

Phospholipide als funktionelle Bausteine biologischer Membranen**

Von Hansjörg Eibl*

In diesem Beitrag werden neue Verfahren zur Synthese biologisch aktiver Phospholipide beschrieben. Die physikalischen Eigenschaften dieser Verbindungen stehen in direkter Beziehung zu ihrer chemischen Struktur, wobei die Position der Substituenten am Glycerin-Grundgerüst von Einfluß auf das Phasenverhalten ist. Phasenübergänge können durch Temperaturänderung und – biologisch relevant – bei konstanter Temperatur durch Änderung der Oberflächenladung und des Protonierungsgrades induziert werden. Wie Modellstudien zeigen, reichen die Eigenschaftsunterschiede der Lipidphasen aus, Membranprozesse zu steuern und zu regeln. Natürliche Membranen können schnell und reversibel durch Alkylglycerine so verändert werden, daß eine erhöhte Permeation von Wirkstoffen möglich ist. Ein Beispiel ist der verbesserte Transport von Cytostatica über die Blut-Hirn-Schranke. In Kenntnis der Substratspezifität Phospholipid-metabolisierender Enzyme können maßgeschneiderte cytotoxische Phospholipide synthetisiert werden, die sich selektiv in Tumorgewebe anreichern. Die sinnvolle Kombination von chemischer Synthese und physikalischen Strukturuntersuchungen schafft somit Grundlagen, die ein Verständnis einfacher Membranprozesse auf molekularer Ebene ermöglichen. Die an Modellsystemen gewonnenen Erfahrungen werden umgesetzt, um natürliche Membranen, z.B. die Blut-Hirn-Schranke oder Tumorgewebe, gezielt zu beeinflussen.

1. Einleitung^{***}

Biologische Membranen sind komplex in Struktur und Funktion. Ihre quantitativ wichtigsten Bestandteile, Phospholipide und Proteine, begünstigen in wäßrigem Milieu den Aufbau planarer Doppelschichten, wobei die strukturierenden Eigenschaften der Phospholipide – Neigung zur Selbstorganisation und zur Bildung von Überstrukturen – dominieren. Als Ursache müssen die Strukturelemente der

amphoteren Phospholipidmoleküle genannt werden: lipid-lösliche, lipophile oder apolare sowie wasserlösliche, hydrophile oder polare Bereiche im gleichen Molekül.

Die Nomenklatur der Phospholipide^[1] geht auf einen Vorschlag von Hirschmann^[2] zurück. Natürliche Phospholipide enthalten Glycerin, das in Position 1 und 2 mit Fettsäuren und in Position 3 mit Phosphat verestert ist. So ergibt sich für Phosphatidsäure (PA) die systematische Bezeichnung 1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-phosphat (*sn* bedeutet „stereospezifisch numeriert“). Die selektive, nicht statistische Verteilung der Substituenten über die Positionen 1, 2 und 3 des Glycerinmoleküls bewirkt Chiralität. Allerdings wurde 2,3-Diacyl-*sn*-glycero-1-phosphat, das (*S*)-Enantiomer, in der Natur bisher nicht nachgewiesen.

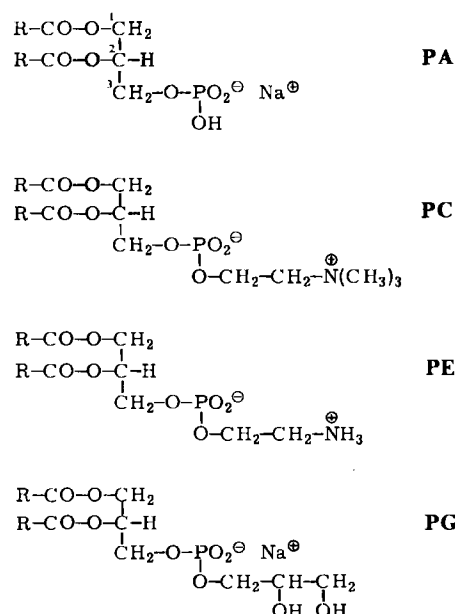
In typischen Membranphospholipiden ist die Phosphatgruppe mit einem weiteren Alkohol verestert, beispielsweise in Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin^[1b] (PE) und Phosphatidylglycerin (PG) (Schema 1). Je nach Struktur des polaren Bereichs sind diese Lipide

[*] Prof. Dr. H. Eibl
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie
Am Faßberg, D-3400 Göttingen

[**] Erweiterte Fassung eines Vortrags am 29. Oktober 1982 in München anlässlich der Verleihung des Heinrich-Wieland-Preises.

[***] Abkürzungen: DCC: Dicyclohexylcarbodiimid; Boc: *tert*-Butoxycarbonyl; 1,2-PP-GPC: 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin; T_p : Phasenumwandlungstemperatur der Vorumwandlung P; T_M : Phasenumwandlungstemperatur der Hauptumwandlung M; Et₁₈-OCH₃: 1-Octadecyl-2-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholin.

bei pH-Werten um 7 neutral (zwitterionisch; PC und PE) oder weisen eine negative Oberflächenladung auf (PA und PG).



Schema 1. Typische Membranphospholipide mit abgekürzten Bezeichnungen (siehe Text). R ist eine langkettige Alkylgruppe, die auch eine oder mehrere Doppelbindungen enthalten kann. Mit PP kann ein synthetisches Analogon von PG bezeichnet werden, dem die Hydroxygruppe an C-2 der unsubstituierten Glycerineinheit fehlt (siehe Tabelle 5).

Die klassischen Untersuchungen von *Gorter und Grendel*^[3] über die Zusammensetzung der Erythrocytenmembran haben gezeigt, daß die dort vorhandenen Phospholipide die Bildung einer lamellaren Doppelschicht ermöglichen. Dieser Befund ist in die Vorstellungen über den Aufbau biologischer Grenzflächen eingeflossen. Dabei hat das von *Danielli und Dawson*^[4] im Jahre 1935 vorgeschlagene Modell über den Aufbau von Biomembranen seine grundsätzliche Bedeutung auch beim heutigen Kenntnisstand behalten. Das Grundgerüst einer Membran ist die Lipiddoppelschicht. Die polaren Bereiche der Phospholipide sind zum Wasser hin orientiert, während die apolaren Fettsäureketten eine hydrophobe Phase bilden (siehe Abb. 1). Auch in viele spätere Membranmodelle wurde die Lipiddoppelschicht als Grundstruktur übernommen. Man findet sie in der „unit membrane theory“ von *Robertson*^[5] und in den Modellvorstellungen von *Finean*^[6], *Singer* und *Nicolson*^[7] sowie *Lynen*^[8]. Proteine als strukturbildende Elemente der biologischen Membran wurden seltener vorgeschlagen^[9,10].

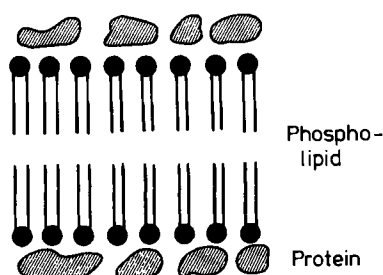


Abb. 1. Membranmodell nach *Danielli und Dawson* (1935) [4].

Biologische Zellen werden durch Membranen nach außen begrenzt und nach innen substrukturiert. Dabei wird die Integrität der Zelle durch die Plasmamembran gewährleistet, die das Cytoplasma umhüllt. Entsprechend werden die subzellulären Partikeln durch innere Membranen abgegrenzt, so daß diese als geschlossene Funktionseinheiten betrachtet werden können, beispielsweise das endoplasmatische Reticulum als Ort der Biosynthese von Phospholipiden^[11,12] und Proteinen^[13] und die Mitochondrien als Ort der Erzeugung von Energie und deren Speicherung in Form chemischer Energie^[10] (ATP-Synthese). Es überrascht deshalb nicht, daß 90% der Trockensubstanz biologischer Zellen aus Membranbausteinen bestehen.

Diese Membranen als natürliche Begrenzung von Zellen oder Abgrenzung von subzellulären Räumen sollen in den Mittelpunkt der folgenden Betrachtungen gestellt werden. Membranen können aus einer Vielzahl von Phospholipid- und/oder Proteinmolekülen zusammengesetzt sein, die in einem sehr komplexen Verbund auf engstem Raum in einer vorwiegend zweidimensionalen Doppelschicht vorliegen. Dort müssen sie in feiner Abstimmung mit der Umgebung multiple Funktionen erfüllen. Die Komplexität der Struktur und die Vielzahl der Funktionen schließen es normalerweise aus, daß durch ein Studium natürlicher Membranfragmente Erkenntnisse über Wechselwirkungen zwischen spezifischen Phospholipiden und Proteinen sowie über andere molekulare Details gewonnen werden können. Für das Verständnis auf molekularer Ebene sollten deshalb biologische Funktionseinheiten aus der natürlichen Umgebung gelöst und in künstlichen Systemen, die chemisch und physikalisch definiert sind, wieder aufgebaut werden. Untersuchungen an Membranen finden deshalb auf vier Ebenen statt: 1. Synthese von Phospholipiden eindeutiger Struktur und Konfiguration, 2. Analyse der physikalischen Eigenschaften reiner Phospholipid-Wasser-Systeme, 3. Rekonstitutionsexperimente, d. h. Versuche zur Wiederherstellung der biologischen Funktion reiner Membranproteine mit synthetischen Phospholipiden (Studium von Einzelereignissen) und 4. selektive Beeinflussung der Eigenschaften natürlicher Zellmembranen.

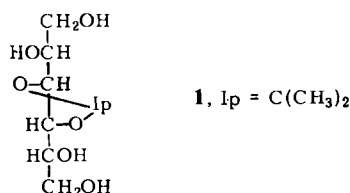
2. Synthese von Phospholipiden

Die zunehmende Bedeutung von Phospholipiden als Träger für Arzneimittel mit verbesserter Bioverfügbarkeit^[14] und als direkte Wirkstoffe^[15] sowie ihre besondere Eignung zum Aufbau einfacher Modellsysteme^[16-18] sind eine Herausforderung für den Synthese-Chemiker. Als Ausdruck für das wachsende Interesse an diesen chemisch variablen Strukturen kann die steigende Zahl der Veröffentlichungen über die synthetische oder halbsynthetische Herstellung von Phospholipiden betrachtet werden.

Die erste Synthese eines Phospholipids mit natürlicher Konfiguration wurde von *Rose* beschrieben^[19]. Es folgten die klassischen Arbeiten von *Baer*^[20] sowie von *de Haas* und *van Deenen*^[21]. Für die neueren Verfahren sei auf Übersichtsartikel verwiesen^[22-28].

Zentrales Edukt für die Synthese von Phospholipiden war bisher 1,2-Isopropyliden-*sn*-glycerin, dessen begrenzte Lagerfähigkeit (Racemisierung) und teilweise ungenügende optische Reinheit Anlaß zur Kritik gibt^[29,30]. Wir

haben jetzt neue Wege zur Synthese von Phospholipiden ausgearbeitet. Edukt ist der stabile, nach Wiggins et al.^[31] leicht zugängliche 3,4-Isopropyliden-D-mannit **1**, der bisher nur begrenzt Verwendung zur Synthese von Lipiden gefunden hat. Seine Herstellung gelingt aus D-Mannit durch Umsetzung mit Aceton/H₂SO₄, wobei intermediär gebildeter 1,2:3,4:5,6-Triisopropyliden-D-mannit durch partielle milde Hydrolyse in wäßriger Essigsäure zu **1** gespalten werden kann.



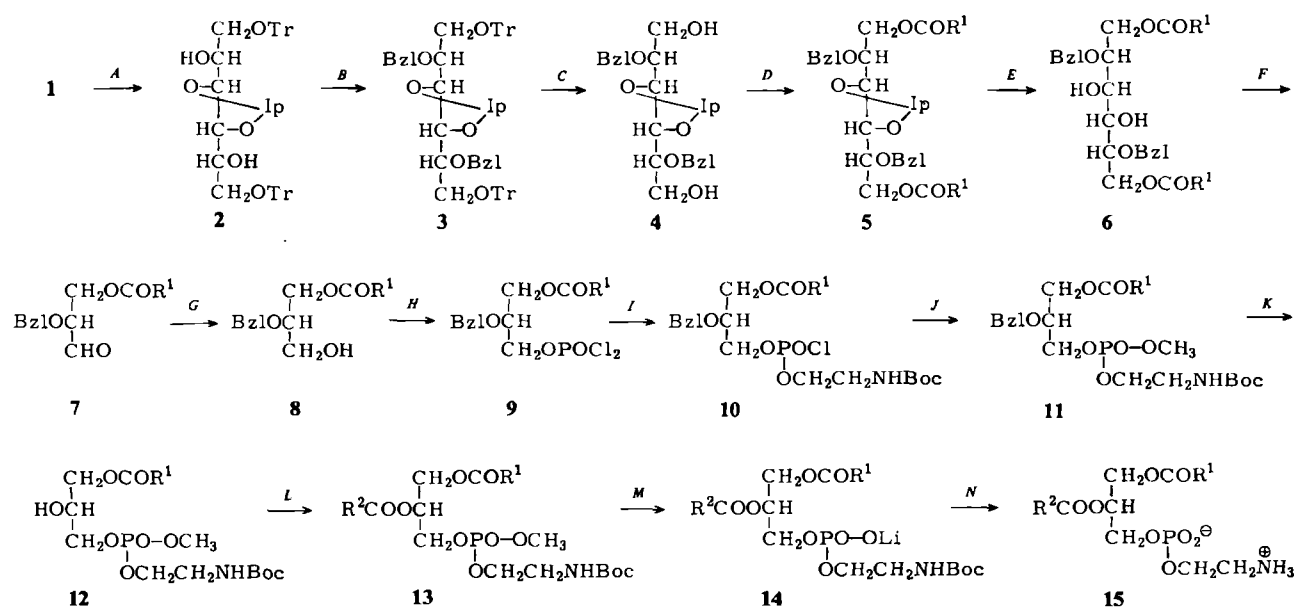
Der Aufbau von Phospholipiden aus dieser einfachen Grundstruktur soll am Beispiel der Synthese von vier Verbindungen mit biologisch wichtigen Eigenschaften geschildert werden: 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin **15**^[28] (wesentliches Phospholipid zur Induktion von Acetylcholinrezeptor-mediertem Ionentransport^[32,33]), 1-Hexadecyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin **21**^[34] (biologischer Mediator^[35], auch PAF – „platelet activating factor“ – genannt), 1-Octadecyl-*sn*-glycero-3-phosphotrimethylammoniohexanol **27**^[27] (Phospholipid mit vergrößertem Phosphor-Stickstoff-Abstand, verändertem Metabolismus und möglicherweise verbesserten Tumorstillwachstums-hemmenden Eigenschaften^[36]) und 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserin **35**^[28] (wichtiger Bestandteil von Liposomen zur Induktion von Fusionsprozessen^[37]).

