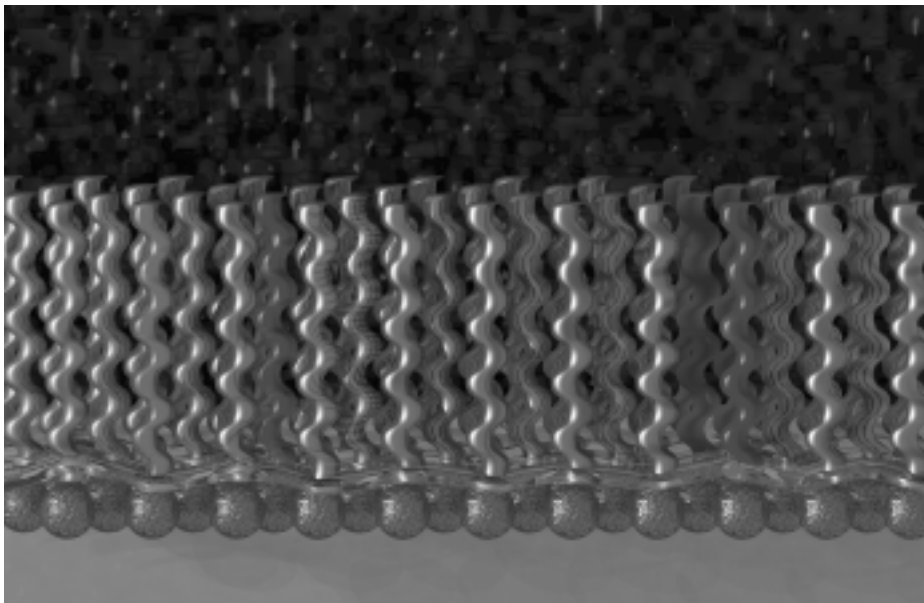


**Synthese und Eigenschaften neuartiger,
nichtkristallisierbarer Amphiphile
als Baustein für biologische Modellmembranen**

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung



vorgelegt von
Christina Benedek
aus Hannover

Hauptberichter: Prof. Dr. C. D. Eisenbach
Mitberichter: Prof. Dr. H. E. A. Kramer

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juni 2000

für Jo

Danksagung

Die folgende Arbeit wurde von Mai 1997 bis März 2000 an der Universität Stuttgart angefertigt.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. C. D. Eisenbach für die Aufnahme in den Arbeitskreis und die Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Bei Dr. Robert Saf (Universität Graz) bedanke ich mich für die ESI/MS-Untersuchungen, bei Andreas Hohner und Matthias Tristl (Technische Universität München) für Hilfe bei den FRAP-Messungen und den Fluoreszenzfilmwaagenuntersuchungen, weiterhin bei vielen Mitgliedern des Lehrstuhls E22 in München, vor allem aber bei Dr. Rudolf Merkel und bei Prof. Dr. E. Sackmann für stete Diskussionsbereitschaft.

Ein Dank geht an das Institut für physikalische Chemie für die Möglichkeit der Nutzung eines Fluoreszenzspektrometers.

Dr. Klaus Dirnberger danke ich für seine Unterstützung und besonders für das Lesen der Rohfassung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei meinen Laborkollegen Michaela Steng und Dominik Winter für gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei NMR Messungen, bei Ines Ketterle und Corinne Rost für Einspritzen und Auswerten an der GPC-Anlage und viele sonstige Hilfestellungen, bei Christian Schaller für die Hilfe bei diversen IT-Problemen und für das Lesen von Teilen der Arbeit, bei Heike Arndt für Hilfe am Dampfdruckosmometer, bei Monika Raible, Markus Schmidtchen und Andreas Bayer für Ihre Unterstützung und Geduld sowie bei allen insgesamt für das gute Arbeitsklima und lebhaften Unorunden.

Mein besonderer Dank gilt Kai Ewert für seine Freundschaft und seine stete Bereitschaft, mir Rat zu geben.

Vor allem danke ich aber József für seine Geduld mit mir, auch in den anstrengenden und enttäuschenden Phasen dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1	Phospholipide	5
1.2	Verschiedene Typen von Modellmembranen	7
1.3	Membranproteine und Proteinimmobilisierung in Modellmembranen	9
1.4	Verzweigte Lipide	11
2.	Problemstellung	13
3	Synthesen	170
3.1	Grundtypen synthetisierter Amphiphile	17
3.2	Allgemeines zur Nomenklatur	21
3.3	Synthesestrategie zum Aufbau der Amphiphile über Urethanverknüpfungen ..	23
3.3.1	Verwendung der Schutzgruppe CBO	23
3.3.2	Synthese der Chloroformiate	25
3.3.3	Kondensation der Chloroformiate mit Aminen	26
3.4	Synthese des hydrophoben Bausteins	26
3.5	Synthese des hydrophilen Bausteins für die anionischen Amphiphile	30
3.6	Synthese der Amphiphile	31
3.6.1	Typ A Amphiphil REnHEGMe	31
3.6.2	Typ B Amphiphil (REn) ₂ EaHEGMe	32
3.6.3	Typ C Amphiphil (RN) ₂ De(HEGMe) ₂	34
3.6.4	Synthese des Typ A Amphiphils RPC <u>25</u>	35
3.7	Retrosyntheschema - Erweiterung der Synthese für Biotinylierung der verzweigten Amphiphile	37
4. Analytik	39
4.1	Molekulargewicht und Dispersität	39
4.1.1	Bestimmung der Dispersität durch Gelpermeationschromatographie	39
4.1.2	Molekulargewichtsbestimmung durch Elektronenspray Ionisation / Massenspektroskopie (ESI-MS)	43
4.1.3	Bestimmung der mittleren Molmassen und der Molekülstruktur aus den ¹ H-NMR Spektren	48
4.1.4	Bestimmung der Molekülstruktur aus den ¹³ C-NMR Spektren	51

4.2	Differentielle Wärmeflußkalorimetrie	61
4.3.	Kritische Mizellbildungskonzentration	67
4.4	Schub-Flächen-Diagramme	74
4.4.1	Isothermen der Reinsubstanzen	75
4.4.2	Isothermen der verzweigten Amphiphile in Mischung mit DPPC	85
4.4.3	Fluoreszenzfilmwaage	92
4.5	Differentielle Wärmeflußkalorimetrie an wäßrigen Amphiphillösungen	99
4.6	Photobleichverfahren	105
4.7	Lichtmikroskopische Untersuchungen	112
4.7.1	Kontaktpräparate	112
4.7.2	Präparation mittels Wechselfeldmethode	114
5.	Experimenteller Teil	118
5.1	Reagenzien und Lösungsmittel	118
5.1.1	Reagenzein in alphabetischer Reihenfolge	118
5.1.2	Lösungsmittel	119
5.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	120
5.2.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Phosgenierung von Hydroxyverbindungen (AAV 1)	120
5.2.2	Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Kondensation von Amininen mit Chloroformiaten in Chloroform (AAV 2)	121
5.2.3	Allgemeine Arbeitsvorschrift für die hydrogenolytische Abspaltung der Benzyloxybarbonyl-Schutzgruppe (CBO-Schutzgruppe) (AAV 3)	121
5.3	Synthese der Einzelverbindungen	122
5.3.1	N-(Benzyloxycarbonyl)-ethan-1,3-diamin <u>1</u>	122
5.3.2	Diethanolamin-N-carbonsäure-benzylester <u>R2</u> („EACBO“)	124
5.3.3	N,N'-Dihydroxyethyl-N,N'-Dicarbonsäure-benzylester-ethylendiamin <u>3</u> („De(CBO) ₂ “)	125
5.3.4	Polymerisation von 1,3-Butadien zur Darstellung des ungesättigten Makroalkohols <u>4</u>	126
5.3.5	Makroalkohol <u>5</u> („ROH“)	127
5.3.6	Makrochloroformiat <u>6</u>	129
5.3.7	Makroamin-CBO <u>7</u> (REnCBO)	130
5.3.8	Makroamin <u>8</u> (REn)	131

5.3.9	Makroamin RNH ₂ <u>9</u>	132
5.3.10	Methoxyhexaethylenglykol („HEGMe“) <u>10</u>	133
5.3.11	Chloroformiat von Methoxyhexaethylenglykol <u>11</u>	134
5.3.12	Amphiphil mit Methoxyhexaethylenglykol Kopfgruppe <u>12</u> („RENMeHEG“)	135
5.3.13	Diethanolamin-N-carbonsäure-benzylester-bis-chloroformiat <u>13</u>	136
5.3.14	„(REn) ₂ EACBO“ <u>14</u>	137
5.3.15	2,2'-Bis-[(Makroamin)carbamoyl oxy]-diethylamin <u>15</u>	138
5.3.16	Amphiphil mit 2 hydrophoben Resten und Methoxyhexaethylenkopfgruppe <u>16</u> („RN ₂ EAMeHEG“)	139
5.3.17	N,N'-Dihydroxyethyl-ethylendiamin-bis-chloroformiat <u>17</u>	140
5.3.18	(RN) ₂ De(CBO) ₂ <u>18</u>	141
5.3.19	(C ₁₈ H ₃₇ N) ₂ De(CBO) ₂ <u>19</u>	142
5.3.20	(RN) ₂ De <u>20</u>	143
5.3.21	(C ₁₈ H ₃₇) ₂ De <u>21</u>	144
5.3.22	(RN) ₂ De(HEGMe) ₂ <u>22</u>	145
5.3.23	(C ₁₈ H ₃₇) ₂ DE(HEGMe) ₂ <u>23</u>	146
5.3.24	2-Bromoethyl dichlorophosphat <u>24</u>	147
5.3.25	Amphiphil mit Phosphatidylcholin Kopfgruppe <u>25</u> („RPC“)	148
5.3.26	Amphiphil mit Phosphatidylcholin Kopfgruppe <u>26</u> („C ₁₈ H ₃₇ OPC“)	149
5.4	Messungen und Instrumente	151
5.4.1	Gerlpermeationschromatographie	151
5.4.2	ESI/MS-Spektren	151
5.4.3	NMR-Spektroskopie	152
5.4.4	Differentielle Wärmefluß Kalorimetrie	152
5.4.5	Fluoreszenzspektren	152
5.4.6	Schub-Flächendiagramme	153
5.4.7	Fluoreszenzfilmwaagenmessungen	153
5.4.8	Photobleichverfahren	153
5.4.9	Lichtmikroskopie	154
5.4.10	Hydrierung	154
6.	Zusammenfassung	155
7.	Summary	160

8.	Literaturverzeichnis	167
9	Anhang	173
9.1	verwendete Abkürzungen	173
9.2	Übersicht über die Strukturformeln aller Amphiphile mit verzweigtem hydrophoben Rest	175
9.2.1	Amphiphile mit einem hydrophoben Rest	175
9.2.2	Amphiphile mit zwei hydrophoben Resten	176

1. Einleitung

1.1 Phospholipide

Natürliche Zellen werden, genauso wie ihre subzellulären Kompartimente, von ihrer Umgebung durch Membranen abgetrennt. Diese Membranen erfüllen dabei eine Reihe wichtiger Aufgaben, angefangen von einer einfachen Schutzfunktion über die Formgebung bis hin zum geregelten Austausch von Stoffen und Informationen mit der Umgebung.

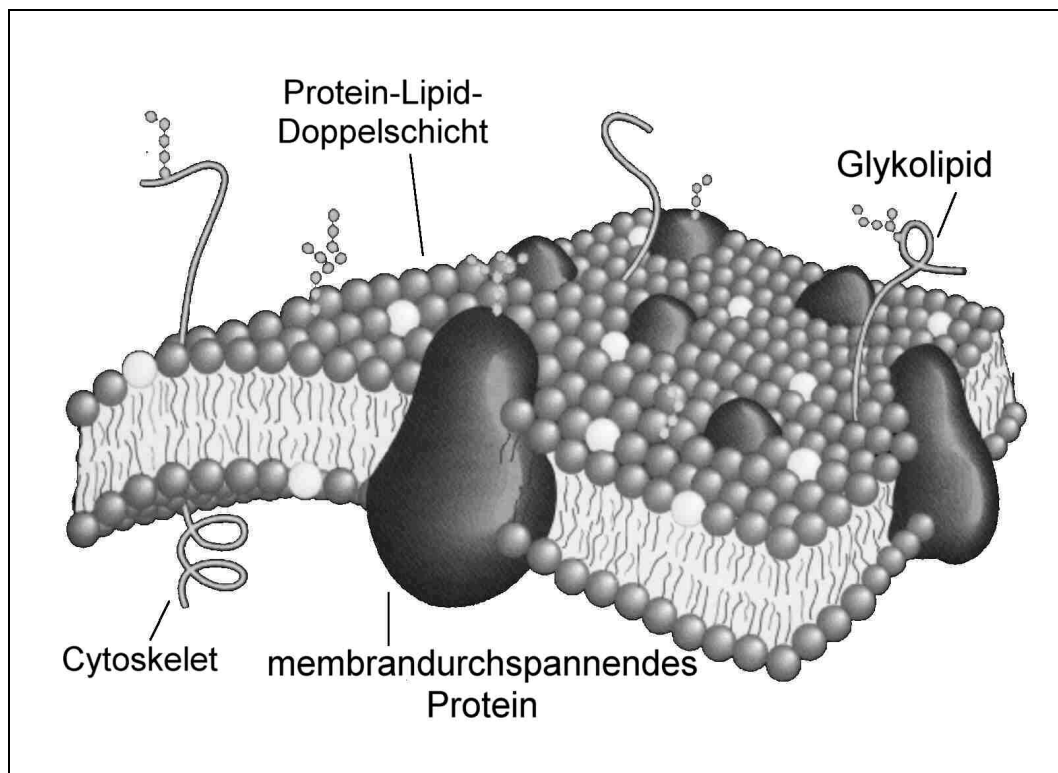


Abb. 1-1: Schematischer Aufbau einer Biomembran nach dem fluid mosaic modell von Singer und Nicolson [1].

