



Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg

Fakultät für Chemie und Pharmazie

**Design, Synthese und Untersuchung  
eines Membrantransporters für acetylierte Aminosäuren**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Christian Urban**  
aus Fulda

Würzburg 2009



Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:



„...Let's Go Exploring!“

(Calvin, 1995)

„You Can't Always Get What You Want“

(Mick Jagger, 1969)



## **Danksagung**

Vor allem möchte ich Herrn Prof. Dr. Carsten Schmuck danken, dass er mir die Dissertation auf einem sehr interessanten Thema ermöglicht hat. Seine ausgezeichnete Betreuung und die anregenden Forschungsgespräche, vor allem aber auch der sehr offene, unkomplizierte und freundschaftliche Umgangston haben mir auch bei wissenschaftlichen Rückschlägen stets Hilfe und Rückhalt vermittelt.

Für die Durchführung der analytischen Messungen möchte ich Dr. Matthias Grüne, Elfriede Ruckdeschel, Dr. Michael Büchner und Fritz Dadrich danken. Weiterhin möchte ich mich bei der Verwaltung und der Werkstatt des Instituts, besonders bei Herrn Markus Braun und Bernd Brunner für äußerst rasche und freundliche Hilfe bei den verschiedensten Problemen bedanken.

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für die freundschaftliche Aufnahme und den sehr kollegialen und hilfreichen Umgang. Von meiner Diplomzeit bis zur Abgabe der Dissertation war hier immer eine Gruppe von tollen Leuten zusammen, mit denen man froh war, sowohl innerhalb als auch außerhalb der Universität seine Zeit verbringen zu dürfen. Besonders erwähnen möchte ich hierbei unsere Wakeboard-Crew und die OC-WG.

Für stets schnelle und kompetente Hilfe bei der Durchführung der HPLC-Experimente danke ich Michael Merschky.

Für das Korrekturlesen meiner Arbeit und viele gute Tipps danke ich außerdem Dr. Volker Bickert, Dr. Uwe Machon, Dr. Thomas Rehm und Peter Wich.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, besonders meinen Eltern und meiner Schwester Stefanie, auf deren geduldige Unterstützung ich stets bauen konnte.



# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Grundlagen.....	6
2.1	Aufbau biologischer Membranen.....	6
2.2	Bewegung von Molekülen durch Membranen.....	9
2.3	Thermodynamik und Kinetik von Transportprozessen.....	14
3	Künstliche Transportsysteme.....	17
3.1	Arten von künstlichen Membranen.....	17
3.1.1	Bulk Liquid Membranes (BLM).....	17
3.1.2	Supported Liquid Membranes (SLM).....	18
3.1.3	Künstliche Lipiddoppelschichten.....	19
3.2	Synthetische Kanäle.....	20
3.3	Mobile synthetische Transporter.....	28
4	Aufgabenstellung.....	41
5	Ergebnisse und Diskussion.....	48
5.1	Synthese des Membrantransporters.....	48
5.1.1	Die elektrophile Esterroute.....	53
5.1.2	Die nukleophile Esterroute.....	60
5.1.3	Die Amidroute.....	63
5.2	Kraftfeldrechnungen.....	68
5.3	Extraktionsversuche.....	73
5.3.1	Versuchsaufbau.....	73
5.3.2	Ergebnisse der Extraktionen mit UV-Auswertung.....	75
5.3.3	Berechnung der Bindungskonstanten aus den Extraktionsdaten.....	78
5.3.4	Ergebnisse der Messungen mit HPLC-Auswertung.....	84

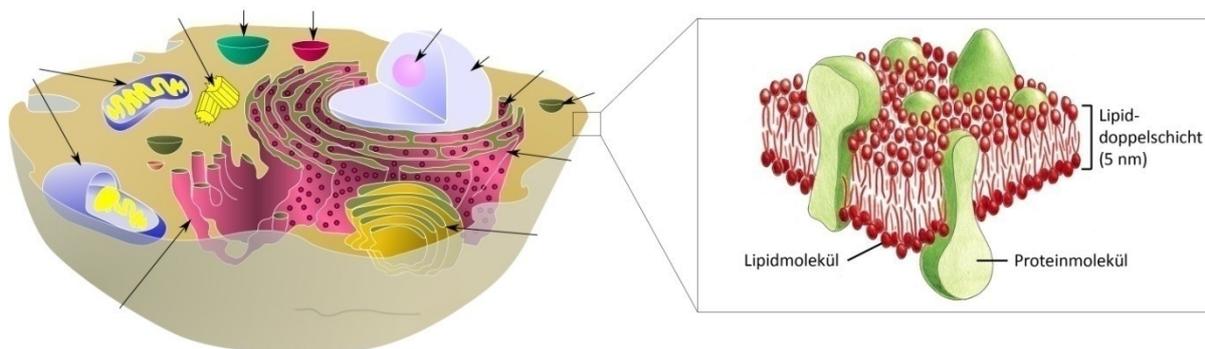
5.4	ITC Experimente .....	90
5.4.1	Wahl der Messmethode .....	90
5.4.2	Grundlagen der ITC.....	92
5.4.3	Ergebnisse der Messungen .....	94
5.5	Transportexperimente .....	102
5.5.1	Versuchsaufbau und Grundlagen .....	102
5.5.2	Ergebnisse der Messungen .....	106
6	Zusammenfassung.....	119
7	Ausblick .....	127
8	Experimentalteil.....	133
8.1	Allgemeiner experimenteller Teil .....	133
8.2	Generelle analytische Methoden .....	135
8.3	Syntheseteil .....	137
8.3.1	Synthese des lipophilen Substituenten.....	137
8.3.2	Synthese des Pyrrolgrundkörpers .....	143
8.3.3	Synthese des kompletten Rezeptors .....	150
8.4	Extraktionsexperimente .....	154
8.5	ITC-Experimente .....	155
8.6	Transportexperimente .....	157
8.7	HPLC-Experimente .....	159
9	Summary .....	162
10	Appendix.....	170
10.1	Literaturverzeichnis.....	170
10.2	Abkürzungsverzeichnis.....	179





# 1 Einleitung

Alle lebenden Organismen bestehen aus Zellen, angefangen bei den einfachsten Einzellern bis hin zu hochentwickelten Tieren oder Pflanzen. Der Aufbau einer Zellmembran aus einer Lipiddoppelschicht hat den ersten einfachen Organismen die Fähigkeit gegeben, die Umgebung um ihre selbstreplizierenden Bausteine, die DNA, zu kontrollieren und sich von der oft lebensfeindlichen Außenwelt abzugrenzen. Bei der Entwicklung von diesen archaischen Lebewesen hin zu multizellulären Organismen entstanden hoch spezialisierte Zellen, die ihrerseits weitere innere Abgrenzungen durch Membranen in kleinere Kompartimente erfuhren. In hochentwickelten Zellen findet man eine Vielzahl verschiedener Membranen, die die Bestandteile der Zelle voneinander abgrenzen (**Abb. 1**).



**Abb. 1** Aufbau einer eukaryotischen Tierzelle. Die Pfeile weisen auf die Bestandteile mit eigener Membran hin. In der Vergrößerung sieht man einen schematischen Ausschnitt der äußeren Zellmembran.<sup>[1]</sup>

Die Membranen der Zellen sind keine undurchdringlichen Barrieren. Einige unpolare Stoffe können das lipophile Innere der Lipiddoppelschicht passieren, während dies für polare oder geladene Teilchen oft nicht möglich ist. Eine Durchlässigkeit der äußeren Zellmembran ist notwendig, da die Zelle energiereiche Stoffe oder für ihren Aufbau wichtige Bausteine aufnehmen muss, um zu funktionieren, während sie gleichzeitig Abfallprodukte und andere Stoffe an die Umgebung abgeben muss. Zudem ist für viele Prozesse, z.B. beim Stoffwechsel oder bei der Reizleitung in Nervenzellen, eine erhöhte Konzentration von bestimmten Stoffen auf einer Seite der Zellmembran notwendig. Zur Regulierung des Durchtritts durch die Zellmembran sowie für die Anreicherung der gewünschten Substanzen gibt es eine Anzahl

von Transportmechanismen, von denen die meisten durch spezialisierte Proteine, sogenannte Carrier oder Translokatoren, ausgeübt werden. Hauptsächlich werden durch diese Transportermoleküle geladene Substanzen befördert, welche die Zellwand sonst meist gar nicht überwinden können, aber auch einige polare Moleküle benötigen Unterstützung beim Eintritt in die Zelle. Die bekanntesten Beispiele für Membrantransporter sind wohl der Kaliumkanal KcsA und die Familie der Wasserkanäle (Aquaporine), für deren Strukturaufklärung der Chemie-Nobelpreis 2003 an *Roderick MacKinnon* und *Peter Agre* vergeben worden ist.<sup>[2]</sup> Aber auch zahlreiche andere Ionen und Moleküle wie Zucker, Aminosäuren oder kleine Peptide, werden durch Transportkaskaden durch die Zellmembranen im Körper geschleust. Dabei kommen sowohl Kanäle als auch mobile Transportermoleküle zum Einsatz.

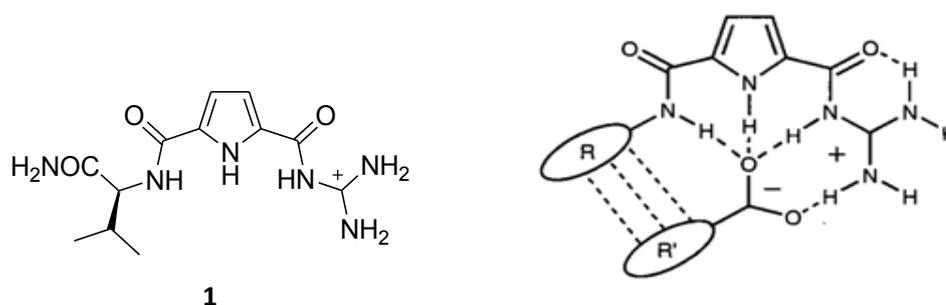
Der Transport von Aminosäuren und Peptiden im Körper ist entscheidend für den Aufbau körpereigener Proteine. Eine Störung des Transports führt zu einer Fehlversorgung des Körpers mit Aminosäuren und kann zu Krankheiten wie der Hartnup-Krankheit führen, die aus einer Unterversorgung mit Tryptophan resultiert. Die körpereigenen Aminosäure- und Peptidtransporter, die vor allem aus der Familie der SLC (solute carrier)- Membrantransporter stammen, sind sehr vielfältig und von ihrem Aussehen und ihrer Wirkungsweise meist noch nicht komplett aufgeklärt.<sup>[3]</sup> Ihre Gemeinsamkeit liegt hauptsächlich in der gleichen Funktion als Transportermoleküle. Eine Ableitung der mechanistischen Funktionsweise aus diesen natürlichen Vorbildern ist deswegen sehr schwierig.

Bei den Transportvorgängen werden die Substrate über nichtkovalente Wechselwirkungen von ihren Trägern gebunden. Dabei treten verschiedene Arten von Wechselwirkungen auf. Die stärksten Kräfte sind hierbei das Auftreten von Salzbrücken zwischen unterschiedlich geladenen Ionen gefolgt von Ionen-Dipol-Interaktionen. Auch Wasserstoffbrückenbindungen und andere Dipol-Dipol-Wechselwirkungen sind bedeutend, besonders in unpolaren Umgebungen wie im Inneren der Zellmembran. Wasserstoffbrückenbindungen sind eine besondere Art von gerichteter Dipol-Dipol-Wechselwirkung, bei denen einer der beteiligten Dipole ein positiv polarisiertes Wasserstoffatom besitzt, während der andere ein freies Elektronenpaar als Akzeptor aufweist. Ein weiterer wichtiger Beitrag sind Stapelwechselwirkungen. Darunter fallen sowohl Kation- $\pi$  als auch die schwächeren  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen. Die schwächsten Wechselwirkungen treten durch Van-der-Waals-Kräfte auf, die durch spontane Polarisierung der Elektronenwolken entstehen. Weniger bedeutend sind hier die hydrophoben Effekte, da die transportierten Substrate meist recht

polar sind. Hydrophobe Effekte sind vor allem bei Komplezierungen in wässrigen Medien bedeutsam und resultieren dort aus der energetisch günstigen Freisetzung von Lösemittelmolekülen.

Eine effektive Bindung eines Substrats durch einen Rezeptor setzt voraus, dass mehrere dieser Wechselwirkungen in einer möglichst kooperativen Weise auftreten. Die Bindungsstellen sollten zudem komplementär sein, sowohl sterisch als auch elektronisch. Dieses Konzept wurde in ursprünglicher Form von *Emil Fischer* 1894 als „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ eingeführt<sup>[4]</sup> und 1958 von *Daniel Koshland* auf das „induced fit“-Konzept erweitert.<sup>[5]</sup> Bei dieser späteren Betrachtungsweise wurden dynamische Konformationsänderungen bei der Bindung miteinbezogen, die dann zum endgültigen Rezeptor-Substrat-Komplex führen. Auf Basis dieser Betrachtungen formulierte *Jean-Marie Lehn* 1979 den Begriff der „Supramolekularen Chemie“ als „chemistry beyond the molecule“, „basierend auf organisierten Anordnungen höherer Komplexität von zwei oder mehr chemischen Spezies, welche von intermolekularen Kräften zusammengehalten werden“. In diesem Teilbereich der Chemie können Bindungsvorgänge untersucht werden, die den physiologischen Erkennungsvorgängen zwischen Substraten und Transportermolekülen ähneln.<sup>[6-10]</sup>

Der Transport von Aminosäuren oder Peptiden durch synthetische Transporter benötigt ein wirksames Bindungsmotiv. Für die effektive Bindung von Carboxylaten, wie sie in Aminosäuren oder Peptiden vorkommen, wurde von *Schmuck* das Guanidiniocarbonylpyrrol-Kation entwickelt.<sup>[11]</sup> Dieses basiert einerseits auf der Bildung eines Ionenpaares zwischen positiv geladener Guanidiniogfunktion und negativ geladenem Carboxylat. Die Bindungsstärke wird zudem durch Präorganisation des Rezeptors, sowie vor allem durch das Auftreten von Wasserstoffbrückenbindungen erhöht, speziell wenn ein zusätzlicher Seitenarm am Pyrrol weitere Wasserstoffbrückenbindungen ermöglicht. Durch zusätzliche Wechselwirkungen im Seitenarm wird zudem die Selektivität des Rezeptors erreicht. So zeigte die Verbindung **1** sehr hohe Bindungskonstanten gegenüber verschiedenen *N*-acetylierten Aminosäuren in einem Bereich von 585 bis 1610 M<sup>-1</sup> in Lösungen von 40% Wasser in DMSO.<sup>[12]</sup>



**Abb. 2** Carboxylatrezeptor nach *Schmuck* (links). Wechselwirkungen des Rezeptors mit einem Carboxylatsubstrat: Es finden sich Ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und zusätzliche Wechselwirkungen zwischen den Resten R und R'; zudem ist der Rezeptor durch die Wasserstoffbrücke zwischen Carbonyl und Guanidiniumfunktion präorganisiert (rechts).<sup>[13]</sup>

In dieser Arbeit wird das Carboxylat-Bindungsmotiv von *Schmuck* zur Entwicklung eines Membrantransporters für Aminosäuren benutzt. Durch die positive Ladung sowie die recht polaren Amidbindungen sind solche Rezeptoren wie z.B. **1** recht gut löslich in wässrigen oder polaren Lösemitteln wie Wasser, DMSO oder Methanol, während sie in unpolaren organischen Solventien wie Chloroform oder Dichlormethan nur geringe Lösungseigenschaften besitzen. Für eine Verwendung als Membrantransporter muss der Rezeptor jedoch besser in organischen Lösemitteln löslich gemacht werden. Wie bei den natürlichen Transportern müssen in den Rezeptor deswegen unpolare Gruppen eingebracht werden, die die polaren Bestandteile vom Lösemittel abschirmen. Ob ein so erzeugter Transporter tatsächlich die gewünschten Fähigkeiten besitzt, hängt von verschiedenen Faktoren ab.

Transportermoleküle müssen sowohl thermodynamisch als auch kinetisch günstige Eigenschaften besitzen. Einerseits muss genügend Affinität zum gewünschten Substrat vorhanden sein, damit es überhaupt zu einer Bindung kommt, dies ist die thermodynamische Voraussetzung. Diese Eigenschaft wird durch die Komplexbildungskonstante über das Massenwirkungsgesetz beschrieben. Experimentell kann die Affinität des Rezeptors zu den Substraten durch Extraktionsexperimente untersucht werden. Transporter hoher Bindungsstärke zeigen hierbei auch höhere Extraktionswerte. Außerdem können Bindungsstudien durch die Untersuchung der Bindungsisotherme von Rezeptor und Substrat aus der Beobachtung verschiedener physikalischer Parameter durchgeführt werden.

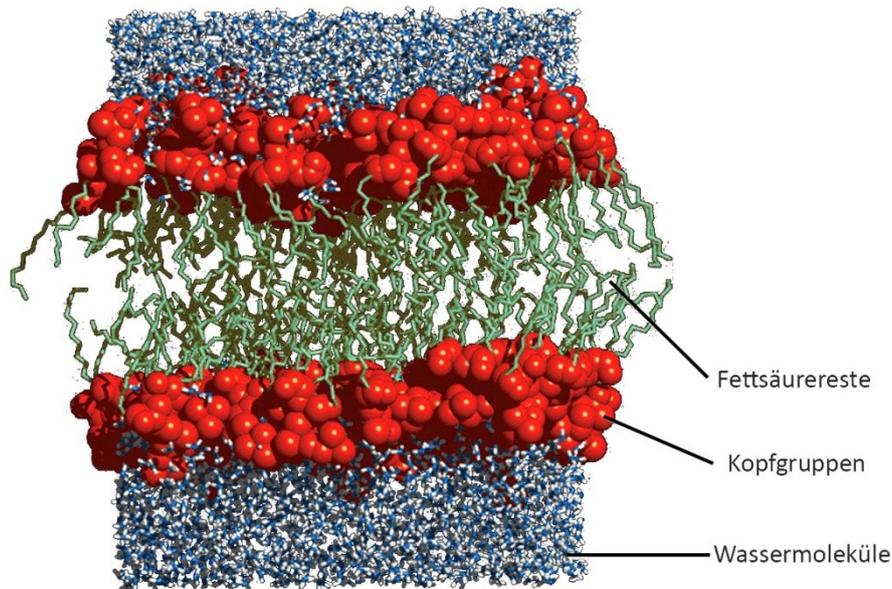
Der zweite Aspekt ist das kinetische Verhalten. Die Dynamik des Transportprozesses spiegelt sich in der Austauschgeschwindigkeit des Rezeptor-Substrat-Komplexes wieder. Diese wird durch die Aktivierungsenergie des Übergangszustandes bei der Komplexbildung und -auflösung bestimmt. Durch Transportversuche lassen sich diese Parameter untersuchen. Substrate, die im Komplex mit dem Rezeptor eine schnelle Austauschgeschwindigkeit aufweisen, werden hierbei hohe Transportraten zeigen.