Die enge Kopplung zwischen chemischer Struktur und biologischer Wirkung wird aus den vier Modellverbindungen deutlich. So haben kleine Strukturvariationen oft drastische Auswirkungen auf die biologischen Eigenschaften. Zum Beispiel werden Thrombocyten von 1-Hexadecyl-2-

acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin **21** in Konzentrationen von 10⁻¹⁰ mol/L aktiviert^[35]. Die entsprechende Lysoverbindung (2-Desacyl-Verbindung) ist inaktiv, hat aber immunstimulierende Wirkung wie 1-Octadecyl-2-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholin (vgl. **53**, Tabelle 7)^[38-40].

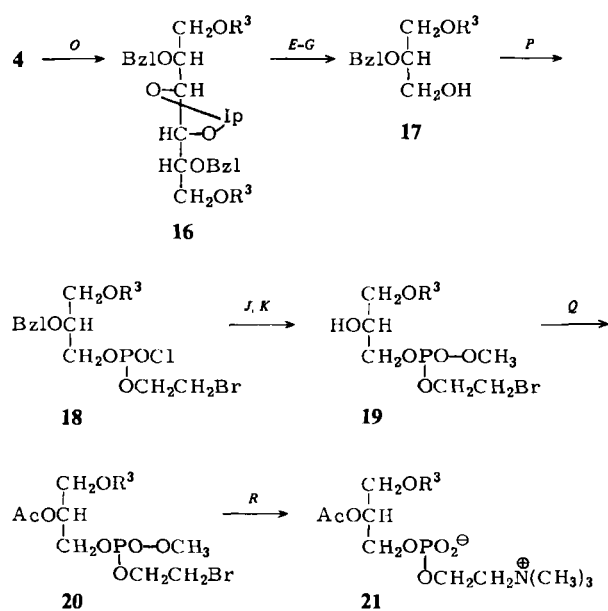
Diese und andere Befunde haben uns bewogen, Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen Phospholipiden und Proteinen zu untersuchen. Voraussetzung dafür sind einfache Verfahren zur Herstellung von Phospholipiden, und zwar Verfahren, die eine beliebige und schrittweise Modifikation dieser wichtigen Naturstoffe ermöglichen.

Die Synthese von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin **15** (Schema 2)^[28] wird ausgehend von 3,4-Isopropyliden-D-mannit **1** beschrieben. **1** wird in Tetrahydrofuran (THF)/Triethylamin mit Tritylchlorid umgesetzt (Schritt A); das gebildete 1,6-Ditrityl-Derivat **2** benzyliert man in THF/Kalium-*tert*-butylalkoholat mit Benzylchlorid in 2,5-Position zu **3** (Schritt B). Die Tritylgruppen können in Methanol/2-Propanol/H₂SO₄ selektiv abgelöst werden (Schritt C). Es entsteht 2,5-Dibenzyl-3,4-isopropyliden-D-mannit **4**, der in Dichlormethan mit Palmitinsäure/Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)/4-(Dimethylamino)pyridin zu 2,5-Dibenzyl-1,6-dipalmitoyl-3,4-isopropyliden-D-mannit **5** acyliert wird (Schritt D). Die Palmitoylgruppe ist damit in ihrer endgültigen Position (*sn*-1). Saure Desacetonisierung von **5** in Chloroform/Trifluoressigsäure/70% HClO₄ ergibt 2,5-Dibenzyl-1,6-dipalmitoyl-D-mannit **6** (Schritt E). Die vicinale Diolgruppe in 3,4-Position von **6** wird mit Bleitetraacetat in THF gespalten (Schritt F); der gebildete Aldehyd **7** läßt sich in Schritt G mit NaBH₄ zu 1-Palmitoyl-2-benzyl-*sn*-glycerin **8** reduzieren. Die Phosphorylierung von **8** – vorteilhaft mit POCl₃ in THF/Triethylamin – ergibt in Schritt H 1-Palmitoyl-2-benzyl-*sn*-glycero-3-phosphorsäuredichlorid **9**. Damit befindet sich auch der Phosphorsäurerest in seiner endgültigen Position (*sn*-3). Alle von **9** abgeleiteten Verbindungen haben somit die natürliche (*R*)-Konfiguration und entsprechen den Phospholipiden, die Hauptbestandteile aller tierischen Membranen sind. Das phosphorylierte Produkt **9**



Schema 2. Synthese von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin **15**. Boc = CO-OC(CH₃)₃; Bzl = CH₂C₆H₅; Tr = C(C₆H₅)₃; R¹ = (CH₂)₁₄CH₃; R² = (CH₂)₇-CH=CH-(CH₂)₇CH₃. Reaktionsschritte A bis N siehe Text.

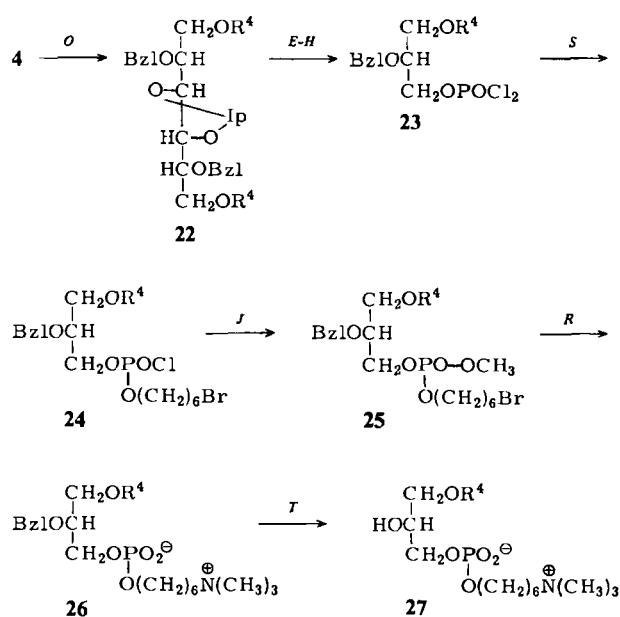
wird direkt mit *N*-*tert*-Butoxycarbonyl(Boc)-ethanolamin zu **10** umgesetzt (Schritt *I*). Mit Methanol/Triethylamin im Überschuß bildet sich in Schritt *J* aus **10** der Phosphorsäuretriester **11**. Katalytische Hydrogenolyse von **11** in Chloroform/Methanol mit 10% Pd/C führt unter Abspaltung der Benzylschutzgruppe zum Derivat **12** mit freier Hydroxygruppe an C-2 (Schritt *K*). Mit Ölsäure/DCC/4-(Dimethylamino)pyridin in Dichlormethan wird daraus in Schritt *L* die 2-Oleoyl-Verbindung **13**. Der Ölsäurerest ist damit in der gewünschten Position (*sn*-2) verankert. Zur Umwandlung in das Endprodukt wird **13** in Ethylmethylketon mit LiBr zu **14** desmethyliert (Schritt *M*); die *N*-Boc-Schutzgruppe wird anschließend in Schritt *N* mit Chloroform/Trifluoressigsäure/70% HClO₄ entfernt. Man erhält das Endprodukt **15** in Ausbeuten von 40 bis 50% bezogen auf **1**. Verbindung **15** ist ein Phosphatidylethanolamin (PE, Schema 1).



Schema 3. Synthese von 1-Hexadecyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin **21**. Ac = COCH₃; R¹ = (CH₂)₁₃CH₃. Reaktionsschritte O bis R siehe Text.

Zur Herstellung von 1-Hexadecyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin **21** (Schema 3)^[34] gingen wir von 2,5-Dibenzyl-3,4-isopropyliden-D-mannit **4** aus. Umsetzung von **4** mit 1-Bromhexadecan in THF/Kalium-*tert*-butylalkoholat führt zu 2,5-Dibenzyl-1,6-hexadecyl-3,4-isopropyliden-D-mannit **16** (Schritt *O*), der analog den Schritten *E* bis *G* (Schema 2) in 1-Hexadecyl-2-benzyl-*sn*-glycerin **17** umgewandelt wird. Die Alkylkette befindet sich somit bereits in der gewünschten *sn*-1-Position. Die Phosphorylierung von **17** mit 2-Bromethylphosphorsäuredichlorid in THF/Triethylamin ergibt in Schritt *P* das *sn*-3-Phosphorsäure-Derivat **18** mit natürlicher Konfiguration. **18** wird analog zu Schritt *J* in den Methylester umgewandelt, den man analog zu Schritt *K* zu **19** debenzyliert. Die Veresterung von **19** in Dichlormethan mit Essigsäure/DCC/4-(Dimethylamino)pyridin ergibt Verbindung **20** mit der Acetylgruppe in der angestrebten *sn*-2-Position (Schritt *Q*). Die Bildung des Endprodukts ist durch Umsetzung von **20** in Chloroform/2-Propanol mit Trimethylamin im Überschuß in einer ein-

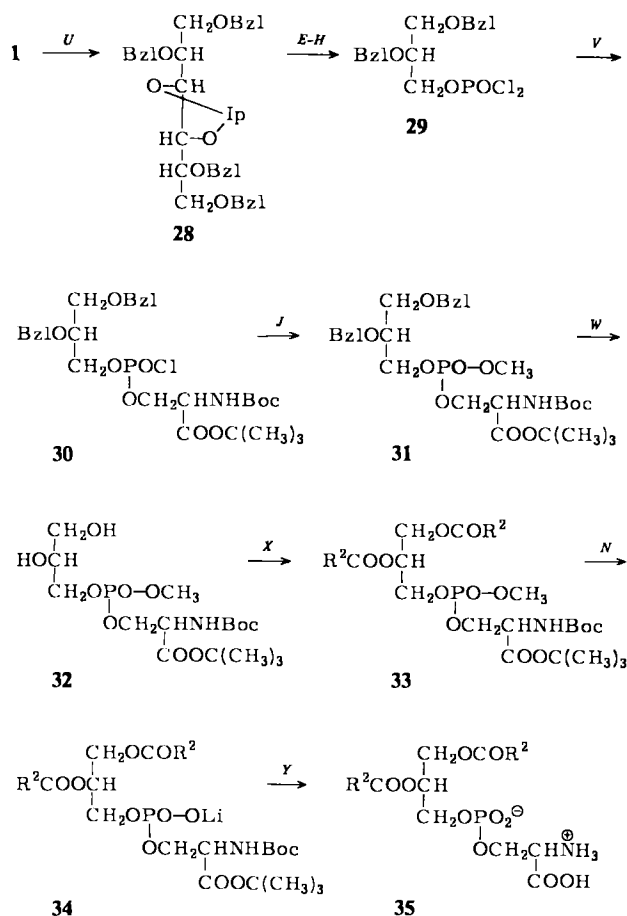
zigen Stufe (Schritt *R*) möglich. Aminierung und Desmethylierung ergeben das Endprodukt **21** in Ausbeuten von etwa 40% bezogen auf **4**.



Schema 4. Synthese von 1-Octadecyl-*sn*-glycero-3-phospho-trimethylammoniohexanol **27**. R¹ = (CH₂)₁₇CH₃, Reaktionsschritte S und T siehe Text.

Die Präparation von 1-Octadecyl-*sn*-glycero-3-phospho-trimethylammoniohexanol **27** (Schema 4)^[27] gelingt ebenfalls aus **4**. Analog zu Schritt *O* wird mit 1-Bromoctadecan 2,5-Dibenzyl-1,6-dioctadecyl-3,4-isopropyliden-D-mannit **22** hergestellt, der in einer zu den Schritten *E* bis *H* völlig analogen Folge von Reaktionen zum Phosphorsäuredichlorid **23** umgesetzt wird. Es folgen die Veresterung von **23** mit 6-Bromhexanol zu **24** (Schritt *S*) und anschließend mit Methanol/Triethylamin zu **25** (Schritt *J*). Die Umsetzung von **25** analog zu Schritt *R* ergibt das Phosphocholin-Analogon **26**. Die katalytische Hydrogenolyse von **26** in Methanol mit 10% Pd/C (Schritt *T*) führt zum Endprodukt **27** in Ausbeuten von etwa 40% bezogen auf **4**.

Die Herstellung von 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserin **35** (Schema 5)^[28] ist ausgehend von 3,4-Isopropyliden-D-mannit **1** möglich. Man perbenzyliert **1** in *tert*-Butylalkohol/Kalium-*tert*-butylalkoholat mit Benzylchlorid (Schritt *U*) zu **28**, das analog zu den Schritten *E* bis *H* in das Phosphorsäuredichlorid **29** umgewandelt wird. **29** wird mit *N*-Boc-Serin-*tert*-butylester zu **30** (Schritt *V*) und dann analog zu Schritt *J* mit Methanol/Triethylamin zum Phosphorsäuretriester **31** umgesetzt. Katalytische zweifache Debenzylierung in Chloroform/Methanol mit 10% Pd/C in Gegenwart von Wasserstoff (Schritt *W*) führt zum Ester **32**, der in den Positionen 1 und 2 von Glycerin zwei freie Hydroxygruppen aufweist. Die Veresterung von **32** in Dichlormethan mit Ölsäure/DCC/4-(Dimethylamino)pyridin ergibt **33** (Schritt *X*). Durch Desmethylierung mit LiBr in Ethylmethylketon analog zu Schritt *N* erhält man das geschützte 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserin **34**, das in einem Schritt (*Y*) durch Abspalten der Schutzgruppen in Chloroform/Trifluoressigsäure/70% HClO₄ in das



Schema 5. Synthese von 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserin **35**. $\text{R}^2 = (\text{CH}_2)_7 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$. Reaktionsschritte U bis Y siehe Text.

Endprodukt **35** umgewandelt werden kann. Die Ausbeute beträgt etwa 60% bezogen auf **28**.

Wie aus den Beispielen **15**, **21**, **27** und **35** hervorgeht, können Phospholipide in der gewünschten Konfiguration gezielt aus einfachen und stabilen Edukten hergestellt werden. Somit sind sowohl natürlich vorkommende als auch bisher nicht in der Natur nachgewiesene Phospholipide durch chemische Synthese zugänglich.

Die spezifische Positionierung der Fettsäurereste ist deshalb wichtig, weil sie in den natürlichen Phospholipiden bevorzugt die Positionen *sn*-1 und *sn*-2 einnehmen. Die Verteilung ist nicht statistisch. Gesättigte Fettsäuren finden sich vorwiegend in *sn*-1- und ungesättigte Fettsäuren in *sn*-2-Position^[41-44]. Auf die physikalische Bedeutung dieses Befundes werden wir in Abschnitt 3 näher eingehen.

3. Physikalische Eigenschaften von Phospholipid-Wasser-Systemen

Phospholipide bilden in Wasser bei Erreichen einer bestimmten Konzentration, der kritischen Micellkonzentration (CMC), spontan höhermolekulare Aggregate, deren Form sowohl von der chemischen Struktur der Phospholipide als auch von physikalischen Parametern wie Oberflächenladung, Temperatur und Ionenmilieu abhängt. Für typische Membranlipide (z. B. 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) liegen die CMC-Werte unter 10^{-10} mol/L, d. h. die Konzentration der Lipide in wässriger Lösung ist vernachlässigbar klein. Sie sind echte Membranbausteine.