Trotz der Vielfältigkeit ihres Auftretens und ihrer Funktionen ist der prinzipielle Aufbau aller Membranen immer der gleiche. In eine aus amphiphilen Molekülen, den Membranlipiden, bestehende flüssige Doppelschicht sind Proteine ganz oder teilweise integriert. Im intra- und extrazellulären Raum wird die Membran von einer wässrigen Phase umgeben. Diese Beschreibung biologischer Membranen wurde unter der Bezeichnung „fluid mosaic model“ von Singer und Nicolson bekannt [1] und wird heute allgemein akzeptiert. (siehe Abbildung 1-1) Es ergibt sich unmittelbar die Frage nach den biologischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten. Die detaillierte Kenntnis dieser

Eigenschaften und ihrer wechselseitigen Beeinflussung kann wegen des Vorkommens biologischer Membranen in allen Zelltypen von großem Nutzen für die Medizin [2] sowie für die Sensortechnik und die Nanostrukturierung von Werkstoffen sein [3].

Membranlipide formen bei ihrer Dispersion in Wasser Strukturen, in denen trotz einer geringen Nahordnung eine starke Fernordnung herrscht. Angetrieben durch den hydrophoben Effekt [4] bilden sich Aggregate von Molekülen aus, bei denen die hydrophilen Molekülteile mit dem wäßrigen Medium in Kontakt stehen, während die hydrophoben Acylketten im Inneren von der polaren Phase abgewandt sind. Anfang der sechziger Jahre beschrieb *Bangham* als erster, daß sich beim Tempern von solchen Phospholipiden im Wasserüberschuß spontan lamellare Doppelschichten bilden. Da diese Strukturen auf Veränderung der Ionenstärke bzw. der Ionenart sehr empfindlich reagierten, folgerte er, daß die Lipiddoppelschichten in sich geschlossen und konzentrisch umeinander gruppiert sind, wobei zwischen jeweils zwei Doppelschichten eine Wasserschicht vorliegt [5]. Diese sphärische Anordnung in sich geschlossener, vielschichtiger Lamellen werden im allgemeinen als multilamellare *Vesikel* (lat. vesicula, Bläschen) bezeichnet. Durch Energie unterschiedlichster Form können daraus kleine einschalige (unilamellare) Vesikel gebildet werden. Der Begriff Vesikel bezieht sich streng genommen nur auf natürlich vorkommende Strukturen, z.B. Membranabschnürungen bei Endozytosevorgängen, im Fall künstlich hergestellter Strukturen lautet die exakte Bezeichnung *Liposomen* (griech. Liposoma, Fettkörper). In dieser Arbeit soll aber wegen seiner allgemeinen Gebräuchlichkeit der Begriff Vesikel synonym mit dem Ausdruck Liposom verwendet werden [6].

Neben lamellaren Strukturen können sich auch mizellare hexagonale oder kubische Phasen bilden [7]. Zum Teil können die Phasen durch Änderung der Temperatur und des Wassergehalts ineinander überführt werden (thermotroper und lyotroper Mesomorphismus) [8]. Welche spezielle Aggregationsform von welchem Lipid bevorzugt wird, kann mit Hilfe des Packungsparameters [9], der sich aus den Größenverhältnissen von hydrophilem und hydrophobem Molekülteil ergibt, erklärt werden.

1.2 Verschiedene Typen von Modellmembranen

Einzelne Membranvorgänge werden bevorzugt an den in Abbildung 1-2 dargestellten vier Modellsystemen untersucht. Diese Systeme sind wie ihr natürliches Vorbild - die Zelle - aus Lipiden aufgebaut, die sich als wasserunlösliche amphiphile Moleküle im Kontakt mit Wasser selbst organisieren. Die dazu erforderlichen Lipide werden häufig synthetisch hergestellt, so daß auch in der Natur nicht vorkommende Derivate zugänglich sind. Je nach der verwendeten Präparationstechnik bilden sich unterschiedliche supramolekulare Strukturen, die man als Modelle biologischer Systeme, Modellmembranen [10], verwenden kann.

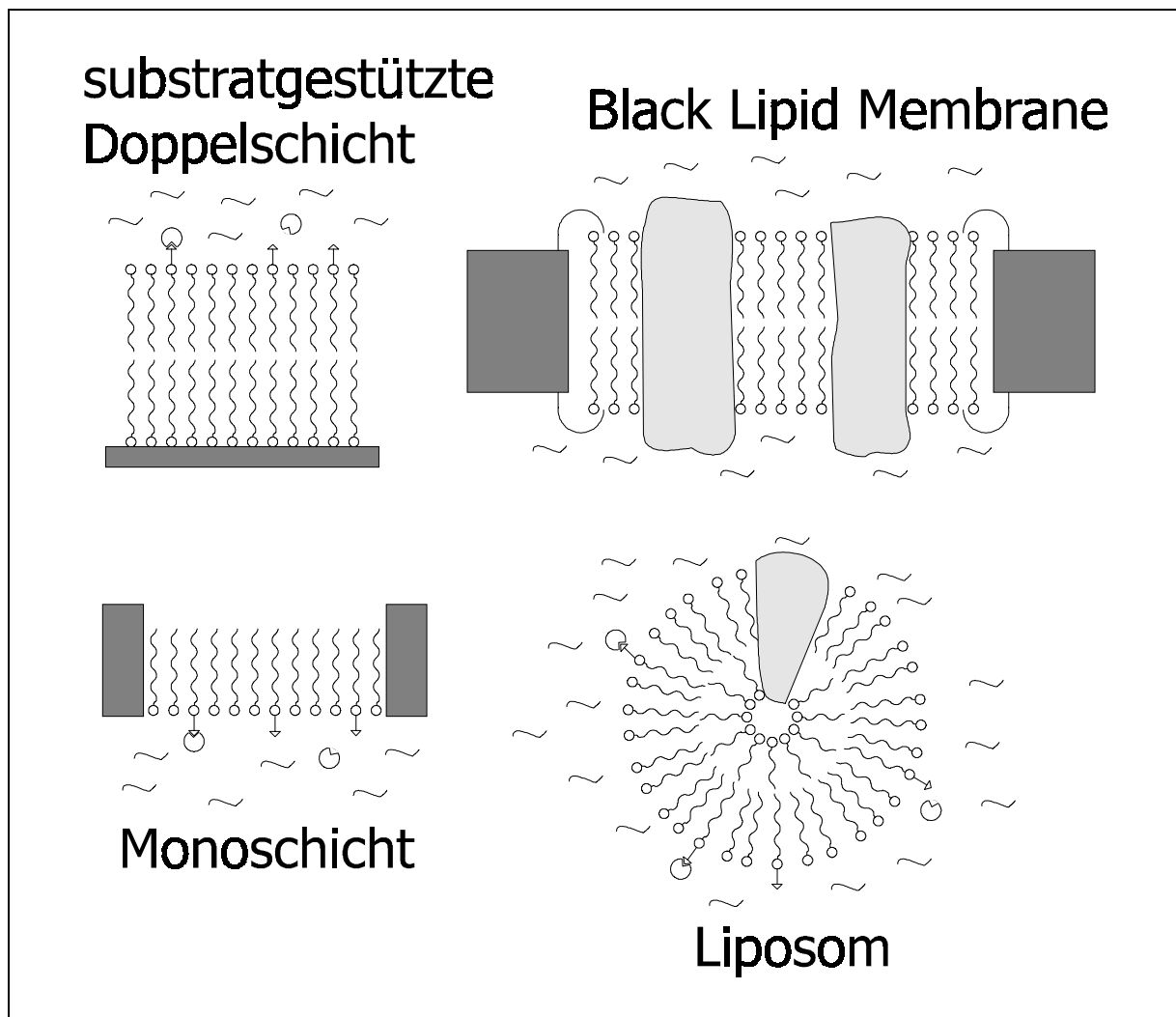


Abb. 4-2: Prinzipischnen der gebräuchlichsten Modellmembranen.

Black Lipid Membranes (BLMs) [11], Lipiddoppelschichten, die ein Loch in einer Trennwand überspannen und dabei zwei wäßrige Kompartimente miteinander verbinden, werden zum Beispiel für Untersuchungen des Ionenverkehrs verwendet. Durch Vesikelfusion oder Langmuir-Blodgett Technik werden *substratgestützte Doppelschichten* auf einem festen Substrat erhalten (*Solid Supported Bilayers, SSB*) [12]. Diese SSBs sind stabiler als BLMs und an der Seite, die der wäßrigen Phase zugeneigt ist, einfach zu manipulieren. Deshalb eignen sie sich für Untersuchungen von Zell-Zell- und Zell-Membran-Wechselwirkungen. Überdies haben sie sich als nützlich für das Studium der lateralen Diffusion von Membranlipiden oder adsorbierten Makromolekülen [13] sowie der spezifischen Bindung von Proteinen an Membranrezeptoren [14-16] erwiesen.

Monoschichten, sogenannte Langmuir Filme [17] entstehen beim Spreiten eines Lipids auf einer Wasseroberfläche. Sie entsprechen einer Hälfte der Lipiddoppelschicht einer Membran. An ihnen lassen sich einfach der Flächenbedarf eines Amphiphils und die Stabilität der Modellmembran, sowie Wechselwirkungen mit in der Subphase gelösten Substanzen wie zum Beispiel Proteinen untersuchen.

Die schon beschriebenen *Liposomen* (Vesikel) werden unter anderem zur Immobilisierung von Membranproteinen sowie zum Studium von Oberflächenerkennungsreaktionen verwendet.

Die Selbstorganisationseigenschaften von Lipiden sind aber nicht nur von akademischem Interesse. Die spontan ausgebildeten Strukturen werden als Template für nanostrukturierte Metalle, Halbleiter oder organische Leiter genutzt. Auch die therapeutische Anwendung von Phospholipiden wurde untersucht, wobei Glycerophospholipide als „drug carrier“ oder als Wirkstoff verwendet wurden [18]. Weiterhin können substratgestützte Membranen als bioaktive Oberflächen in der Medizin [19] sowie zur Konstruktion von empfindlichen Biosensoren [3] dienen.

1.3 Membranproteine und Proteinimmobilisierung in Modellmembranen

Für den Stofftransport durch die Membran sind spezielle, in der Membran eingebettete Transportproteine verantwortlich [11, 21]. Ebenso läuft die physiologische Zell-Zell Kommunikation oftmals über Proteine oder Kohlenwasserstoffstrukturen an der Oberfläche der Zellmembranen ab, die spezifische Zellrezeptoren benachbarter Zellen aktivieren. In der Vergangenheit wurden an Lipide gekoppelte Proteine bereits für eine Reihe von immunochemischen und diagnostischen Zwecken verwendet. Antikörper an der Oberfläche von Liposomen befähigen dabei die Proteine, an bestimmte Moleküle auf der Oberfläche von Zellen zu binden und als „drug delivery system“ in die Zelle inkorporiert zu werden.

Viele physiologisch wichtige Proteine enthalten einen hydrophoben Anker, entweder eine Fettsäure oder komplexe Glycophospholipide wie Glycophosphatidylinositol [22-24]. Es wurde eine Vielzahl von Standardtechniken für die kovalente Bindung von Proteinen an Liposomen entwickelt [25-28]. Für die Untersuchung solcher membrangebundenen Proteine ist die Präparation membrangestützter Modellmembranen mit lateraler Mobilität wünschenswert [29]. Dies läßt sich allerdings nur schwierig mit der Langmuir-Blodgett Technik realisieren, da viele Proteine den Transfer in eine Monoschicht nicht tolerieren. Oftmals führt ein direkter Kontakt mit Luft zur Denaturierung [30].

