

6. Summary

A wealth of experimental evidence points towards a great importance of the supramolecular structures – and in particular of cubic structures – of lipids for processes in membranes. However, very little was known about the prerequisites to chemical structure for cubic phases to occur and model-systems were lacking which would enable the correlation of chemical structures with mesogenic properties.

The aim of this work was to synthesise simple model compounds and to derive structure-property relationships in general as well as for cubic phases in particular. The working hypothesis was that sterically problematic sugar headgroups may destabilise the ordinary lamellar and columnar phases and thus stabilise cubic phases (Figure 2.1).

In the first step, alkyl glycosides were synthesised as the most simple model system and the sugar headgroup structure was changed systematically. The synthesis was accomplished using the peracetylated saccharides as glycosyl donors and the Lewis acid-catalysed displacement of the acetoxy group at C-1 for glycoside synthesis. This strategy simplifies the synthesis, since both anomers of a glycoside can be obtained from the same glycosyl donor, depending on the reaction conditions (Figure 3.3).

The alkyl glycosides with a monosaccharide headgroup displayed thermotropically a S_A phase and in the contact preparation with water myelin figures (Figure 3.5), whereas a broad polymorphism was found in the case of alkyl glycosides with a disaccharide headgroup. In this case lamellar and cubic phases were found in the dry state (Figure 3.12) and bicontinuous cubic phases of type 1 and 2, lamellar phases, columnar phases of type 1, micellar cubic phases of type 1 and lyotropic cholesteric phases in the contact preparation with water (Figure 3.15). The observed phase behaviour was correlated with the chemical structure. The hypothesis, that sterically problematic 1→6 linked sugar headgroups favour the occurrence of cubic phases could be proved.

While there are only a few examples of lyotropic cholesteric phases, this phase occurred in the case of long-chain alkyl glycosides with disaccharide headgroups frequently. Its existence was verified by small-angle neutron scattering, and it could be demonstrated that its occurrence requires a minimal chain length of the alkyl chain.

Glycosyl diacylglycerols were synthesised (Chapter 4) as model compounds which closely resemble nature. As these compounds were intended for use in binary mixtures in the final step, it was necessary to use glycosyl diacylglycerols bearing unsaturated fatty acid chains. Hence, the classical synthetic strategy according to Mannock (Figure 4.2) could not be used, since the final deprotecting step was known to interfere with unsaturated fatty acids. A new strategy was therefore developed, giving a quick and easy access within 6 steps to unsaturated glycosyl

diacylglycerols, starting with the peracetylated sugar and the suitably protected glycerol (Figures 4.6 and 4.7).

Glycosyl dioleoylglycerols with a monosaccharide headgroup displayed a columnar mesophase in the dry state and no further lyotropic phases, while with a disaccharide headgroup a broad lyotropic polymorphism was observed (Figures 4.10 and 4.12). These disaccharide derivatives displayed in the contact preparation with water besides a columnar phase a bicontinuous cubic phase, a lamellar phase and myelin figures. According to the general concept outlined in Chapter 2 (Figure 2.1), the disaccharide headgroup should already destabilise the columnar phase and exactly this was found for the lyotropic properties to occur. If the 1→4 linked disaccharide headgroup was replaced by a broad 1→6 linked headgroup, even in the anhydrous state a cubic and a lamellar phase were found in addition to a columnar phase, again proving the general hypothesis and the proposed effect of 1→6 linked headgroups. Again it was possible to link the observed mesogenic behaviour with the structure of the carbohydrate headgroup, which was changed systematically (Table 4.1).

The compounds synthesised were used in the final step (Chapter 5) to prepare binary mixtures, and it was possible to induce cubic phases in the mixture of a columnar and a lamellar component. The induced cubic phase was dependent on concentration as well as temperature, and proved to be a derivative of the lamellar phase. It was possible to deduce the influence of the carbohydrate structure on the stability of the induced cubic phase by comparison of the different phase diagrams, which have been obtained by changing the carbohydrate headgroup of the mixture components systematically (see page 85). For example, galactose caused the induced cubic phase to be less temperature dependent compared to glucose (Figure 5.13).

This last observation may be of great biological relevance, since galacto lipids are found in particular in plants which have to withstand a wide range of ambient temperatures during the different seasons while still maintaining their membrane properties.