Die Frage nach der Form dieser Überstrukturen ist aktuell, insbesondere hinsichtlich der Diskussion über ein allgemeines Ordnungsprinzip, das bei gegebener Struktur die wahrscheinliche Anordnung der Phospholipide in Wasser vorhersagen läßt. Tatsächlich ermöglichen einfache geometrische Betrachtungen über die Grenzflächenbeanspruchung von Einzelmolekülen recht sichere Prognosen. Dazu müssen jedoch die Werte für die Grenzflächenbeanspruchung der beiden Teilbereiche des Phospholipidmoleküls – der apolaren und der polaren Region – bekannt sein, die über die Auswertung von Druck-Flächen-Diagrammen monomolekularer Filme im Langmuir-Trog^[45] oder aus Röntgendaten von Einkristallen erhalten werden können^[46-48]. Je nachdem, ob die Grenzflächenbeanspruchung des apolaren oder polaren Teilbereichs überwiegt, sind bestimmte Strukturen begünstigt. Deshalb kann man die Bildung der wichtigsten höhermolekularen Organisationsformen von Phospholipiden (Micellen, lamellare Doppelschichten, Vesikeln, hexagonale Strukturen) oft zwanglos erklären (Abb. 2).

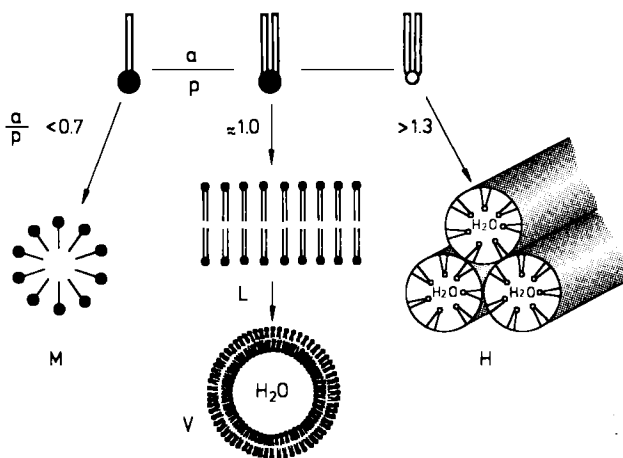


Abb. 2. Überstrukturen von Phospholipiden in Wasser. M: Micelle; L: lamellare Doppelschicht; V: Vesikel; H: hexagonale Anordnung; a: apolar; p: polar. a/p = Grenzflächenverhältnis.

Entscheidend ist das Verhältnis der Grenzflächenbeanspruchung des apolaren und des polaren Bereichs eines Phospholipidmoleküls (Tabelle 1). Beträgt dieses „Grenzflächenverhältnis“ etwa 1, entstehen ausgedehnte lamellare Doppelschichten, die auch Kugeln mit wässrigem Innenvolumen, sogenannte Vesikeln oder Liposomen, bilden können. Charakteristische Beispiele dafür sind Phosphatidylcholine (Lecithine) wie **38** (siehe Tabelle 1).

Bei einem Grenzflächenverhältnis < 0.7 (keilförmige Moleküle mit einem Übergewicht des polaren Bereichs) bilden sich Micellen, die sich von den Vesikeln dadurch unterscheiden, daß ihre großflächigen polaren Bereiche nach außen, d. h. gegen das Wasser, und die Fettsäureketten nach innen orientiert sind. Das Innenvolumen ist apolar und enthält kein Wasser. Typische Micellbildner sind Monoacyl-glycerophosphocholine (Lysolecithine) wie **36**. Überwiegt der apolare Bereich, Grenzflächenverhältnis > 1.3 (keilförmige Moleküle mit breiterem apolarem Be-

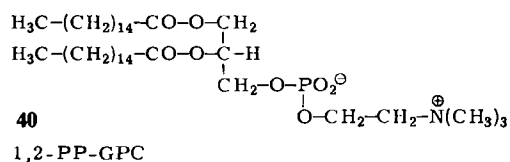
Tabelle 1. Grenzflächenbeanspruchung ($\text{\AA}^2/\text{Molekül}$) von Phospholipiden sowie den apolaren und polaren Teilbereichen des betreffenden Moleküls. Das Verhältnis der Grenzflächenbeanspruchung des apolaren und polaren Teilbereichs („Grenzflächenverhältnis“) ermöglicht Prognosen hinsichtlich der zu erwartenden Überstrukturen in Gegenwart von Wasser. Ein Verhältnis von etwa 1 führt zu lamellaren Doppelschichten (L); darunter sind Micellen (M), darüber hexagonale Anordnungen (H) bevorzugt (siehe Abb. 2). H(L) bedeutet, daß je nach Temperatur eine hexagonale Struktur oder eine lamellare Anordnung vorliegen kann (siehe auch Tabelle 3); Entsprechendes gilt für M(L).

Phospholipide [a]	Grenzfl.-Beanspr. Gesamt- molekül	Teilbereiche [Å ² /Molekül]		Verhältnis apolar zu polar	beob. Über- struktur
		apolar	polar		
1-Stearoyl- sn-G-3-PC 36	40	20	40	0.50	M
1-Stearoyl- sn-G-3-PE 37	28	20	28	0.71	M(L)
1,2-Distearoyl- sn-G-3-PC 38	44	44	40	1.10	L
1,2-Distearoyl- sn-G-3-PE 39	42	42	28	1.50	H(L)

[a] In den abgekürzten Namen bedeuten G-3-PC und G-3-PE Glycero-3-phosphocholin bzw. Glycero-3-phosphoethanolamin.

reich), so entstehen sogenannte „invertierte Micellen“. Zur besseren Abgrenzung gegen die Micellen hat sich die Bezeichnung hexagonal II^[1] für Strukturen dieser Geometrie durchgesetzt. Wichtige Beispiele sind Phosphatidylethanolamine (Kephalline), z. B. **15**, **37** und **39**.

Wie die Vesikeln haben die hexagonalen Strukturen ein wäßriges Innenvolumen, das nach außen durch eine Lipidmonoschicht – in Vesikeln dagegen durch eine Lipiddoppelschicht – begrenzt wird. Es bilden sich röhrenförmige Strukturen, die Eigenschaften von Ionenkanälen haben. Lamellare Doppelschicht und hexagonale Anordnung lassen sich durch Röntgen-Strukturanalyse unterscheiden.



In der folgenden Diskussion werden wir insbesondere auf die lamellare Doppelschicht eingehen, weil über diese für die biologische Membran fundamentale Struktur zuverlässige Detailinformationen vorhanden sind. Grundlegende experimentelle Daten über die Phospholipiddoppelschicht wurden an 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (1,2-PP-GPC, 40) erarbeitet, dessen Phasenverhalten am besten verstanden wird. Ausgehend von den richtungsweisenden Versuchen der Arbeitsgruppe um Chapman^[49] ist dieses Phospholipid in Modellsystemen aus mehreren Gründen am intensivsten analysiert worden: Neben der einfachen Synthese^[28] und der biologischen Bedeutung als Hauptphospholipid der Lungenalveolen^[50, 51] zeigt es thermische Phasenumwandlungen im experimentell gut zugänglichen Bereich zwischen 10 und 50°C. Deshalb ist es naheliegend, am Beispiel von 1,2-PP-GPC die charakteristischen Eigenschaften von lamellaren Doppelschichten zu besprechen und die Diskussion über den Ein-

[*] In der Folge wird zur Bezeichnung dieser Strukturen anstelle von „hexagonal II“ meistens nur „hexagonal“ verwendet.

fluß von Strukturvariationen im apolaren und im polaren Bereich an den Eigenschaften dieses Lipids zu orientieren.

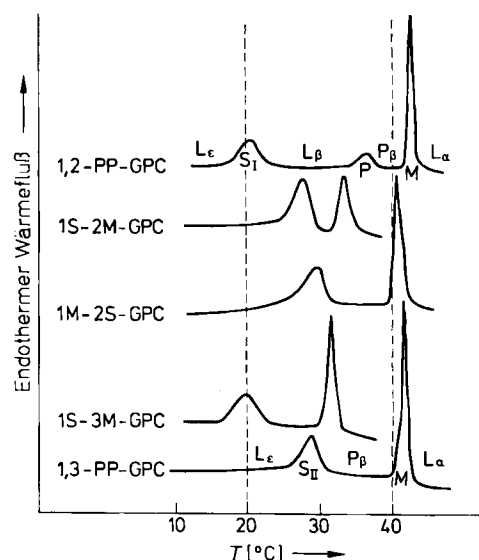


Abb. 3. Calorimetrische Heizkurven von Phosphatidylcholin. L_c , L_b , P_b , L_a : Lipidphasen; S_I : Subumwandlung I; S_{II} : Subumwandlung II; P : Vorumwandlung; M : Hauptumwandlung. Abgekürzte Namen der Phospholipide siehe Tabelle 2. Ein Abweichen der Heizkurve von der Grundlinie wird durch zusätzliche Wärmeaufnahme bei einer Phasenumwandlung beobachtet. Die Fläche des Ausschlags entspricht der Phasenumwandlungsenthalpie ΔH .

Nach bisherigen experimentellen Befunden zeigt 1,2-PP-GPC in wäßriger Dispersion beim Erwärmen von 0 auf 50°C drei thermische Umwandlungen^[52-55], die Subumwandlung I (Phasenumwandlungstemperatur T_S), die Vorumwandlung (Phasenumwandlungstemperatur T_P) und die Hauptumwandlung (Phasenumwandlungstemperatur T_M), wobei S, P und M für „subtransition“, „pretransition“ und „maintransition“ stehen. Der Zustand unterhalb der Hauptumwandlungstemperatur wird als geordnete, auch kristalline Phase oder Gel-Phase (P_{β^-} - oder P'_{β^-} -Phase^[1]), der Zustand oberhalb der Hauptumwandlungstemperatur als fluide, auch flüssig-kristalline oder ungeordnete Phase (L_{α^-} -Phase) bezeichnet. Die Hauptumwandlung entspricht damit beim Aufheizen einem Übergang von der P_{β^-} - in die L_{α^-} -Phase, d. h. vom geordneten in den fluiden Zustand. Beide Phasen differieren in der Packungsdichte der Kohlenwasserstoffketten. Die geordnete Phase ist dicht gepackt (all-*trans*-Konformation der Kohlenwasserstoffketten), während die fluide Phase einer aufgelockerten Packung entspricht (*gauche*-Konformation)^[56]. Der Zustand unterhalb der Vorumwandlungstemperatur wird als L_{β^-} , oberhalb als P_{β^-} -Phase bezeichnet, entsprechend der Zustand unterhalb der Temperatur der Subumwandlung I als L_{α^-} , oberhalb als L_{β^-} -Phase (Abb. 3).

[*] Bei den hier diskutierten Untersuchungen wurde der Neigungswinkel der Fettsäureketten zur Membrannormalen nicht bestimmt. Es kann deshalb zwischen der L_c - oder L'_c -, der L_{H1} oder L'_{H1} -, der P_H - oder P'_H - sowie der L_n - oder L'_n -Phase nicht unterschieden werden. Nach Definition bedeutet L_c Stellung der Fettsäureketten parallel und L'_c geneigt zur Membrannormalen. Zur Vereinfachung wird in der Folge nur L_c für L_c (L'_c) geschrieben, usw.

Die mit der Hauptumwandlung geordnet → fluid verbundenen Konformationsänderungen wurden durch Laser-Raman-Spektroskopie direkt nachgewiesen^[57]. Sie führen zu einer Verkürzung der Kohlenwasserstoffketten (*gauche*-Konformation) und damit zu einer lateralen Expansion der gesamten Lipiddoppelschicht. Für 1,2-PP-GPC wurden folgende Änderungen ermittelt: Vergrößerung der Oberflächenbeanspruchung von etwa 48 auf 70 Å²/Molekül^[58], Verkürzung der Kohlenwasserstoffkette um 6 bis 7 Å^[59], Ausdehnung des Doppelschichtvolumens um 1 bis 2%^[59] und Einsetzen einer raschen lateralen Diffusion der Lipidmoleküle oberhalb der Hauptumwandlung als Ergebnis der verringerten van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen den Ketten. Für den fluiden Zustand wird ein Diffusionskoeffizient von 10⁻⁸ cm²/s angegeben^[60,61]. Im geordneten Zustand ist die laterale Diffusion unmeßbar klein.

Wie durch die Rekonstitutionsexperimente (Abschnitt 4) gezeigt wird, ist die Hauptumwandlung für biologische Systeme wie auch für Membranmodelle besonders wichtig. Es ist deshalb angezeigt, die Diskussion auf die Hauptumwandlung auszurichten und – im Hinblick auf den amphoteren Aufbau der Phospholipidmoleküle – den Einfluß apolarer und polarer Strukturelemente auf die physikalischen Eigenschaften des Gesamtmoleküls getrennt zu besprechen. Gerade die Hauptumwandlung kann empfindlich auf kleine Änderungen im Ionenmilieu reagieren, während die Subumwandlung eine Packungsänderung in einer bereits sehr starren Matrix ist, die isotherm wahrscheinlich wenig auf Milieuänderungen anspricht.

Der Effekt der Strukturvariationen im apolaren Bereich wurde an ausgewählten Phosphatidylcholinen untersucht, die alle das gleiche Molekulargewicht aufweisen (Tabelle 2). Sie unterscheiden sich in der Kettenlänge der Fettsäuren^[55,62] und in der Art der Positionierung der Fettsäuren und des Phosphocholinrestes am GlycerinGrundgerüst^[63]. Der Vergleich umfaßt 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (1,2-PP-GPC), dessen 1,3-Isomer sowie 1,2- und 1,3-Isomere von Phosphatidylcholinen, bei denen das Glycerinmolekül mit Stearinsäure und Myristinsäure verestert ist. Nach der Anzahl der thermischen Umwandlungen und charakteristischen Röntgenbeugungsmuster der Lipidphasen können die Lipide in zwei Gruppen unterteilt werden.

1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine mit zwei gleichen Fettsäureresten nehmen eine Sonderstellung ein. Ihre Eigenschaften werden durch drei thermische Umwandlungen geprägt – Subumwandlung I, Vorumwandlung und Hauptumwandlung (Abb. 3) mit den entsprechenden Umwandlungsenthalpien – ein Verhalten, das bei 1,2-PP-GPC **40** und 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin **38** (Tabelle 1) gefunden wurde und wohl auch für das 1,2-Dimyristoyl-Analogon zu erwarten ist^[63]. Über die Röntgenreflexe können die dazugehörenden vier Lipidphasen (L_c, L_β, P_β und L_α) charakterisiert werden (Tabelle 2). Mit zunehmender Packungsdichte der Kohlenwasserstoffketten (L_α nach L_c) wächst die Anzahl der Reflexe im Bereich von 4 bis 10 Å infolge der kristallähnlichen Eigenschaften der L_c-Phase.