Alternativ kann zunächst eine substratgestützte Lipidmonolayer hergestellt werden, die einen gewissen Anteil eines Lipides enthält, an das selektiv Proteinbindung erfolgen kann. Eine Strategie hierzu ist die Anbindung eines Molekülfragments mit einer Antigenbindungsstelle (Fab-Fragment) über Disulfidbrücken an ein Phosphatidylethanolamin in einer gemischten Phospholipidmembran und die anschließende Kopplung des Proteins an das Fab-Fragments [22]. Ein weiterer Ansatz benutzt Lipide mit Metallchelaten in der hydrophilen Kopfgruppe. Besitzt der Metallkomplex freie Bindungsstellen, können Elektronendonoren wie Imidazol oder Histidin gebunden werden [23].

Die einfachste Präparationsmethode macht sich die Besonderheiten des Biotin-Avidin Komplexes zu nutze. Avidin und Streptavidin sind zwei homologe wasserlösliche Proteine, die jeweils aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut sind [31]. Jede dieser Einheiten weist eine spezifische Bindungsstelle für Biotin auf [32]: Die Bindungsenthalpie kommt mit 84 kJ/mol der einer kovalenten Bindung nahe [33]. Die Bindung ist damit nahezu irreversibel. Biotin kommt als CO₂-Gruppen übertragendes Coenzym in verschiedenen Carboxylasen in

allen höheren Organismen vor [34]. Diese Funktion wird durch die Avidine gehemmt, indem sie Biotin so fest binden, daß es nicht mehr für die enzymatische Reaktion zur Verfügung steht. Diese feste Bindung wird für zahlreiche Anwendungen in der Bioanalytik genutzt [35]. Biotin kann an seiner freien Carboxylgruppe funktionalisiert und so in die Kopfgruppe von Lipiden eingebunden werden [36-38]. Ausgehend von solchen modifizierten Lipiden ist der Aufbau sehr dünner und gut definierter Streptavidin-Multischichtstrukturen denkbar (siehe Abbildung 1-3). Dabei kann an eine substratgestützte zweikomponentige Monoschicht mit einem biotinylierten Lipid Avidin gebunden werden. Die so entstandenen kristallinen Proteinschichten können zum Andocken weiterer biotinylierter Moleküle, wie zum Beispiel Proteine oder Nukleinsäuren, dienen [39].

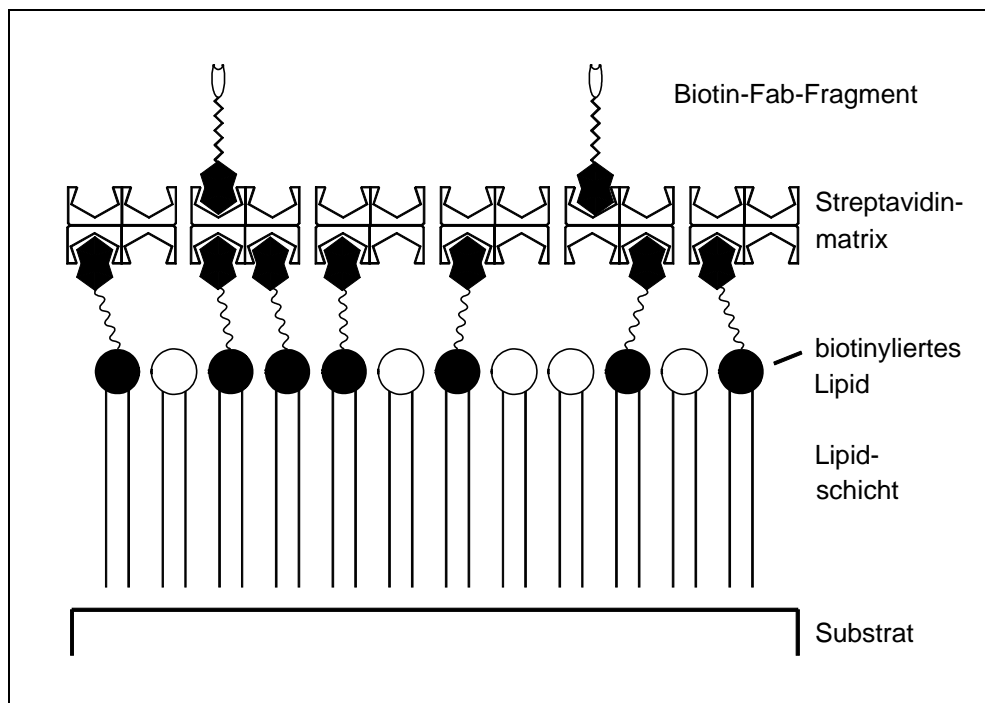


Abb. 1-3: Schematischer Aufbau einer substratgestützten Multischicht zur Anbindung von Proteinen an Modellmembranen über einen Biotin-Avidin Komplex.

Die Anbindung von Proteinen an Lipidmonoschichten bringt allerdings auch Probleme mit sich. Das Protein übt einen gewissen Zug auf das Lipid aus, so daß dieses leicht aus der Membran herausgezogen werden kann. Dafür sind zwei verschiedene Faktoren verantwortlich. Zum einen kostet es freie Energie, ein großes wasserlösliches Protein an einer Stelle zu Verankern. Gründe hierfür sind der Translations-Entropie-Verlust beim Verankern und die Änderung der Hydratisierung der Membran, falls das Protein über einen kurzen Spacer angebunden ist. Der andere Faktor sind echte mechanische Kräfte durch

hydrodynamische Strömung. Die Energie, die aufgewendet werden muß, um ein Lipid aus einer Monolayer zu entfernen, steigt mit der Kettenlänge des hydrophoben Restes. Dieser kann jedoch nicht beliebig verlängert werden, ohne Einbußen bei der lateralen Mobilität hinnehmen zu müssen. Nötig wäre also ein Lipid, das an der Kopfgruppe biotinyliert werden kann und unabhängig von der Kettenlänge des hydrophoben Restes fluide bleibt. Dieses Ziel kann über die Verwendung verzweigter Lipide erreicht werden, wie im Folgenden ausgeführt wird.

1.4 Verzweigte Lipide

Kettensubstituierte Lipide in monomolekularen Filmen besitzen in der Regel geringere Packungsdichte und verleihen damit der Membran höhere Permeabilität [40]. Kurze Alkylseitenketten erhöhen die Löslichkeit und vermindern die Mizellbildungstendenz von Amphiphilen [41, 42]. In der Natur kommen verzweigte Lipide in Archaeobakterienmembranen vor [43]. Sie bestehen aus einem isoprenoiden hydrophoben Baustein, häufig ein membrandurchspannender Makrozyklus (siehe Abbildung 1-4), und über Etherbindungen angebondenen polaren Kopfgruppen (Glycerolphosphoester oder Zuckerkomponenten). Die Etherbindungen sind extrem stabil, auch bei hohen Temperaturen oder in sauren Medien. Aufgrund der Verzweigungen zeichnen sich diese Lipide weiterhin durch eine hohe Fluidität, auch bei tiefen Temperaturen, aus. Beispielsweise bilden sie noch bei 4°C spontan Riesenvesikel durch Schwellen („swelling“) aus [44]. Oberhalb 0°C besitzen sie keine Hauptumwandlung (keinen Phasenübergang von einer flüssigkristallinen in eine Gelphase) [45]. Allerdings ist die Synthese dieser Verbindungen, besonders der hydrophoben Reste, aufwendig und langwierig [46, 47], weshalb ihre Eignung für den Einsatz in Modellmembranen eingeschränkt ist.

Als oberflächenaktive Bürsten haben in jüngerer Zeit Verbindungen mit Polyisoprenrest und Sulfatkopfgruppe Anwendung gefunden [48, 49]. Auch hier zeigt sich eine hohe Fluidität durch die geringe Glasumwandlungstemperatur.

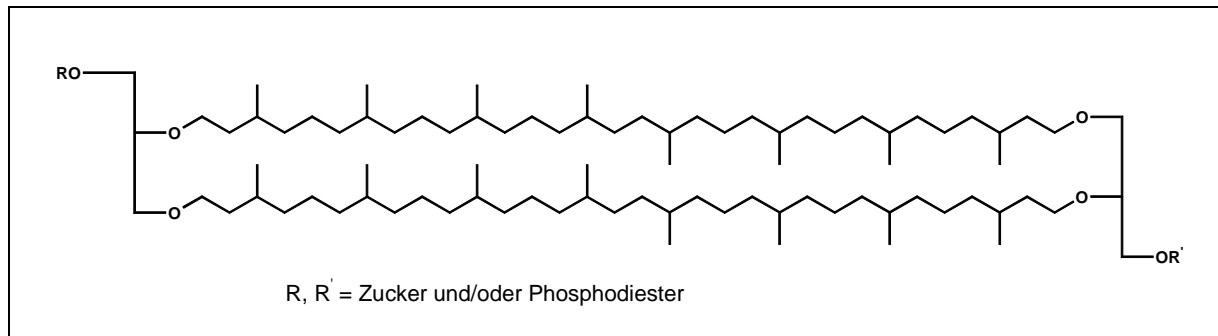


Abb. 1-4: allgemeine Strukturformel eines membrandurchspannenden isoprenoiden Lipids.

Anstelle der Nutzung isoprenoider Derivate bilden Alkylketten mit kurzen Verzweigungen ausgehend von Polybutadien mit einem bestimmten Gehalt an 1,2-Verknüpfungen und nachfolgender Hydrierung der Doppelbindungen einen prinzipiell einfacheren Zugang zu Strukturen mit geringer Kettensteifigkeit. Durch das Auftreten von 1,2- und 1,4-Addition der Monomere an das aktive Zentrum der Polymerisation können Verbindungen mit einem einstellbaren Gehalt an Ethylseitengruppen und definierter Rückgratlänge erhalten werden. Dieser Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit verfolgt.

2. Problemstellung

In der Biophysik wird die Nachahmung biologischer Membranen oder sogar Zellen mit dem Ziel verfolgt, die Vorgänge in natürlichen Systemen besser zu verstehen. Ein interessantes Gebiet ist dabei die Immobilisierung von Proteinen an Modellmembranen. Hierfür gibt es mehrere Ansätze zur Realisierung. Die Anbindung über Ankerlipide bringt Probleme mit sich und bedarf der Entwicklung neuer Amphiphilsysteme.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen daher die Suche nach einem völlig neuen Amphiphiltyp für den Einsatz in Modellmembranen als möglicher hydrophober Anker für Proteine oder nach Biotinylierung zur Anbindung anderer Moleküle und das Auffinden bzw. Ausarbeiten von geeigneten Synthesewegen. Dabei werden eine Reihe von Anforderungen an diese Verbindungen gestellt.

In erster Linie müssen die amphiphilen Bausteine für den Einsatz in gemischten Modellmembranen mit natürlichen Lipiden wie dem Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) mischbar sein. Falls eine Mischungslücke vorliegt, muß diese identifiziert werden und der Bereich des Molenbruches an synthetischem Amphiphil bestimmt werden, bei dem eine Entmischung auftritt.

Weiterhin soll dieses neuartige Amphiphil die Fähigkeit zur Bildung von Vesikeln besitzen. Dazu ist die Einstellung eines geeigneten hydrophil/hydrophob-Verhältnisses nötig. Dies soll bei der Synthese durch die Wahl einer hydrophilen Kopfgruppe geeigneter Länge berücksichtigt werden. Insbesondere wird angestrebt, daß die synthetischen Amphiphile fluide Mono- und Doppelschichten ausbilden und auch in der Lage sind, eine DPPC-Membran zu fluidisieren, um diese in ihren fluiden Eigenschaften natürlichen Membranen anzunähern. Aus diesem Grund sollen die synthetischen Cotenside nichtkristallisierbar sein oder zumindest in Lösung mit Wasserüberschuß oberhalb 0°C keine thermotrope Phasenumwandlung besitzen. Dieser Forderung soll durch die Wahl eines hydrierten Polybutadiens als hydrophobem Baustein entsprochen werden.

Bezüglich der Synthese ist bei polymeren Bausteinen eine enge Molekulargewichtsverteilung Grundvoraussetzung, um ein gut definiertes und in seinen Struktur-Eigenschaftsbeziehungen untersuchbares System zu erhalten. Die Synthese muß erweiterbar sein, so daß gegebenenfalls Biotin oder andere Bausteine zur Proteinanbindung in das Molekül eingebaut werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen endgruppenfunktionalisierte und hydrierte Polybutadiene als variables System für den hydrophoben Baustein der Amphiphile verwendet werden. Es sollen dabei Verbindungen mit unterschiedlichem Gehalt an Ethylverzweigungen und enger Molekulargewichtsverteilung hergestellt werden, um anschließend den daraus resultierenden Effekt auf die Mischbarkeit mit Fluidisierung von DPPC in gemischten Membranen studieren zu können. Weiterhin sollen unterschiedliche Kopfgruppen Verwendung finden und eine Aussage über ihre Eignung als Kopfgruppe eines Cotensids für fluide gemischte Membranen mit DPPC getroffen werden. Daneben sollen verschiedenartige Blocksysteme (mit unterschiedlicher Anzahl an hydrophoben und hydrophilen Bausteinen) synthetisiert und der Einfluß dieser Variation auf das Verhalten in Modellmembranen studiert werden.