Bei diesen beiden Betrachtungsweisen ist zusätzlich die Selektivität von Interesse. Eine gleichartige Bevorzugung der verschiedenen Substrate bei den beiden Prozessen ist nicht unbedingt zu erwarten, da bei den thermodynamischen Untersuchungen die Energiedifferenz der Edukte zum Komplex, bei den kinetischen hingegen die Aktivierungsenergien bei der Komplexbildung über die Selektivität entscheiden.

Transporter in biologischen Systemen müssen gute Bindungseigenschaften gegenüber den erwünschten Substraten besitzen, aber gleichzeitig einen schnellen Umsatz durch hohe Transportraten ermöglichen. Ist eine der beiden Voraussetzungen nicht erfüllt, wird kein effektiver Transport stattfinden. Diese Mehrschichtigkeit des Membrantransports sollte sich auch in der Untersuchung eines synthetischen Transporters finden.



Zusammensetzung der Fettsäuren variiert je nach Gewebetyp. Einen starken Einfluss auf die Form des Lipids haben ungesättigte Fettsäuren, die ein allzu starkes Verknäulen der Alkylketten verhindern. Eine zweite wichtige Lipidklasse sind die Sphingolipide, die statt der Phosphatgruppe Aminoalkohole als Kopfgruppe tragen. Auch sie sind amphipatisch. Des Weiteren findet sich Cholesterol als Bestandteil der Zellmembran, das deren Viskosität verändert und die Stabilität erhöhen kann.

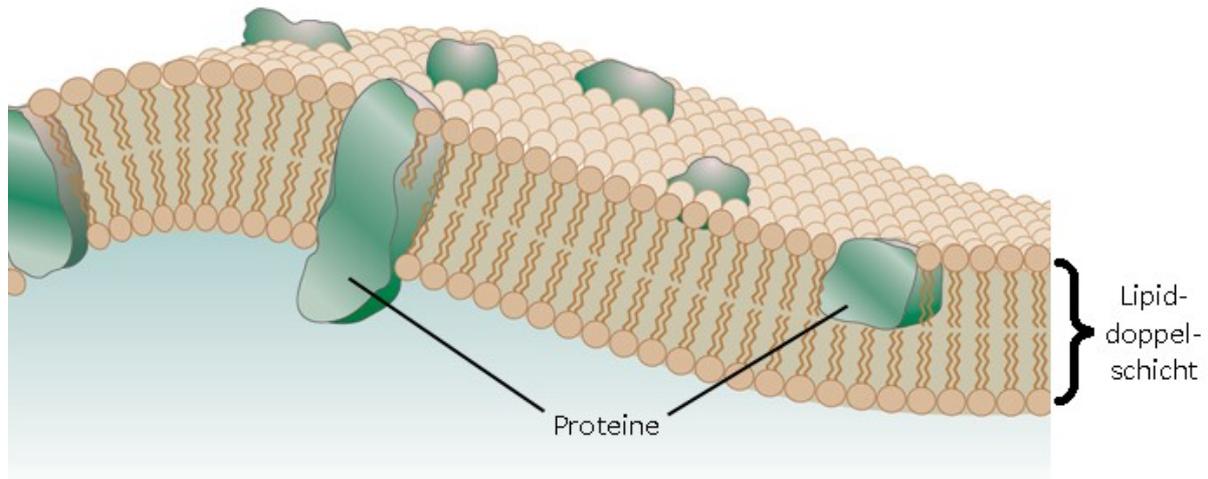


**Abb. 4** Aufbau der Lipiddoppelschicht mit umgebendem Wasser.<sup>[15]</sup>

Die physikochemischen Eigenschaften der Phospholipide bedingen die strukturellen Charakteristika der Zellmembranen. In der Umgebung des Organismus organisieren sie sich in einer Lipiddoppelschicht, bei der sich die polare Kopfgruppe an der Grenzfläche zum wässrigen Medium befindet. Im Inneren der Doppelschicht ordnen sich die Alkylketten gegenüberliegend an und erzeugen ein hydrophobes Inneres (**Abb. 4**). Durch diese unterschiedlichen Wechselwirkungen können sich stabile kugelförmige Vesikel bilden, die man Liposome nennt. Die einzelnen Lipidmoleküle besitzen eine relativ hohe Bewegungsfreiheit auf einer Seite der Doppelschicht, können ohne Hilfe durch ein Transporterprotein jedoch nur schwer auf die andere Seite hinüberwechseln, da dabei die polare Kopfgruppe das hydrophobe Innere der Zellmembran durchqueren müsste.<sup>[17]</sup>

Der zweite Hauptbestandteil der Zellmembran sind Proteine. Hierbei unterscheidet man nach Innigkeit der Verbindung zwischen peripheren und integralen Proteinen. Die Aufgaben der

Membranproteine umfassen u.a. Rezeptoren für Hormone und Wachstumsfaktoren, die Formgebung der Zelle sowie die Ermöglichung von Transmembranbewegungen.



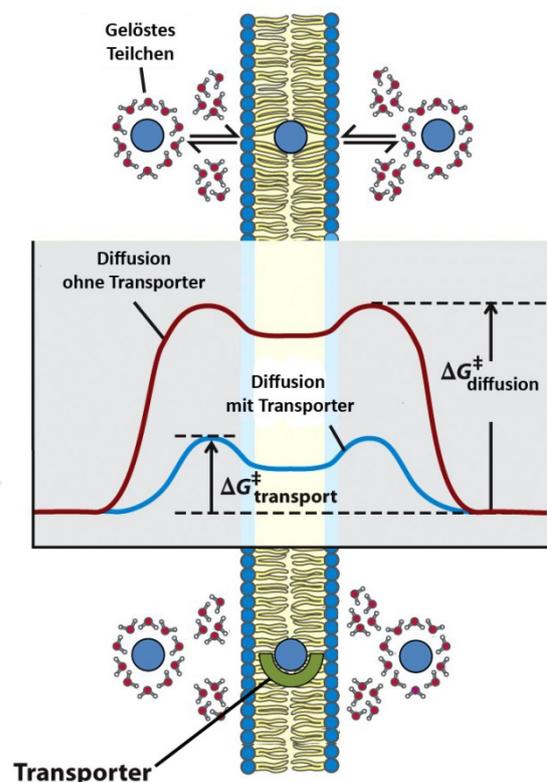
**Abb. 5** Flüssig-Mosaik-Modell der Zellmembran.<sup>[18]</sup>

Die beiden Bestandteile sind verknüpft im Flüssig-Mosaik-Modell (**Abb. 5**). Nach diesem sind die Membranproteine frei beweglich in der Lipidschicht. Dieses Modell lässt die Flüssigkeit und Flexibilität der Zellwände zu, während sie immer noch stabil und undurchdringlich gegenüber den meisten Stoffen bleiben. Die Verbindung zwischen integralen Proteinen und Membran erfolgt mittels eines oder mehrerer hydrophober Transmembransegmente, die in die Doppellipidschicht eingebettet liegen und sie durchspannen. Bei den peripheren Proteinen kann die Verknüpfung an die Membran über Anbindung an ein integrales Protein, elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Phosphatresten der Glycerophospholipide, Verankerung in der Membran durch eine hydrophobe Aminosäuresequenz oder auch durch kovalente Anbindung an ein Glycerophospholipid erfolgen.<sup>[19]</sup>

## 2.2 Bewegung von Molekülen durch Membranen

Für die meisten Moleküle ist es kaum möglich, die Plasmamembran lediglich mittels Diffusion zu überwinden. Dafür verantwortlich zeichnet das hydrophobe Innere der Lipiddoppelschicht, das für polare und besonders ionische Verbindungen eine schwer überwindbare Energiebarriere bedeutet. Zu den wenigen Molekülen, die durch die Membran diffundieren können, gehören vor allem Gase wie  $O_2$ ,  $N_2$ ,  $CO_2$  oder auch Steroide. Etwas langsamer kann auch Wasser die Zellmembran durchqueren. Die Überwindung der Zellmembran ist umso leichter, je lipophiler die Moleküle sind, da sie beim Eintritt in die Zellmembran eine umso weniger starke solvatisierende Hülle von Wassermolekülen abstreifen müssen. Die Energiebarriere kann hierbei einige hundert Kilojoule pro Mol betragen. Die Richtung der Diffusion ist stets entlang des Konzentrationsgradienten und findet solange statt, bis ein Stoffgleichgewicht auf beiden Seiten eingestellt ist. Sie kann nicht zu einer Anreicherung einer Komponente führen.

Zur Verbesserung des Membrandurchtritts und damit zur Erhöhung der Transportgeschwindigkeit bedient sich die Zelle des Prinzips des erleichterten Transports (**Abb. 6**). Dabei unterscheidet man zwischen passivem Transport, der auch erleichterte Diffusion genannt wird, bei dem nur Transport entlang des Konzentrationsgradienten erfolgt, und aktivem Transport, der den Einsatz von Energie benötigt und eine Anreicherung eines Stoffes erreichen kann. Diese Vorgänge werden im Allgemeinen von spezialisierten Proteinen katalysiert.



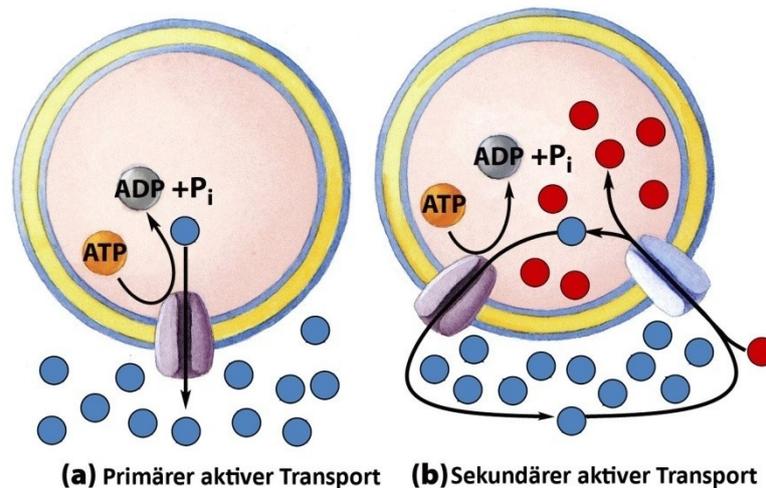
**Abb. 6** Energieprofile von normaler und erleichteter Diffusion.<sup>[15]</sup>

Die Proteine, die den Transport ermöglichen, nennt man Transporter, Translokasen oder Permeasen. Sie unterscheiden sich von sonstigen Enzymen, da sie ihre Substrate chemisch nicht verändern, sondern sie lediglich durch die Zellwand hindurchschleusen. Genauso wie andere Enzyme besitzen sie aber auch eine Spezifität gegenüber ihren Substraten und zeigen eine Sättigungskinetik. Im Vergleich zur normalen Diffusion ist die Geschwindigkeit für den Membrandurchgang stark erhöht, da die Energiebarriere wesentlich geringer ist (**Abb. 6**). Wie Enzyme können auch die Transporterproteine inhibiert werden.

Für die erleichterte Diffusion stehen zwei Arten von Transportern zur Verfügung, Membrankanäle oder Molekültransporter. Membrankanäle sind integrale Proteine, die eine hydrophile Pore durch die Membran aufbauen. Die Kanäle zeigen Spezifität gegenüber ihren Substraten, meist gesteuert durch Ladung und Größe der transportierten Stoffe. Ein Beispiel ist der Kaliumionenkanal, für dessen Strukturaufklärung 2003 der Nobelpreis an *Roderick MacKinnon* vergeben wurde. Der Fluss durch den Kanal kann durch verschiedene Prozesse gesteuert werden, die ihn öffnen und schließen, im Falle des Kaliumkanals ist dies das elektrische Potential.<sup>[2]</sup>

Die zweite Art sind mobile Transportermoleküle, die ihre Substrate ebenfalls nichtkovalent binden, um sie dann aber physikalisch auf die andere Seite der Zellmembran zu bewegen. Oft sind sie hochspezifisch für die zu transportierende Substanz. Sie haben eine deutlich geringere Transportgeschwindigkeit im Bereich von  $10^3$  Molekülen pro Sekunde im Vergleich zu Membrankanälen, welche Geschwindigkeiten bis zu  $10^7$  Molekülen pro Sekunde erreichen. Ein Beispiel für erleichterte Diffusion im Organismus durch einen mobilen Transporter ist der Glucosetransport in Erythrocyten mittels des Transporters GluT1 aus der Familie der SLC-Proteine. Dieser besitzt eine Bindungsstelle für Glucose und kann durch eine reversible Konformationsänderung einen Durchgang in das Zellinnere öffnen.<sup>[19]</sup>

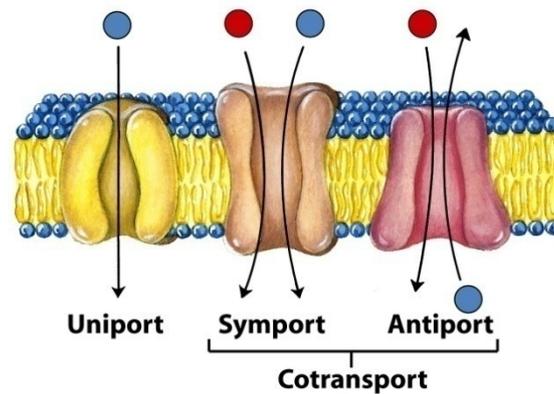
Im Gegensatz zum passiven Transport können beim aktiven Transport Teilchen entgegen ihres Konzentrationsgradienten bewegt werden. Demzufolge ist er energetisch ungünstig und benötigt den Einsatz von Energie. Beim primären aktiven Transport wird die Energie durch eine gleichzeitig ablaufende energetisch günstige Reaktion geliefert, im Organismus meist die Hydrolyse von ATP zu ADP. Beim sekundären aktiven Transport wird der Transport der Substanz an die gleichzeitige Translokation einer anderen Substanz entlang ihres Konzentrationsgefälles gekoppelt, deren elektrochemischer Potentialgradient somit den aktiven Transport antreibt (**Abb. 7**).



**Abb. 7** Unterschiedliche aktive Transportarten im Organismus: a) primärer aktiver Transport, getrieben durch die Hydrolyse von ATP. b) sekundärer aktiver Transport, getrieben durch den elektrochemischen Gradienten des blauen Substrates, dessen Konzentrationsgradient die Triebkraft für den Transport des roten Substrates ist.<sup>[15]</sup>

Das bestuntersuchte Beispiel für den primären aktiven Transport im menschlichen Organismus ist die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  oder auch Natrium-Kalium-Pumpe genannt, für deren Entdeckung 1997 der Nobelpreis für Chemie an *Jens Christian Skou* verliehen wurde.<sup>[20]</sup> Sie bewegt  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  entgegen ihres elektrochemischen Gradienten und verbraucht dabei ATP, welches zu ADP umgewandelt wird. Das Enzym ist ein sogenannter Antiport, da es zwei verschiedene Moleküle in unterschiedliche Richtungen transportiert (**Abb. 8**). Die Phosphorylierung einer Aspartatgruppe durch ATP führt hierbei zu einer Konformationsänderung des Enzyms, die den Transport der Ionen einleitet.

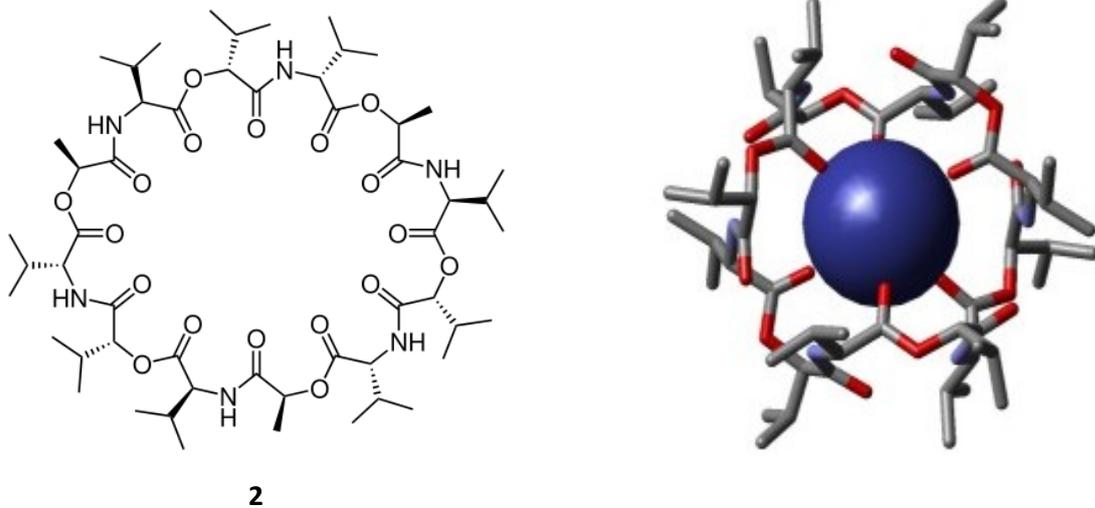
Der sekundäre aktive Transport erfolgt in biologischen Systemen meist durch Cotransport, bei dem zwei Teilchen gleichzeitig bewegt werden. Bei Bewegung in die gleiche Richtung spricht man noch genauer von Symport, bei unterschiedlichen Richtungen von Antiport (**Abb. 8**). Der Natrium-Glucose-Transporter in den menschlichen Darmepithelzellen beispielsweise benutzt den zuvor aufgebauten Natriumgradienten, um Glucose mittels eines Symports in körpereigene Zellen zu pumpen. Das elektrochemische Potential der Natriumionen erlaubt es dabei, Glucose bis zur 30,000fachen Konzentration gegenüber dem Darminneren anzuhäufen. Aus der Epithelzelle können die Glucosemoleküle anschließend mittels passiven erleichterten Transports ins menschliche Blut übertreten. Dies geschieht nun über einen enzymatischen Uniport, der genau eine Art von Teilchen, hier Glucose, in eine beliebige Richtung passiv transportiert (**Abb. 8**).