Alle weiteren Phosphatidylcholone, die in unserer Arbeitsgruppe untersucht wurden, zeigen ein anderes Phasenverhalten. Es treten nur zwei thermische Umwandlungen

Tabelle 2. Physikalische Eigenschaften lamellarer Doppelschichten aus Phosphatidylcholinen (siehe auch Abb. 3) in Abhängigkeit von der Temperatur *T*. Bei den Zahlenwerten für *T* ist angegeben, ob eine Phasenumwandlung stattfindet: S_I: Subumwandlung I; S_{II}: Subumwandlung II; P: Vorumwandlung; M: Hauptumwandlung. Δ*H*: Phasenumwandlungsenthalpie; L_c, L_β, P_β, L_α: charakteristische Phasen der lamellaren Doppelschicht; *d*: Abstand der lamellaren Periodizitäten, der sich zusammensetzt aus der Dicke der lamellaren Doppelschicht und der Dicke der Wasserschicht zwischen zwei Phospholipiddoppelschichten (lange Abstände im Bereich von 47 bis 70 Å); *s*: Abstand zwischen einzelnen Fettsäureketten und Abstand zwischen einzelnen Phosphatidylcholinmolekülen, die jeweils zwei Fettsäureketten enthalten (kurze Abstände im Bereich von 3.72 bis 10.00 Å).

Phosphatidylcholine [a]	<i>T</i> [°C]	Δ <i>H</i> [kcal/mol]	Phase	<i>d</i> [Å]	<i>s</i> [Å]
1,2-PP- <i>sn</i> -G-3-PC 40	5		L _c	58.70	10.00, 6.78, 4.40, 4.20, 3.88
	15 (S _I)	4.1			
	20		L _β	63.50	4.20, 4.05
	35 (P)	1.6			
	38		P _β	70.00	4.18
	41 (M)	8.7			
	45		L _α	68.00	4.50
1,3-PP-G-2-PC	5		L _c	57.04	9.63, 6.70, 4.14
	25 (S _{II})	8.0			
	35		P _β	47.10	4.12
	39 (M)	9.4			
	45		L _α	62.16	4.55
1S-2M- <i>sn</i> -G-3-PC	4		L _c	67.30	9.55, 4.49, 3.72
	24 (S _{II})	7.9			
	30		P _β	—	4.16
	33 (M)	6.0			
	39		L _α	68.40	4.55
1M-2S- <i>sn</i> -G-3-PC	4		L _c	60.40	9.98, 6.75, 4.34, 4.15, 3.86
	26 (S _{II})	6.6			
	31		P _β	69.90	4.15
	42 (M)	8.2			
	46		L _α	63.80	4.55
1S-3M- <i>sn</i> -G-2-PC 49	5		L _c	58.30	9.82, 6.69, 4.33, 4.15, 3.76
	16 (S _{II})	5.9			
	20		P _β	68.30	4.13
	30 (M)	7.1			
	35		L _α	63.40	4.55

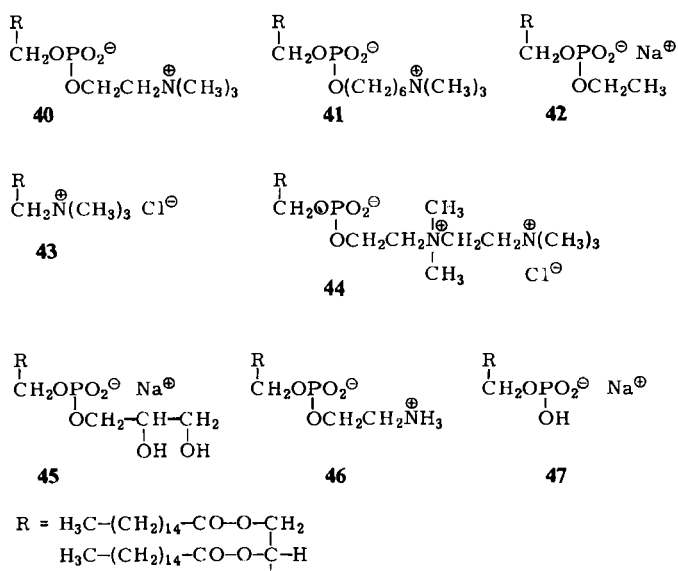
[a] In den abgekürzten Namen bedeuten M Myristoyl (CH₃(CH₂)₁₂CO), P Palmitoyl (CH₃(CH₂)₁₄CO), S Stearoyl (CH₃(CH₂)₁₆CO) und GPC Glycerophosphocholin.

gen auf, die Subumwandlung II und die Hauptumwandlung mit den entsprechenden Umwandlungsenthalpien und den dazugehörenden Lipidphasen (L_c, P_β und L_α), denen charakteristische Röntgenbeugungsmuster zugeordnet werden können. Zu dieser Gruppe von Phosphatidylcholinen zählen die 1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine mit zwei verschiedenen Fettsäureketten sowie alle 1,3-Diacyl-*sn*-glycero-2-phosphocholine, unabhängig davon, ob sie zwei gleiche oder zwei verschiedene Fettsäuren enthalten. Der wichtigste Unterschied zwischen diesen Verbindungen und den gleichkettigen 1,2-Diacylverbindungen ist das Fehlen der Vorumwandlung und sehr wahrscheinlich der L_β-Phase (detaillierte Diskussion siehe ^[63]).

Weil biologische Membranen stets aus Phospholipidgemischen unterschiedlicher Oberflächenladung zusammengesetzt sind^[64], werden Strukturvariationen im polaren Bereich intensiv untersucht. Nach Träuble und Eibl^[65] können durch Variation der Oberflächenladung tiefgreifende Eigenschaftsänderungen in planaren Doppelschichten aus-

gelöst werden, die sich besonders auf die Hauptumwandlung auswirken.

Der Einfluß des polaren Bereichs auf die Eigenschaften des Gesamtmoleküls wurde an Verbindungen untersucht, die 1,2-Dipalmitoylglycerin als konstantes, apolares Strukturelement enthielten. Das hat den Vorteil, daß bei 1,2-PP-GPC auch die Vorumwandlung in die Betrachtungen einbezogen werden kann, die ja bei den gemischtkettigen Phospholipiden fehlt. Das Referenzmolekül 1,2-PP-GPC **40** wurde wie folgt abgewandelt: Vergrößerung des Phosphor-Stickstoff-Abstandes (**41**), Entfernung der Trimethylammonium-Gruppe (**42**), Verzicht auf die Phosphat-Gruppe (**43**), Überkompensation der negativen Ladung der Phosphatgruppe durch zwei positive Ladungen (**44**) und Ersatz des Cholins durch Glycerin (**45**). Der Einfluß dieser teilweise sehr weitgehenden Variationen von Struktur und Ladung auf die physikalischen Eigenschaften der Phospholipid-Wasser-Systeme bei pH 7 ist gering. Die Hauptumwandlungstemperatur liegt bei 40 bis 42°C und die Vorumwandlungstemperatur zwischen 33 und 36°C, d. h. die Phospholipiddoppelschicht reagiert nicht auf diese Änderungen von Struktur und/oder Oberflächenladung.

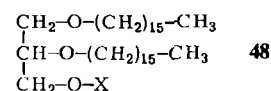


Es gibt jedoch eine zweite Gruppe von Lipidmolekülen, bei denen relativ geringe Variationen von Struktur und/oder Oberflächenladung das physikalische Verhalten ändern. Diese Lipide weisen keine Vorumwandlung auf, und die Hauptumwandlung wird zu höheren Temperaturen verschoben, z. B. bei Phosphatidylethanolaminen und Phosphatidsäuren (pH-Wert um 7). So haben 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin **46** und 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphat **47** T_M -Werte um 65°C (pH 7); beim entsprechenden Phosphatidylcholin **40** beträgt $T_M \approx 41^\circ\text{C}$.

Bei der Suche nach strukturellen Analogien zwischen Phosphatidylethanolaminen (PE) und Phosphatidsäuren (PA) und Unterschieden zu den Phospholipiden, die Phosphatidylcholin(PC)-ähnliche Eigenschaften haben, fällt auf, daß die Lipide mit den höheren T_M -Werten (um 65°C) protoniert sind, d. h. strukturelle Protonen enthalten, wäh-

rend die Lipide mit den niedrigeren T_M -Werten (um 40°C) deprotoniert, die Phosphatgruppen also vollständig dissoziiert sind. Möglicherweise wird das Wechselspiel der Kräfte in den polaren Regionen von Phospholipiden durch die Gegenwart struktureller Protonen entscheidend beeinflusst^[66, 67].

Eine experimentelle Überprüfung dieser Annahme ist möglich. Wenn der Unterschied im Protonierungsgrad oder im Dissoziationsgrad α die direkte Ursache für die extremen Eigenschaftsunterschiede der Phospholipide bei pH-Werten um 7 ist, dann sollte ein Vergleich des Phasenverhaltens von ein und derselben Phospholipidstruktur bei pH-Werten, die oberhalb und unterhalb ihres pK -Wertes liegen, Aufschluß darüber geben können. Für diese Studien im pH-Bereich von 1 bis 12 haben wir Phospholipide vom Typ **48** mit Etherketten, in denen 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-



glycerin durch 1,2-Dihexadecyl-*sn*-glycerin als Grundstruktur ersetzt ist, hergestellt, die sich in wäßriger Suspension durch hohe Stabilität auszeichnen. Der Unterschied im physikalischen Verhalten der „Ether-Phospholipide“ und der „Ester-Phospholipide“ ist gering. Die Phasenumwandlungstemperatur der „Ether-Phosphatidylcholine“ liegt um 3 bis 4°C höher als bei den entsprechenden Estern^[68–72].

Ausgehend vom pH-Wert 12 wurde das Phasenumwandlungsverhalten einiger „Ether-Phospholipide“ vom Typ **48** bei steigender Protonenkonzentration verfolgt (Abb. 4). Deprotoniertes 1,2-Dihexadecyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin sowie das entsprechende Phosphoethanolamin, Phosphoglycerin und Phosphat sind im physikalischen Verhalten nicht zu unterscheiden ($T_M \approx 43^\circ\text{C}$, $T_P \approx 38^\circ\text{C}$). Die

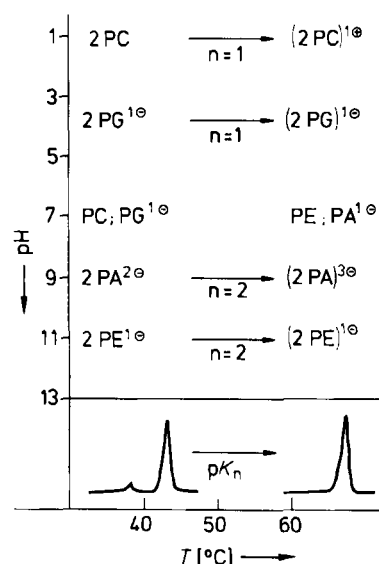


Abb. 4. Einfluß der Protonenkonzentration auf die Vor- und Hauptumwandlung von „Ether-Phospholipiden“ vom Typ **48**, die wegen ihrer höheren Stabilität als Modelle für die entsprechenden „Ester-Phospholipide“ gewählt wurden. PE, PA, PG und PC bedeuten hier 1,2-Dihexadecyl-*rac*-glycero-3-phosphoethanolamin, -3-phosphat, -3-phosphoglycerin bzw. -3-phosphocholin. Bei pH-Werten > 12 sind alle diese Lipide deprotoniert und weisen eine Vorumwandlung und eine Hauptumwandlung auf. Bei Erreichen des pK_a -Wertes wird die Hauptumwandlung zu höheren Temperaturen verschoben. Eine Vorumwandlung ist nicht mehr nachzuweisen.

Vorumwandlung ist also keine charakteristische Eigenschaft von Phosphatidylcholinen. Sie ist vielmehr eine Eigenschaft gleichkettiger 1,2-disubstituierter Phosphatidyl-Verbindungen, die völlig dissoziiert sind, also keine strukturellen Protonen in der Membran aufweisen. Mit steigender Protonenkonzentration (sinkendem pH-Wert) kommt damit den pK -Werten der verschiedenen veresterten Phosphatgruppen und der Ammoniumgruppe offensichtlich eine große Bedeutung zu^[*]. Bei pH-Werten um 11 wird die Aminogruppe des Phosphatidylethanolamins protoniert. Damit ändern sich die Eigenschaften des Lipids sprunghaft. Die Vorumwandlung ist nicht mehr nachzuweisen, und die Hauptumwandlung wird bei $>70^{\circ}\text{C}$ beobachtet. Entsprechende Eigenschaftsänderungen bei Protonierung treten auch bei den anderen Lipiden auf, bei der Phosphatidsäure bei pH 9 (pK_2), beim Phosphatidylglycerin bei pH 4 (pK) und beim Phosphatidylcholin bei pH 1 (pK). Das physikalische Verhalten dieser „Ether-Phospholipide“ steht somit in direkter Beziehung zum Dissoziationsgrad α ; „Ester-Phospholipide“ verhalten sich analog.

Die unterschiedlichen pK -Werte der Phospholipide sind für die Funktion natürlicher Membranen von großer Bedeutung. Sie bewirken, daß im biologisch relevanten pH-Bereich um 7 zwei Gruppen von Phospholipiden mit ausgeprägten Unterschieden im physikalischen Verhalten koexistieren: völlig dissoziierte und teilprotonierte Strukturen. So haben „Ether-Phospholipide“ mit gleichem apolarem Bereich, z. B. 1,2-Dihexadecyl-*sn*-glycerin, als Phosphocholin oder Phosphoglycerin T_M -Werte um 43°C und T_P -Werte um 38°C . Das entsprechende Phosphoethanolamin oder Phosphat dagegen weisen T_M -Werte $>70^{\circ}\text{C}$ auf (eine zusätzliche Umwandlung nach hexagonal II wird später diskutiert).

Ursache für die Stabilisierung der protonierten Zustände – höhere T_M -Werte infolge dichter Packung der Kohlenwasserstoffketten – sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen negativ geladenen Phosphatgruppen und protonierten Phosphorsäureresten oder Ammoniumgruppen. Deshalb hat Phosphatidsäure bei pH-Werten um 12 (völlig dissoziiert) und um 2 (völlig protoniert) eine deutlich tiefere Phasenumwandlungstemperatur als zwischen den pK -Werten pK_1 und pK_2 . Damit ergibt sich für Phospholipide mit zwei dissoziierten Protonen ein Plateau für die T_M -Werte zwischen den pK -Werten. Das Plateau liegt um mehr als 25°C über den T_M -Werten der völlig dissoziierten und um mehr als 15°C über den T_M -Werten der völlig protonierten Zustände (Abb. 5). Die Ausdehnung des Plateaus wird durch die pK -Werte bestimmt. Es erstreckt sich für das „Ether-Phosphoethanolamin“ vom Typ 48 über den pH-Bereich von 1 bis 11 und für die analoge Phosphatidsäure über den pH-Bereich von 3.5 bis 9. Dagegen ergibt sich ein Maximum des T_M -Wertes im pK -Wert für Phospholipide mit nur einem dissoziierten Proton, z. B. für 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphorsäuremethylester bei pH 3.5^[73, 74].