Die hydrophoben, polymeren Bausteine sowie alle daraus synthetisierten Amphiphile sollen auf ihre Struktur hin untersucht werden. Dabei soll die Gelpermeationschromatographie (GPC) und gegebenenfalls alternative Untersuchungsmethoden Verwendung finden, um die Polydispersität zu bestimmen. Es soll der Gehalt an Verzweigungen und das Molekulargewicht festgestellt werden, sowie die Mikrostruktur analysiert werden. Hierzu sollen verschiedene Methoden der magnetischen Kernresonanzspektroskopie Verwendung finden. Weiterhin sollen die thermischen Eigenschaften mittels Differentieller Wärmeflußkalorimetrie untersucht werden.

Von Interesse sind weiterhin die Struktur-Eigenschaftsbeziehungen der verzweigten Amphiphile. Dazu sollen die kritischen Mizellbildungskonzentrationen in Abhängigkeit der Kopfgruppe und der Struktur des hydrophoben Restes bestimmt und somit ein Anhaltspunkt für die Löslichkeit der Verbindungen in Wasser erhalten werden.

Das Verhalten an der Wasser-Luft-Grenzfläche soll mittels Filmwaagenuntersuchungen bestimmt werden. Hierbei ist zunächst die Stabilität der monomolekularen Filme von Interesse. Weiterhin soll der Flächenbedarf der Amphiphile in einer Modellmembran bestimmt und die dabei erhaltenen Daten in Zusammenhang mit der Art der Kopfgruppe bzw. der Mikrostruktur der hydrophoben Kette gesetzt werden.

Zur Beantwortung der Frage der Mischbarkeit mit DPPC sollen gemischte Filme mit variierendem Gehalt an verzweigtem Amphiphil hergestellt und mittels konventioneller Filmwaagenteknik sowie - nach Zusatz eines Fluoreszenzindikators - gekoppelt mit Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Aus diesen Untersuchungen sollen außerdem Aussagen über die Stabilität der gemischten Filme getroffen werden.

Anhand der Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen einige geeignete Amphiphile für weitere Experimente ausgewählt werden, welche die Ergebnisse der Filmwaagenmessungen unterstützen sollen. Es ist hierfür wichtig, andere Typen von Modellmembranen zu verwenden, um ein umfassendes Bild über das Verhalten der neuen Amphiphilklasse gewinnen zu können. Für Untersuchung an Liposomen soll die Differentielle Wärmeflußkalorimetrie zum Einsatz kommen. Die Messungen in Lösung mit Wasserüberschuß sollen Aufschluß über die Fluidisierung der DPPC-Doppelschicht durch die verzweigten Amphiphile geben. Außerdem sollen Aussagen über die Mischbarkeit beider Amphiphile getroffen werden und gegebenenfalls der Bereich einer Mischungslücke festgestellt werden.

An substratgestützten Membranen aus DPPC mit unterschiedlichem Gehalt an verzweigtem Amphiphil sollen die Diffusionskonstanten der zweikomponentigen Doppelschichten bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen und somit eine Aussage über die Fluidität in Abhängigkeit vom Gehalt an synthetischem Amphiphil getroffen werden. Dazu soll das Photobleichverfahren eingesetzt werden. Außerdem sollen Anhaltspunkte über die Stabilität dieser Modellmembranen erhalten werden.

Abschließend sollen Untersuchungen mittels videounterstützter Mikroskopie helfen festzustellen, ob die synthetisierten Amphiphile in der Lage sind, als Reinsubstanz und in Mischung mit DPPC Vesikel zu bilden. Aus diesen Untersuchungen sollten qualitative Schlußfolgerungen über die Fluidität der verzweigten Verbindungen bzw. die Fluidisierung von DPPC Vesikeln durch den Zusatz dieser neuartigen Substanzen gezogen werden.

Es soll versucht werden, alle Ergebnisse in Zusammenhang zu setzen und so ein komplettes Bild von den Eigenschaften der verzweigten Amphiphile zu erstellen. Aus den Untersuchungen soll sich ergeben, welche Strukturmerkmale sich für gemischte Modellmembranen und für eine spätere Immobilisierung von Proteinen als günstig erweisen.

3 Synthesen

In diesem Kapitel werden die Synthese des polymeren hydrophoben Restes sowie der daraus hergestellten Amphiphile vorgestellt. Zunächst werden die verschiedenen Amphiphiltypen aufgeführt und die zur Benennung der Verbindungen verwendeten Kurzbezeichnungen erklärt. Im Anschluß daran werden die Synthesen der einzelnen Amphiphile detailliert besprochen und ein Ausblick auf eine Möglichkeit der Erweiterung der Synthesen gegeben.

3.1 Grundtypen synthetisierter Amphiphile

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Amphiphiltypen mit unterschiedlicher Anzahl an hydrophoben und hydrophilen Gruppen sowie unterschiedlichen Arten hydrophiler Kopfgruppen synthetisiert (vgl. Abb. 3-1 bis 3-3). Allen Amphiphilen war jedoch die Art des hydrophoben Restes gemeinsam, an den eine Reihe von Anforderungen gestellt wurden.

Zunächst sollten die neuartigen Amphiphile nicht kristallisierbar sein, um fluide Verbindungen für Modellmembranen zur Verfügung zu haben, um so die biologischen fluiden Membranen möglichst gut zu imitieren. Dies wurde durch Verwendung eines Makroalkohols, bestehend aus einer Alkylkette mit statistisch verteilten Ethylenverzweigungen, erreicht (vgl. Kap. 3-4). Sie sollten eine geringe Polydispersität besitzen, ebenfalls in Analogie zu den in natürlichen Systemen vorkommenden Lipiden als Vorbildern, die aus definierten Verbindungen bestehen. Weiterhin sollte der Grad der Verzweigung einstellbar sein und auch variiert werden, um den Einfluß durch die Verzweigungen mit Hilfe verschiedener physikalisch-chemischer Untersuchungen studieren zu können.

Butadien kann sich in Abhängigkeit der Polarität des Lösungsmittels unter 1,2- neben 1,4-Addition an das aktive Zentrum der Polyreaktion anlagern. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um über das Verhältnis von Cyclohexan und Tetrahydrofuran (THF) als Lösungsmittel den Verzweigungsgrad gezielt zu variieren. Durch Verwendung der anionischen Polymerisation konnte eine enge Molekulargewichtsverteilung gewährleistet werden. Eine Endgruppenfunktionalisierung unter Verwendung von Ethylenoxid ermöglichte die Anknüpfung verschiedener hydrophiler Kopfgruppen. Um diesen polymeren Baustein chemisch zu stabilisieren, wurde er hydriert. Dieser Makroalkohol wurde nach Phosgenierung und Verknüpfung mit Ethylendiamin oder durch Mitsunobu-Reaktion in ein Makroamin

umgewandelt (siehe Kap. 3.6, Abb. 3-8). Ausgehend von diesen drei Grundbausteinen konnten anschließend die Zielverbindungen aufgebaut werden.

Die Fähigkeit zur Ausbildung von Vesikeln war eine weitere Anforderung an die synthetisierten Verbindungen. Um hierfür das richtige hydrophil/hydrophob Verhältnis einzustellen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Reihe von Amphiphilen mit unterschiedlicher Anzahl an hydrophilen und hydrophoben Gruppen (vgl. Abb. 3-1 - 3-3) synthetisiert. Dadurch konnte die Variabilität der gewählten Synthesestrategie nach einem Baukastenprinzip gezeigt werden (s. Kap. 3.3). Außerdem fanden zwei verschiedene hydrophile Kopfgruppen Anwendung, die ebenfalls auf ihre Besonderheiten in Modellmembranen hin untersucht werden sollten.

Es wurden drei verschiedene Typen amphiphiler Moleküle synthetisiert:

Typ A mit einem hydrophilen und einem hydrophoben Rest (Abb. 3-1), Typ B, ein gabelförmiges Molekül mit zwei hydrophoben und einem hydrophilen Rest (Abb. 3-2), sowie Typ C als Vertreter der sogenannten Gemini-Amphiphile [50] mit je zwei hydrophilen und hydrophoben Resten (Abb. 3-3).

Typ A: Amphiphil mit je einem hydrophoben und hydrophilen Block unterschiedlicher Art:

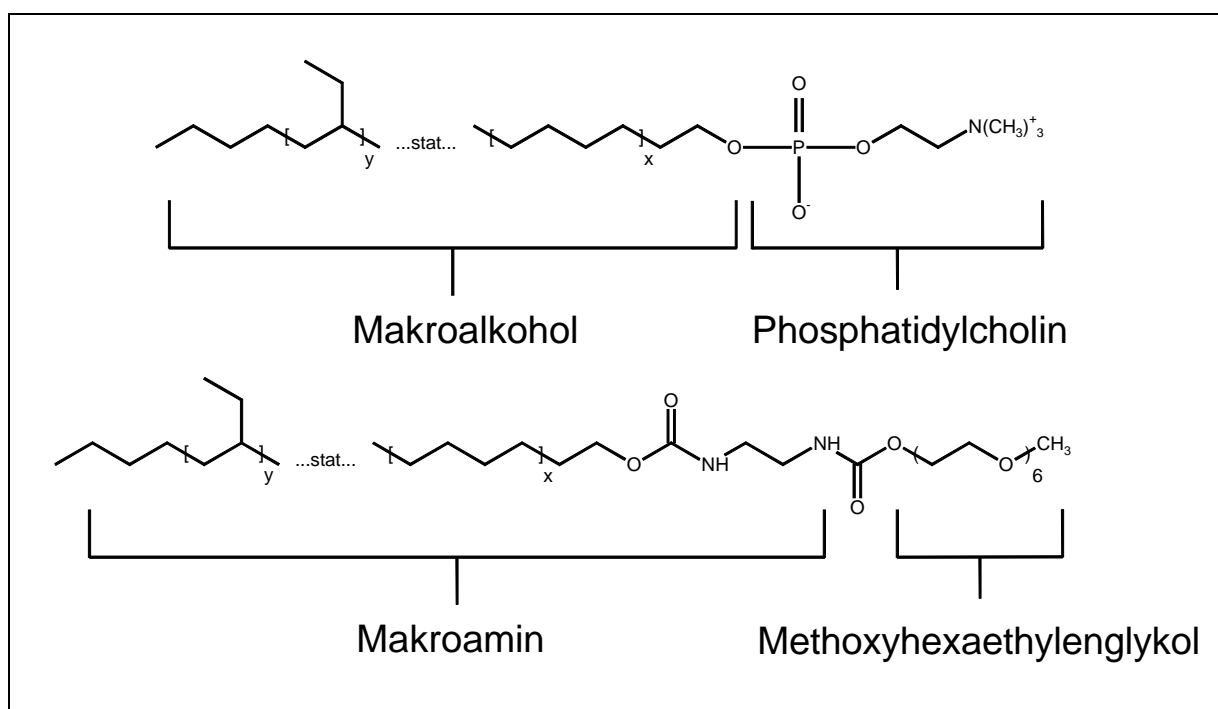


Abb. 3-1: Strukturformeln der Typ A Amphiphile.

Für das *Typ A Amphiphil* fanden zwei verschiedene hydrophile Kopfgruppen Verwendung: Phosphatidylcholin und Methoxyhexaethylglykol.

Phosphatidylcholin als die häufigste Kopfgruppe bei Lipiden, die in biologischen Systemen vorkommen, wurde im Hinblick auf die Untersuchung der Mischbarkeit der vorliegenden synthetischen Amphiphile mit dem natürlichen Lipid DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholin) und auf die Ähnlichkeit zu biologischen Systemen gewählt. Die Synthese erfolgte ausgehend vom Makroalkohol (Kap. 3.7).

Polyethylenglykol ist eine in der chemischen Biophysik häufig verwendete Kopfgruppe für synthetische Lipide. Des weiteren bestehen im Arbeitskreis schon Erfahrungen in der Synthese von Amphiphilen mit dieser hydrophilen Gruppe [51, 52], weshalb sie als Alternative für die Phosphatidylcholingruppe verwendet wurde. Hexaethylglykol ist das höchste Homologe in der Reihe der Polyethylenglykole, das als definierte Verbindung kommerziell erhältlich ist. Die Verwendung dieser molekulareinheitlichen Verbindung anstatt eines Polyethylenglykol-Gemisches garantiert eine enge Molekulargewichtsverteilung der amphiphilen Zielverbindung, da nur der hydrophobe Molekülteil durch anionische Polymerisation synthetisiert wurde. Durch Endcapping mit einer Methyleinheit wird die einseitige Anbindung an den hydrophoben Rest ermöglicht.