**Abb. 8** Verschiedene Arten von Transport, nach Anzahl und Richtung der Substrate unterschieden.<sup>[15]</sup>

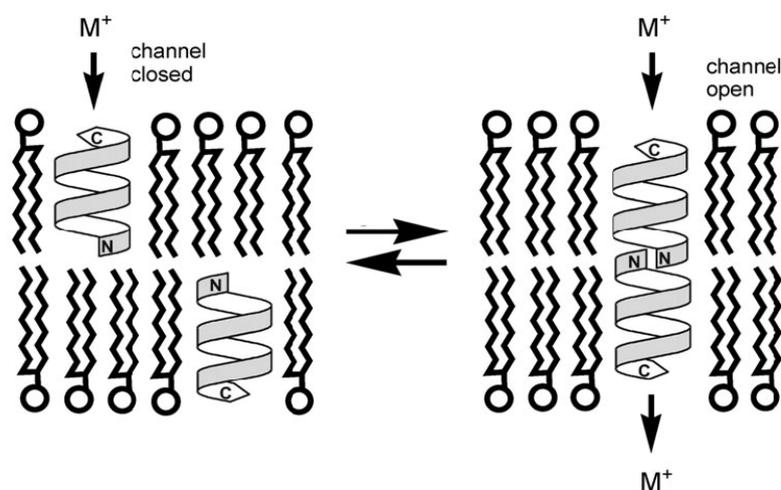
Eine Klasse von bakteriellen Transportermolekülen sind die Ionophore, übersetzt Ionenträger. Auch bei ihnen gibt es sowohl mobile Transporter als auch Kanalbildner, jedoch sind sie deutlich kleinere Moleküle, oft Polypeptide oder davon abgeleitete Strukturen. Im Organismus wirken sie antibiotisch. Diese Moleküle erhöhen den Fluss von zumeist Kationen und lassen dadurch das Membranpotential zusammenbrechen, was zum Zelltod führt.<sup>[21]</sup>

Ein bekanntes Ionophor ist das Valinomycin **2**, das einem Kronenether ähnelt (**Abb. 9**). Es ist ein Cyclodepsipeptid, das nach außen hin sechs Isopropylgruppen trägt, welche für die Löslichkeit in der Zellmembran sorgen, während die Sauerstoffatome der Carbonylgruppen der Valinreste zum Inneren hin zeigen. Dadurch entsteht für  $K^+$  eine passende oktaedrische Koordinationsumgebung, während der Hohlraum zu groß ist, um  $Na^+$ -Ionen effektiv zu koordinieren. Das Resultat ist eine um den Faktor 10,000 größere Selektivität für Kaliumionen. Ein einzelnes Molekül Valinomycin kann dabei bis zu  $10^4$  Kaliumionen pro Sekunde durch die Zellwand schleusen. Dies ist ein elektrogener Prozess, der als Uniport Ionen nur in eine Richtung bewegt.<sup>[21]</sup>



**Abb. 9** Natürlicher Ionophor Valinomycin (links). Valinomycin-Kalium-Komplex (rechts).

Als Beispiel für kanalbildende Ionophore sei auf die Familie Gramicidine verwiesen (**Abb. 10**). Diese finden in der Medizin als Antibiotika Anwendung. Die Gramicidine sind lineare Pentadecapeptide aus alternierenden *L*- und *D*-Aminosäuren. In der Zellmembran dimerisieren sie in einer Schwanz-zu-Schwanz-Anordnung, wodurch eine  $\beta$ -Helix mit ca. 4 Å Durchmesser entsteht. Sie formt eine membrandurchspannende Pore, deren innere Kavität den Durchtritt von  $K^+$  und  $Na^+$ -Ionen in einer Geschwindigkeit im Bereich der körpereigenen Membrankanäle erlaubt.<sup>[14]</sup>



**Abb. 10** Gramicidin bildet einen dimeren Ionenkanal für  $Na^+$  und  $K^+$ .<sup>[22]</sup>

Die thermodynamischen und kinetischen Gesetze, die den beschriebenen Transportprozessen im Organismus zugrunde liegen, sollen im folgenden Kapitel behandelt werden.

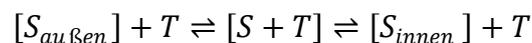
## 2.3 Thermodynamik und Kinetik von Transportprozessen

Das grundlegende Prinzip für die thermische Eigenbewegung von Teilchen ist die Diffusion. Sie führt zur Entropieerhöhung und ist damit nach dem zweiten Hauptsatz der Thermodynamik ein freiwillig ablaufender Prozess. Für normale und erleichterte Diffusion in einem isothermalen und isobaren System gilt das erste Ficksche Diffusionsgesetz:

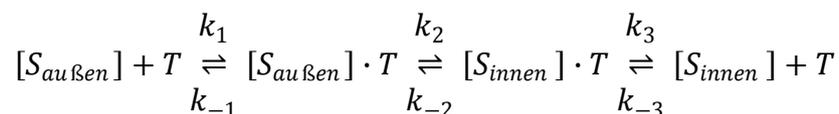
$$J = -D \left( \frac{\delta c}{\delta x} \right)$$

wobei J die Bewegungsrate pro Flächeneinheit in mol/(m<sup>2</sup>s), D der Diffusionskoeffizient in mol/m<sup>2</sup> und  $\frac{\delta c}{\delta x}$  der chemische Konzentrationsgradient in mol/m<sup>3</sup> ist. J wird auch chemischer Flux genannt.

Bewegungen, die durch Transporter katalysiert werden, kann man ähnlich wie enzymatische Reaktionen beschreiben, nur dass dabei keine Reaktion, sondern Translokation stattfindet. Kinetisch lässt sich der passive Transport nach folgender Gleichung beschreiben:



Spezieller gilt für mobile Transportermoleküle:

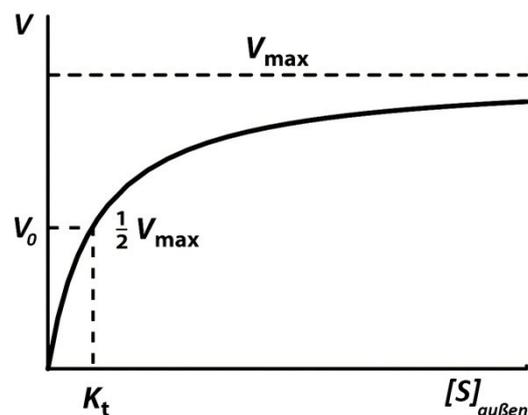


wobei S das Substrat außerhalb und innerhalb der Zelle, T der Transporter und k<sub>1</sub>, k<sub>-1</sub> und so fort die vorwärts, beziehungsweise rückwärts gerichteten Geschwindigkeitskonstanten der verschiedenen Schritte sind.

Aus der Gleichung kann man die Geschwindigkeitskonstanten des Prozesses ableiten. Es ergibt sich ein Ausdruck, der ähnlich der Michaelis-Menten-Gleichung für enzymatische Reaktionen ist (**Abb. 11**):

$$V_0 = \frac{V_{max} [S_{au\beta en}]}{K_t + [S_{au\beta en}]}$$

wobei  $V_0$  die Anfangsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt  $t = 0$  und  $K_t$  eine Konstante wie die Michaelis-Menten-Konstante, eine Kombination der verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten ist. Man erhält über die Gleichung die Anfangsgeschwindigkeit des Transports, wenn die Konzentration an Substrat im Inneren gleich Null ist. Die Kinetik enthält eine Maximalgeschwindigkeit  $V_{\max}$ , die sich deswegen ergibt, da es eine begrenzte Anzahl von Transportmolekülen gibt (**Abb. 11**). Wie bei enzymatischen Reaktionen gibt es auch hier nach einer kurzen Einstellphase, in der sich der Rezeptor-Substrat-Komplex bildet, eine längere Phase konstanter Transportgeschwindigkeit, das Fließgleichgewicht oder „steady state“. Da keine chemischen Bindungen gebildet oder gelöst werden, ist der Prozess vollständig reversibel.



**Abb. 11** Erleichterter Transport kann ähnlich der Michaelis-Menten-Gleichung dargestellt werden.

Transport entgegen eines Konzentrationsgefälles ist im Unterschied zur Diffusion entropisch ungünstig. Beim aktiven Transport verändert sich die freie Energie für ungeladene Moleküle:

$$\Delta G_t = -RT \ln \left( \frac{c_1}{c_2} \right)$$

wobei  $R$  die Gaskonstante ist,  $T$  die Temperatur und der Transport von einem Kompartiment mit der Konzentration  $c_1$  zu einem der Konzentration  $c_2$  führt. Für geladene Teilchen erweitert sich der Term zu:

$$\Delta G_t = ZF\Delta\psi - RT \ln \left( \frac{c_1}{c_2} \right)$$

wobei  $Z$  die Ladung des Ions,  $F$  die Faraday-Konstante und  $\Delta\psi$  das elektrische Potential an der Membran ist. Aus diesem Zusammenhang kann durch Umformung nach  $\Delta\psi$  die Nernst-

Gleichung abgeleitet werden, die u.a. für die Bestimmung des Ruhemembranpotentials benutzt wird.

Im Zusammenhang mit Transportvorgängen bezeichnet  $\Delta G_t$  die freie Energie, die pro Mol transportiertem Substrat aufgebracht werden muss. Beispielsweise ergibt sich für die Anreicherung der Glucosemoleküle in den Darmepithelzellen auf den 30,000fachen Wert im Vergleich zum Darmlumen bei 37 °C somit eine Veränderung der freien Energie von ca. 26.6 kJ/mol.

Auf Grundlage der biologischen Vorbilder und unter Berücksichtigung der thermodynamischen und kinetischen Grundlagen wurden verschiedene künstliche Transportsysteme entwickelt, die im nächsten Kapitel beschrieben werden.

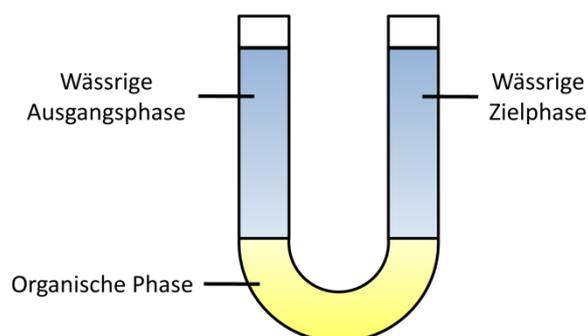
### 3 Künstliche Transportsysteme

Synthetische Transportermoleküle werden seit einigen Jahrzehnten in der supramolekularen Chemie untersucht. Wie in der Natur versucht man, selektiven und schnellen Transport zu erreichen. Da Membrantransport ein dynamischer Prozess ist, sind sowohl thermodynamische als auch kinetische Aspekte zu beachten. Entsprechend den biologischen Vorbildern gibt es mobile Transporter und Kanalbildner. Die höheren Fluxraten erreicht man normalerweise mit Kanälen, während die mobilen Transportermoleküle eine höhere Selektivität für spezifische Moleküle oder Molekülarten aufweisen. In diesem Kapitel werden die verschiedenen Herangehensweisen erläutert und es werden einige Beispiele aus der Literatur vorgestellt. Bei diesen Untersuchungen des Transports wird die biologische Membran auf verschiedene Arten simuliert, die im Folgenden beschrieben werden.

#### 3.1 Arten von künstlichen Membranen

##### 3.1.1 Bulk Liquid Membranes (BLM)

Bulk Liquid Membranes (BLM) bestehen aus einem Gefäß mit Ausgangs- und Zielphase, die durch eine damit unmischbare organische Phase getrennt sind. Der normale Aufbau für derartige Experimente ist das U-Rohr (**Abb. 12**). Bei organischen Lösemitteln, die eine höhere Dichte aufweisen als Wasser, befindet sich die organische Phase in der Biegung und die beiden wässrigen Phasen in den Armen links und rechts. Ein Aufbau mit Lösemitteln, die leichter sind als Wasser, in einem umgekehrten U-Rohr ist ebenfalls denkbar, wird aber seltener verwendet.

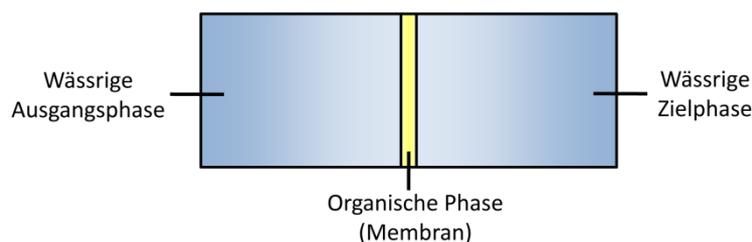


**Abb. 12** Aufbau eines U-Rohr-Experiments.

Mit diesem Aufbau können ausschließlich mobile Transporter untersucht werden. Vorteile der U-Rohr-Versuche sind der geringe Versuchsaufwand, freie Auswahl des organischen Lösemittels und wenig Einschränkungen für die Eigenschaften der Transportermoleküle. Z.B. wird auch eine gewisse Löslichkeit der Rezeptoren im wässrigen Medium toleriert, ohne dass die Transportkapazität sinkt. Nachteilig ist die relativ große Distanz zwischen den beiden wässrigen Phasen, sowie bedingt durch die röhrenartige Form eine schlechte Durchmischung der Phasen. Dies muss durch Rühren ausgeglichen werden. Durch kleine Unterschiede im Versuchsaufbau und andere Einflüsse auf die Experimente ergeben sich Schwankungen der Resultate im Bereich von  $\pm 20\%$ . Für erste Untersuchungen von neuen Transporterklassen ist dies meist aber trotzdem die Methode der Wahl.<sup>[23]</sup>

### 3.1.2 Supported Liquid Membranes (SLM)

Auch bei Supported Liquid Membranes (SLM) sind die drei grundlegenden Bestandteile vorhanden, also Ausgangs-, Zielphase und organische Phase mit Transporter und auch sie sind nur für mobile Transporter geeignet. Die organische Phase ist hier jedoch in den Poren einer makroporösen ( $0.1 - 1.0\ \mu\text{m}$ ) Polymermembran einer Dicke von  $10 - 100\ \mu\text{m}$  enthalten (**Abb. 13**).



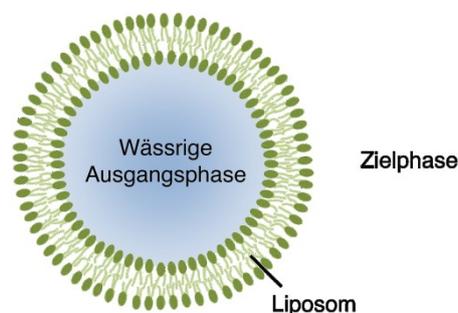
**Abb. 13** Aufbau einer Supported Liquid Membrane. Die organische Phase ist in einer Membran enthalten, die die beiden wässrigen Phasen voneinander trennt.

Man erhält insgesamt einen kleinen und robusten Versuchsaufbau mit einer großen Oberfläche der organischen Phase und einer geringen absoluten Menge an eingesetztem Carriermolekül. Die Ergebnisse sind gut reproduzierbar, das System stellt aber mehr Ansprüche an die verwendeten Transporter. Die Lösemittel sind auf wenige sehr unpolare

Vertreter beschränkt, was oft Löslichkeitsprobleme für weniger lipophile Transporter bedeutet. Zusätzlich darf der Transporter nicht in die wässrige Phase übertreten, da dies mit einem Verlust an Transportaktivität einhergeht. Zur Erhöhung der Stabilität kann man die organische Phase plastifizieren, was zu einer gelartigen Struktur der organischen Phase führt, man erhält sogenannte Polymer Inclusion Membranes (PIM). Durch die erhöhte Viskosität der organischen Phase sinkt die Transportgeschwindigkeit, auf der anderen Seite wird aber der Transporter besser in der Membran festgehalten.<sup>[23, 24]</sup>

### 3.1.3 Künstliche Lipiddoppelschichten

Den realen biologischen Systemen kommt man am nächsten durch den Einsatz von Liposomen oder Vesikeln, die aus Lipiddoppelschichten bestehen. Diese erhält man, indem man Lipide nach Zugabe des Transporters im wässrigen Medium mit Ultraschall dispergiert. Dadurch kann man unilamellare Vesikel mit einem Durchmesser von 0.02 – 0.5  $\mu\text{m}$  erhalten (**Abb. 14**).



**Abb. 14** Aufbau eines unilamellaren Vesikels. Im Inneren, der Ausgangsphase, befinden sich die Substrate, die durch das Liposom, das hier die organische Phase darstellt, in die äußere Zielphase gelangen.

Nun wird die äußere wässrige Lösung ausgetauscht, während im Inneren der Vesikel das Substrat zurückbleibt. Durch ionenselektive Elektroden, selektive Farbstoffe o.ä. kann der Austritt der transportierten Spezies verfolgt werden. Diese Methode ist sowohl für carrierbasierte als auch kanalbildende Transporter geeignet. Das Transportermolekül darf bei diesen Versuchen jedoch nicht die Lipidmembran zerstören, also als Detergenz wirken.

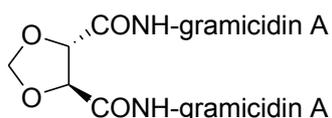
Im folgenden Kapitel sollen nun einige Vertreter von synthetischen Membrantransportern vorgestellt werden, die diese verschiedenen Versuchsanordnungen nutzen.

### 3.2 Synthetische Kanäle

Bei den kanalbildenden Transportmolekülen finden sich generell zwei Arten von Transportern. Man unterscheidet zwischen monomeren Kanälen, die die komplette Membran durchspannen, und auf der anderen Seite selbstassoziiierenden porenbildenden Molekülen, die sich erst in der Membran durch Selbstassoziation aus mehreren Teilen aufbauen. Als Substrate findet man hauptsächlich einfache Ionen wie Alkalimetalle oder Halogene. Da besonders für die Kationenkanäle zahlreiche verschiedene Arten von Kanälen entwickelt worden sind, soll hier nur ein kurzer Überblick über die verschiedenen Ansätze für synthetische Kanäle gezeigt werden und an einigen Beispielen verdeutlicht werden. Für umfassendere Beschreibungen sei auf einige der zahlreichen Übersichtsartikel verwiesen.<sup>[25-32]</sup>

Anfangs wurden vor allem Kationenkanäle untersucht, Anionenkanäle rückten erst in jüngerer Zeit ins Zentrum des Interesses. Frühe Untersuchungen haben sich vor allem an den natürlichen Vorbildern orientiert, zum Beispiel wurden strukturelle Veränderungen des natürlichen Ionenkanals Gramicidin A vorgenommen.