[*] Wir haben die pK -Werte von wasserlöslichem Glycerinphosphat mit denen von 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphat, d. h. einem Membranstruktur-gebundenen Phosphat, verglichen [65]. Die pK -Werte für Matrix-gebundenes Phosphat sind zu höheren pH-Werten verschoben (Glycerin-3-phosphat: $pK_1 \approx 2.0$, $pK_2 \approx 6.0$; 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphat: $pK_1 \approx 4.0$, $pK_2 \approx 9.0$). Die Dissoziation eines Protons aus einer negativ geladenen Lipidmatrix erfordert mehr Energie als die Ablösung aus einem Einzelmolekül.

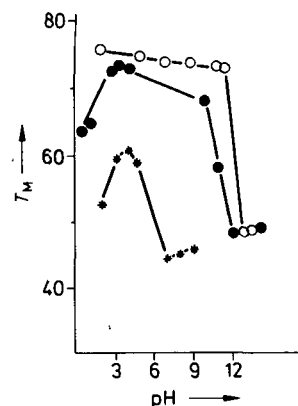


Abb. 5. pH-Abhängigkeit der Hauptumwandlungstemperatur (T_M) mehrerer Phospholipide. O: 1,2-Dihexadecyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (Typ 48); ●: 1,2-Dihexadecyl-*sn*-glycero-3-phosphat (Typ 48); *: 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphorsäuremethylester. Die Breite des Plateaus für T_M wird durch den Abstand zwischen pK_1 und pK_2 bestimmt. Für ein Phospholipid mit nur einem dissoziierbaren Proton ergibt sich am pK -Wert ein Maximum für T_M .

Neben den höheren T_M -Werten können teilprotonierte Phospholipide wie Phosphatidylethanolamin hexagonale Strukturen bilden (vgl. Tabelle 1). Für einige synthetische Phosphatidylethanolamine wurden Strukturumwandlungen beschrieben, die durch Röntgenreflexe als Umwandlungen von der lamellar-fluiden Doppelschicht in die hexagonale Struktur charakterisiert werden konnten^[75]. Die Abhängigkeit der Phasenumwandlungstemperatur T_H (lamellar-fluid nach hexagonal) von der Kettenlänge der Fettsäuren ist anders als für T_M . Mit wachsender Kettenlänge verschiebt sich T_H zu niedrigeren, T_M dagegen zu höheren Temperaturen. Dagegen kann Phosphatidsäure bei pH 7 keine hexagonale Anordnung einnehmen.

In biologischen Membranen werden pH-Werte um 7 eingehalten, da sonst irreversible Prozesse wie die Denaturierung von Proteinen zu Defekten führen können. Deshalb ist zu untersuchen, ob und wie bei pH-Werten um 7 physikalische Eigenschaften von Phospholipid-Wasser-Systemen durch Zusatz ein- oder zweiwertiger Kationen beeinflusst werden können.

Einwertige Kationen können die Dissoziation von Protonen bewirken^[65, 74]. Voraussetzung ist, daß die Phospholipidmembranen sich in einem teilprotonierten Zustand befinden, der empfindlich auf Änderungen in der Konzentration einwertiger Kationen anspricht. Dann ändert sich der Dissoziationsgrad α , und T_M wird niedriger (deprotonierter Zustand). Die Sensitivität gegenüber einwertigen Kationen ist an den kritischen pK -Wert eines Phospholipids gekoppelt, den wir allgemein als pK_n -Wert in einem n -Protonen-System definieren möchten, z. B. pK_3 von Phosphatidylserin ($n=3$; pH-Wert um 11), pK_2 für Phosphatidsäure ($n=2$; pH-Wert um 9) und pK für Phosphatidylglycerin ($n=1$; pH-Wert um 4). In biologischen Membranen bei pH-Werten um 7 weisen die natürlichen Phospholipide keinen kritischen pK -Wert auf, und der Einfluß einwertiger Kationen auf die physikalischen Eigenschaften von Phospholipiden ist deshalb gering.

Wichtig jedoch ist der Einfluß zweiwertiger Kationen, die bei konstantem pH-Wert Strukturänderungen induzieren können, wie wir sie für Protonen beschrieben haben. Entsprechend den sehr verschiedenen pK -Werten unter-

Tabelle 3. Einfluß von Kationen auf die Überstruktur natürlicher Phospholipide bei pH-Werten um 7. PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerin; PA: Phosphatidsäure; L: lamellare Doppelschicht; H: hexagonale Anordnung. Voraussetzung für eine Umwandlung von der lamellaren in eine hexagonale Anordnung ist der fluide Zustand der lamellaren Doppelschicht. Deshalb gilt $T_H > T_M$, d. h. die Phasenumwandlungstemperatur lamellar-fluid/hexagonal liegt immer oberhalb der Umwandlungstemperatur geordnet/fluid. PE kann deshalb oberhalb T_M auch als lamellare Doppelschicht vorliegen. Man kann davon ausgehen, daß natürliche PE-Spezies bei 37°C die hexagonale Anordnung einnehmen. T_H liegt bei diesen Phospholipiden wohl meistens unterhalb der Körpertemperatur.

Phospholipide	Einfluß von Kationen auf die Struktur		
	pH 7	NaCl (1 mol/L)	CaCl ₂ (0.1 mol/L)
PC	L	L	L
PE	H (L)	H (L)	H (L)
PG	L	L	H (L)
PA	L	L	H (L)

scheiden sich die Phospholipide auch in ihrer Sensitivität gegenüber zweiwertigen Kationen (Tabelle 3). Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin sind unempfindlich. Ihre typischen Eigenschaften, d. h. ihre T_M -Unterschiede und das individuelle Vermögen von Phosphatidylethanolamin zur Bildung hexagonaler Strukturen^[75,76], bleiben unbeeinflusst. Dagegen reagiert Phosphatidylglycerin empfindlich auf die Anwesenheit von Calcium-Ionen, die eine T_M -Erhöhung um etwa 24°C und die Bildung hexagonaler Strukturen ermöglichen^[76,77]. Phosphatidylglycerin erhält damit ganz ähnliche Eigenschaften wie Phosphatidylethanolamin. Bei Phosphatidsäure ist T_M bereits hoch (protonierter Zustand). Die Bindung von Calcium-Ionen ermöglicht nun aber auch bei pH 7 die Bildung hexagonaler Strukturen^[76].

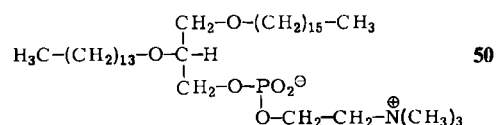
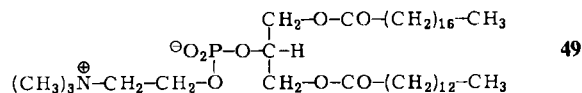
Negativ geladene Phospholipide reagieren stöchiometrisch mit zweiwertigen Kationen. Die Bindung von Magnesium-Ionen führt zu Aggregation, d. h. zur Aneinanderlagerung von Vesikeln, deren Integrität und Individualität erhalten bleibt^[78]. Bei der Bindung von Calcium-Ionen erfolgt ebenfalls Aggregation und im Anschluß daran Fusion^[79]. Mit dem Fusionsprozeß sind tiefgreifende Änderungen verbunden, da die individuellen Eigenschaften einzelner Vesikeln oder Membranen verloren gehen: Membranen unterschiedlicher Zusammensetzung gehen dabei in einheitliche Strukturen über^[80].

4. Rekonstitutionsexperimente

Bei Rekonstitutionsexperimenten werden biologische Funktionseinheiten der Membran (z. B. enzymkatalysierte Reaktionen oder Transportvorgänge) aus der natürlichen Umgebung gelöst, in physikalisch definierter Umgebung wieder aufgebaut und als Einzelereignis studiert. Durch solche Experimente läßt sich ermitteln, ob eine spezielle Lipidstruktur für den Ablauf eines bestimmten biologischen Prozesses notwendig ist. Als funktionelle Bausteine werden solche Membrankomponenten definiert, die in gereinigter Form inaktiv sind. Erst ihre Rekonstitution zu einer Funktionseinheit induziert biologische Aktivität. Als einfache Beispiele werden wir den Ionentransport durch Lipidmembranen und die biologische Aktivität phospholipidabhängiger Enzyme besprechen.

Zum Studium des Ionentransports durch planare Lipiddoppelschichten („Black Films“) konnten Boheim et al.^[17]

erstmalig Filme im geordneten Zustand analysieren. Die von uns für diese Experimente hergestellten gemischt-kettigen Phospholipide, z. B. 1-Stearoyl-3-myristoyl-*sn*-glycero-2-phosphocholin **49** mit $T_M \approx 30^\circ\text{C}$ (Tabelle 2), erwiesen sich als ideale Filmbildner. Durch ihre besondere Stabilität konnten sie im fluiden Zustand, im Umwandlungsbereich und im geordneten Zustand untersucht werden. Im Vergleich zu den gleichkettigen Phospholipiden haben die gemischt-kettigen Phospholipide überraschend günstige Eigenschaften. Die Ursache hierfür könnte das Fehlen der Vorumwandlung sein.



Abkühlkurven planarer Lipiddoppelschichten sind in Abbildung 6 dargestellt. Die reine Lipiddoppelschicht aus **48** zeigt eine geringe Grundleitfähigkeit von $< 1 \text{ nA cm}^{-2}$. Auffallend sind Fluktuationen der Leitfähigkeit, die mit der Phasenumwandlung fluid/geordnet oder vice versa einhergehen. Durch die Reorientierung der Phospholipide im Phasenumwandlungsbereich treten Packungsdefekte auf, die zu den beobachteten Leitfähigkeitsänderungen führen. Die Fluktuationen sind thermisch durch das Schmelzen der Ketten induziert. Es werden aber auch andere Leitfähigkeitsänderungen beschrieben, die durch Protonen ausgelöst werden und somit auf protonierbare Phosphatgruppen zurückzuführen sind^[81].

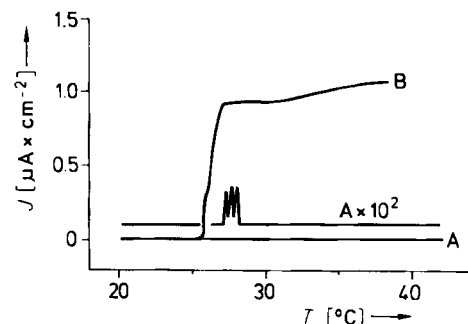


Abb. 6. Leitfähigkeitsänderungen von planaren Lipiddoppelschichten in Abhängigkeit von der Temperatur („Abkühlkurven“). A: Leitfähigkeitsänderung von 1-Stearoyl-3-myristoyl-*sn*-glycero-2-phosphocholin **49**; $A \times 10^2$; vergrößerte Darstellung von A, um Fluktuationen der Leitfähigkeit im Umwandlungsbereich ($T_M < 30^\circ\text{C}$) sichtbar zu machen; B: Leitfähigkeitsänderung von 1-Hexadecyl-2-tetradecyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin **50** in Gegenwart von Valinomycin und 1 M KCl. Im Bereich der Umwandlungstemperatur des Lipids, $T_M \approx 28^\circ\text{C}$, fällt die Leitfähigkeit stark ab.

Der Einfluß der Lipidmatrix auf den Carrier-induzierten Ionentransport (Abb. 6) ist besonders ausgeprägt. Hohe Leitfähigkeiten von $> 1 \text{ µA cm}^{-2}$ können in einem System aus 1-Hexadecyl-2-tetradecyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin **50** in Gegenwart von Valinomycin und Kaliumchlorid gemessen werden, solange sich der Lipidfilm im fluiden Zustand oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur, $T_M \approx 28^\circ\text{C}$, befindet. Ein spontaner Abfall des Membran-

stroms erfolgt jedoch im Umwandlungsbereich: von etwa $1 \mu\text{A cm}^{-2}$ oberhalb T_M auf etwa 1nA cm^{-2} unterhalb T_M (Faktor 10^3). Die Leitfähigkeit von 1nA cm^{-2} entspricht der Leitfähigkeit des Carrier-freien Films. Verständlicherweise ist der fluide Zustand der Membranen für den Carrier-induzierten Transport eine notwendige Voraussetzung. Wie die laterale Diffusion von Lipidmolekülen ist auch der Ionentransport über die Membran, d. h. von einer Lipidmonoschicht zur anderen, in der geordneten Phase unmeßbar klein.

Entsprechende Leitfähigkeitsänderungen wurden auch in Mischsystemen erzielt, z. B. in Lipidfilmen aus Phosphatidylcholin/Phosphatidsäure^[82]. In Gegenwart von Valinomycin und Rubidiumchlorid werden hohe Leitfähigkeiten gemessen. Der Zusatz von Calcium-Ionen induziert eine Phasenseparation, die zu Lipiddomänen führt mit einem überwiegenden Anteil entweder an Phosphatidylcholin oder an Phosphatidsäure. Die Phosphatidsäure-Areale sind erwartungsgemäß elektrisch inaktiviert (geordnete Phase unterhalb T_M der Phosphatidsäure in Gegenwart von Calcium-Ionen). Nur die Domänen aus Phosphatidylcholin liefern einen Beitrag zum Membranstrom (fluide Phase oberhalb T_M von Phosphatidylcholin).

In proteinfreien Lipidsystemen ist Carrier-induzierter Ionentransport nur im fluiden Zustand möglich. Die reversible Phasenumwandlung der Lipide vom geordneten in den fluiden Zustand kann damit im Sinne eines Ein- und Ausschaltmechanismus zur Steuerung von Membranströmen verwendet werden. Die Umwandlung kann thermisch oder durch Calcium-Ionen ausgelöst werden. In Mischsystemen von Phosphatidylcholin (insensitiv gegen Ionen) mit negativ geladenen Phospholipiden bewirken Calcium-Ionen durch Bindung an die negativ geladenen Phosphatgruppen sowohl Phasenseparation als auch eine Erhöhung von T_M .

In Lipid-Protein-Systemen kann eine Phasenseparation von Lipiden durch spezifische Wechselwirkung zwischen Proteinen und Phospholipiden induziert werden. Das ist wichtig für die Funktion der aus *E. coli* gewonnenen D-Lactat-Dehydrogenase, einem phospholipidabhängigen Enzym^[83]. Die Phospholipidzusammensetzung der *E.-coli*-Membran und möglicherweise deren Eigenschaften werden durch die dominierende Rolle von Phosphatidylethanolamin (über 90 Mol-%) geprägt. Der Anteil an negativ geladenen Phospholipiden wie Phosphatidylserin oder Phosphatidylglycerin ist vernachlässigbar klein (unter 5 Mol-%). Hier stellt sich die Frage nach der Bedeutung der Lipidminoritäten für den biologischen Prozeß.