Typ B: Amphiphil mit einem gegabelten, hydrophoben Strukturelement, bestehend aus 2 Makroaminen, (angeknüpft an eine Diethanolamingruppe) und einem linearen, hydrophilen Teil (Abb. 3-2)

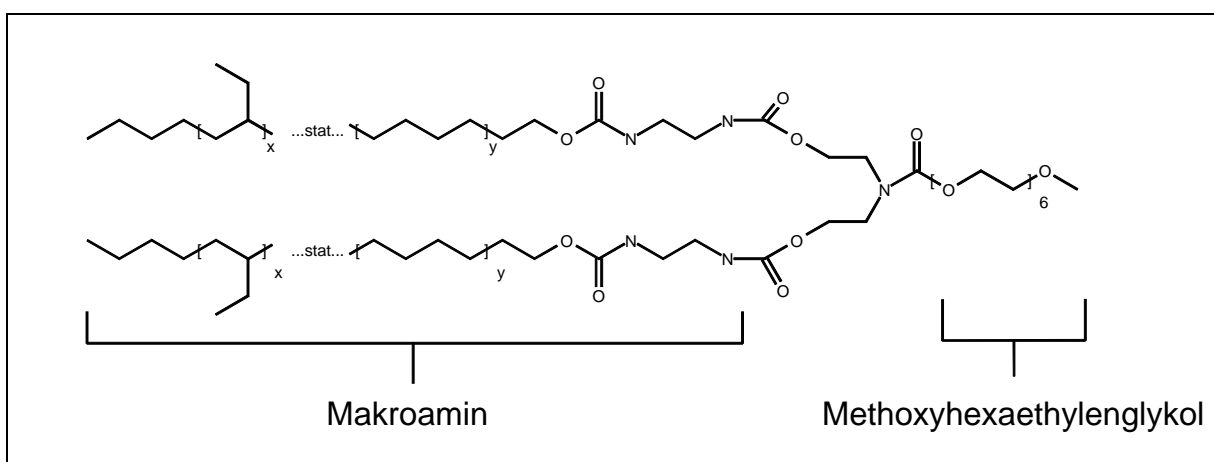


Abb. 3-2: Strukturformeln des Typ B Amphiphils.

Auch für diesen Typ wurde Methoxyhexaethylenglykol als hydrophile Kopfgruppe verwendet. Die Verknüpfung der zwei hydrophoben Reste mit dem hydrophilen Block erfolgte über eine Diethanolamin-Einheit (Ea) (Kap. 3.6.2), so daß ein gabelförmiges Molekül entsteht, das hydrophober ist als die Typ A Amphiphile mit nur einem verzweigten Rest.

Typ C: Gemini-Amphiphil mit zwei hydrophoben und zwei hydrophilen Resten, verknüpft über eine N,N'-Dihydroxyethylethylendiamin Einheit (Abb. 3-3)

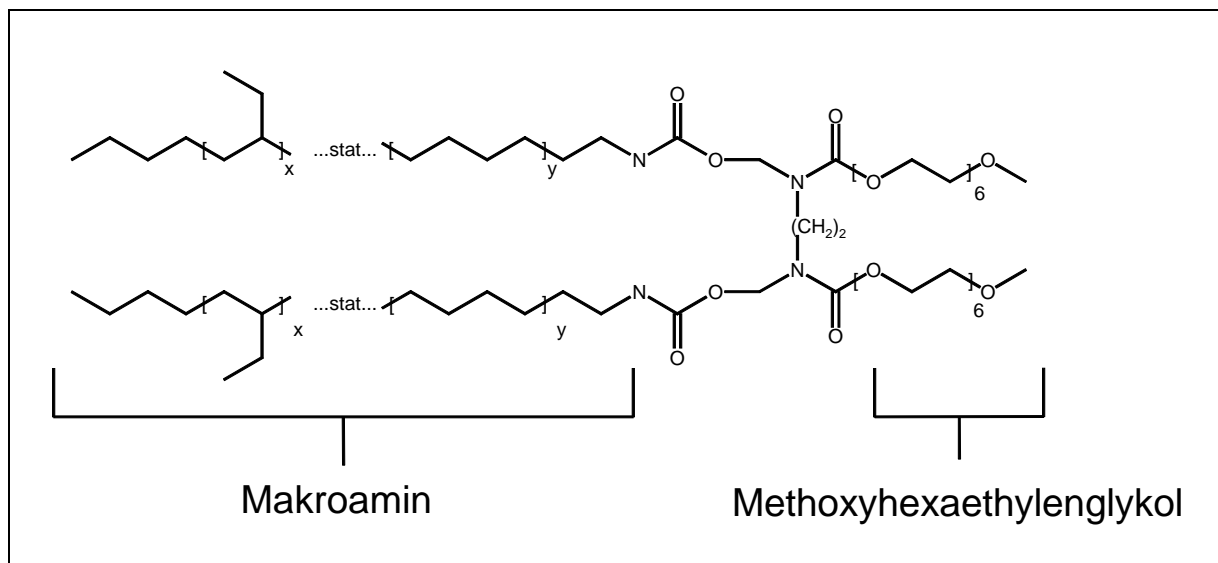


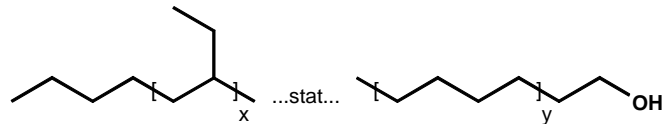
Abb. 3-3: Strukturformeln des Typ C Amphiphils.

Die Verknüpfungseinheit dieses Amphiphils vom sogenannten Gemini-Typ (Zwillings-Amphiphil mit zwei hydrophilen und zwei hydrophoben Resten) bildete ein N,N'-Hydroxymethyl-ethylendiamin Baustein, der nach Phosgenierung an beiden Hydroxygruppen mit einem Makroamin verknüpft wurde (siehe Kap. 3.6.3). Verwendet wurde ebenfalls eine Methoxyhexaethylenglykol Kopfgruppe. An diesem Amphiphil konnte im Vergleich mit dem Typ A und Typ B Amphiphil der Einfluß der hydrophilen Kopfgruppe untersucht werden (s. Kap. 4.4).

3.2 Allgemeines zur Nomenklatur

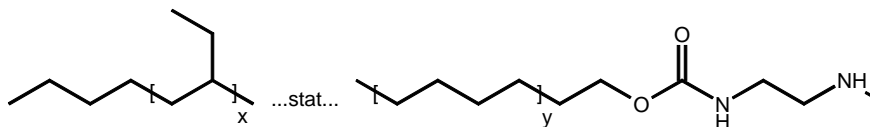
Zur Vereinfachung der Benennung einzelner Bausteine und der aus ihnen synthetisierten Zielverbindungen wird eine Reihe von Kürzeln benutzt:

- a) **ROH** Makroalkohol; R bezeichnet die Alkylkette mit veränderlicher Kettenlänge und statistischer Verzweigung (vgl. Abb. 3-8)



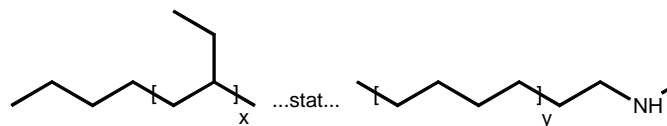
Die Bezeichnung „...stat...“ ist dabei konform mit den IUPAC Regeln und bedeutet „statistischer Einbau“ beider Gruppen in das Polymer.

- b) **REn** Umsetzungsprodukt von ROH zum Makroamin mit Ethylendiamineinheit (vgl. Abb. 3-8)

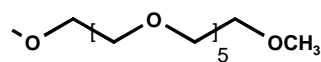


Entsprechend wird die Ethylendiamineinheit kurz als **En** bezeichnet.

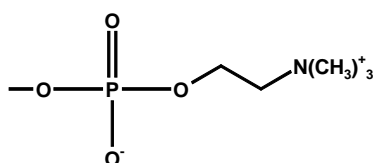
- c) **RN** Umsetzungsprodukt von ROH zum Makroamin (vgl. Abb. 3-8)



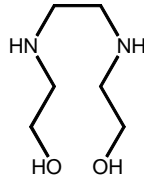
- d) **HEGMe** Methoxyhexaethylenglykolbaustein (vgl. Abb. 3-9)



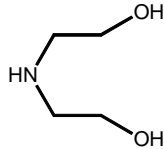
- e) **PC** Phosphatidylcholkopfgruppe



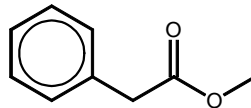
f) De N,N'-Dihydroxyethylethylendiamin



g) Ea Diethanolamin



h) „CBO“: Benzyloxycarbonyl-, Schutzgruppe für Amine



Die Benennung der Amphiphile und der Zwischenstufen der Synthese erfolgt in der Reihenfolge hydrophober Teil (R, REn, RN) - u.U. Verbrückungsteil (Ea, De) - hydrophiler Teil (HEGMe, PC). Demzufolge lauten die Kurzbezeichnungen für die Typ A Amphiphile RPC bzw. REnHEGMe, für das Typ B Amphiphil ergibt sich die Bezeichnung (REN)₂EaHEGMe und für das Typ C Amphiphil das Kürzel (RN)₂De(HEGMe)₂.

3.3 Synthesestrategie zum Aufbau der Amphiphile über Urethanverknüpfungen

Die Verbindung der einzelnen Bausteine zu Amphiphilen erfolgte über Urethanbindungen. (Die einzige Ausnahme bildet das Typ A Amphiphil RPC mit Phosphatidylcholinkopfgruppe, dessen Synthese gesondert in Kapitel 3.6.4 besprochen wird.) Diese Art der Verknüpfung bietet den Vorteil einer einfachen Synthese über Phosgenierung eines Alkohols zum Chloroformiat (Kap. 3.3.2) und anschließender Kondensation mit einem Amin (Kap. 3.3.3). Mit Hilfe dieser Synthesestrategie wurde die Ausarbeitung und Verwendung eines Baukastensystems aus verschiedenen Blöcken ermöglicht. Im vorliegenden Fall handelt es sich dabei um das Makroamin bzw. den Makroalkohol als hydrophoben Block und die hydrophile Methoxyhexaethylenglykolgruppe. Diese können über verschiedene Verknüpfungseinheiten durch wenige Reaktionen miteinander zu Multiblocksyste men verknüpft werden. Die Urethangruppen besitzen dabei den entscheidenden Vorteil einer hohen Stabilität gegenüber den Reaktionen, die im Laufe der Synthese zum Aufbau dieser Oligomere verwendet wurden.

Bifunktionelle Amine mußten vor der Kondensation mit einem Chloroformiat einseitig geschützt werden, um nur eine der beiden Amingruppen in die Kondensationsreaktion einzubeziehen. Dies wurde mit der bewährten CBO-Schutzgruppe [53] erreicht (Kap. 3.3.1). Diamine lassen sich durch genaue Einstellung des pH-Wertes bei der Kondensationsreaktion mit dieser Gruppe gezielt monoschützen. Die Eliminierung der Schutzgruppe ist hydrolytisch leicht möglich [54].

Die ausgearbeitete Synthesestrategie bietet somit eine hohe Flexibilität, die durch die Anzahl der verschiedenen hergestellten Amphiphiltypen widerspiegelt wird.

3.3.1 Verwendung der Schutzgruppe CBO

Zur Herstellung des Makroamins REn war es zunächst erforderlich, ein mit CBO monogeschütztes Ethylendiamin zu synthetisieren (vgl. Abb. 3-4). Dies gelang über eine pH-kontrollierte Kondensationsreaktion des Chlorameisensäurebenzylesters mit dem Diamin. Bei pH 3,8 liegen sowohl Ethylendiamin als auch Ethylendiamin-N-carbonsäurebenzylester monoprotioniert vor, so daß eine gleichzeitige Reaktion mit Chlorameisensäurebenzylester an

beiden Stickstoffatomen unterdrückt werden konnte. Der pH-Wert wurde durch abwechselnde Zugabe des Chlorameisensäureesters und Natriumacetatlösung konstant am Umschlagspunkt des zugesetzten Indikators Bromkresolgrün gehalten. Trotz dieser Reaktionsführung entstanden kleine Mengen disubstituiertes Piperazin, die durch Extraktion mit Benzol im Sauren abgetrennt werden konnten. Durch erneute Extraktion des Reaktionsgemisches mit Toluol bei pH 10 wurden das Produkt (1) und Edukt aus der wäßrigen Phase von geringen Mengen disubstituietem Ethylendiamin abgeschieden und anschließend durch Säulenchromatographie voneinander getrennt.