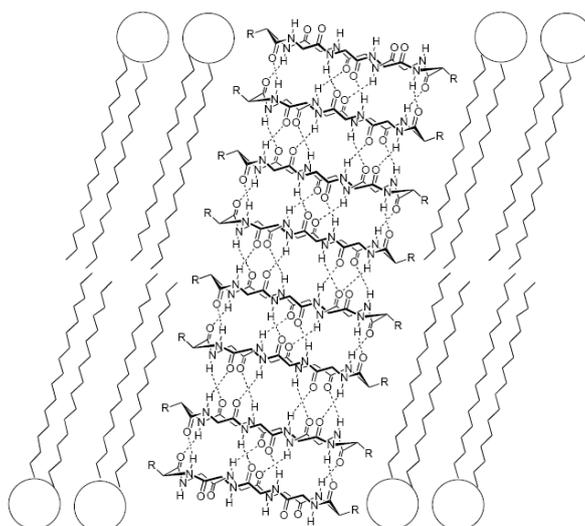
In einer Arbeit von *Heinemann* und *Schreiber* wurde das Gramicidin A-Monomer mittels eines geschützten Weinsäurebausteins an seinem *N*-Terminus mit einem zweiten Gramicidin A Monomer verknüpft (**Abb. 15**). Das so erhaltene kovalente Dimer **3** zeigte in Leitfähigkeitsuntersuchungen an Lipidmembranen Kationentransport und belegte damit den postulierten Aufbau des Membrankanals.<sup>[33, 34]</sup>



**3**

**Abb. 15** Kovalentes Gramicidin-Dimer von *Heinemann* und *Schreiber*.

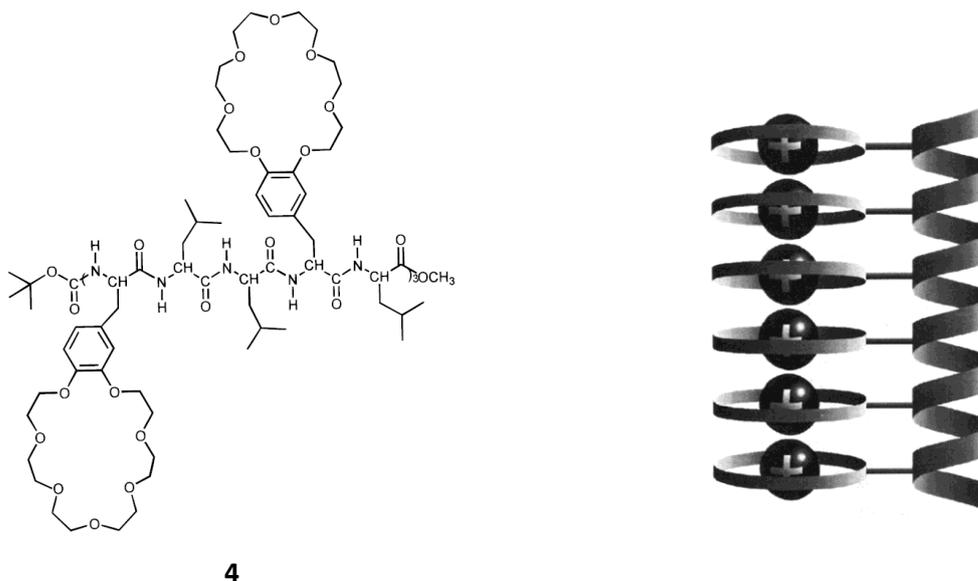
Mit peptidischen Ausschnitten aus Membrantransportproteinen konnten einige funktionierende synthetisch erzeugte Kanalbildner dargestellt werden.<sup>[35]</sup> Aber auch Peptide, die nicht aus natürlich vorkommenden Translokasen stammen, wurden erfolgreich verwendet. *Ghadiri* konnte mit cyclischen  $\beta$ -Tetrapeptiden durch röhrenförmige Stapelung Nanoröhren erzeugen, die hohe Leitfähigkeit für Protonen und  $K^+$ -Ionen aufwiesen (**Abb. 16**). Die Flussrate für  $K^+$  war sogar höher als die von Gramicidin A. Die Höhe der Flussraten sowie IR-Untersuchungen der Aggregate legten nahe, dass nicht mobiler Transport vorlag, sondern tatsächlich, wie durch Rechnungen untermauert, Röhren entstanden waren.<sup>[36-38]</sup>



**Abb. 16** Modell des Ionenkanals durch Stapelung von  $\beta$ -Tetrapeptiden von *Ghadiri*. Die Reste R sind Isopropyl oder 3-Methylenindol.<sup>[39]</sup>

Durch die Kombination von helixbildenden Peptiden und Kronenethern konnten ebenfalls leitfähige Kanäle erhalten werden. Von *Voyer* wurde eine  $\alpha$ -Helix aus einem Peptid von fünfzehn *L*-Leucinen und sechs 21-Krone-7-*L*-Phenylalaninen **4** erzeugt, wobei diese nichtnatürliche Aminosäure in jeder vierten Position eingesetzt wurde.<sup>[40]</sup> Da die Helix damit gerade eine volle Drehung vollzogen hat, ordneten sich die Kronenether genau übereinander an und erlaubten so den Durchtritt von Kationen (**Abb. 17**). Leucinreste waren gewählt worden, da sie eine hydrophobe Außenseite erzeugen, sowie eine generelle Neigung zu  $\alpha$ -Helices aufweisen. Da 21-Krone-7 eine mittelstarke Affinität zu Alkali-Metall-Ionen aufweist, konnte Leitfähigkeit für alle Alkali-Ionen sowie Protonen in unilamellaren Vesikeln beobachtet werden. Der Vergleich mit natürlichem Gramicidin A zeigte ähnliche Transportgeschwindigkeiten bei der Untersuchung von Cäsiumionen. Die Leitfähigkeit hing hierbei von der Anzahl der Aminosäurereste des Peptids, erst ab einer gewissen Länge schien

die Helix die Membran durchspannen und einen Kanal bilden zu können.<sup>[41]</sup> An diesem Beispiel wird besonders der dynamische Aspekt von synthetischen Transportern deutlich. Eine zu hohe Bindungskonstante des Kronenethers zu den transportierten Kationen würde den Austausch bzw. den Durchtritt der Substrate zu langsam machen, während eine zu geringe Bindungskonstante eine zu hohe Energiebarriere des Membrandurchtritts bedeuten würde.

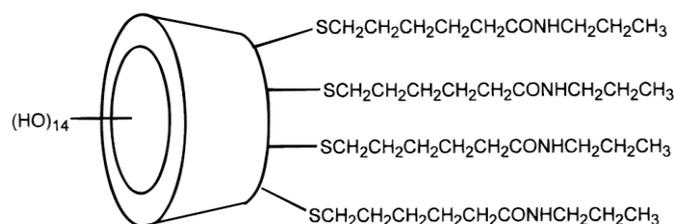


4

**Abb. 17** Kronenetheroligopeptid von *Voyer* (links), das durch Helixbildung einen kationenleitenden Kanal aufbaut (rechts).<sup>[42]</sup>

Nichtpeptidische Kationenkanäle wurden schon sehr früh hergestellt, noch bevor genaue Analysen der biologischen Kanalbildner veröffentlicht waren. Dennoch ähneln sie in ihrer Konzeption den natürlichen Vorbildern in wichtigen Punkten, vor allem in der Bereitstellung von regelmäßigen Koordinationsstellen. Ein frühes Beispiel ist der  $\beta$ -Cyclodextrin-basierte nichtpeptidische Kationenkanal **5** von *Tabushi* (**Abb. 18**). Die 14 nach außen weisenden Hydroxygruppen dieses Cyclodextrins sollten dabei dem wässrigen Medium zugewandt sein, während vier der inneren Gruppen durch Thioether-Gruppen mit aliphatischen Resten mit einer Amidbindung ersetzt worden waren. Die freien Elektronenpaare am Schwefel und am Sauerstoff ermöglichten dabei in gleichmäßigen Abständen von 6-10 Å die Komplexbildung von hindurchgeschleusten Kationen, die durch die Mitte des Cyclodextrinrings in den Kanal eingetreten waren. Der vollständige Kanal wurde durch das Zusammentreten von zwei Monomeren oder „Halbkanälen“ gebildet, da dann eine Länge von ungefähr 48 Å erreicht wurde, was die Lipiddoppelschicht somit durchspannen konnte. Der gemessene Transport von

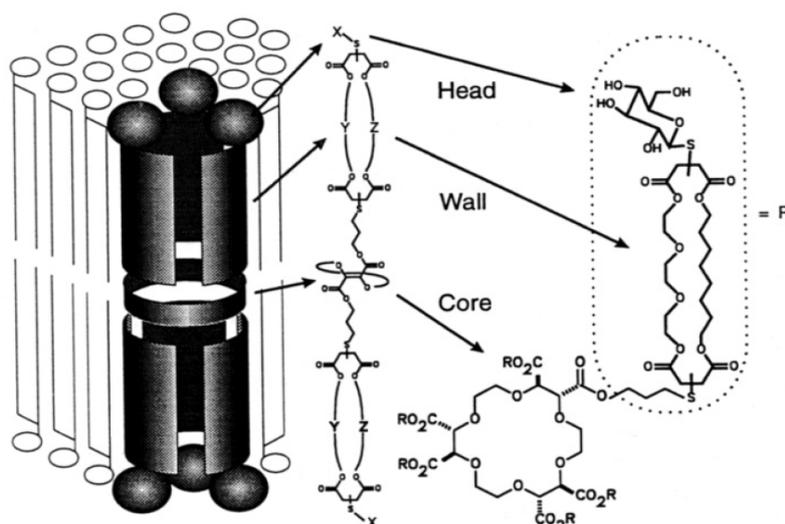
Cobalt- und Kupferionen war um eine Größenordnung schneller als der Vergleichswert mit 18-Krone-6 als Transporter.<sup>[43]</sup>



5

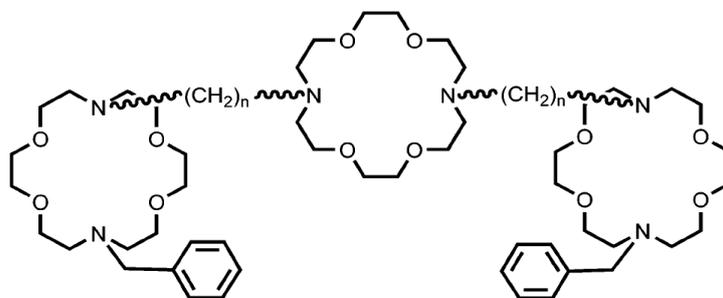
**Abb. 18** *Tabushis* künstlicher Kationenkanal aus tetrasubstituierten Cyclodextrinen.<sup>[44]</sup>

Spätere nichtpeptidische Kationenkanäle konzentrierten sich vor allem auf biologisch relevante Substrate wie  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ . Eine häufig zu beobachtende Strategie war das Vorhandensein eines zentralen Gerüsts, das für die röhrenartige Form sorgen sollte, meist ein Kronenether oder Cyclodextrin. In einer Arbeit von *Fyles* wurde als zentrales Gerüst 18-Krone-6 eingesetzt, an welches als „Wände“ des Kanals in beide Richtungen orthogonal zum Kronenether zweisträngige, cyclische Bolaamphiphile angebunden wurden (**Abb. 19**). Diese Bolaamphiphile wurden in Anzahl (von zwei bis zu sechs), Länge, als auch in Polarität (durch zunehmendes Einfügen von Ethylenoxy-Einheiten) variiert. Vor allem durch Variation der Anzahl der Wandmoleküle veränderte der Transporter sein Verhalten von Kanal zu mobilem Transporter, bei zwei „Wänden“ fand sich ausschließlich mobiler Transport, während bei vier oder sechs bis auf eine Ausnahme nur kanalartiges Verhalten beobachtet wurde. Ein weiteres Resultat war, dass der Ionentransport umso schneller war, je weniger polar die Reste zwischen den Koordinationsstellen waren, das heißt je weniger Ethylenoxyeinheiten enthalten waren. Wenige Koordinationsstellen in regelmäßigen Abständen schienen also einer ständigen Koordinationsumgebung bzw. einer zu hohen Polarität, vorzuziehen zu sein.<sup>[45-47]</sup>



**Abb. 19** Ionenkanalmimetika mit zentralem Gerüst und Bolaamphiphilen als Wände von *Fyles*. Die Anzahl und Art der Reste R wurden wie im Text beschrieben variiert.<sup>[48]</sup>

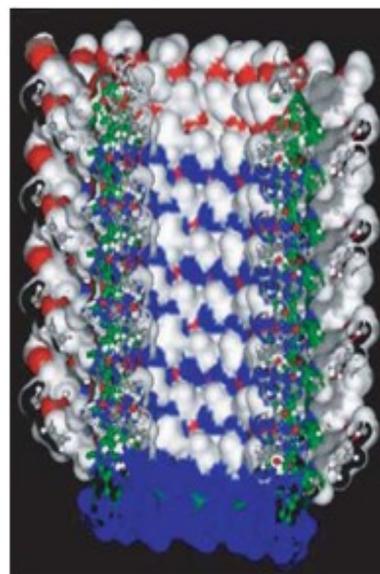
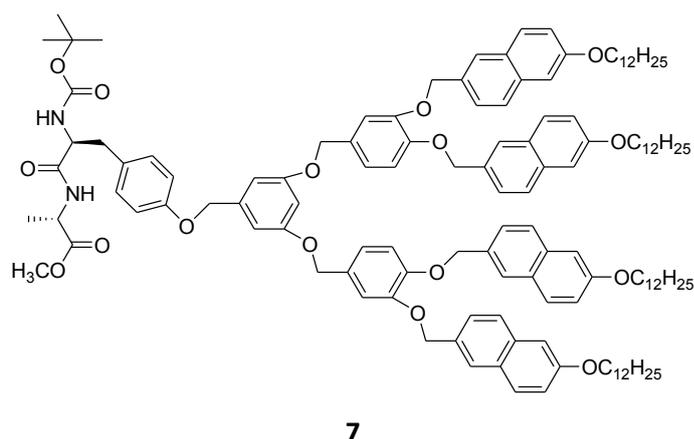
Eine ähnliche Herangehensweise findet man in Arbeiten von *Gokel*, dessen Kationenkanäle kein zentrales Gerüst, sondern Ein- und Ausgangsportale, verbunden mit einem zentralen „Relais“ aufwiesen. Die Portale sowie das Relais bestanden hierbei aus Aza-Kronenthermen (**Abb. 20**). Die „Hydraphile“ genannten Verbindungen erreichten bis zu 27 % der Transportgeschwindigkeit von Gramacidin A. Durch Variation ihrer Spacerlänge konnten in Versuchen mit verschiedenen Liposomarten sowie mit lebenden *Escherichia Coli* Bakterien optimale Transportbedingungen bestimmt werden. Die besten Ergebnisse, abhängig von der Art des Liposoms, wurden bei Spacereinheiten zwischen C<sub>12</sub> und C<sub>16</sub> erreicht, was einer Gesamtmoleküllänge von 38-48 Å entspricht. Man sieht, dass relativ wenige Koordinationsstellen, hier nur eine einzige im Inneren der Membran, für passablen Kationentransport ausreichen.<sup>[49-51]</sup>



6

**Abb. 20** „Hydraphile“ variabler Länge mit zwei Portalen und zentralem Relais von *Gokel*.<sup>[52]</sup>

Auf Grundlage des dendritischen Dipeptids **7** erreichte *Percec* den Aufbau von wasser- und protonenleitenden Poren. Aus dem Monomer, das im dendritischen Gerüst vor allem aus Benzylethern bestand, baute sich ein Kanal aus übereinanderliegenden Scheiben auf, die aus Schichten von circa. 12 Monomeren bestanden. Treibende Kraft waren hydrophobe Effekte und  $\pi$ -Stacking, besonders bei den weiterentwickelten Dendrimern mit Naphtyl- statt Benzylgruppen in der Peripherie. Dadurch wurde eine zentrale Pore aufgebaut, die von den Dipeptidresten gesäumt war, was eine hydrophile Umgebung erzeugte. In Experimenten an Phospholipidmembranen konnte der Transport von Protonen mit pH-sensitiven Farbstoffen und von Wassermolekülen durch osmotische Untersuchungen nachgewiesen werden. Die Pore war undurchdringlich für andere Kationen und Chloridionen.<sup>[53-55]</sup>

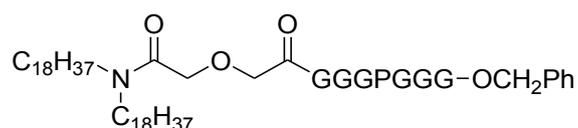


**Abb. 21** Dendritisches Dipeptid von *Percec* (links) zum Aufbau einer hydrophilen Pore, dargestellt durch Molecular Modelling (rechts).<sup>[56]</sup>

Für anionentransportierende Kanäle sind in der Literatur weniger Beispiele beschrieben, die auch zeitlich deutlich später liegen als die bisher besprochenen Kationenkanäle. Auch hier gibt es sowohl peptidbasierte Ansätze, die sich meist an natürlichen Beispielen orientieren, als auch rein synthetische Transporter.

Ein Beispiel für einen peptidbasierten Anionenkanal stammt von *Gokel* und *Schlesinger*. In den Strukturen der ClC-Familie von Chloridkanälen findet sich ein hochkonservierter Prolinrest im Selektivitätsfilter des Eintrittsportals. Davon ausgehend wurde ein Heptapeptid entworfen, das je drei Glycinreste auf beiden Seiten eines Prolinrestes trug (**Abb. 22**). Dieses

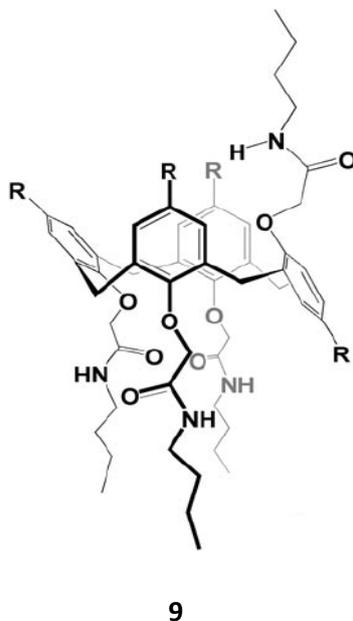
wurde über diglykolische Säure mit langen Kohlenstoffresten verbunden, die das Strukturmotiv in der Lipidschicht verankern sollten. Experimente an unilamellaren Liposomen zeigten einen konzentrations- und spannungsabhängigen Fluss von Chlorid mit einer Selektivität von  $\text{Cl}^-/\text{K}^+$  von  $>10:1$ . Mutmaßlich wurde aus zwei der Transportmoleküle eine 6-7 Å lange Pore aufgebaut, während die Kohlenwasserstoffreste die Phospholipidmembran hinreichend störten, um den Chloridtransport zu ermöglichen.<sup>[57]</sup>



## 8

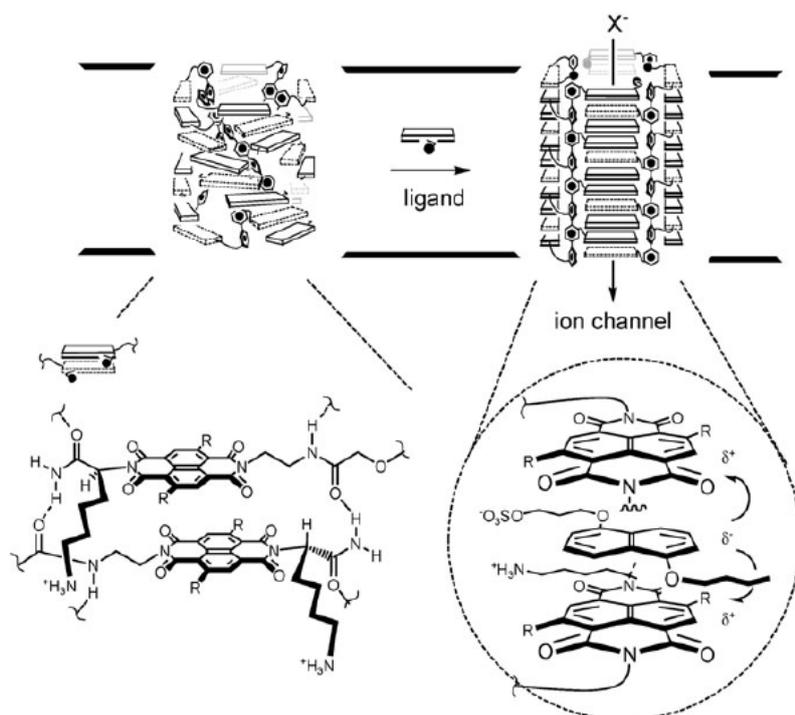
**Abb. 22** Synthetischer Membrantransporter für Chloridionen von *Gokel* und *Schlesinger* aus einem Heptapeptid mit Prolin als Selektivitätsfilter (G = Glycin, P = Prolin).