D-Lactat-Dehydrogenase benötigt für den enzymatischen aktiven Zustand eine apolare Lipidmatrix. Mit synthetischen 1-Acyl-1,3-propandiol-phosphocholinen **51** mit unterschiedlicher Kettenlänge konnten Kovatchev et al.^[84] die Aktivität des Enzyms oberhalb und unterhalb der kritischen Micellkonzentration (CMC) bestimmen. Wie erwartet, wurde das Enzym nur oberhalb des CMC-Bereichs aktiviert, d. h. D-Lactat-Dehydrogenase kann nur durch Wechselwirkung mit Micellen, aber nicht mit Monomeren eine aktive Konformation einnehmen. In Tabelle 4 sind die kritischen Konzentrationen für die Bildung von Micellen, für die Aktivierung von D-Lactat-Dehydrogenase und für die Hämolyse von Rindererythrocyten für verschiedene 1-Acyl-1,3-propandiol-phosphocholine **51** zusammenge-

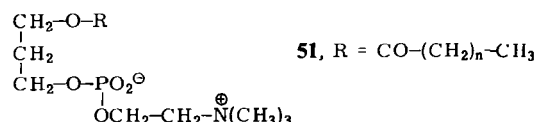


Tabelle 4. Kritische Micellkonzentrationen (CMC) von 1-Acyl-1,3-propandiolphosphocholinen **51** in Abhängigkeit von der Acylgruppe. Angegeben sind außerdem die Konzentrationen, die 50% D-Lactat-Dehydrogenase-Aktivierung (LDH-Akt.) oder 50% Hämolyse (von Rindererythrocyten) bewirken.

R in 51 [a]	log CMC [mol/L]	log 50% LDH-Akt. [mol/L]	log 50% Hämolyse [mol/L]
22:0	-5.05	-5.0	—
20:0	-5.00	-4.50	-4.70
18:0	-4.80	-4.30	-4.70
16:0	-4.70	-4.10	-4.70
14:0	-4.35	-3.70	-4.35
12:0	-3.52	-3.10	-3.60
10:0	-2.46	-2.05	—

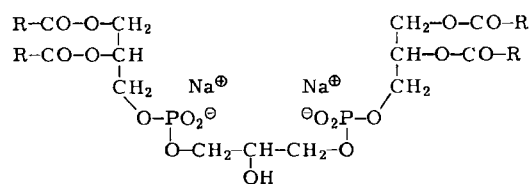
[a] Die Acylreste R in **51** werden durch die Anzahl der C-Atome und Doppelbindungen in den Säuren charakterisiert: 22:0, Behensäure; 20:0, Arachidinsäure; 18:0, Stearinsäure, 16:0, Palmitinsäure; 14:0, Myristinsäure; 12:0, Laurinsäure; 10:0, Decansäure.

stellt. Diesen Modellverbindungen fehlt die OH-Gruppe an C-2 von Glycerin. Die gute Übereinstimmung der Werte überrascht nicht, denn Micellbildung, Enzymaktivierung und hämolytische Aktivität der Verbindungen beruhen auf einer für diese Prozesse zentralen Eigenschaft, der Grenzflächenaktivität. Sie bewirkt in Wasser die Bildung von Überstrukturen (Micellen, Enzymaktivierung) sowie die Reorientierung von lamellaren Doppelschichten, wenn ein Verhältnis Phospholipid zu Lysophospholipid von etwa 4:1 (Hämolyse) erreicht wird. Lysoverbindungen dieser Art haben eine freie OH-Gruppe an C-2 von Glycerin.

Wichtig ist das Verhalten von D-Lactat-Dehydrogenase in lamellaren Doppelschichten, die aus dem Hauptphospholipid der *E.-coli*-Membran, 1-Palmitoyl-2-elaidoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin, aufgebaut sind. Überraschenderweise ist für dieses Lipid experimentell keine Aktivierung nachzuweisen. Negativ geladene Phospholipide wie Phosphatidylserin oder Phosphatidylglycerin dagegen, deren Konzentration in der natürlichen Membran sehr gering ist, bewirken eine ausgezeichnete Aktivität des Enzyms. Das bedeutet, daß das native Protein in einem aktiven Zustand ebenfalls von negativ geladenen Phospholipiden umgeben sein muß. Der aktive Zustand des Enzyms kann also durch Phasenseparation in der vorwiegend neutralen Lipidmatrix induziert werden, während statistische Verteilung zu einem inaktiven Zustand führt^[84]. Phosphatidylserin und Phosphatidylglycerin können als funktionelle Bausteine der *E.-coli*-Membranen betrachtet werden.

Phospholipide sind für die Funktion vieler membrangebundener Proteine wesentlich^[85,86]. Teilweise sind die Anforderungen an die Spezifität nicht sehr hoch. D-β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase aus Rinderherzmitochondrien^[87] benötigt jedoch unbedingt Phosphatidylcholin^[88,89]. Das Enzym befindet sich natürlicherweise in einer Umgebung von Phospholipiden ~ Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Diphosphatidylglycerin (Cardiolipin) **52** im Molverhältnis 43:37:20^[90,91] –, die

hochungesättigte Fettsäuren enthalten. Aufgrund der unterschiedlichen Fettsäureketten ist die Anzahl der molekularen Spezies sehr groß^[92].



52, R = (CH₂)_n-CH₃

Mit den in Abschnitt 2 beschriebenen Verfahren haben wir definierte Phospholipide mit natürlicher, aber auch nicht natürlicher Konfiguration und Zusammensetzung synthetisiert. Mit diesen Phospholipiden konnten Fragen nach der Vielfalt der molekularen Spezies von Phospholipiden, nach der Notwendigkeit von Diphosphatidylglycerin **52** und nach dem Einfluß der Phasenzustände geordnet/fluid auf die enzymatische Reaktion untersucht und beantwortet werden.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Phosphatidylcholin ist essentiell für die enzymatische Aktivität von D-β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase. Die Feinstruktur der Phosphatidylcholins hat dagegen für den Aktivierungsprozeß nur untergeordnete Bedeutung. Es gibt keine Hinweise, daß hochungesättigte Fettsäuren Vorteile für das rekonstituierte System bringen, immer vorausgesetzt, daß die Phasenumwandlungstemperatur des Lipidgemisches nicht unterschritten wird. Der fluide Zustand der Lipidmatrix ist auch hier wesentlich für den Ablauf der enzymatischen Reaktion^[93,94].

Cardiolipin **52** als charakteristisches Phospholipid der Mitochondrienmembran kann ohne Einfluß auf die kinetischen Parameter der Reaktion durch andere negativ geladene Phospholipide ersetzt werden. Die Untersuchungen ermöglichen eine klare Unterteilung der Phospholipide in funktionelle Bausteine – in diesem Fall die Phosphatidylcholins – und in Matrixmoleküle. Offensichtlich hängen die Eigenschaften der Lipidmatrix aber von der Phospholipidzusammensetzung ab. Aus den Daten in Tabelle 5 ergibt sich, daß die günstigsten Matrixeigenschaften für die Enzymreaktion in einer Mischung aus Phosphatidylcholin/Phosphatidylethanolamin/negativ geladenen Phospholipiden erzielt werden. Diese Mischung entspricht der Zusammensetzung der natürlichen Membran, die allerdings Cardiolipin **52** als dritte Komponente enthält. Es findet sich kein Hinweis, daß die große Zahl von Lipidspezies in der Natur eine besondere Bedeutung für den Ablauf der enzymatischen Reaktion hat, sofern die Phospholipidmatrix sich im fluiden Zustand befindet, d. h. oberhalb von T_M des Lipids oder des Lipidgemisches. Auch hochungesättigte Fettsäuren sind nicht essentiell, denn die Vielzahl der in den Mitochondrien vorhandenen Lipidspezies kann durch drei individuelle Phospholipide ersetzt werden, die nur gesättigte Fettsäuren enthalten. D-β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase findet in einer Matrix aus 1-Palmitoyl-2-lauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin, -3-phosphoethanolamin und -3-phospho-1,3-propandiol optimale Bedingungen für die enzymatische Reaktion (Tabelle 5, rechte Spalte, letzte Zeile). In diesem Phospholipidge-

Tabelle 5. Aktivierung von D-β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase mit definierten Phospholipid-Spezies bei 37°C. Mikrodispersionen von Phospholipiden wurden durch Ultraschallbehandlung von PC allein, von PC/PE-Gemischen (Phosphatverhältnis 5:4) und von PC/PE/PP-Gemischen (Phosphatverhältnis 5:4:1) hergestellt. PC bedeutet Phosphatidylcholin mit den in der linken Spalte angegebenen Acylgruppen [a]; PE bedeutet Phosphatidylethanolamine mit den in der Kopfleiste angegebenen Acylgruppen [a]; PP bedeutet Phosphatidyl-1,3-propandiol mit den gleichen Acylgruppen wie PE (siehe Schema 1). Die Zahlen in der Tabelle geben das Ausmaß der Aktivierung in Prozent bezogen auf 100 Prozent für die Aktivierung des Enzyms mit natürlichem Mitochondrien-Phospholipid-Extrakt an. Die Zahlen in Klammern stehen für die Effektivität der Reaktivierung (Molverhältnis Phosphatidylcholin zu Enzym, das halbmaximale Aktivierung ergibt), d. h. je kleiner die Zahl, um so effektiver ist das Gemisch. Für den natürlichen Phospholipidextrakt aus Mitochondrien wurde eine Effektivität von 7 gefunden. – PE oder PE/PP-Gemische führen nicht zur Aktivierung des Enzyms.

1,2-Diacyl von PC [a]	PC (allein)	+ PE 1-16:0 2-18:1	+ PE 1-16:0 2-12:0	+ PE/PP 1-16:0 2-18:1	+ PE/PP 1-16:0 2-12:0
1-16:0 2-18:1	82 (29)	100 (17)	100 (16)	100 (7)	100 (7)
1-16:0 2-18:2	82 (26)	99 (16)	—	100 (7)	—
1-16:0 2-20:4	85 (27)	100 (13)	—	99 (8)	—
1-22:0 2-18:1	79 (25)	100 (16)	100 (18)	100 (7)	98 (8)
1-16:0 2-14:0	67 (74)	97 (29)	96 (28)	96 (7)	95 (7)
1-16:0 2-12:0	63 (80)	93 (30)	96 (29)	93 (7)	97 (7)

[a] Die Acylgruppen werden durch die Anzahl der C-Atome und Doppelbindungen in den Säuren charakterisiert; siehe Fußnote [a] von Tabelle 4. 20:4, Arachidonsäure; 18:2, Linolensäure; 18:1, Ölsäure.

misch ist das Phosphatidylcholin funktioneller Baustein zur Rekonstitution der enzymatischen Aktivität und Bestandteil der Lipidmatrix.

Gemische aus Phosphatidylethanolaminen und Phosphatidyl-1,3-propandiol allein (ohne das Phosphatidylcholin) können das Enzym dagegen nicht aktivieren.

5. Selektive Beeinflussung der Eigenschaften natürlicher Zellmembranen

Die gezielte Beeinflussung natürlicher Membranen in Zelloberflächen oder in subzellulären Partikeln ist von großem medizinischem Interesse. Im Vordergrund stehen dabei Methoden, die eine Anreicherung von Wirkstoffen in ausgewählten Zielorganen ermöglichen. Die Prinzipien unserer neuesten Untersuchungen werden an zwei Beispielen dargestellt: am Problem der Blut-Hirn-Schranke und an der Entwicklung von cytotoxischen Substanzen, die im Normalgewebe entgiftet, im Tumorgewebe (Enzymdefekt) aber nicht abgebaut werden können.

Die Blut-Hirn-Schranke als hochselektive Permeabilitätsbarriere wurde zuerst von Lewandowsky^[95] beschrieben. Sie ist Ursache der relativen Therapieresistenz von Hirnmetastasen, da eine therapeutisch wirksame Cytostatica-Konzentration im Gehirn nicht erreicht werden kann. Angeregt durch die Experimente von Deuticke^[96] über den Einfluß niedermolekularer Alkohole auf die Permeabilitätseigenschaften von Erythrocytenmembranen haben wir den Effekt der physiologisch verträglicheren 1-Alkylglycerine mit kurzen Alkylketten wie 1-Pentyl-*rac*-glycerin auf die Blut-Hirn-Schranke untersucht.

Mit der Methode von *Oldendorf*^[97] wurde der Transport von zwölf gebräuchlichen Cytostatica durch die Blut-Hirn-Schranke gemessen. Eine Lösung mit ¹⁴C-markiertem Wirkstoff wurde Wistar-Ratten in die rechte Carotis-Arterie (Halsschlagader) injiziert. Nach Dekapitation wurde dem Tier die rechte Hirnhälfte entnommen und deren Radioaktivität in einem Gewebsverbrenner bestimmt. Die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für ¹⁴C-markierte Wirkstoffe wurde im Vergleich zu frei diffusiblen ³H₂O als internem Standard gemessen. Die so ermittelten „Brain Uptake Index“-Werte sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6. „Brain Uptake Index“ (BUI)-Werte (als Quotient des Verhältnisses der Aktivitäten von ¹⁴C-markiertem Wirkstoff und frei diffusiblen ³H₂O als internem Standard im Gehirn und in der Injektionslösung multipliziert mit 100) und Öl-Wasser-Verteilungskoeffizienten *p* von Cytostatica. Die Wirkstoffe sind nach steigenden Molekulargewichten (MG) in drei Bereiche (100 bis 500, 500 bis 600 und 600 bis 1500) eingeteilt. Innerhalb jeder Gruppe wurde die Einteilung nach steigender Lipophilie vorgenommen. BUI*-Werte erhält man aus BUI-Werten durch Abzug von 3.3% (Fehlergrenze der Methode), d. h. ein BUI-Wert von 3.3% bedeutet keine Aufnahme. 1-Pentyl-*rac*-glycerin (PeG) wurde in physiologischen Konzentrationen (0.15 M) eingesetzt.

Wirkstoffe	MG	BUI*-Werte [%]		log <i>p</i>
		ohne PeG	mit PeG	
5-Fluoruracil	132	0.4	9.7	-2.89
Methotrexat	455	2.0	22.9	-2.44
Cyclophosphamid	262	8.1	50.2	-1.03
Et ₁₈ -OCH ₃ 53 [a]	542	7.4	—	-1.25
Doxorubicin	544	0	—	-1.00
Etoposid	589	0	14.5	-0.62
Daunorubicin	528	0	—	-0.30
Bleomycin	1400	0	2.4	-1.89
Peplomycin	1400	0.9	10.5	-0.74
Vincristin	923	0	—	-0.47
Mitoxantrone	625	0	21.8	+0.13
Vinblastin	909	0	38.3	+0.99

[a] 1-Octadecyl-2-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholin.

Die von uns ausgewählten Cytostatica unterscheiden sich im Molekulargewicht (90 bis 1500) und im Öl-Wasser-Verteilungskoeffizienten (log*p* -3 bis +1). Nach *Oldendorf*^[98] ist die Lipophilie der entscheidende Parameter für die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke. Nach unseren Ergebnissen ist das nur für einen engen Molekulargewichtsbereich richtig.