Die Synthese von Diethanolamin-N-carbonsäure-benzylester (2) und CBO geschütztem N,N'-Dihydroxyethylendiamin (3) (vgl. Abb. 3-4) erfolgte ebenfalls durch eine Zweiphasen Kondensationsreaktion [55] unter Zusatz einer schwachen anorganischen Säure, wobei hier kein exakter pH-Wert eingestellt werden mußte, sondern nur entstehende Salzsäure abgefangen und gleichzeitig die Hydroxyfunktion vor einer Reaktion mit dem Chlorameisensäureester geschützt wurde. Aufgrund der höheren Nucleophilie der Aminogruppe findet in basischem Medium keine Reaktion zwischen dem Chlorameisensäurebenzylester und der Hydroxygruppe statt. Beide Verbindungen konnten in guter Ausbeute (82 bzw. 97 %) synthetisiert werden.

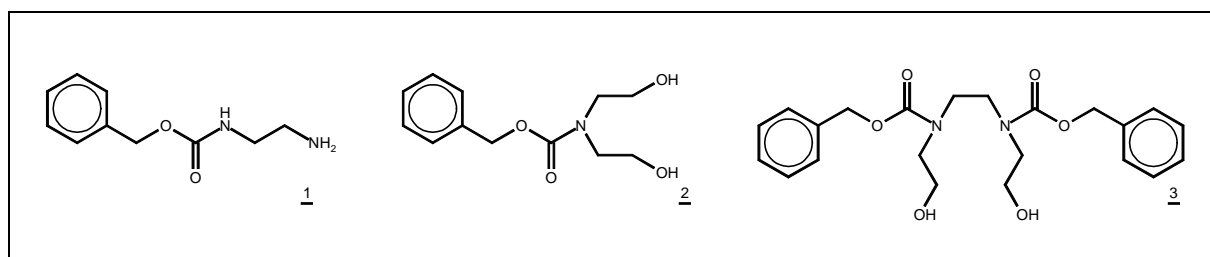


Abb. 3-4: Strukturformeln der mit CBO geschützte Bausteine CBOEn 1, CBOEa 2 und CBODe 3.

Nach Umsetzen der geschützten Verbindungen zu Urethanen mußte die CBO-Schutzgruppe wieder eliminiert werden, bevor Anknüpfung an einen anderen Baustein möglich war. Die Besonderheit dieser Schutzgruppe ist die Möglichkeit der selektiven Eliminierung durch katalytische Hydrierung (vgl. Abb. 3-5), wobei neben dem freien Amin Kohlendioxid und Toluol entstehen. Die Urethanbindungen wurden dabei nicht angegriffen [56].

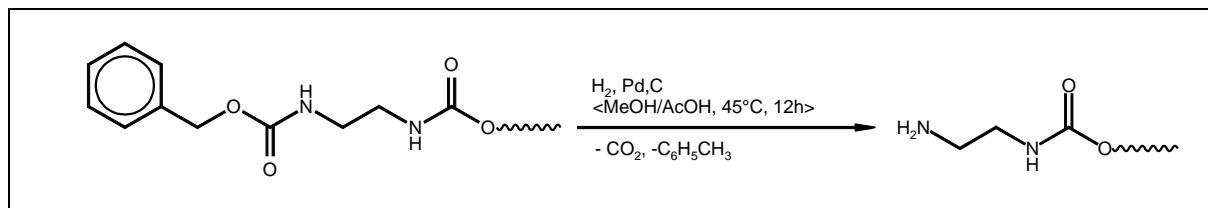


Abb. 3-5: Beispiel für die Abspaltung der CBO-Schutzgruppe.

Diese Reaktion wurde mit 10 % Palladium auf Aktivkohle katalysiert und bei 55°C durchgeführt. Als Lösungsmittel wurde eine Mischung aus Methanol und Essigsäure verwendet. In einigen Fällen wurde aus Gründen der Löslichkeit Ethylacetat zugesetzt. Das Ende der Reaktion wurde mittels NMR-Spektroskopie überprüft; die vollständige Entfernung der Schutzgruppe bedurfte nie einer längeren Zeit als zwölf Stunden. Zur Aufarbeitung wird der Katalysator über Celite abfiltriert, das Filtrat mit wässriger Natriumhydroxidlösung auf pH 14 abgestumpft und das Produkt aus der wässrigen Lösung mit Chloroform extrahiert.

3.3.2 Synthese der Chloroformiate

Durch Umsetzung eines Alkohols mit Phosgen wird das entsprechende Chloroformiat erhalten. Dabei wurde ein mindestens fünffach molarer Überschuss (bei Diolen siebenfach) an Phosgen verwendet. Die Reaktion wurde mit einer speziellen Apparatur durchgeführt (siehe Kap. 6.2.3), da wegen des toxischen Gases Phosgen eine geschlossene Reaktionsführung nötig war.

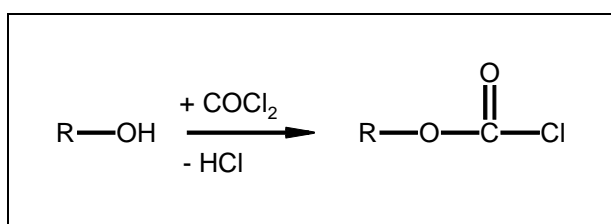


Abb. 3-6: allgemeine Reaktionsgleichung
Synthese der Chloroformiate.

Überschüssiges Phosgen wurde nach erfolgter Reaktion durch Erwärmen des Reaktionsgemisches auf 40°C weitestgehend aus der Reaktionsapparatur ausgetrieben. Letzte Reste wurden beim Entfernen des Lösungsmittels im Hochvakuum entfernt. Das Chloroformiat wurde umgehend und ohne Reinigung eingesetzt. Dabei wurde davon ausgegangen, daß die Umsetzung des Alkohols zu 100% erfolgt ist.

3.3.3 Kondensation der Chloroformiate mit Aminen

Die Verknüpfung der verschiedenen Bausteine durch Urethanbindungen war durch Kondensation von Aminen und Chloroformiaten möglich.

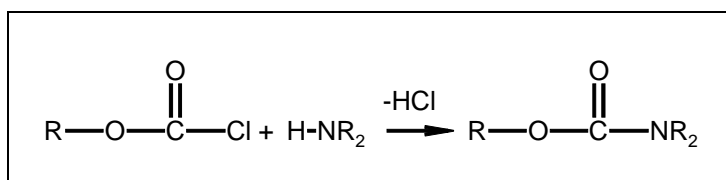


Abb. 3-7: *allgemeine Reaktionsgleichung
Kondensationsreaktion.*

Dabei wurde das Amin in 1,3 facher molarem Überschuß in Chloroform vorgelegt und unter Kühlung das Chloroformiat zugetropft. Die entstehende Salzsäure wurde durch Natriumcarbonat abgefangen, wobei dies im 1,5 fachen Überschuß bezogen auf das Amin vorliegen mußte. Überschüssiges Amin wurde nach erfolgter Reaktion durch Waschen mit verdünnter Salzsäure entfernt.

3.4 Synthese des hydrophoben Bausteins

Der Makroalkohol wurde im ersten Schritt durch anionische Polymerisation von Butadien mit n-Butyllithium als Initiator und nachfolgender Umsetzung des lebenden Polymers mit Ethylenoxid [57] und Abbruch durch verdünnte Salzsäure hergestellt (Abb. 3-4). Da Ethylenoxid mit einem Carbanion in einem apolaren Medium und bei tiefen Temperaturen in Gegenwart eines Lithium Gegenions nur einmal reagiert [58], ist eine genaue Dosierung dieses Reaktanden nicht erforderlich. Als Lösungsmittel wurde ein Gemisch aus Cyclohexan und THF in variierender Zusammensetzung verwendet. Zunächst war unsicher, ob der Zusatz an Tetrahydrofuran einen Einfluß auf die Anlagerung des Ethylenoxids besitzt. Die ^1H -NMR Spektren des Makroalkohols und der daraus synthetisierten Amphiphile geben allerdings keinen Anhaltspunkt für eine mehrfache Anlagerung des Ethylenoxids (vgl. Abbildung 4-5).

Die Menge an Butadien wird über ein gradiertes Gefäß genau bestimmt, in welches das Monomer zunächst einkondensiert wird. Durch Umkondensation über eine kurze Säule mit Molekularsieb in ein Druckgefäß mit Kaliumspiegel erfolgte die Reinigung und Trocknung des Butadiens vor Einleitung in das eigentliche Reaktionsgefäß. Alle Glasgeräte wurden durch

sorgfältiges Ausheizen von Feuchtigkeit befreit. Dabei wurde bewußt auf die Durchführung in einer speziell für anionische Polymerisationen ausgelegten Apparatur verzichtet, da die mit der konventionellen Vakuum-/Schutzgastechnik erzielten Ergebnisse für die hier gestellten Erfordernisse absolut ausreichend waren. Es wurde dabei in Kauf genommen, daß ein Anteil der Polymerisationszentren vor Zugabe des Ethylenoxids inaktiviert wurden, da die Oligomere ohne Hydroxyendgruppe leicht durch Säulenchromatographie entfernt werden konnten.

Da Nichtkristallinität ein Hauptfordernis an die synthetisierten Amphiphile sein sollte, war es notwendig, Seitengruppen in die Alkylkette einzubauen. Dies gelang durch 1,2- neben 1,4-Polymerisation des Butadiens [59]. Diene als bifunktionelle Monomere bieten dem aktiven Polymerisationszentrum zwei Reaktionsstellen zum Angriff an. Handelt es sich um ein konjugiertes Dien, so kann der Übergangszustand isomerisieren, und durch eine Umlagerung kann sowohl die Addition mit dem Kohlenstoffatom 1 und 2, wie auch mit dem ersten und vierten C-Atom eintreten.

Das Verhältnis 1,2- zu 1,4-Polymerisation und damit der Verzweigungsgrad konnte durch die Zusammensetzung des Lösungsmittelgemisches (Cyclohexan/Tetrahydrofuran) bzw. durch das Verhältnis von THF zu Initiator und durch die Initiatorkonzentration gesteuert [60] und anschließend, ebenso wie das Molekulargewicht, aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bestimmt werden. So wurden verschiedene hydrophobe Reste (Ansätze a-f) mit unterschiedlichen Kettenlängen und verschiedenem Anteil an Seitenketten synthetisiert. Eine an die Polymerisation anschließende Hydrierung in Cyclohexan mit Palladium auf Calciumcarbonat als Katalysator führte zum gesättigten Makroalkohol 5 (Abb. 3-8). Tabelle 3-I faßt die Konzentrationsverhältnisse $[\text{THF}]/[\text{I}]$ und die Initiatorkonzentration wie auch den prozentualen Anteil an 1,2-Additionseinheiten, bestimmt aus quantitativer Auswertung der $^{13}\text{C-NMR}$ Spektren (vgl. Kap. 4.1.4) für die Verbindungen 5a-f zusammen. Eine ausführliche Diskussion der Werte im Vergleich mit Literaturdaten folgt in Kapitel 4.1.4.

Tabelle 3-I: Konzentrationsverhältnis THF zu Initiator ($[THF]/[I]$), Konzentration des Initiators ($[I]$) in mol/l sowie Anzahl der Ethylethylen- sowie Tetramethyleneinheiten (x bzw. y) des resultierenden Polymers (vgl. Abb. 3-8) und dem daraus berechneten prozentualen Anteil an 1,2-Additionseinheiten (% 1,2) für die Makroalkohole 5a-f.

Verbindung	$[THF]/[I]$	$[I]$	x	y	% 1,2
5a	6,0	0,5	5,1	0,8	87
5b	0,8	1,4	1,7	0,5	78
5c	0,7	0,1			
5d	0,0	0,5	1,3	1,8	41
5e	0,2	0,1	1,5	4,1	26
5f	6,0	0,5	1,2	0,3	82

Die Reinigung der Oligomere von Nebenprodukten wie verzweigten Alkanen ohne Hydroxyendgruppe erfolgte durch Säulenchromatographie. Die Ausbeuten nach Aufreinigung bezogen auf Butadien lagen zwischen 29 und 48%.

Nach Phosgenierung des Makroalkohols 5 zum Chloroformiat 6 erfolgte Kondensation mit dem monogeschützten Ethylendiamin EnCBO 1 entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise zur Verbindung REnCBO 7. Abschließende hydrogenolytische Abspaltung der CBO-Schutzgruppe komplettiert die Synthese des hydrophoben Bausteins REn 8. Dieses Zwischenprodukt wurde aus den Makroalkoholen 5a-f hergestellt. Eine vollständige Reinigung der Verbindungen 7 und 8 war über Säulenchromatographie trotz zweifacher Chromatographie bei Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittelsysteme nicht möglich. So wurden beide Stufen nur grob durch Säulenchromatographie vorgereinigt und so für die weitere Synthese verwendet. Die daraus synthetisierten Zielverbindungen waren jedoch aufgrund größerer Polaritätsunterschiede zwischen Verunreinigung und Produkt vollständig rein erhältlich.