Nichtpeptidische Anionenkanäle auf der Basis von Calix[4]arenen wurden von *Davis* entwickelt.<sup>[58]</sup> Die weiterentwickelten Calixarene der zweiten Generation waren mit Tetraamidresten an den Hydroxygruppen versehen und trugen in *para*-Position unterschiedliche Reste, was zu einer partial-cone-Struktur führte (**Abb. 23**).<sup>[59]</sup> Je nach Rest zeigten die Kanäle unterschiedliches Transportverhalten. So war mit Wasserstoff als Rest der Kanal komplett inaktiv, während bei *tert*-Butyl-Substitution ein  $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ -Antiport-Mechanismus beobachtet werden konnte. Dieses Verhalten wurde durch Röntgenbeugungsexperimente im Festkörper erklärt, wo sich unterschiedliche Packungseigenschaften auf Grundlage von veränderten Wasserstoffbrückenbindungen ergeben. Letztendlich kann das wasserstoffsubstituierte Derivat eine entscheidende Wasserstoffbrückenbindung vom Amid-Proton zu passierenden Chloridionen aufbauen, während *tert*-Butyl-substituierte Verbindungen intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zu anderen Calixarenen bilden. Da einzelne Moleküle zu klein sind, um einen Kanal zu bilden und in Leitfähigkeitsexperimenten ein Kanalmechanismus nahegelegt wurde, ging man davon aus, dass wie im Festkörper auch in Lösung selbstorganisierte Strukturen vorliegen.



**Abb. 23** Calixarenmonomer zum Aufbau von chloridleitenden Kanälen von *Davis* ( $R = H$ ).<sup>[60]</sup>

Weitere nichtpeptidische Anionenkanäle wurden von der Gruppe um *Matile* entwickelt.<sup>[61]</sup> Seine Kanäle setzen sich aus vier Untereinheiten zusammen, deren Grundbaustein ein steifer molekularer Stab mit einem *p*-Octaphenyl-Rückgrat ist (**Abb. 24**). Eine weiterentwickelte Version dieses Kanals trägt in unregelmäßigen Abständen elektronenarme Naphthyldiimidreste.<sup>[62]</sup> Durch Interkalation mit den Resten anderer Monomere ergab sich zuerst eine aus vier Einheiten bestehende Helix. Nach Zugabe eines elektronenreichen Dialkoxynaphtylderivats, das sich unter Bildung von  $\pi$ -Stacks zwischen die Naphthyldiimidreste anordnete, öffnete sich die Helix ligandengesteuert zu einem annähernd rechteckigen Kanal, der durchlässig für Anionen war. In pH-Messungen wurde ein  $\text{OH}^-$ -Fluss beobachtet, der durch verschiedene Anionen verschieden stark gehemmt werden konnte, was als Beleg für Selektivität gewertet wurde.



**Abb. 24** Ionenkanal von *Matile* aus stabförmigen Untereinheiten. Im helicalen Zustand (links) ist der Kanal geschlossen, erst durch Zugabe eines elektronenreichen Aromaten bildet sich die offene Form (rechts).<sup>[63]</sup>

Die synthetischen Kanäle sind vor allem auf einfache Substrate wie Kalium- oder Chloridionen beschränkt. Es finden sich zahlreiche peptidische Ansätze, die sich an natürlichen Vorbildern orientieren, aber auch rein synthetische Kanäle. Transport wird hier meist über Leitfähigkeitsmessungen nachgewiesen.

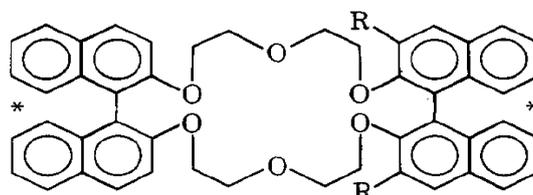
Eine zweite Möglichkeit bei der Entwicklung von Membrantransportern sind die mobilen synthetischen Transporter, die im folgenden Kapitel vorgestellt werden sollen.

### 3.3 Mobile synthetische Transporter

Während kanalbildende Moleküle relativ hohe Flussraten erreichen, war bei den mobilen Transportern schon sehr früh der Fokus stärker auf Substratspezifität gelegen. Zeitlich wurden sie bereits früher als die Kanäle untersucht, was sicherlich auch am experimentell einfacheren Aufbau lag. Die frühesten Transporter waren vor allem von Kronenethern und Cryptanden abgeleitet, die einige Jahre zuvor von *Donald J. Cram*, *Jean-Marie Lehn* und *Charles J. Pedersen* entdeckt worden waren und wofür sie u.a. 1987 den Nobelpreis erhielten.

Folgerichtig entstammten einige der ersten Arbeiten über synthetische Membrantransporter auch ihren Arbeitsgruppen und beschäftigten sich zuerst mit dem Transport von positiv geladenen Substraten.

Pionierarbeit wurde auf dem Gebiet von *Cram* geleistet, der bereits 1974 von einem Kationentransporter auf Basis eines chiralen Kronenethers berichtete. Die verschiedenen chiralen Transporter enthielten je zwei Binaphthylringe, von denen einer variierbare Reste in den zwei *ortho*-Positionen trug (**Abb. 25**). Die untersuchten Gastverbindungen waren Benzylammoniumbromid und protonierte Aminosäureester von Phenylalanin und Tyrosin mit Chlorid als Gegenion. Die Experimente wurden in einem U-Rohr durchgeführt, das als organische Phase Chloroform enthielt, sowie als wässrige Phase auf der Startseite Lösungen der Ammoniumsalze bei leicht saurem pH-Wert. Bei den Transportern mit den größeren Resten, nämlich Methyl und Chlormethyl konnte für die protonierten Aminosäureester enantioselektiver Transport festgestellt werden, jedoch keine Selektivität zwischen den verschiedenen Substraten. Es wurden optische Reinheiten von 78-85 % erreicht, wobei die Versuche bis zu ca. 10 % Übertragung von Substrat in die Zielphase durchgeführt wurden, was 19-182 h dauerte. Die thermodynamische Triebkraft war hierbei die Verdünnung der Ammoniumverbindung von der hochkonzentrierten Startphase in die Zielphase, es lag also passiver Transport vor.<sup>[64]</sup>

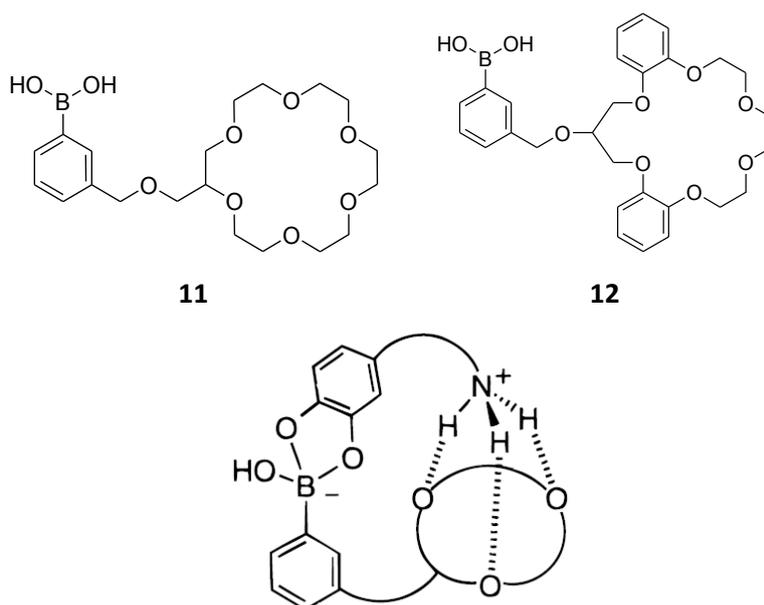


10

**Abb. 25** Chiraler Kronenether von *Cram* zum Transport von Ammoniumverbindungen. R kann ein Methyl- oder Chlormethylrest sein.<sup>[65]</sup>

Der Transport von verschiedenen Catecholaminen wurde von *Smith, de Jong* und *Reinhoudt* untersucht.<sup>[66, 67]</sup> Ihre Transporter **11** und **12** enthielten einen 18-Krone-6-Ring bzw. 19-Krone-6-Ring, an den über verschiedene Linker eine Borsäuregruppe angebracht worden war (**Abb. 26**). Durch die Kondensation des Catechols mit der Borsäure ergab sich bei neutralem pH-Wert ein negativ geladener Borsäureester, während die Amingruppe protoniert wurde. Man erhielt eine zwitterionische Spezies, was den Vorteil hatte, dass kein Gegenion zur Ammoniumgruppe mittransportiert werden musste. Die Transporter unterschieden sich durch

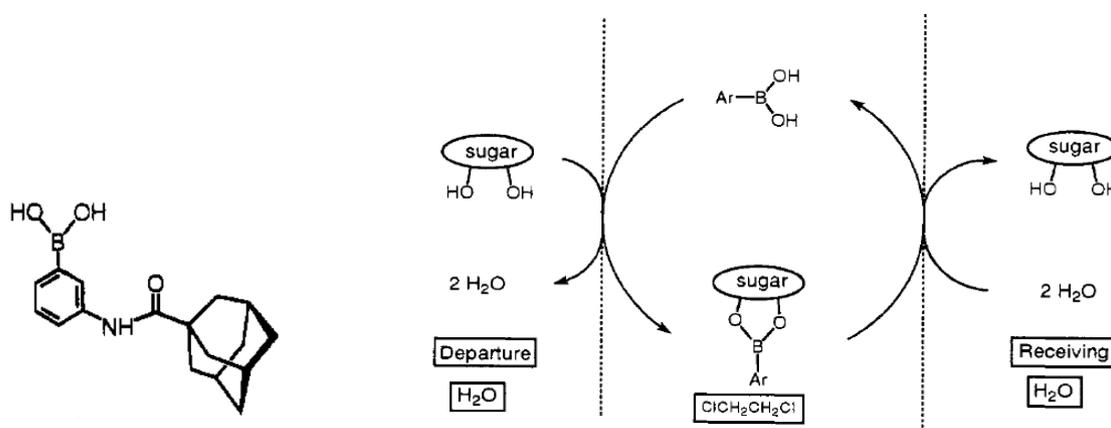
zusätzlich eingefügte Alkylreste in ihrer Lipophilie. Es wurden die Transportgeschwindigkeiten in BLM- und SLM-Versuchen untersucht. Die höchste Fluxrate in den BLM-Versuchen erreichte der am wenigsten lipophile Rezeptor mit  $4 \cdot 18 \cdot 10^{-7} \text{ mol/m}^2\text{s}$ . Vermutlich war es ein Vorteil, wenn der Rezeptor sich teilweise in der wässrigen Phase lösen konnte, um den erwünschten Rezeptor-Substrat-Komplex zu bilden. Bei den SLM-Versuchen war dieser Rezeptor hingegen weniger gut, da er in die wässrige Phase übertrat. Hier waren die lipophileren Rezeptoren besser; der Rezeptor mit dem 19-Krone-6-Ring erreichte zwar nur eine Fluxrate von  $1.5 \cdot 10^{-7} \text{ mol/m}^2\text{s}$ , war aber dafür im Vergleich zum besser transportierenden Rezeptor mit dem 18-Krone-6-Ring dauerhaft löslich in der Transportmembran. Da die Komplexierung der Catecholamine bei neutralem pH-Wert in der Startphase ein Proton freisetzt, konnte durch Einstellung eines sauren pH-Wertes in der Empfangsphase auch aktiver Transport beobachtet werden.



**Abb. 26** Kronenether-Boronsäurederivate zum Transport von Catecholaminen nach *Smith, de Jong* und *Reinhoudt* (oben). Kovalentes Catecholamin-Addukt (unten).<sup>[68]</sup>

Der Transport von Diolen durch Borsäurederivate kann auch auf Glycoside ausgeweitet werden. *Smith* setzte hierbei adamantyl-substituierte Phenylboronsäure und als Substrate verschiedene Pyranoside ein, die am anomeren Sauerstoffatom durch *para*-Nitrophenyl substituiert waren.<sup>[69, 70]</sup> Die Verwendung nichtnatürlicher Glycoside verhinderte u.a. Aldose-Ketose-Isomerisierungen und erleichterte die UV-spektroskopische Verfolgung. In U-Rohr-

Experimenten bei schwach alkalischem pH-Wert konnte selektiver Transport für  $\alpha,\gamma$ -Diole als trigonaler Boronsäureester beobachtet werden. Die Fluxraten sind nicht explizit angegeben, können aber aus den angegebenen Daten zu ca.  $2.4 \cdot 10^{-8}$  mol/m<sup>2</sup>s für den adamantyl-substituierten Transporter bestimmt werden, was einer Steigerung um den Faktor 15 zur Hintergrunddiffusion entspricht. Auch Uphill-Transport entgegen dem Konzentrationsgefälle konnte erzielt werden, durch die Einstellung eines alkalischen pH-Wertes in der Startphase und Zugabe von Trioctylammoniumchlorid, was zu einem tetraedrischen Boronat-Komplex als transportierende Spezies führte. Die Komplexierung des Glycosids ist ein protonengenerierender Prozess, weswegen der Ausgleich des pH-Wertes die Triebkraft des Transportes war. Ein zweiter Ansatz zum Erreichen von aktivem Transport wurde über Gruppentranslokation versucht. Hierzu wurde zusätzliche Boronsäure in die Empfangsphase gegeben, bei alkalischem pH in beiden wässrigen Phasen. Durch die Boronsäure wurde das transportierte Substrat komplexiert und somit für den Rücktransport unzugänglich gemacht. Die Energie für den aktiven Transport wurde hier also in Form der freien Energie bei der Bildung des Boronsäure-Glycosidkomplexes eingebracht, was auch tatsächlich zu Transport entgegen dem Konzentrationsgefälle führte.<sup>[70]</sup>

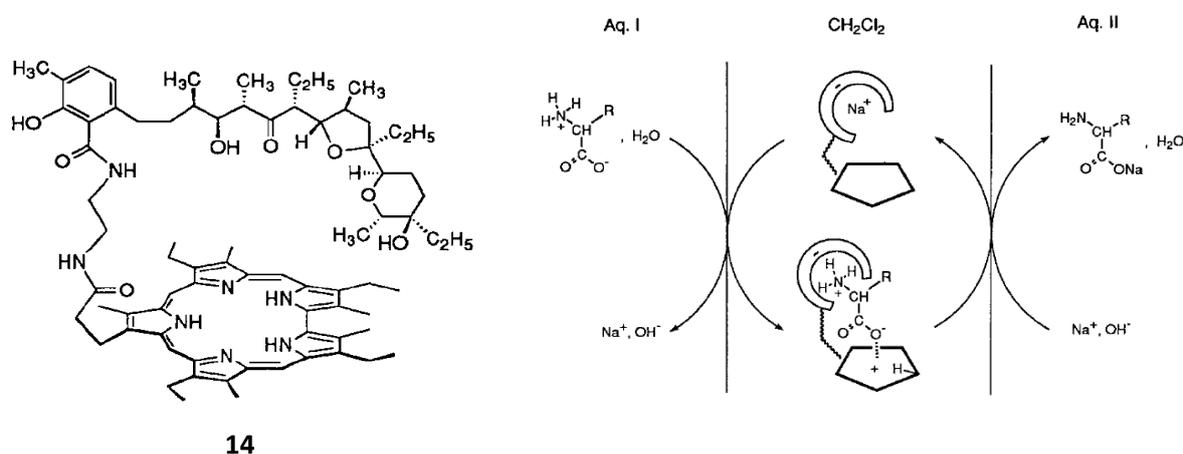


13

**Abb. 27** Transporter für Glycoside auf Borsäurebasis von *Smith* (links). Vorgeschlagener Transportmechanismus (rechts).<sup>[71]</sup>

Ein Transporter für Aminosäuren in ihrer zwitterionischen Form wurde von *Sessler* entwickelt. Hierbei tritt das generelle Problem auf, dass Bindungsstellen für Carboxylat als auch Ammoniumgruppe bereitgestellt werden müssen, die aber nicht selbtkomplementär sein dürfen, damit sie nicht zu einer intramolekularen Komplexierung führen können. Dies sollte durch einen neutralen Transporter erreicht werden, der aus zwei Teilen bestand. Eine Sapphyrineinheit sollte im protonierten Zustand mittels Wasserstoffbrückenbindungen als