But there is still an even more important general observation, which has been made whenever a cubic phase was found:

It took at elevated temperatures only a short time for the lamellar to cubic transition to occur throughout the whole sample, while at low temperatures this transition took several hours, if it happened at all. However, the formation of a seed of a cubic phase is expected to occur immediately. This seed of a cubic phase in a membrane is equivalent to a pore, which is necessary for a non-leaky fusion, whereas the transformation of the whole membrane into a cubic phase would destroy its barrier function. The quick formation of a seed of a cubic phase whilst the macroscopic phase transition is hindered for kinetical reasons – as found here – might be the crucial key-step in processes such as the cell fusion.

Zusammenfassung

Zahlreiche experimentelle Befunde deuten daraufhin, daß die von Lipiden gebildeten supramolekularen Strukturen und hier insbesondere die kubische Phasen von großer Bedeutung für Prozesse in Zellmembranen sind. Fundierten Erkenntnisse über die chemischen Strukturvoraussetzungen zur Erzeugung dieser bikontinuierlichen kubischen Phasen und Modellsysteme, die diese Phasen mit den gefundenen Effekten quantitativ korrelieren können, fehlten jedoch bisher.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, einfache Modellverbindungen zu synthetisieren und Struktur-Eigenschaftsbeziehungen im allgemeinen und für kubische Phasen im besonderen abzuleiten. Der Grundgedanke war dabei, daß die Stabilität kubischer Phasen auf einem neuen Strukturkonzept beruhen könnte, nämlich der Destabilisierung der gewöhnlichen lamellaren und kolumnaren Phasen durch sterisch problematische Kopfgruppen, so daß bikontinuierliche kubische Phasen relativ dazu stabilisiert werden (Abbildung 2.1).

Als einfachste Modellsysteme wurden zunächst Alkylglycoside dargestellt (Kapitel 3), deren Zuckerkopfgruppe systematisch modifiziert wurde. Die Synthese erfolgte ausgehend von den peracetylierten Zuckern als Glycosyldonor durch die Lewis-Säure katalysierte direkte Glycosylierung mit dem jeweiligen Alkohol. Diese Strategie vereinfacht die Synthese erheblich, da man auf diesem Weg aus ein und dem selben Glycosyldonor je nach den gewählten Reaktionsbedingungen das eine oder andere Anomer eines Glycosides erhält (Abbildung 3.3).

Alkylglycoside mit einer Monosaccharidekopfgruppe zeigten thermotrop eine S_A -Phase und im Kontakt mit Wasser Myelinfiguren (Abbildung 3.5), während im Falle einer Disaccharidkopfgruppe ein ausgeprägter Polymorphismus gefunden wurde. Hier traten im wasserfreien Zustand lamellare und kubische Phasen auf (Abbildung 3.12) und im Kontakt mit Wasser wurden bikontinuierliche kubische Phasen des Typs 1 und 2, lamellare Phasen, kolumnare Phasen des Typs 1, micellar kubische Phasen des Typs 1 sowie lyotrop cholesterische Phasen beobachtet (Abbildung 3.15). Das beobachtete Phasenverhalten konnte mit der chemischen Struktur korreliert werden, wobei der Grundgedanke, daß sterisch problematische 1→6 verknüpfte Zuckerkopfgruppen das Auftreten kubischer Phasen begünstigen, bestätigt wurde.

Während es nur wenige Beispiele für das Auftreten lyotrop cholesterischer Phasen gibt, trat diese Phase bei den langkettigen Alkylglycosiden mit einer Disaccharidkopfgruppe nahezu ubiquitär auf. Das Vorliegen einer lyotrop cholesterischen Phase wurde zusätzlich durch Kleinwinkel Neutronenstreuung bestätigt und es konnte nachgewiesen werden, daß für ihr auftreten eine minimale Kettenlänge nötig ist.

Im nächsten Schritt wurden Glycosyldiacylglycerole als naturähnlichere Modellverbindungen

synthetisiert (Kapitel 4). Da diese Verbindungen auch in binären Mischungen im letzten Schritt eingesetzt werden sollten, war es nötig, Glycosyldiacylglycerole darzustellen, die ungesättigte Fettsäureketten tragen. Aus diesem Grunde konnte die klassische von Mannock entwickelte Synthesestrategie (Abbildung 4.2) nicht genutzt werden, da der Entschützungsprozess am Ende der Synthese bei ungesättigten Ketten bekanntermaßen zu Problemen führt. Es wurde daher eine neue Strategie entwickelt, die einen einfachen und schnellen Zugang in 6 Stufen zu ungesättigten Glycosyldiacylglycerolen gibt und vom peracetylierten Zucker und dem geeignet geschützten Glycerol ausgeht (Abbildungen 4.6 und 4.7).