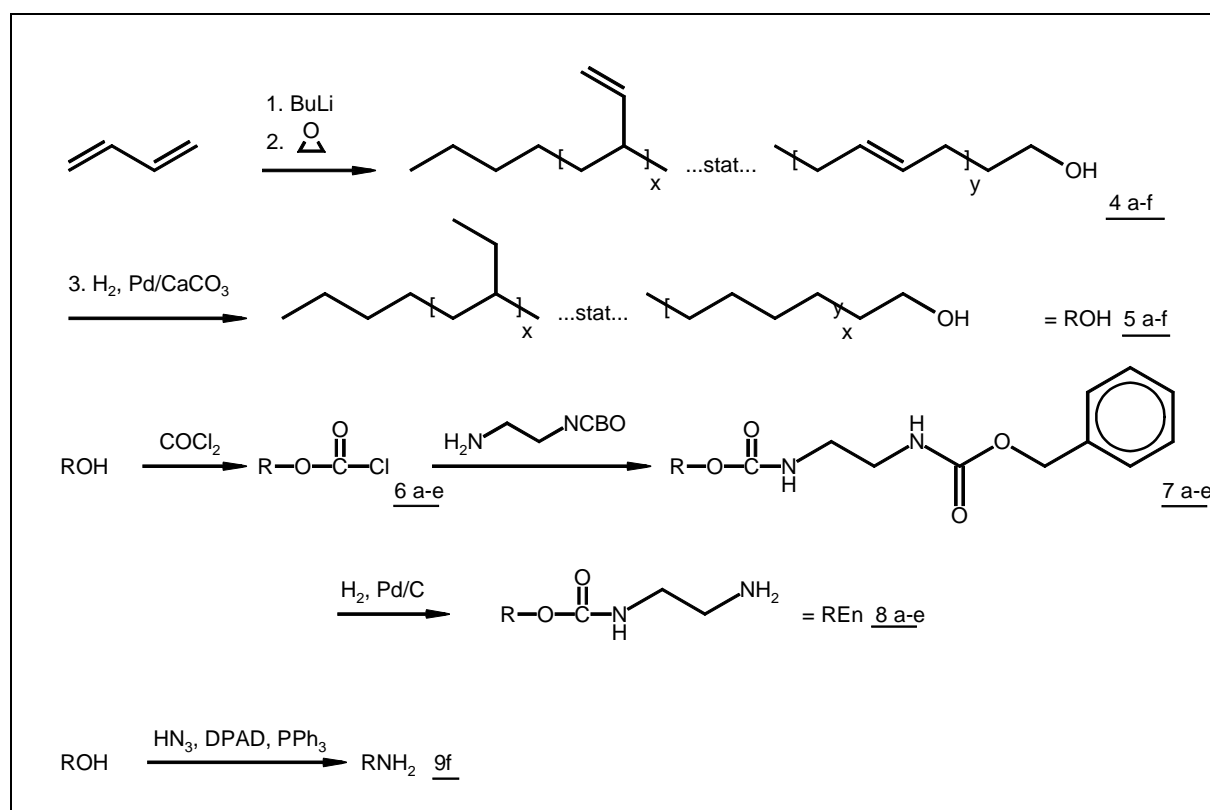


Abb. 3-8: Synthese der hydrophoben Bausteine ROH (5), REn (8) und RNH₂ (9) mit statistischem Einbau an 1,2- und 1,4-Additionseinheiten (x bzw. y; vgl. Tab. 3-I).

Das Makroamin RNH₂ 9 konnte aus dem Makroalkohol ROH 5g durch eine Mitsunobu Reaktion [61] synthetisiert werden. Dazu wird zunächst eine Lösung von Knallsäure HN₃ in Benzol durch vorsichtige Zugabe von Schwefelsäure zu Natriumazid in Benzol hergestellt [62]. Die überstehende benzolische Lösung wird mit Natriumhydroxid Maßlösung gegen Phenolphthalein titriert und sofort eingesetzt. Der Makroalkohol wird in absolutem THF gelöst und mit HN₃ Überschuß versetzt. Die Zugabe von Diisopropylazidcarbonsäure und Triphenylphosphin komplettieren die Reaktion zum Makroamin.

3.5 Synthese des hydrophilen Bausteins für die anionischen Amphiphile

Um den hydrophilen Baustein Methoxyhexaethylenglykol an das hydrophobe Grundgerüst anzuknüpfen, mußte gezielt eine Hydroxygruppe phosgeniert werden. Dazu war es nötig, eine der beiden Hydroxygruppen zuvor zu blockieren [63]. Es wurde ein Endcapping mit einer Methylgruppe vorgenommen. Nach Umsetzung mit Natriumhydrid wurde dazu das Diol mit Methyljodid verethert. Um den Anteil an Diether im Produkt gering zu halten, wurde das Diol im Überschuß vorgelegt und Methyljodid langsam zugegeben. Das Produktgemisch konnte mittels Säulenchromatographie gereinigt werden.

Durch die Methoxyendgruppe wurde die Kopfgruppe nicht zu stark hydrophobisiert. Sie kann somit ohne nachteilige Wirkung auf das hydrophil/hydrophob Verhältnis am Zielmolekül belassen werden. Dies stellt eine gute Alternative zur bisher benutzten, sterisch anspruchsvollen Schutzgruppe 3,5-Di-*tert*-butyl-benzylchlorid dar, die nach Kondensation des hydrophilen Restes mit dem hydrophoben Grundgerüst nicht mehr hydrogenolytisch abspaltbar war [52].

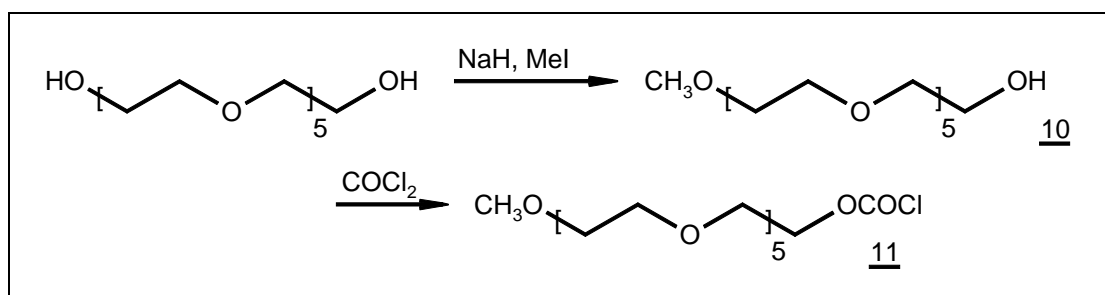


Abb. 3-9: Reaktionsschema Synthese des hydrophilen Bausteins HEGMe 10 und seines Chloroformiats 11 als hydrophile Kopfgruppe für die nichtionischen Amphiphile.

3.6 Synthese der Amphiphile

3.6.1 Typ A Amphiphil REnHEGMe

Aus den bisher beschriebenen Bausteinen war die Synthese des Amphiphils REnHEGMe durch eine einfache Kondensationsreaktion erhältlich. Diese wurde wie schon beschrieben (siehe 3.3.3) in einer Zweiphasenreaktion mit Natriumhydrogencarbonat zum Abfangen der entstehenden Salzsäure durchgeführt. Dabei war darauf zu achten, daß in der Aufarbeitung zunächst nur eine Phasentrennung erfolgte und kein Extrahieren des überschüssigen Amins aus der organischen Phase mit verdünnter Salzsäure. Dies hätte eine Reduzierung der Ausbeute zufolge gehabt, da das Amphiphil 12 eine signifikante Löslichkeit in Wasser besitzt. Das Amphiphil konnte anschließend durch Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt werden. Die Ausbeute bezogen auf den Makroalkohol 5 lag zwischen 18 und 31 %. Das Amphiphil wurde unter Verwendung verschiedener hydrophober Reste (8a-e) synthetisiert, die sich in ihrem Gehalt an Ethylverzweigungen und der Länge der Hauptkette entsprechend der Daten in Abbildung 3-10 unterschieden (vgl. Tab. 4-IV).

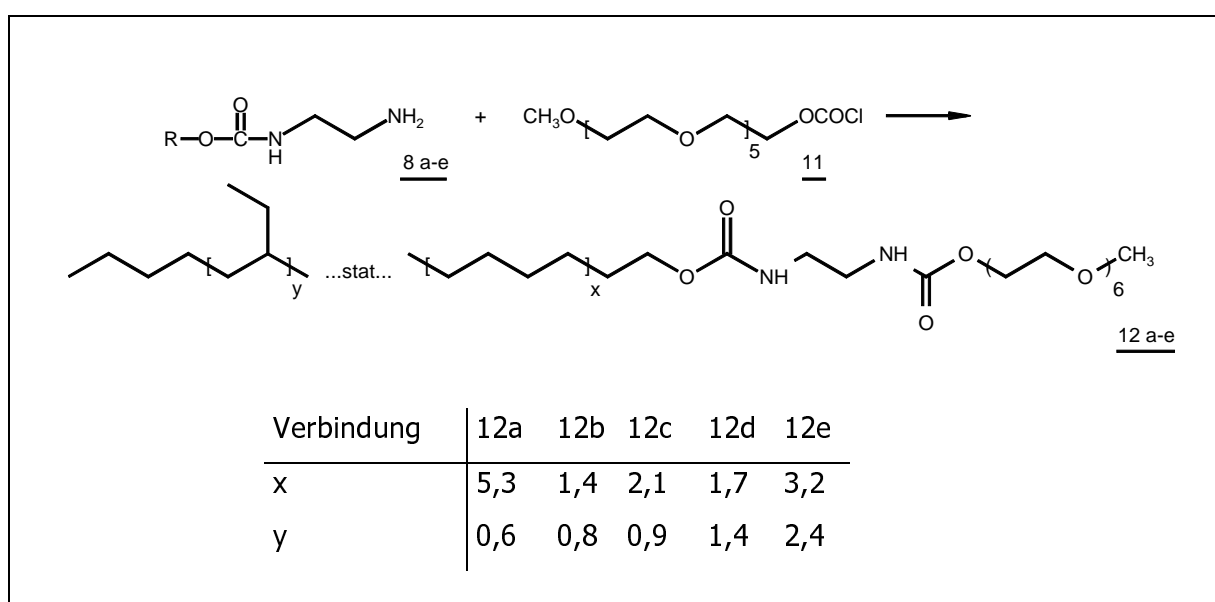


Abb. 3-10: Syntheschema anionisches Typ A Amphiphil REnHEGMe 12a-e.

3.6.2 Typ B Amphiphil (REn)₂EaHEGMe

Das Typ B Amphiphil wurde aus den Makroaminen REn 8a bzw. b, dem hydrophilen Chloroformiat 11 und dem CBO geschützten Diethanolamin CBOEa 2 stufenweise aufgebaut. So entstanden zwei gegabelte Zielverbindungen, die sich in der Zahl der Ethylverzweigungen und der Kettenlänge entsprechend Abbildung 3-11 unterschieden (vgl. Tab. 4-IV).