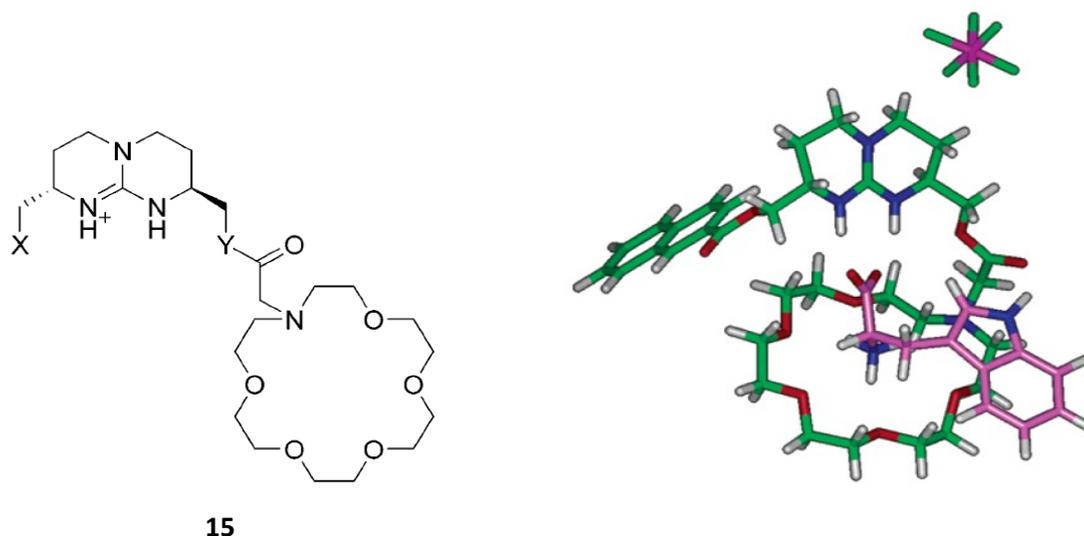
Rezeptor für die Carboxylgruppe fungieren,<sup>[72, 73]</sup> während über einen Linker verbunden das natürlich vorkommende chirale Ionophor Lasalocid als Ammoniumbindungsstelle verwendet wurde. Es wurden Experimente in einem U-Rohr mit einer Mischung von Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin in entweder *L*- oder *D*-Form durchgeführt mit jeweiligen Konzentrationen der Substrate von 50 mM und einer Rezeptorkonzentration von 0.1 mM in Dichlormethan. Es ergab sich ein selektiver Transport mit einem Verhältnis von Phenylalanin/Tryptophan/Tyrosin von 1000/250/1 in der *L*-Form (*D*-Form: 635/210/1) mit einem maximalen Flux für Phenylalanin von  $5.5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/m}^2\text{s}$ , was eine Beschleunigung bezüglich der Hintergrunddiffusion um den Faktor 400-500 bedeutete. Die *L*-Form schien im Vergleich zur *D*-Form der Aminosäuren schneller transportiert zu werden, jedoch wurden keine direkten kompetitiven Versuche durchgeführt. Der vorgeschlagene Mechanismus beinhaltet einen  $\text{H}^+/\text{Na}^+$ -Antiport, der dadurch unterstützt wurde, dass die Zielphase aus 0.01 M Natronlauge bestand. Durch den Einbau eines chiralen Estersubstituenten an den Sapphyrinringen konnte die Enantioselektivität je nach Stereokonfiguration des Substituenten umgekehrt oder verstärkt werden, so dass eine Bevorzugung der *L*-Aminosäuren um den Faktor 1.6-2.3 erreicht werden konnte.<sup>[74]</sup>



**Abb. 28** Sapphyrin-Lasalocid-Konjugat zum Transport von Aminosäuren nach *Sessler* (links). Vorgeschlagener Transportmechanismus (rechts).<sup>[75]</sup>

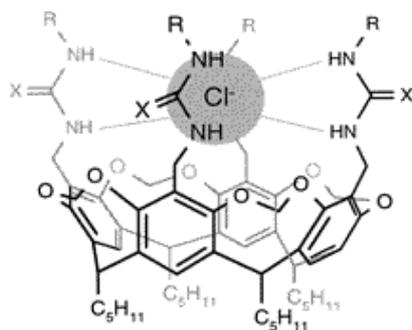
Von *de Mendoza* wurde ebenfalls der Transport zwitterionischer Aminosäuren untersucht. Er benutzte ein bicyclisches chirales Guanidiniummotiv zur Bindung des Carboxylats, an das verschiedene Kronether angebunden wurden, die die Ammoniumgruppe komplexieren sollten.<sup>[76]</sup> Ein chiraler Seitenarm wurde zur stereoselektiven Erkennung eingefügt (**Abb. 29**).

Es wurden Transportstudien in U-Rohrversuchen bei neutralem pH-Wert durchgeführt, mit Substratkonzentrationen von Phenylalanin bzw. Tryptophan von 50 mM in der Ausgangsphase bei 1.5 mM Konzentration des Transporters in der organischen Phase aus Dichlorethan. Die besten Resultate wurden mit den Azakronenether-substituierten Rezeptoren mit einem Naphtalinring als Seitenarm erzielt. Es konnten Fluxraten für den Transporter **15** mit dem Esterlinker von  $19 \cdot 10^{-6}$  mol/m<sup>2</sup>s, bzw.  $23 \cdot 10^{-6}$  für den analogen Transporter mit Amidlinker erreicht werden. Hierbei erreichte der langsamere Transporter für Tryptophan eine Enantioselektivität von 34 %, die auf bis zu 79 % gesteigert werden konnte, wenn man die Konzentration des Transporters in der organischen Phase auf 0.125 mM verringerte, was allerdings auch mit einer Verringerung der Transportgeschwindigkeit einherging. Durch stetiges Rühren der Startphase konnte der Enantiomerenüberschuss über mehrere Stunden hochgehalten werden, da ansonsten eine lokale Anreicherung des weniger gut transportierten Enantiomers an der Phasengrenzfläche den selektiven Transport zu verhindern schien. Der Grund für die Bevorzugung des *L*-Enantiomers beim Transport wurde durch Molecular Modelling untersucht. Hier wurde nicht etwa, wie erwartet ein  $\pi$ -stacking zwischen Naphtalin-Ring und Indolrest des Tryptophans gefunden, vielmehr bildete *L*-Tryptophan einen kompakteren Komplex mit dem Rezeptor der weniger Oberfläche des Indolrestes dem Lösungsmittel zugänglich machte, d.h. hydrophobe Effekte waren für die Enantioselektivität verantwortlich.<sup>[77]</sup>



**Abb. 29** Bicyclischer Guanidiniumrezeptor zum enantioselektiven Transport von Aminosäuren nach *de Mendoza* (X = O-2-naphtyl, Y = O) (links). Komplex aus **15** und *L*-Tryptophan aus Molecular Modeling Berechnungen (rechts).<sup>[78]</sup>

Als Transporter für verschiedene Halogenide wurden von *Reinhoudt* (Thio-)Harnstoffresorcinaaren-Cavitanden **16** eingesetzt (**Abb. 30**). Diese bestanden aus vier miteinander verbundenen Resorcineinheiten, die jeweils mit (Thio-)Harnstoffgruppen, sowie verschiedenen lipophilen Gruppen, teilweise mit mehr oder weniger elektronenziehenden aromatischen und aliphatischen Gruppen, substituiert waren. Diese Verbindungen waren in Chloroform in der Lage, verschiedene Halogenide mit Assoziationskonstanten von bis zu  $4.7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  in Chloroform zu binden. Dabei zeigten sie eine gewisse Präferenz bezüglich Chlorid gegenüber anderen Halogeniden. In einem SLM-Experiment wurde die Fähigkeit einiger dieser Rezeptoren zu Membrantransport untersucht. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die eingesetzten Transporter die Diffusion von  $\text{Pr}_4\text{NCl}$  gegenüber  $\text{Pr}_4\text{NBr}$  stärker beschleunigten. Während die Hintergrunddiffusion für das Chlorid- im Vergleich zum Bromidsalz deutlich langsamer war, erreichten beide Spezies  $\text{Pr}_4\text{NCl}$  bzw.  $\text{Pr}_4\text{NBr}$  mit dem besten Transporter für einen ähnlichen Flux von  $44\text{-}48 \cdot 10^{-6} \text{ mol/m}^2\text{s}$ . Das entspricht einer Beschleunigung gegenüber der Hintergrunddiffusion um den Faktor 12 für Bromid bzw. um den Faktor 55 für Chlorid. Die Werte für den Transport der Kaliumsalze von Bromid und Chlorid waren um bis zu eine Größenordnung kleiner, da ja bei dieser Art von neutralem Transporter ein Symport vorliegt und somit zum Zwecke der Elektroneutralität auch ein Gegenion mittransportiert werden muss, was im Falls von  $\text{Pr}_4\text{N}^+$  aufgrund der höheren Lipophilie energetisch günstiger ist als bei  $\text{K}^+$ .<sup>[79, 80]</sup>

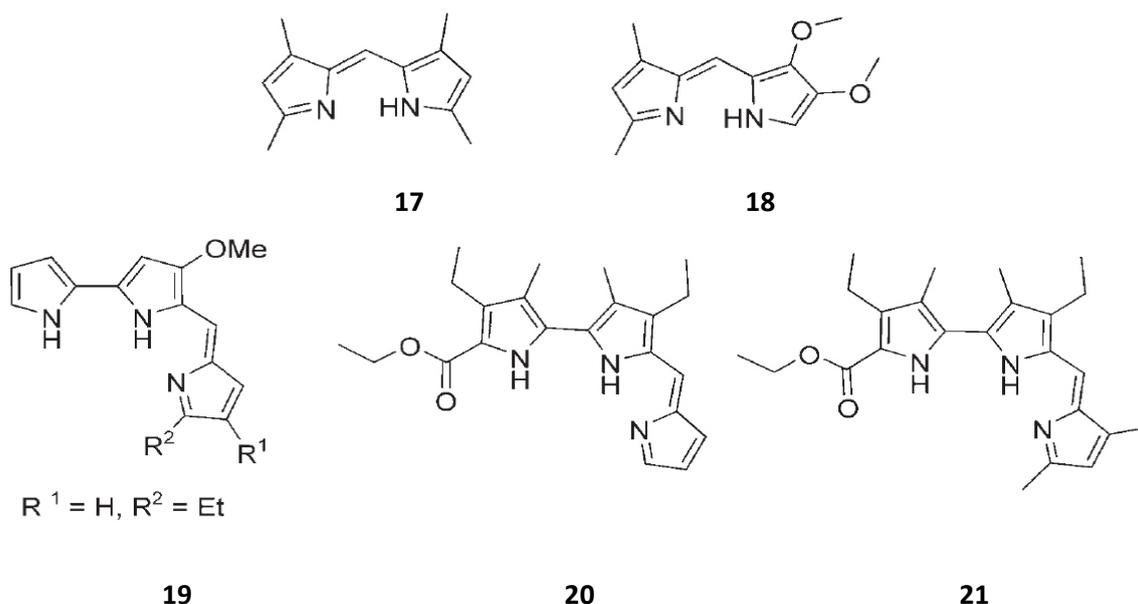


16

**Abb. 30** (Thio-)Harnstoffresorcinaarencavitanden zum Transport von Chloridionen von *Reinhoudt* ( $\text{X} = \text{O}, \text{S}$ ;  $\text{R}$  = verschiedene aliphatische und aromatische Reste).<sup>[81]</sup>

Für Anionentransport mittels eines  $\text{H}^+/\text{Cl}^-$  Symport-Mechanismus veröffentlichte *Sessler* ein Beispiel, das auf der natürlichen Substanzklasse der Prodigiosine basiert. Diese Verbindungen in ihrer protonierten Form zeigten in Studien vielversprechende Aktivitäten gegenüber

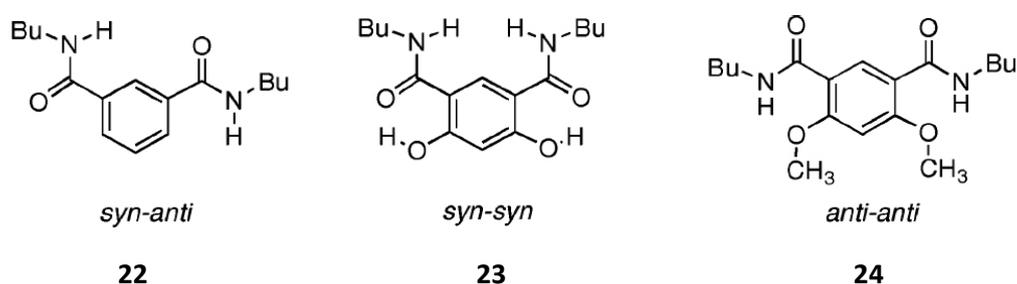
Krebszellen, was möglicherweise auf die Fähigkeit des Transports von Chloridionen durch Zellmembranen zurückgeführt werden kann. Es wurden Studien an den Verbindungen **17** bis **21** durchgeführt, die verschiedene, leicht variierte Struktur motive der natürlichen Prodigiosine sind (**Abb. 31**). In ITC-Experimenten wurden die Bindungskonstanten in Acetonitril bestimmt, die jedoch nicht gut mit den anschließend gemessenen Transportergebnissen korrelierten. Als Grund wurde angenommen, dass die Bindungsstärke der besten Binder bereits so hoch ist, dass effektiver Transport nicht mehr möglich war. Die Transportresultate wurden über die Chlorid-Austrittsrate aus Phospholipidvesikeln mit Hilfe einer chlorid-selektiven Elektrode bestimmt. Bei anschließend durchgeführten *in vitro* Versuchen an menschlichen Lungen- und Prostatakrebszellen zeigte sich eine ähnliche Abstufung der Resultate wie in den Transportexperimenten. Die Ergebnisse belegten also den angenommenen  $H^+/Cl^-$ -Symport-Mechanismus, der somit zur Erklärung der Anti-Krebs-Aktivität herangezogen werden kann.<sup>[82]</sup>



**Abb. 31** Anionentransporter, abgeleitet von Prodigiosin nach *Sessler*. Die Verbindung **17** zeigte die höchste Bindungsstärke. Die Transportgeschwindigkeit der Verbindungen entsprach mit **19** >> **20**  $\approx$  **17** > **18** >> **21** weitgehend der antiproliferativen Aktivität.<sup>[83]</sup>

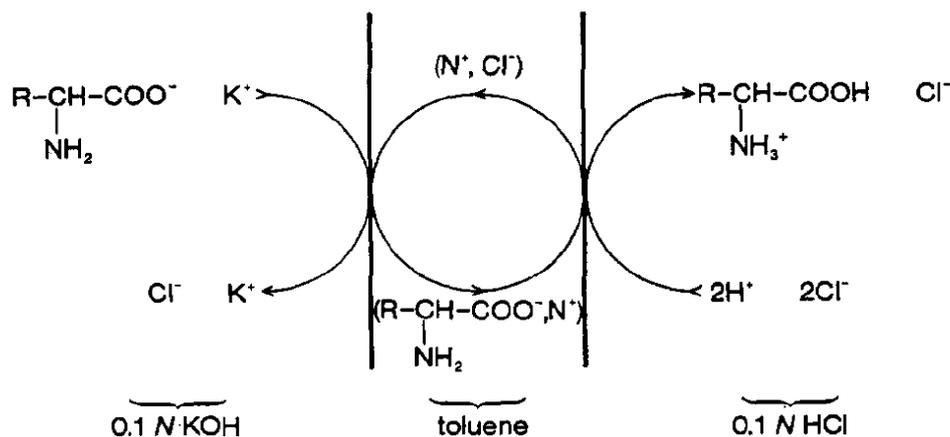
*Davis, Gale* und *Quesada* zeigten die Bedeutung der Präorganisation des Transporters für effektiven Anionentransport. Es wurden verschiedene Isophthalimide verglichen, von denen nur eines, nämlich **23**, die Fähigkeit zur Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen besaß, wodurch eine *syn-syn* Ausrichtung der Wasserstoffbrückendonoren bewirkt wurde (**Abb. 32**). Dieser Rezeptor zeigte in einer NMR-

Titration verglichen mit dem Rezeptor **22** ohne Hydroxy-Gruppen mit einer Bindungskonstante von  $5230 \text{ M}^{-1}$  in Acetonitril eine mehr als 10mal so hohe Affinität gegenüber Chloridionen. In einem Versuch in Phospholipidvesikeln zeigte auch nur diese Verbindung effektive Transportfähigkeit gegenüber  $\text{Cl}^-$ -Ionen. Es wurden zusätzlich Versuche mit veränderlichem pH-Wert durchgeführt. Bei Werten von  $\text{pH} > 8$ , was dem  $\text{pK}_s$ -Wert der Phenolgruppen entspricht, wurde der Transport unterbunden, was auf die Deprotonierung der Phenolgruppen und damit einhergehend die konformative Veränderung einer Amidbindung in die *anti*-Form und somit dem Verlust der Anionenbindungstasche zurückging.<sup>[84]</sup>



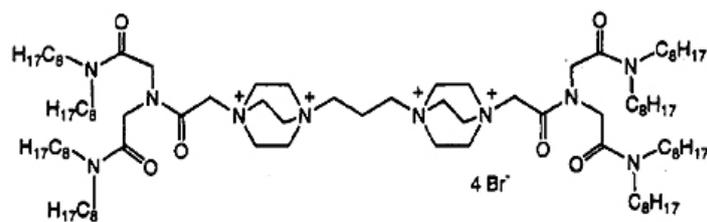
**Abb. 32** Verschiedene Isophthalimide zum Transport von Chloridionen von *Davis*, *Gale* und *Quesada*. Nur der präorganisierte Rezeptor **23** mit *syn-syn*-Ausrichtung zeigt Transportaktivität.<sup>[85]</sup>

Das früheste Beispiel für Transport von Aminosäuren in ihrer anionischen Form durch einen kationischen Transporter wurde 1973 von *Lehn* veröffentlicht. Dieses einfache erste System bestand aus dem quarternären Ammoniumsalz Tricaprylmethylammoniumchlorid (Aliquat 336), das deprotonierte Aminosäuren, sowie einige Dipeptide in einem Antiport-Mechanismus durch eine Toluolschicht beförderte (**Abb. 33**). Der Versuchsaufbau war ein umgekehrtes U-Rohr, da die organische Phase hier leichter als die wässrige war. Die Ausgangsphase mit den Aminosäuren in Konzentration von 50 mM bestand aus wässriger 0.1 M KOH, die Zielphase aus 0.1 M HCl, der Transporter wurde in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt. Es wurden Fluxraten von  $0.29-18 \cdot 10^{-7} \text{ mol/m}^2\text{s}$  für die verschiedenen Aminosäuren und Dipeptide erreicht, die in der relativen Reihenfolge ihren Verteilungskoeffizienten für das transporterfreie Zweiphasensystem entsprachen. Es wurde aktiver Transport gegen das Konzentrationsgefälle beobachtet, der durch den Antiport der hochkonzentrierten Chloridionen aus der Empfangsphase getrieben wurde.<sup>[86]</sup>

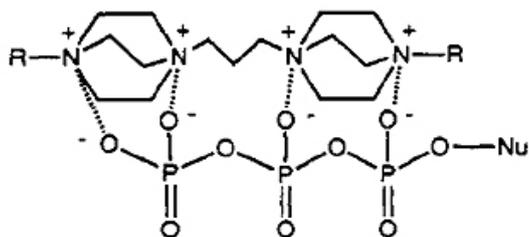


**Abb. 33** Transportmechanismus von Aminosäuren durch eine quaternäre Ammoniumverbindung nach *Lehn*. N<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> bezeichnet hier den Transporter Tricaprylmethylammoniumchlorid.<sup>[87]</sup>