Von den zwölf getesteten Substanzen werden nur Cyclophosphamid (Endoxan) und Et₁₈OCH₃ 53 in nennenswertem Ausmaß durch die Blut-Hirn-Schranke transportiert (≈10%). Cyclophosphamid ist im Gehirn therapeutisch nicht wirksam, da es nur in der Leber aktiviert werden kann. Der therapeutische Wert von Et₁₈OCH₃ ist umstritten (s. u.). Somit genügt von zwölf geprüften Cytostatica nicht eines den Anforderungen, die an eine Anwendung zur Chemotherapie von Gehirntumoren gestellt werden müssen.

Eine systematische Diskussion der Ergebnisse aus Tabelle 6 erlaubt, die Wirkstoffe in drei Molekulargewichtsbereiche zu unterteilen. Im Bereich von 90 bis 500 werden die Transporteigenschaften der Wirkstoffe durch die Lipophilie bestimmt. Die Blut-Hirn-Schranke verhält sich wie eine Öl-Wasser-Grenzfläche, d. h. die Diffusion der Moleküle durch die Membran wird allein durch den Öl-Wasser-Verteilungskoeffizienten bestimmt.

Der Molekulargewichtsbereich zwischen 500 und 600 nimmt eine Zwischenstellung ein, während für Cytostatica mit Molekulargewichten über 600 die Blut-Hirn-Schranke eine echte Barriere bildet. Unabhängig vom Öl-Wasser-Verteilungskoeffizienten werden die Wirkstoffe ausgeschlossen. Ein eindrucksvolles Beispiel ist Vinblastin, das trotz des sehr günstigen Verteilungskoeffizienten (log*p* +0.99) die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann^[99]. Dieser experimentelle Befund widerlegt die Theorie von *Oldendorf*^[98], nach der ein Zahlenwert für den Verteilungskoeffizienten von log*p* -1 bereits für vollständigen Wirkstofftransport durch die Blut-Hirn-Schranke ausreicht.

Die Ergebnisse zeigen, daß eine Chemotherapie von Gehirntumoren wenig sinnvoll ist. Die Blut-Hirn-Schranke als echte Barriere verhindert die Anreicherung der Wirkstoffe im Gehirn. Wir haben neuerdings jedoch zeigen können^[100], daß die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke durch 1-Alkylglycerine mit kurzen Alkylketten günstig beeinflußt werden kann. Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, können in Gegenwart von 1-Pentylglycerin niedermolekulare Wirkstoffe (MG bis 500) effektiv über die Schranke transportiert werden. Der Transport höhermolekularer Wirkstoffe (MG bis 1500) wird durch den Zusatz von 1-Pentylglycerin überhaupt erst möglich. Volle Reversibilität ist in einem Zeitraum von einer Minute gegeben. Damit unterscheidet sich die Methode prinzipiell von der osmotischen Schocktherapie nach *Rapoport* et al.^[101], in der die Blut-Hirn-Schranke erst nach Stunden ihren Normalzustand wieder erreicht.

Das Ziel, ausgewählte Organe oder Tumorgewebe mit einem cytotoxischen Prinzip zu erreichen, kann also über Carrier-Moleküle (Beispiel Blut-Hirn-Schranke) erreicht werden, die ihre Wirkung nach Unterschreiten einer bestimmten Konzentration verlieren. So ermöglicht 1-Pentylglycerin den Transport von Wirkstoffen nur in der Richtung vom Blut zum Gehirn. Durch Verdünnung des Carriers wird die für den Transport notwendige kritische Konzentration unterschritten. Die Wirkstoffe können den Gehirraum nicht wieder verlassen (Käfig-Effekt).

Cytotoxische Substanzen können aber auch dadurch in bestimmten Organen angereichert werden, daß Unterschiede in der Enzymausrüstung genutzt werden. Von praktischem Interesse ist die Beobachtung von *Snyder* et al.^[102], daß Tumorzellen gegenüber normalen Zellen einen Enzymdefekt aufweisen: Es fehlt das 1-*O*-Alkyl-spaltende Enzym. Diese Befunde können in direkten Zusammenhang mit den Untersuchungen von *Westphal*, *Fischer*, *Munder* et al. gebracht werden, die sich für immunstimulierende und cytotoxische Prinzipien^[39, 103] interessieren. Als Repräsentant einer neuen Klasse von Antitumormitteln wurde 1-Octadecyl-2-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholin (Et₁₈-OCH₃) 53 intensiv untersucht. Man konnte erwarten, daß es in Tumorzellen angereichert wird und dort eine selektive Cytolyse bewirkt. Das überzeugende Konzept konnte bisher nicht in eine erfolgreiche Therapie umgesetzt werden.

Auf der Suche nach den Gründen für die auch für gesunde Zellen sehr hohe Toxizität von Et₁₈-OCH₃ 53 haben wir uns die Substrateigenschaften derartiger Spezies gegenüber dem 1-*O*-Alkyl-spaltenden Enzym aus Rattenleber angesehen. Mit einem neuen Test konnte die Enzymreak-

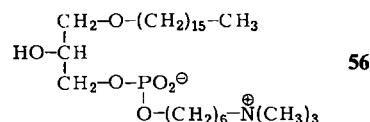
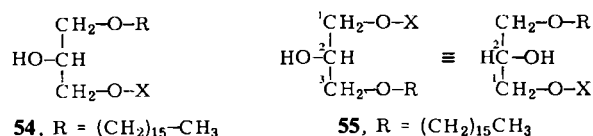
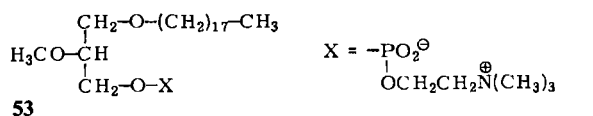


Tabelle 7. Substratspezifität von 1-O-Alkyl-spaltenden Enzymen aus Rattenleber. Eine spezifische Aktivität von <0.2 bedeutet, daß möglicherweise kein Abbau stattfindet; aus methodischen Gründen ist eine exakte Zahlenangabe nicht möglich. Die Werte werden über die quantitative Bestimmung von wasserlöslichen Phosphatestern [104] ermittelt, die während der Enzymreaktion gebildet werden.

Substrate [a]	spezifische Aktivität [nmol (mg Protein) ⁻¹ min ⁻¹]
1-Hexadecyl- <i>sn</i> -G-3-PC 54	8.0
1-Hexadecyl- <i>sn</i> -G-3-P-trimethylammoniohexanol 56	7.5
3-Hexadecyl- <i>sn</i> -G-1-PC 55	9.0
1-Octadecyl- <i>sn</i> -G-3-PC	5.6
1-Octadecyl-2-methyl- <i>sn</i> -G-3-PC 53	<0.2
3-Octadecyl-2-methyl- <i>sn</i> -G-1-PC	<0.2
1-Octadecyl-2-methyl- <i>rac</i> -G-3-PC	<0.2
1-Methyl-2-octadecyl- <i>rac</i> -G-3-PC	<0.2
1-Hexadecyl-1,3-propandiol-3-PE	7.8
1-Hexadecyl-1,3-propandiol-3-phosphoglykol	3.2
2-Tetradecyl- <i>rac</i> -G-3-PE	7.4
1-Octadecyl-1,3-propandiol-3-phosphat	<0.2

[a] In den abgekürzten Namen bedeuten G-3-PC und G-3-PE Glycerol-3-phosphocholin bzw. Glycerol-3-phosphoethanolamin.

tion über die Bildung von wasserlöslichen Phosphatestern^[104] verfolgt und damit die Verwendung ¹⁴C-markierter Substrate^[105] umgangen werden. Die bisherigen Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengestellt. Es fällt auf, daß 53, wenn überhaupt, dann nur sehr langsam vom Enzym gespalten wird. Bessere Substrate sind Analoga mit freier 2-Hydroxygruppe, beispielsweise 1-Hexadecyl-*sn*-glycerol-3-phosphocholin 54. Das Enzym hat keine ausgeprägte Stereoselektivität, denn 3-Hexadecyl-*sn*-glycerol-1-phosphocholin 55 wird etwa ebenso schnell gespalten wie das Substrat 54 natürlicher Konfiguration. Als Antitumorstoffe sind beide Verbindungen jedoch wenig geeignet, da sie durch Acyl-Transferasen (nur das Derivat 54 mit natürlicher Konfiguration^[106]) und durch Phospholipasen C und D entgiftet werden können.

Durch sorgfältiges Studium der Phospholipid-metabolisierenden Enzyme in Rattenleber ist es uns jetzt gelungen, ein cytotoxisches Lysophospholipid mit natürlicher Konfiguration herzustellen, das sowohl durch Acyl-Transferasen als auch durch die Phospholipasen C und D metabolisch nicht verändert und entgiftet werden kann^[107,108]. Es handelt sich um 1-Hexadecyl-*sn*-glycerol-3-phospho-trimethylammoniohexanol 56, dessen Abbau nur über das 1-O-Alkyl-spaltende Enzym möglich ist^[106].

Tierversuche mit diesem cytotoxischen Phospholipid natürlicher Konfiguration, aber vergrößertem Phosphor-Stickstoff-Abstand, werden jetzt durchgeführt. Wir erwarten eine deutlich verringerte Cytotoxizität in Normalzellen (biologischer Abbau) im Vergleich zu Tumorzellen (kein Abbau). Die Befunde zeigen, wie über eine genaue Kenntnis der physikalischen und biochemischen Eigenschaften von Phospholipiden und deren Analoga maßgeschneiderte Strukturen mit optimaler Wirkung entwickelt werden können.

6. Ausblick

Aus den in den letzten Jahren durch Modellstudien an definierten Phospholipiden gewonnenen Erkenntnissen hat sich ein neues Verständnis der Bedeutung von Phospholipiden in Biomembranen entwickelt. Phospholipide sind nicht nur Matrixmoleküle, die eine zweidimensionale Doppelschicht für den Ablauf von Membranprozessen bereitstellen (klassische Vorstellung), sondern auch funktionelle Bausteine, die biologische Aktivität im Zusammenwirken mit anderen Membrankomponenten überhaupt erst ermöglichen. Es hat sich gezeigt, daß Prozesse wie Ionen-transport durch die Membran und die Aktivität Phospholipid-abhängiger Enzymsysteme von der chemischen Struktur direkt abhängen und sogar über sie gesteuert werden können. Damit erhalten physikalische Eigenschaften wie Phasenumwandlung und Phasenseparation eine besondere Bedeutung als wichtige Steuer- und Regelprinzipien.

Eines der drängenden Probleme unserer Zeit ist Krebs. Über die einfache Modifizierung von Phospholipidstrukturen, die teilweise sehr sensitiv von Phospholipid-metabolisierenden Enzymen erkannt werden, erschließen sich neue Möglichkeiten der Therapie – ein erfolgversprechender Einstieg besonders dann, wenn Unterschiede in der Enzymausrüstung zwischen Normal- und Tumorgewebe vorhanden sind.

Neue Impulse für die Chemotherapie von Gehirntumoren sollten sich aus der Beobachtung entwickeln, daß die Blut-Hirn-Schranke für Cytostatica in Gegenwart von Alkylglycerinen spontan und reversibel durchlässig wird. Da der Molekulargewichtsbereich für den Transport von Wirkstoffen über die Membranbarriere außerdem von 500 auf 1500 erweitert wird, öffnet sich hier eine Fülle neuer Möglichkeiten, insbesondere im Hinblick auf eine sinnvolle chemische Derivatisierung von Wirkstoffen zur Verbesserung ihrer Lipophilie und Membrangängigkeit.

Abschließend möchte ich eine Arbeit von Christoph Wilhelm Hufeland^[109] aus dem Jahre 1796 („Die Kunst, das menschliche Leben zu verlängern“) zitieren. Der Autor, der Persönlichkeiten wie Goethe, Herder, Wieland und Schiller medizinisch betreute, fordert von einer Arznei, die als „Naturheilmittel“ bezeichnet wird, daß sie „ohne in die Sinne fallenden Eigenschaften und ohne merkliche Alteration des Organismus, still und sanft wie die Natur selbst, die herrlichsten Wirkungen im Organismus hervorbringt“. In diesem Sinne betrachten Kunze et al.^[110] Lecithin als wahres Naturheilmittel, das wie „Sonne, Licht, Luft, Wasser und Erde stets vorbeugend wirkt und in sehr vielen

Krankheitsfällen zur Unterstützung der Behandlung angezeigt ist.“

Eine realistischere Einschätzung der Eigenschaften von Phospholipiden ist heute angebracht. Nach unserer Auffassung sind chemisch definierte Phospholipide jedoch bewährte Modellsysteme zum Studium der Eigenschaften von Biomembranen und zur Erkennung von Transportmechanismen, die eine verbesserte Permeation von Wirkstoffen über die Lipiddoppelschicht zulassen. Mit Sicherheit werden einfache chemische Abwandlungen von Phospholipiden und die damit verbundenen, oft überraschenden Eigenschaftsänderungen zur Entwicklung neuer Arzneimittel herangezogen werden können.

Danken möchte ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Deutschen Krebshilfe, der Stiftung Volkswagenwerk, der Max-Planck-Gesellschaft und der Technischen Universität Braunschweig, die meine Forschung wirkungsvoll unterstützten. Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Brigitte und meiner Tochter Kirsten für ihr Verständnis und für ihr Interesse an meiner Arbeit. Herrn H. Brand danke ich für das sorgfältige Lesen des Manuskripts.