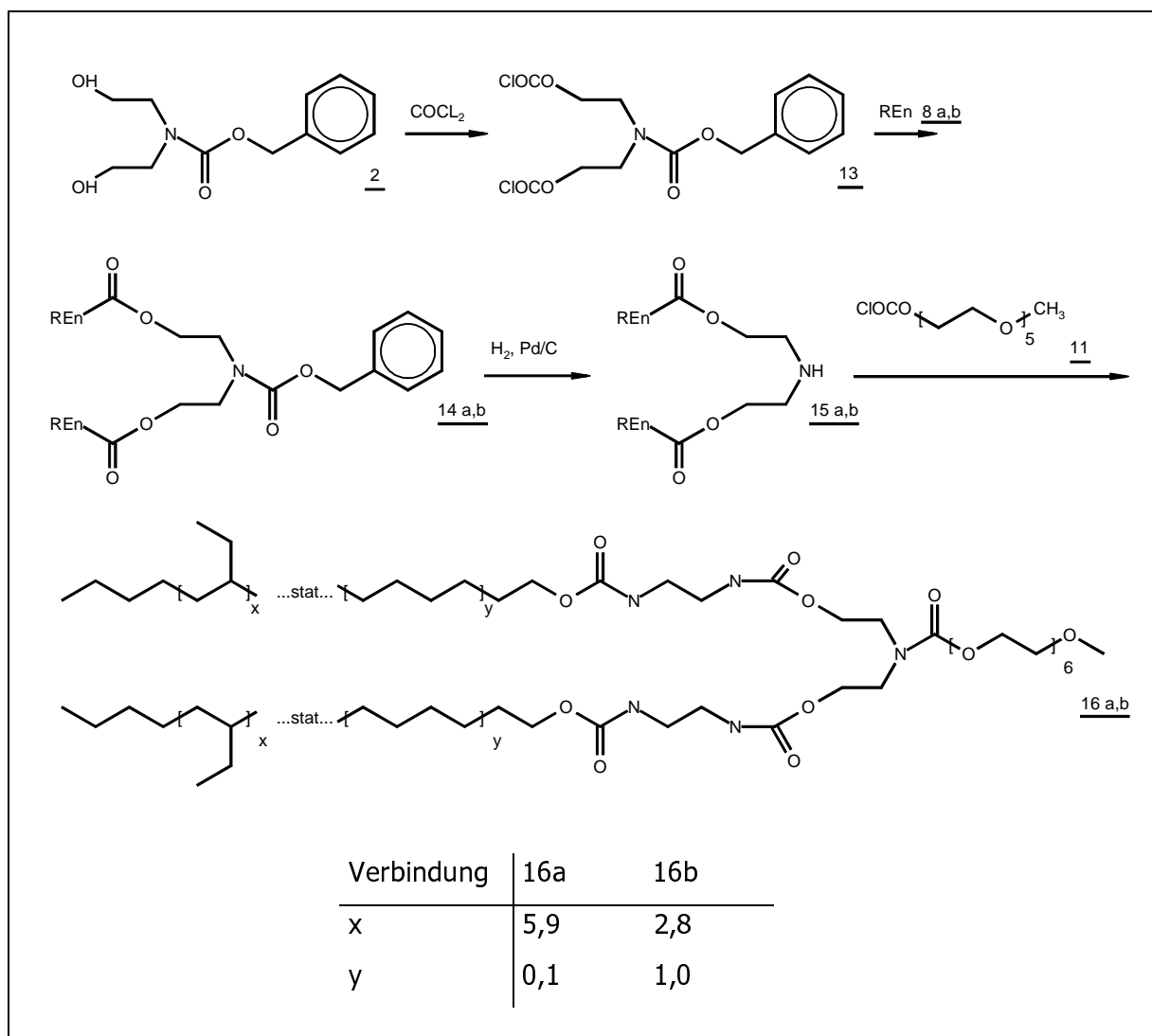


Abb. 3-11: Syntheschema Typ B Amphiphil 16 (REn)₂EaHEGMe.

Zunächst wurde das geschützte Diethanolamin phosgeniert und das entstandene Chloroformiat mit dem Makroamin REn zur Zwischenverbindung 14 kondensiert. Diese konnte durch einfache Säulenchromatographie nicht vollständig rein erhalten werden, so daß die Abtrennung aller Nebenprodukte erst auf der Stufe der Zielverbindung erfolgte. Nach hydrolytischer Abspaltung der CBO-Schutzgruppe erfolgte Kondensation der Verbindung 15 mit dem Chloroformiat des Methoxyhexaethylenglykols 11 zur Zielverbindung

(REn)₂EaHEGME 16. Auch hier wurde eine Reinigung durch Säulenchromatographie und nicht durch Extraktion des überschüssigen Amins aus der organischen Phase vorgenommen. Neben der Zielverbindung wurden auch die Zwischenstufen 14 und 15 zweifach mittels Säulenchromatographie gereinigt. Dadurch sanken die Ausbeuten bezogen auf das Makroamin auf etwa 4% bzw. 8% (vgl. Kap. 5.3.16)

3.6.3 Typ C Amphiphil $(RN)_2De(HEGMe)_2$

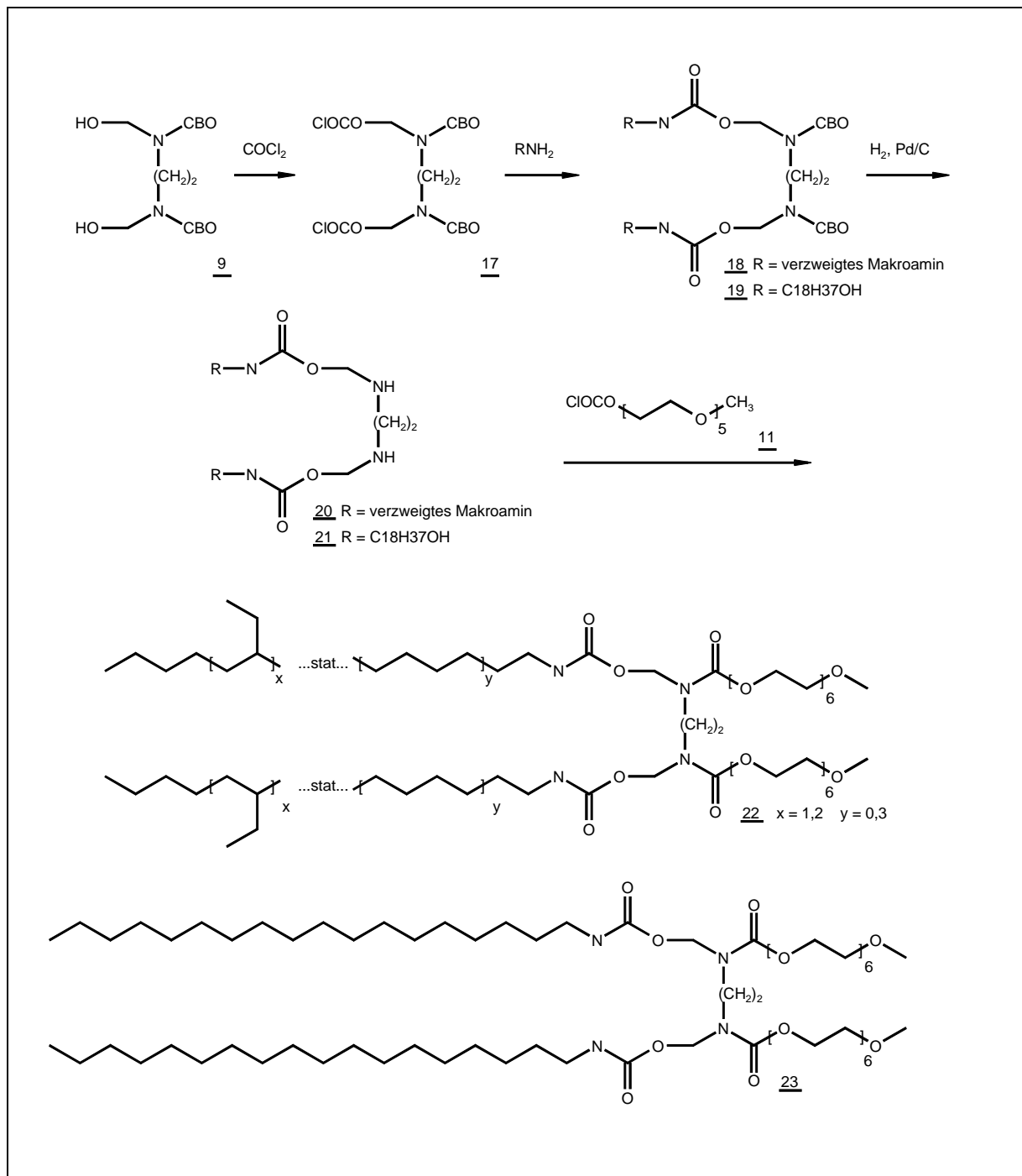


Abb. 3-12: Syntheschema Typ C Amphiphil $RN_2DeHEGMe_2$ 22 und 23.

Auch dieses Amphiphil konnte durch eine Folge von Kondensations- und Chloroformierungsreaktionen hergestellt werden. Nach der Umsetzung des Diols 3 mit Phosgen konnte dieses mit dem Makroamin RNH_2 9f (s. Abb. 3-8) kondensiert werden. Im Anschluß an die hydrolytische CBO-Abspaltung erfolgte die Kondensation des Diamins 20 mit

dem Chloroformiat des Methoxyhexaethylenglykols 11 zur Zielverbindung $\text{RN}_2\text{DeHEGMe}_2$ 22, die durch Säulenchromatographie gereinigt werden konnte. Zum Vergleich des Verhaltens dieser Verbindung mit einem unverzweigten Rest wurde ebenfalls ein Typ C Amphiphil 23 mit einem Octadecylamin als hydrophobem Rest synthetisiert.

3.6.4 Synthese des Typ A Amphiphils RPC 25

Im Gegensatz zu den anderen Amphiphilen mit Methoxyhexaethylenglykolkopfgruppe konnte das Phosphatidylcholin in einer Multistepreaktion nach Gaentzler *et al.* [64] synthetisiert werden (s. Abb. 3-13). Dazu wurde zunächst aus Bromethanol und Phosphorylchlorid das Reagenz 2-Bromoethyldichlorophosphat synthetisiert [65]. Dies wurde nachfolgend mit den Makroalkoholen ROH 5a-e umgesetzt. Ohne Aufarbeitung oder Aufreinigung entstanden die Phosphatidylcholone nach anschließender Reaktion mit Triethylamin.

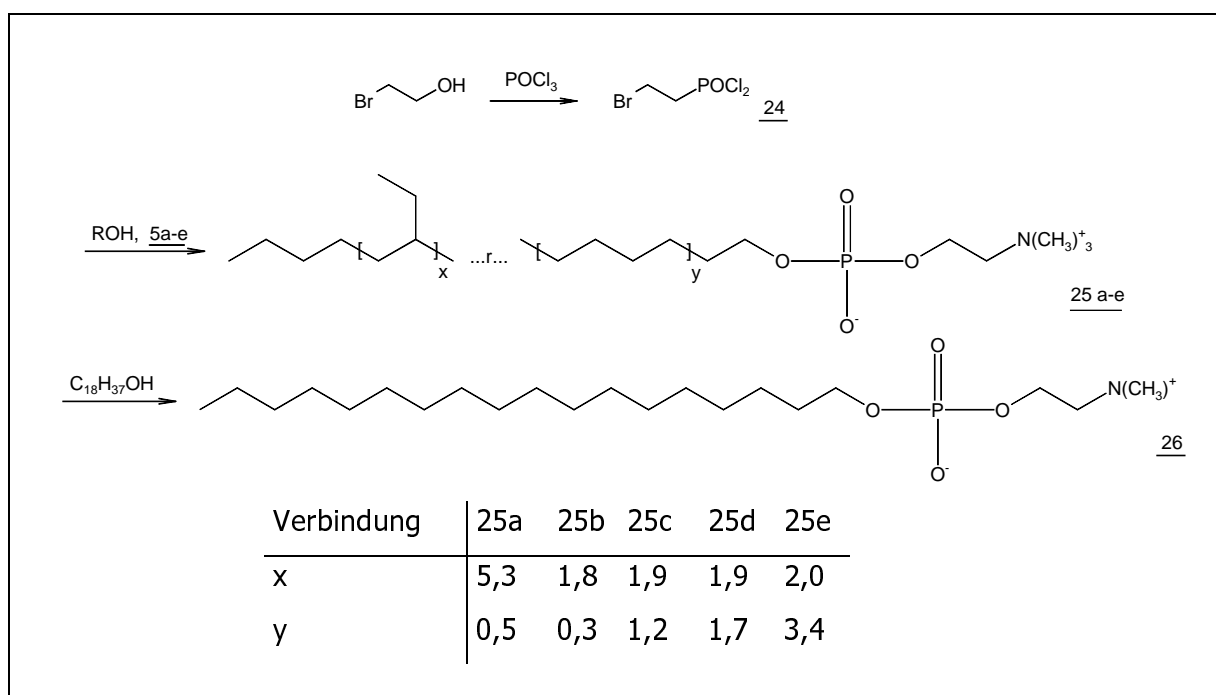


Abb. 3-13: Syntheschema Typ A Amphiphil RPC 25a-e.

Die erhaltenen Amphiphile konnten durch Säulenchromatographie gereinigt werden. Dazu wurden zunächst sämtliche Verunreinigungen mit einem Gemisch aus Methylenchlorid und Methanol mit langsam wachsenden Gehalt an Methanol entfernt und anschließend die Produkte durch ein Gemisch aus Methanol und wässriger 25%iger Ammoniaklösung von der Chromatographiesäule eluiert. Die Amphiphile waren auf diese Weise mit hoher Reinheit

synthetisierbar, was im ^1H - und ^{31}P -NMR Spektrum sowie durch Elektronenspray Ionisation / Massenspektroskopie (siehe Kap. 4.1.2) deutlich wurde.

Wie im Fall des Typ C Amphiphils $(\text{RN})_2\text{De}(\text{HEGMe})_2$ wurde auch hier ein Amphiphil mit einem unverzweigten C18 Rest synthetisiert (C18H37OPC, 26), um den Unterschied der thermischen Eigenschaften herauszuarbeiten.