Zum Transport von verschiedenen Nukleotid 5'-Triphosphaten wurden von *Diederich* tetrakationische Verbindungen untersucht, die zwei diquaternäre Diazabicyclooctan (DABCO)-Einheiten trugen (**Abb. 34**). Zur Ermöglichung der Löslichkeit der hochgeladenen Verbindung in der organischen Phase mussten ausgedehnte aliphatische Reste in den Transporter eingebracht werden. Bis zu 6 Octylketten konnten noch keine Löslichkeit in der organischen Phase ermöglichen, erst durch den Rezeptor mit 8 Octylketten war ausreichende Lipophilie erreicht, so dass Transportereigenschaften auftraten. Es wurden U-Rohr-Versuche mit Konzentrationen der Triphosphate von 100  $\mu\text{M}$  in Wasser bei neutralem pH in der Ausgangsphase, eine Transporterkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  in Dichlormethan und in der Empfangsphase 0,2 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in Wasser bei neutralem pH eingesetzt. Bei dieser niedrigen Transporterkonzentration konnte immerhin ein Flux von  $0,29 \cdot 10^{-9} \text{ mol/m}^2\text{s}$  für ATP gemessen werden, die anderen Triphosphate lagen in einem ähnlichen Bereich. Durch Extraktionsversuche konnte ein 1:1 Transporter-Nukleotid-Komplex belegt werden. Bei anschließenden Versuchen in bakteriellen Liposomen zeigte sich allerdings, dass die Verbindung dort nicht als Transporter fungierte, sondern die Liposomstruktur zerstörte, also effektiv als Detergenz wirkte.<sup>[88, 89]</sup>

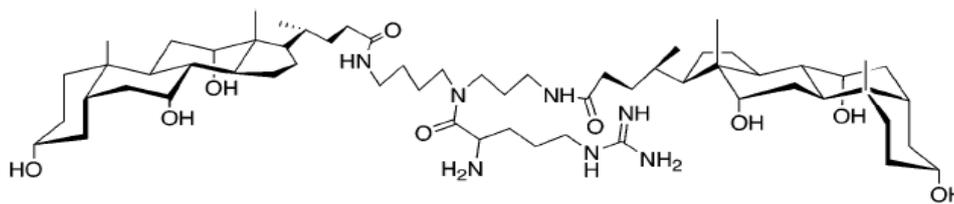


25



**Abb. 34** Tetrakationischer Transporter für Nukleotid-5'-Triphosphate von *Diederich* (oben); vorgeschlagene Interaktionsgeometrie (unten).<sup>[90]</sup>

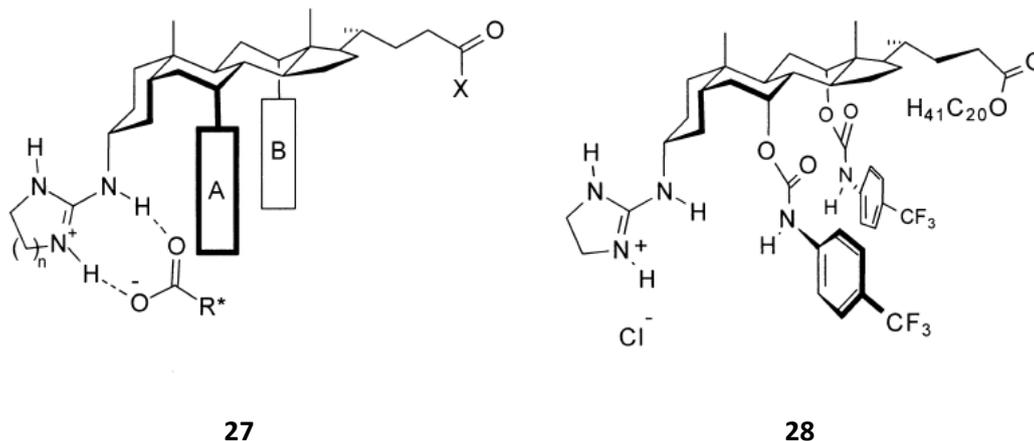
Von *Regen* wurden die sogenannten „molekularen Regenschirme“ vorgestellt (**Abb. 35**).<sup>[91-93]</sup> Dieses Transporterdesign besteht aus zwei Seitenarmen aus Cholsäure und Spermidin, sowie einer zentralen Erkennungseinheit, die einen Argininrest enthält. Die Innenseiten der steroidischen Reste bieten hierbei zusätzliche Wasserstoffbrückendonoren, so dass sie sich eng um die Substrate legen sollen und dadurch die Löslichkeit in der lipophilen Membran herstellen, während die unpolaren Außenseiten für die Löslichkeit in der Membran sorgen. Die Affinität des Guanidiniumkations zu Phosphationen wurde in einem Transportversuch mit Vesikeln aus Phospholipiden untersucht, in denen ATP in 5.0 mM Konzentration und Glutathion in 3.0 mM Konzentration bei einem pH von 6.8 eingeschlossen waren. Der Transporter in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  hatte nach 48 h das Triphosphat zu 75 % selektiv aus den Vesikeln freigesetzt, während Glutathion so gut wie gar nicht transportiert worden war. Durch den Einsatz von ATP-abbauenden Enzymen, also mittels Gruppentranslokation, konnte 100 % ATP nach 48 h freigesetzt werden.<sup>[94]</sup>



26

**Abb. 35** Molekularer Regenschirm zum Transport von Triphosphaten von *Regen*.<sup>[95]</sup>

Von *Davis* wurden verschiedene Rezeptoren für anionische Substrate auf Steroidbasis entwickelt (**Abb. 36**). Durch den großen unpolaren und chiralen Grundbaustein war die Löslichkeit in lipophilen Medien sowie die Fähigkeit zu enantioselektiver Erkennung ermöglicht. Als Grundgerüst wurden Cholsäure oder Derivate davon verwendet. In einer frühen Untersuchung wurde das Extraktionsvermögen von Guanidinium-substituierten Spezies **27** für *N*-acylierte Aminosäuren untersucht.<sup>[96]</sup> Zur Verbesserung der Enantioselektivität wurden an den verbliebenen beiden freien Hydroxyfunktionen verschiedene Substituenten mit zusätzlichen Wasserstoffbrückendonoren und aromatischen Resten eingeführt. Die erhaltenen Rezeptoren mit Chlorid als Gegenion in Chloroform zeigten in Extraktionsversuchen mit einem ca. 6fachen Überschuss an acylierten Aminosäuren bei einem pH-Wert von 7.4 gutes Extraktionsvermögen. Für die meisten acetyl- und Boc-geschützten Aminosäuren konnten zwischen 20 und 65 % bezogen auf die Rezeptorkonzentration extrahiert werden. Dabei wurden Enantioselektivitäten von bis zu 10:1 erreicht. In Kooperation mit *de Mendoza* und *de Vries* wurden die Transportfähigkeiten eines leicht veränderten, synthetisch leichter zugänglichen steroidischen Guanidiniumrezeptor **28** untersucht (**Abb. 36**). In einem U-Rohr-Versuch mit 50 mM Substratkonzentration von racemischem *N*-Ac-Phe-OH in TRIS-Puffer bei pH 8.1 in der Startphase und mit Rezeptorkonzentration von 0.86 mM in der organischen Phase wurden die Transportraten gemessen. In der Zielphase war keine Aminosäure, sondern KBr in einer Konzentration von 0.5 M, um durch den AA<sup>-</sup>/Br<sup>-</sup>-Antiport elektronischen Ausgleich zu gewährleisten. Nach 24 h konnte der Transport von 27 % des Substrates in die Zielphase gemessen werden, was einem Flux von  $2.8 \cdot 10^{-6}$  entspricht. Ein Vergleich mit der Hintergrunddiffusion wurde nicht angegeben. Dabei trat anfangs ein Enantiomerenüberschuss des L-Enantiomers von ca. 70 % auf, der im Verlauf des Versuchs auf 56 % sank.<sup>[97, 98]</sup>

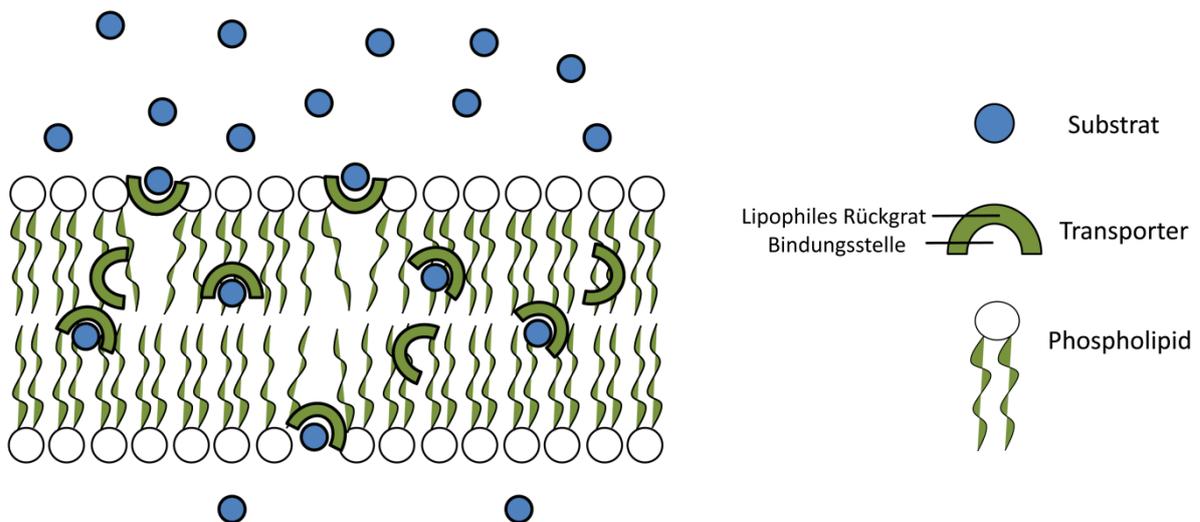


**Abb. 36** Steroidaler Guanidiniumrezeptor von *Davis* (links) mit  $n=2$ ,  $X=OMe$ ; Modifizierte Version als Transporter von *Davis*, *de Mendoza* und *de Vries* (rechts).<sup>[99]</sup>

Die verschiedenen mobilen Transporter, die in der Literatur beschrieben werden, tragen sehr unterschiedliche Struktur motive. Auch die Versuchsbedingungen sowie die Substrate sind meist recht variabel und spezifisch für die einzelnen Ansätze. Teilweise wird ein aktiver Transportmodus eingesetzt, viele Transporter erleichtern aber auch nur die Diffusion der Substrate. Vielen Ansätzen gemein ist eine Aufteilung des Transporters in einen Bereich, der für die Bindung des Substrates zuständig ist und in einen zweiten Bereich, der die Löslichkeit in organischen Lösemitteln möglich macht. Auf Grundlage eines solchen Aufbaus soll im Folgenden ein neuer mobiler Membrantransporter entworfen werden.

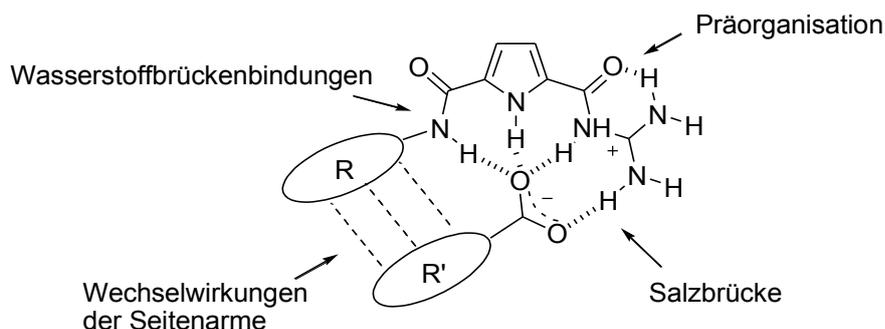
## 4 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, einen molekularen Membrantransporter zum Transport von *N*-acetylierten Aminosäuren durch organische Lösemittel zu entwickeln. Dieser muss eine Bindungsstelle für Carboxylate und zusätzlich ein Löslichkeitsvermittelndes Rückgrat für lipophile Medien wie das Innere der Phospholipiddoppelschicht besitzen (**Abb. 37**).<sup>[100]</sup>

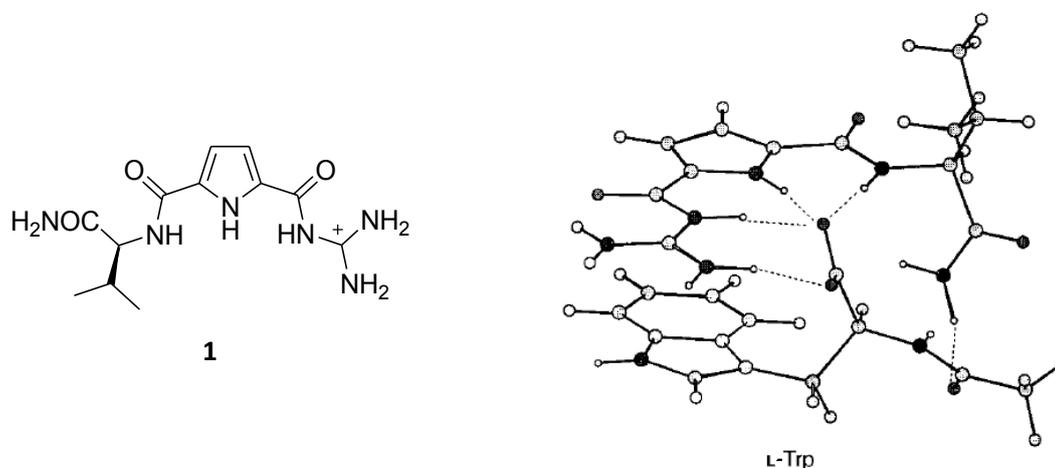


**Abb. 37** Schema des Membrantransports (links). Bestandteile und Aufbau des Transporters (rechts).

Die Bindungsstelle soll durch das Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotiv von *Schmuck* zur Bindung von Oxo-Anionen gebildet werden. Das Grundmotiv und die verschiedenen Wechselwirkungen bei der Bindung sind in **Abb. 38** dargestellt. Den wichtigsten Beitrag liefert die Salzbrücke zwischen positiv geladenem Guanidinium und negativ geladenem Carboxylat, gefolgt von den zahlreichen Wasserstoffbrückenbindungen. Durch Wechselwirkungen des Pyrrol-Seitenarms mit dem Rest  $R'$  des Substrats wird die Selektivität des Rezeptors erreicht. Zusätzlich ist zu beachten, dass durch die interne Präorganisation des Rezeptors durch die Wasserstoffbrücke zwischen Guanidinium- und Carbonylfunktion ebenfalls die Bindungsstärke erhöht wird. Der Rezeptor bekommt dadurch eine planare Gestalt, die für die Komplexierung des Carboxylats optimal ist (**Abb. 38**). Bei entsprechenden aromatischen Resten  $R'$  des Carboxylats, zum Beispiel im Falle von aromatischen Aminosäuren, kann zusätzlich eine stabilisierende  $\pi$ -Kation-Stapelwechselwirkung mit der positiv geladenen Guanidiniumfunktion auftreten (**Abb. 39**).

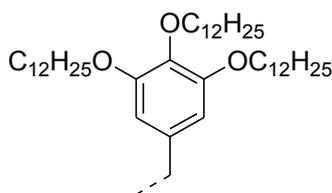


**Abb. 38** Guanidiniocarbonylpyrrolmotiv von *Schmuck* zur Bindung von Oxo-Anionen.



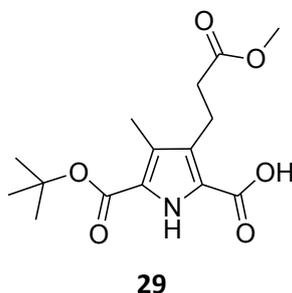
**Abb. 39** Guanidiniocarbonylrezeptor von *Schmuck* (links). Konformation niedrigster Energie von Molecular Modeling-Studien zum Rezeptor-Substrat-Komplex von Guanidiniocarbonylpyrrol **1** mit Ac-*L*-Trp-OH.<sup>[13]</sup>

Verbindung **1** ist löslich in DMSO und in wässrigen Lösungen von DMSO, aber nicht in Dichlormethan oder Chloroform. Die sehr polare Natur des Guanidiniocarbonylpyrrols resultiert in starken intermolekularen Kräften, was die Verbindungen in unpolaren organischen Lösemitteln so gut wie unlöslich macht. Es treten starke Ion-Dipol-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen auf, so dass zum Ausgleich eine große lipophile Gruppe eingeführt werden müsste, um die nötige Löslichkeit zu erreichen. Dazu geeignet sind unpolare Reste wie Alkyl-, Alkoxyketten oder aromatische Reste. Als löslichkeitsvermittelnder Rest wurde Tris-(Dodecyloxy)phenylmethyl ausgewählt (**Abb. 40**). Diese Gruppe trägt drei lange Alkylketten, die über eine Etherfunktion in 3, 4 und 5 Position an einer Benzylgruppe angebunden sind. Über die benzyliche Position soll die Verbindung zum Pyrrolgrundgerüst erfolgen.



**Abb. 40** Tris-(Dodecyloxy)phenylmethylen zur Erhöhung der Löslichkeit in unpolaren Solventien.

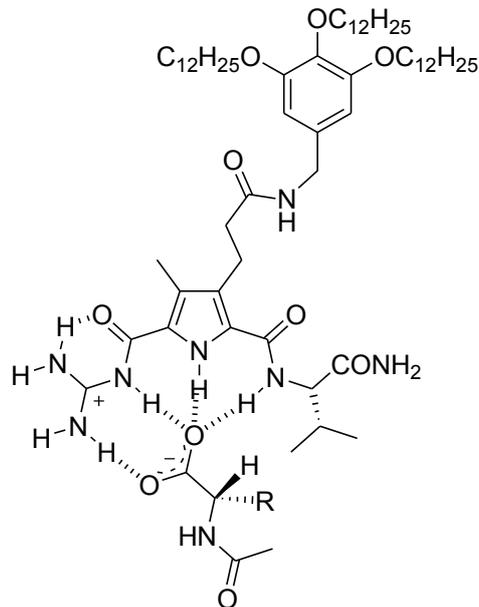
Diese lipophile Gruppe sollte auf eine geeignete Art mit dem Pyrrolbaustein verknüpft werden. Dazu bieten sich die Positionen 3 und 4 des Pyrrolringes an, die bei dem Rezeptor **1** noch unbesetzt sind. Zum Aufbau beliebig substituierbarer Pyrrolverbindungen wurden in unserer Arbeitsgruppe verschiedene Triesterverbindungen entwickelt.<sup>[101]</sup> Die Vorstufe **29** eines der beschriebenen Triester ist am besten geeignet für die geplante Synthese (**Abb. 41**). Hier sind die Schutzgruppen derart angebracht, dass zuerst an den Positionen 2 und 5 das Grundgerüst des Rezeptors um neue Substituenten erweitert werden kann, die mittels Peptidkupplungen und ggf. Entschützungen eingebracht werden. Der Methylester in Position 3 soll zuletzt ersetzt werden, um die lipophile Gruppe einzuführen.