Glycosyldiacylglycerole mit einer Monosaccharidkopfgruppe zeigten in wasserfreier Form eine kolumnare Phase und auch keine weiteren lyotropen Phasen, während im Falle einer Disaccharidkopfgruppe neben einer thermotropen kolumnaren Phase ein ausgeprägter lyotroper Polymorphismus gefunden wurde (Abbildungen 4.10 und 4.12). Diese Disaccharidderivate zeigten im Kontakt mit Wasser neben einer kolumnaren Phase eine bicontinuierliche kubische Phase, eine lamellare Phase und Myelinfiguren. Gemäß dem in Kapitel 2 vorgestelltem allgemeinen Konzept (Abbildung 2.1) sollte die Disaccharidkopfgruppe hier die kolumnare Phase destabilisieren und eine kubische Phase begünstigen und genau dies wurde hier beim lyotropen Verhalten auch gefunden.

Wurde die 1→4 verknüpfte Disaccharidkopfgruppe durch eine breite 1→6 verknüpfte Disaccharidkopfgruppe ersetzt, traten eine bicontinuierliche kubische Phase und eine lamellare Phase neben einer kolumnaren Phase sogar in wasserfreier Form auf. Dies bestätigte wiederum das allgemeine Konzept und den vermuteten Effekt von 1→6 verknüpften Kopfgruppen und es war wieder möglich, das mesogene Verhalten mit der Struktur der Kohlenhydratkopfgruppe zu korrelieren, die systematisch modifiziert wurde (Tabelle 4.1).

Die zuvor dargestellten Verbindungen wurden im letzten Schritt (Kapitel 5) in binären Mischungen eingesetzt und es gelang, eine kubische Phase in Mischungen einer kolumnaren und einer lamellaren Verbindung zu induzieren. Diese induzierte kubische Phase war sowohl konzentrations- als auch temperaturabhängig und wie sich zeigte ein Derivat der lamellaren Phase. Ferner war es möglich den Einfluß der Struktur der Kohlenhydratkopfgruppe auf die Stabilität der induzierten kubischen Phase abzuleiten durch Vergleich der unterschiedlichen Phasendiagramme, die durch einen systematischen Austausch der Kohlenhydratkopfgruppen der Mischungskomponenten erhalten wurden (siehe Seite 85). So nahm zum Beispiel die Temperaturabhängigkeit der induzierten kubischen Phase ab, wenn eine Glucosekopfgruppe gegen Galactose ausgetauscht wurde (Abbildung 5.13).

Diese Beobachtung könnte von großer biologischer Bedeutung sein, da Galactolipide vor allem in Pflanzen vorkommen, die natürlich innerhalb eines weiten Temperaturbereichs, den die Umgebungstemperatur innerhalb eines Jahres überstreicht, ihre Membraneigenschaften bewahren müssen.

Noch bedeutender könnte eine andere allgemeine Beobachtung sein, die immer gemacht wurde, wenn eine induzierte kubische Phase auftrat:

Die Umwandlung lamellar→kubisch vollzog sich bei erhöhten Temperaturen innerhalb kürzester Zeit und die gesamte Probe wandelte sich um. Bei Temperaturen im unteren Existenzbereich der kubischen Phase dauerte die Umwandlung jedoch oft Stunden, wenn sie überhaupt erfolgte und dies geschah dann oft nur in kleinen Bereichen. Nichts desto trotz sollte die Keimbildung einer kubischen Phase sofort erfolgen. Der Keim einer kubischen Phase in einer Membran entspricht einer Pore, wie sie für eine Fusion nötig ist, während eine vollständige Umwandlung der Membran in eine kubische Phase ihre Funktion als semipermeable Grenze zerstören würde. Die schnelle Bildung eines Keims einer kubischen Phase, wobei die makroskopische Phasenumwandlung kinetisch gehindert ist, –genau wie es hier beobachtet wurde – könnte genauer der entscheidende Schlüsselschritt in Prozessen wie der Zellfusion sein.