Eingegangen am 17. Januar 1984 [A 489]

- [1] a) Nomenclature of Lipids, *Eur. J. Biochem.* 79 (1977) 11; b) in Einklang mit dem Kommentar zu Regel Lip-2.4 (*ibid.* S. 15) wird die Bezeichnung Ethanolamin (korrekt: Aminoethanol) beibehalten.
- [2] H. Hirschmann, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 2762.
- [3] E. Gorter, F. Grendel, *J. Exp. Med.* 41 (1925) 439.
- [4] J. F. Danielli, H. Dawson, *J. Cell. Comp. Physiol.* 5 (1935) 495.
- [5] J. D. Robertson, *Prog. Biophys.* 3 (1960) 343.
- [6] J. B. Finean: *Biochemical Problems of Lipids*, Butterworth, London 1956.
- [7] S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* 175 (1972) 720.
- [8] F. Lynen in L. Djavadi-Ohanian: *The Structural Basis of Membrane Function*, Academic Press, New York 1976.
- [9] D. Branton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55 (1966) 1048.
- [10] D. E. Green, H. Baum: *Energy and the Mitochondrion*, Academic Press, New York 1970.
- [11] G. F. Wilgram, E. P. Kennedy, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 2615.
- [12] H. Eibl, E. E. Hill, W. E. M. Lands, *Eur. J. Biochem.* 9 (1969) 250.
- [13] P. C. Zamecnik, *Harvey Lect.* 54 (1960) 256.
- [14] R. L. Juliano in C. G. Knight: *Liposomes: From Physical Structure to Therapeutic Application*, Elsevier, Amsterdam 1981, S. 391.
- [15] K. Satouchi, R. N. Pinchard, L. M. McManus, D. J. Hanahan, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 4425.
- [16] P. Läger, *Science* 178 (1972) 24.
- [17] G. Boheim, W. Hanke, H. Eibl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 3403.
- [18] J. Langmuir, *J. Am. Chem. Soc.* 39 (1917) 1848.
- [19] W. G. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* 69 (1947) 1384.
- [20] E. Baer, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 42 (1965) 257.
- [21] L. L. M. van Deenen, G. H. de Haas, *Adv. Lipid Res.* 2 (1964) 167.
- [22] A. J. Slotboom, P. P. M. Bensen, *Chem. Phys. Lipids* 5 (1970) 301.
- [23] A. J. Slotboom, H. M. Verheij, G. H. de Haas, *Chem. Phys. Lipids* 11 (1973) 195.
- [24] M. Kates in E. D. Kornberg: *Methods in Membrane Biology*, Vol. 8, Plenum, New York 1977, S. 195.
- [25] H. Eibl, S. Kovatchev, *Methods Enzymol.* 72 (1981) 632.
- [26] H. Eibl, *Chem. Phys. Lipids* 26 (1980) 405.
- [27] H. Eibl in [14], S. 19.
- [28] H. Eibl, J. O. McIntyre, E. A. M. Fleer, S. Fleischer, *Methods Enzymol.* 98 (1983) 623.
- [29] J. Le Cocq, C. E. Ballou, *Biochemistry* 3 (1964) 976.
- [30] H. Eibl, *Chem. Phys. Lipids* 28 (1981) 1.
- [31] L. F. Wiggins, *J. Chem. Soc.* 1946, 13.
- [32] M. Criado, H. Eibl, J. Barrantes, *J. Biol. Chem.* (1984), im Druck.
- [33] M. Criado, H. Eibl, J. Barrantes, *J. Biol. Chem.* (1984), im Druck.
- [34] H. Eibl, *Chem. Phys. Lipids* (1984), im Druck.
- [35] L. M. McManus, D. J. Hanahan, R. N. Pinckard, *J. Clin. Invest.* 67 (1981) 903.
- [36] H. Eibl, C. Unger, H. W. von Heyden, G. Nagel, 17. Deutscher Krebskongress, *Verh. Dtsch. Krebsges.* 1984, im Druck.
- [37] F. Szoka, D. Papahadjopoulos in [14], S. 51.
- [38] R. Andreesen, M. Modolell, H. U. Weltzien, H. Eibl, H. H. Common, G. W. Löhr, P. G. Munder, *Cancer Res.* 38 (1978) 3894.
- [39] P. G. Munder, H. Fischer, H. U. Weltzien, H. F. Oettgen, O. Westphal, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 17 (1976) 174.
- [40] W. E. Berdel, *Blut* 44 (1982) 71.
- [41] L. M. G. van Golde, L. L. M. van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta* 125 (1966) 496.
- [42] H. H. Grünhagen, H. Eibl, G. Krebs, P. Reiter, *Biochim. Biophys. Acta* 732 (1983) 675.
- [43] D. J. Hanahan, H. Brockerhoff, E. J. Barron, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 1917.
- [44] M. K. Jain: *The Bimolecular Lipid Membrane: A System*, Van Nostrand-Reinhold, New York 1972.
- [45] H. Eibl, R. A. Demel, L. L. M. van Deenen, *J. Colloid Interface Sci.* 29 (1969) 381.
- [46] H. Hauser, I. Pascher, R. H. Pearson, S. Sundell, *Biochim. Biophys. Acta* 650 (1981) 21.
- [47] K. Harlos, H. Eibl, I. Pascher, S. Sundell, *Chem. Phys. Lipids* 34 (1983) 115.
- [48] K. Harlos, H. Eibl, I. Pascher, S. Sundell, *Chem. Phys. Lipids*, im Druck.
- [49] M. C. Phillips, R. M. Williams, D. Chapman, *Chem. Phys. Lipids* 3 (1969) 234.
- [50] H. Träuble, H. Eibl, H. Sawada, *Naturwissenschaften* 61 (1974) 344.
- [51] R. J. King, J. A. Clements, *Am. J. Physiol.* 223 (1972) 715.
- [52] S. C. Chen, J. M. Sturtevant, B. J. Gaffney, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 5060.
- [53] H. H. Földner, *Biochemistry* 20 (1981) 5707.
- [54] M. J. Ruocco, G. G. Shipley, *Biochim. Biophys. Acta* 684 (1982) 59.
- [55] J. Stümpel, A. Nicksch, H. Eibl, *Biochemistry* 20 (1981) 662.
- [56] H. Träuble, H. Eibl in F. O. Schmitt, D. M. Schneider, D. M. Crothers: *Functional Linkage in Biomolecular Systems*, Raven Press, New York 1975, S. 59.
- [57] J. L. Lippert, W. L. Peticolas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (1971) 1572.
- [58] M. C. Phillips, D. Chapman, *Biochim. Biophys. Acta* 163 (1968) 301.
- [59] H. Träuble, D. H. Haynes, *Chem. Phys. Lipids* 7 (1971) 324.
- [60] P. Devaux, H. McConnell, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 4475.
- [61] H. Träuble, E. Sackmann, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 4499.
- [62] K. M. W. Keough, P. J. Davies, *Biochemistry* 18 (1979) 1453.
- [63] J. Stümpel, H. Eibl, A. Nicksch, *Biochim. Biophys. Acta* 727 (1983) 246.
- [64] A. Colbeau, J. Nachbaur, P. M. Vignais, *Biochim. Biophys. Acta* 249 (1971) 462.
- [65] H. Träuble, H. Eibl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 214.
- [66] H. Eibl in W. H. Kunau, R. T. Holman: *Polynunsaturated Fatty Acids*, Am. Oil Chem. Soc., Champaign, USA 1977, S. 229.
- [67] H. Eibl, P. Woolley, *Biophys. Chem.* 10 (1979) 261.
- [68] H. Eibl, A. Blume, *Biochim. Biophys. Acta* 553 (1979) 476.
- [69] A. Blume, H. Eibl, *Biochim. Biophys. Acta* 558 (1979) 13.
- [70] J. Stümpel, K. Harlos, H. Eibl, *Biochim. Biophys. Acta* 599 (1980) 464.
- [71] K. Harlos, J. Stümpel, H. Eibl, *Biochim. Biophys. Acta* 555 (1979) 409.
- [72] F. Jähnig, K. Harlos, H. Vogel, H. Eibl, *Biochemistry* 18 (1979) 1459.
- [73] H. Eibl in R. C. Aloia: *Membrane Fluidity in Biology*, Vol. 2, Academic Press, New York 1983, S. 217.
- [74] H. Träuble, M. Teubner, P. Woolley, H. Eibl, *Biophys. Chem.* 4 (1976) 319.
- [75] K. Harlos, H. Eibl, *Biochemistry* 20 (1981) 2888.
- [76] K. Harlos, H. Eibl, *Biochim. Biophys. Acta* 601 (1980) 113.
- [77] K. Harlos, H. Eibl, *Biochemistry* 19 (1980) 895.
- [78] J. Wilschut, N. Düzgünes, D. Papahadjopoulos, *Biochemistry* 20 (1981) 3126.
- [79] J. Wilschut, N. Düzgünes, R. Fraley, D. Papahadjopoulos, *Biochemistry* 19 (1980) 6011.
- [80] N. Düzgünes, D. Papahadjopoulos in [73], S. 187.
- [81] K. Kaufmann, I. Silman, *Biophys. Chem.* 18 (1983) 89.
- [82] G. Schmidt, H. Eibl, W. Knoll, *J. Membr. Biol.* 70 (1982) 147.
- [83] M. Futai, *J. Biochem.* 80 (1976) 821.
- [84] S. Kovatchev, W. L. C. Vaz, H. Eibl, *Biochemistry* 256 (1981) 10369.
- [85] S. Fleischer, B. Fleischer, *Methods Enzymol.* 10 (1967) 406.
- [86] L. I. Rothfield, D. Romeo in L. I. Rothfield: *Structure and Function of Biological Membranes*, Academic Press, New York 1971, S. 251.
- [87] H. G. Bock, S. Fleischer, *Methods Enzymol.* 31 (1974) 374.
- [88] I. Sekuzo, P. Jurtschuk, D. E. Green, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 975.
- [89] B. Fleischer, A. Casu, S. Fleischer, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 24 (1966) 289.
- [90] P. Gazotti, H. G. Bock, S. Fleischer, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 5782.
- [91] Y. A. Isaacson, P. W. De Roo, H. F. Rosenthal, R. Bittman, J. O. McIntyre, H. G. Bock, P. Gazotti, S. Fleischer, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 117.
- [92] S. Fleischer, G. Rouser, *J. Am. Chem. Soc.* 42 (1965) 588.
- [93] H. Eibl, P. Churchill, J. O. McIntyre, S. Fleischer, *Biochem. Int.* 4 (1982) 551.
- [94] P. Churchill, J. O. McIntyre, H. Eibl, S. Fleischer, *J. Biol. Chem.* 288 (1983) 208.

- [95] M. Lewandowsky, *Z. Klin. Med.* 40 (1900) 480.
 [96] B. Deuticke, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 78 (1977) 1.
 [97] W. H. Oldendorf, *Brain Res.* 24 (1970) 372.
 [98] W. H. Oldendorf, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 147 (1974) 813.
 [99] C. Unger, H. Eibl, H. W. von Heyden, G. A. Nagel, *Cancer Res.* (1984), im Druck.
 [100] C. Unger, H. Eibl, H. W. von Heyden, G. A. Nagel in [36].
 [101] S. J. Rapoport, M. Hori, J. Klatzo, *Am. J. Physiol.* 223 (1972) 323.
 [102] J. F. Soodsma, C. Piantadosi, F. Snyder, *Cancer Res.* 30 (1970) 309.
 [103] H. U. Weltzien, P. G. Munder in H. K. Mangold, F. Paltauf: *Ether Lipids*, Academic Press, New York 1983, S. 277.
 [104] C. Unger, H. Eibl, *Cancer Res.*, im Druck.
 [105] F. Snyder, B. Malone, C. Piantadosi, *Biochim. Biophys. Acta* 316 (1973) 259.
 [106] H. Eibl, O. Westphal, H. van den Bosch, L. L. M. van Deenen, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 738 (1970) 161.
 [107] W. Diembeck, H. Eibl, *Chem. Phys. Lipids* 24 (1979) 237.
 [108] D. Bach, I. Bursucker, H. Eibl, I. R. Miller, *Biochim. Biophys. Acta* 514 (1978) 310.
 [109] C. W. Hufeland: *Die Kunst, das menschliche Leben zu verlängern*, Reimer Verlag, Berlin 1796.
 [110] R. Kunze, H. C. Buer, *Arzneim.-Forsch.* 1 (1941) 7.

Die chemische Bindung bei den höheren Hauptgruppenelementen

Von Werner Kutzelnigg*

Viele qualitative Konzepte zur Beschreibung der chemischen Bindung, die aus der Frühzeit der Theoretischen Chemie stammen, sind zwar durch quantenchemische Rechnungen an Molekülen mit Atomen von Elementen der zweiten Periode (Li bis Ne) gestützt worden, lassen sich aber – entgegen einer weit verbreiteten Auffassung – nicht ohne weiteres auf Moleküle mit Atomen von Elementen der höheren Perioden verallgemeinern. Insbesondere ist der Begriff der Hybridisierung bei den Atomen aus höheren Perioden nur mit Vorsicht zu verwenden. Der wesentliche Unterschied zwischen den Atomen aus der zweiten und denen aus höheren Perioden besteht darin, daß bei den einen die Rumpfe nur s-AOs, bei den letztgenannten aber zumindest s- und p-AOs enthalten. Das hat zur Folge, daß die s- und p-Valenz-AOs der Atome aus der zweiten Periode ungefähr im gleichen räumlichen Bereich lokalisiert sind, während sich bei den Atomen aus den höheren Perioden die p-Valenz-AOs deutlich weiter außen befinden. Hierauf beruht die größere Bedeutung der „lone-pair-Abstoßung“ und der „isovalenten Hybridisierung“ sowie schließlich die Schwäche von Einfachbindungen und die Stärke von Mehrfachbindungen bei den leichten Hauptgruppenelementen. Die Valenzausweitung (Verletzung der Oktettregel) bei Verbindungen der höheren Hauptgruppenelemente hängt nur sehr wenig mit der Verfügbarkeit von d-AOs zusammen, mehr mit der Größe dieser Atome und somit der geringeren gegenseitigen sterischen Hinderung von Liganden, etwas auch mit der geringeren Elektronegativität der schweren Atome. Jedenfalls kommt das Modell von Elektronenüberschuß-Mehrzentrenbindungen der Realität näher als dasjenige von Hybriden unter d-AO-Beteiligung. Die XO-Bindungen in Phosphanoxiden, Sulfoxiden, Oxosäuren und verwandten Verbindungen werden besser semipolar als als echte Doppelbindungen formuliert, auch wenn viele Eigenschaften die andere Vorstellung nahelegen. – Das zunehmende Interesse der Theorie an den Verbindungen der höheren Hauptgruppenelemente fällt zeitlich zusammen mit neuen und zum Teil spektakulären experimentellen Forschungsergebnissen aus der Chemie dieser Elemente.

1. Einleitung

Die Molekül-Chemie^[1] der höheren Hauptgruppenelemente hat in den letzten Jahren einen unerwarteten Aufschwung genommen. Hervorgehoben sei die Synthese und Charakterisierung von Verbindungen mit „echten“^[2] Doppelbindungen, an denen Elemente wie Si oder P beteiligt sind^[4–16] und die lange als nicht existenzfähig galten, z. B. SiC^{–[7–9]}, SiSi^{–[10,11]} oder PP-Doppelbindungen^[12–16]. Auch die relativ junge Chemie der Phosphor-Ketten, -Ringe und

-Polycyclen^[17] sei erwähnt, z. B. die Synthese eines substituierten Tetraphosphabicyclobutans^[18], sowie auch Fortschritte in der Chemie von hypervalenten Verbindungen mit „unechten“^[2] Doppelbindungen wie OSF₂^[19], RNSF₄^[20–22], H₂CSF₄^[23] oder sogar Dreifachbindungen wie NSF₃^[24].

Parallel zu diesen Fortschritten auf experimentellem Gebiet hat sich auch die Quantenchemie zunehmend mit den höheren Hauptgruppenelementen befaßt. Dies wurde einerseits durch leistungsfähigere ab-initio-Programme ermöglicht, für welche die große Zahl von Elektronen in den schweren Atomen kein unüberwindliches Hindernis ist, andererseits durch die Vervollkommnung der „Pseudopotentialmethoden“, bei deren Anwendung die Atomrümpfe

[*] Prof. Dr. W. Kutzelnigg
 Lehrstuhl für Theoretische Chemie der Universität
 Postfach 102148, D-4630 Bochum 1