**Abb. 41** Orthogonal geschützte Pyrroltricarbonsäure als Grundgerüst des Membrantransporters.

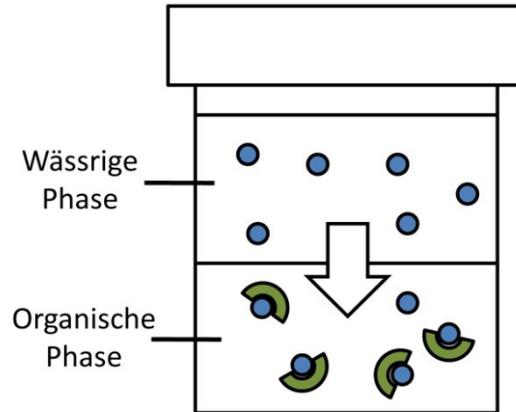
Als Resultat erhält man einen Rezeptor für Oxo-Anionen wie Carboxylate, der erhöhte Löslichkeit in organischen Lösemitteln aufweist. Mit einer solchen Verbindung sollte Membrantransport möglich sein. Das mögliche Aussehen des Rezeptor-Substrat-Komplexes ist in **Abb. 42** dargestellt. Man erkennt die Salzbrücke und die Präorganisation des Rezeptors durch eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung. In der Peripherie des Rezeptors ist die löslichkeitsvermittelnde, lipophile Benzylgruppe eingefügt. Das endgültige Aussehen des Komplexes wird noch durch weitere Faktoren, vor allem die Art des Restes R des Substrates bestimmt. Bei aromatischen Resten lässt sich das Auftreten einer Kation- $\pi$ -Wechselwirkung

zwischen Guanidinium-Funktion und Aromaten erwarten, der dann auch die Geometrie des Komplexes und das Wasserstoffbrückenmuster bestimmen wird.



**Abb. 42** Mögliches Aussehen des Rezeptor-Substrat-Komplexes. Nicht eingezeichnet sind zusätzliche Wechselwirkungen mit dem Rest R des Substrats.

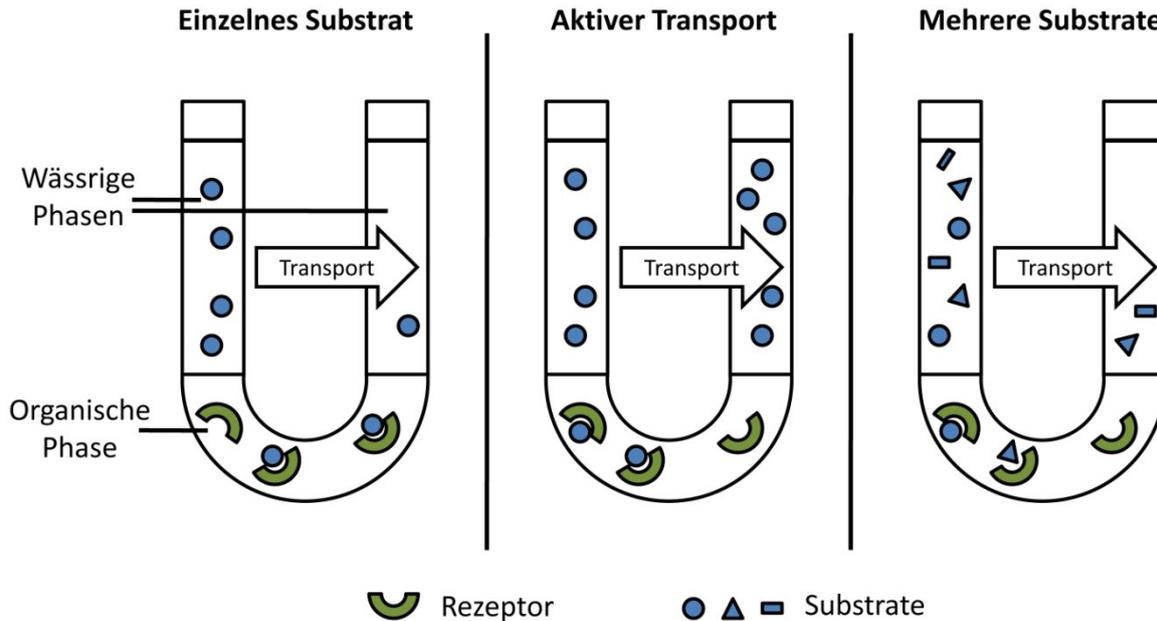
Nach erfolgreicher Synthese des Membrantransporters sollten zunächst Versuche zur Bestimmung des Extraktionsvermögens durchgeführt werden. Dies sollte durch Ausschütteln *N*-acetylierter Aminosäuren in wässrigen Lösungen gegen Lösungen des Transporters in organischen Lösemitteln erfolgen (**Abb. 43**). Dabei sollten Substrate, Lösemittel und pH-Wert variiert werden, um auf dieser Grundlage die optimalen Bedingungen für weitere Experimente zu ermitteln. Die Resultate sollten zudem zur Abschätzung der Bindungseigenschaften des Rezeptors gegenüber den Substraten ausgewertet werden.



**Abb. 43** Aufbau der Extraktionsexperimente.

Zur Bestätigung der Bindungskonstanten sowie zur Bestimmung weiterer Parameter wie Stöchiometrie, Enthalpie und Entropie der Komplexbildung sollten zudem ITC-Experimente durchgeführt werden. Rezeptor und Substrat müssen hierzu im gleichen Lösemittel eingesetzt werden. Es sollten die Tetrabutylammoniumsalze der acetylierten Aminosäuren eingesetzt, um gute Löslichkeit in organischen Lösemitteln zu erreichen.

Basierend auf diesen Ergebnissen sollten die Transportexperimente entworfen werden. Das beste Lösemittel und geeignete Substrate sollten aus den Extraktionsexperimenten abgeleitet werden. Daraufhin sollte die Fähigkeit des Rezeptors zum Transport der *N*-acetylierten Aminosäuren durch eine organische Phase getestet werden. Die verschiedenen denkbaren Versuchsaufbauten sind in Kap. 3.1 beschrieben worden. Da dies die ersten Versuche zum Membrantransport durch Guanidiniocarbonylpyrrole waren, sollte ein möglichst einfacher experimenteller Aufbau gewählt werden. Dies wurde am besten durch U-Rohr-Versuche erreicht, da hier die größte Toleranz gegenüber verschiedenen Lösemitteln und Rezeptoreigenschaften vorliegt (**Abb. 44**).



**Abb. 44** Verschiedene U-Rohr-Versuche. Links: Transport eines einzelnen Substrats. Mitte: Transport eines einzelnen Substrats gegen einen Konzentrationsgradienten (aktiver Transport). Rechts: Kompetitiver Transport verschiedener Substrate.

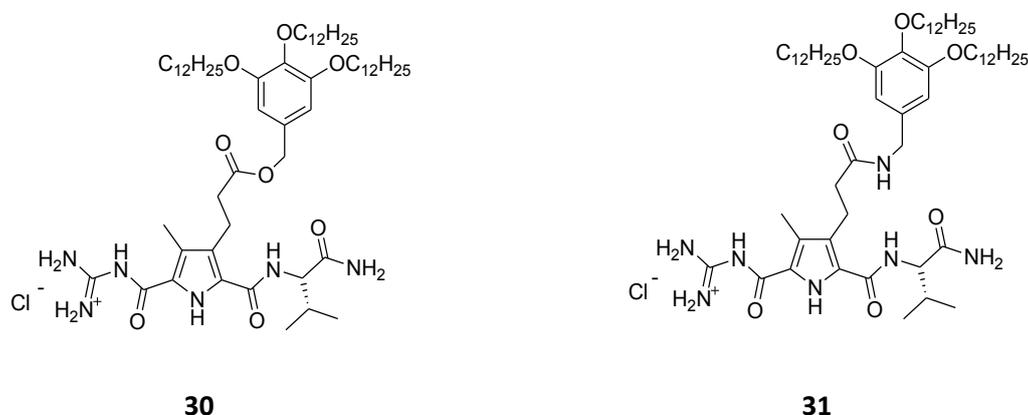
In anfänglichen Versuchen sollen die Fluxraten von verschiedenen Substraten sowie ihren jeweiligen Enantiomeren bestimmt werden. Gleichzeitig sollen in Blindmessungen die Diffusionsraten der Substrate gemessen werden. Durch den Vergleich unter den beiden Bedingungen sollen die Selektivitäten des Transporters, sowie die Geschwindigkeit des Transports evaluiert werden. Durch geeignete Wahl des pH-Werts soll hierbei ein Protonengradient eingestellt werden, der zu aktivem Transport führt. Der aktive Transportmodus soll durch Experimente bestätigt werden, bei denen kein anfänglicher Konzentrationsgradient der Substrate zwischen Ausgangs- und Zielphase vorliegt. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass erleichterte Diffusion für den Stofftransport verantwortlich ist. Zuletzt sollten kompetitive Messungen durchgeführt werden, bei denen im gleichen Experiment verschiedene Substrate in der wässrigen Phase vorliegen. Dadurch sollten zusätzliche Informationen über das Verhältnis von thermodynamischen mit den kinetischen Daten gewonnen werden, da nun mehrere Substrate um den Transporter konkurrieren. Es können einerseits Unterschiede zwischen den verschiedenen Enantiomeren eines Substrats festgestellt werden, zudem kann aber auch die Selektivität des Transporters gegenüber unterschiedlichen Substraten unter kompetitiven Bedingungen beobachtet werden.

Zu Beginn der Arbeit standen zunächst verschiedene Entwürfe für die Syntheseroute des Transporters im Vordergrund, die im folgenden Kapitel besprochen werden sollen.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

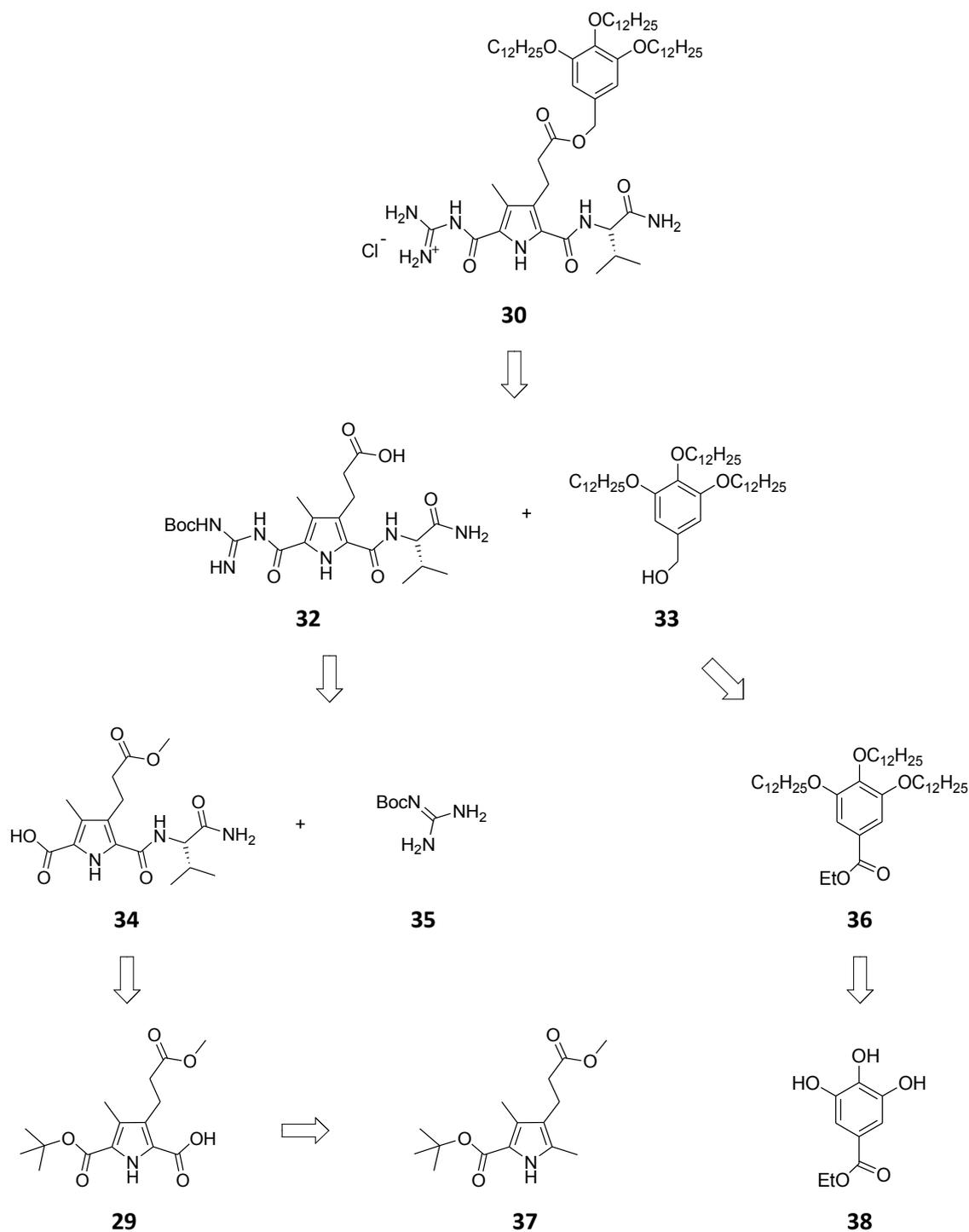
### 5.1 Synthese des Membrantransporters

Für die Synthese des Membrantransporters wurden drei Strategien in Betracht gezogen. Die ersten beiden führten zur Verbindung **30** mit einem Esterlinker, während aus der dritten Strategie ein Amidlinker und somit Verbindung **31** resultierte (**Abb. 45**). Im Folgenden werden die verschiedenen Ansätze in den Grundzügen beschrieben.



**Abb. 45** Die zwei möglichen Zielverbindungen.

Die erste Strategie (**Abb. 46**), die im Folgenden „elektrophile Esterroute“ genannt wird, soll zum Ester **30** führen. Dieser soll aus dem Pyrrolbaustein **32** sowie dem Tris-dodecylether **33** mittels einer Veresterung und anschließender saurer Abspaltung der Boc-Schutzgruppe aufgebaut werden. Die elektrophile Position befindet sich hier an der Carbonylgruppe des dabei auftretenden Aktivesters. Die Synthese des Pyrrolbausteins **32** geht von Verbindung **29** aus, die mittels Oxidation aus der Vorläuferverbindung **37** erzeugt wird.<sup>[101]</sup> Durch die orthogonalen Schutzgruppen können hier variable Reste an den drei Carbonsäurefunktionen angebracht werden. Zunächst soll die freie Carbonsäure mit *L*-Valinamid gekuppelt werden und darauf folgend der *tert*-Butylester des Pyrrols entschützt werden, was zu Verbindung **34** führt. Nach Verseifung des Methylesters im Basischen soll mit mono-Boc-geschütztem Guanidin<sup>[102]</sup> umgesetzt werden und so der erste Baustein **32** erhalten werden.



**Abb. 46** Retrosynthese nach erster Strategie („Elektrophile Esterroute“).

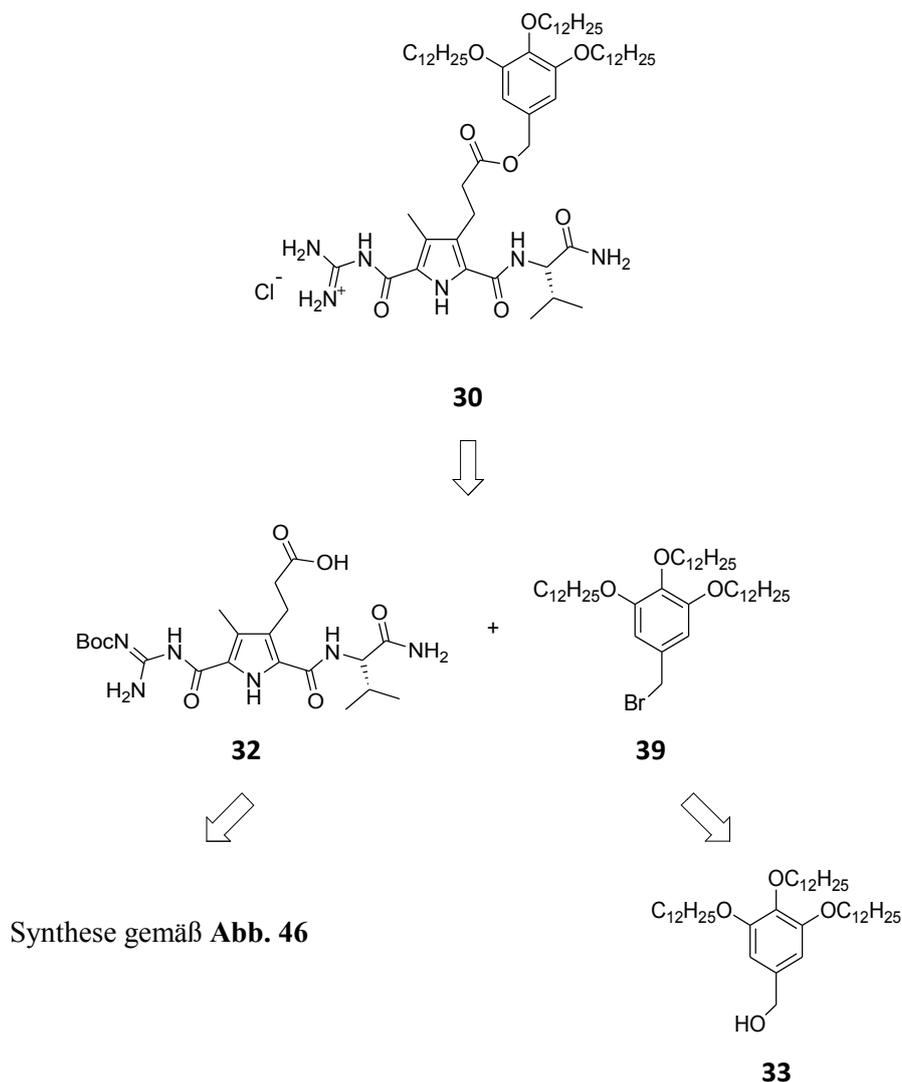
Dieser Aufbau des Zielmoleküls basiert auf der passenden Verwendung von orthogonalen Schutzgruppen am Pyrrolbaustein. Zuletzt wird der Methylester am Linker in der 3-Position des Pyrrols im Alkalischen gespalten, so dass bis dahin keine basenlabilen Schutzgruppen verwendet werden dürfen. Deswegen wurde die Boc-geschützte Guanidinverbindung verwendet. Da in Verbindung **30** ein Benzylester vorhanden ist, konnte zudem keine Cbz-

Schutzgruppe verwendet werden, denn die Entschützung des Guanidins ist der letzte Schritt der Synthesesequenz und würde zur gleichzeitigen Spaltung des Benzylesters führen. Eine denkbare direkte Reaktion mit freiem Guanidin ist problematisch, da dieses mit aktivierten Pyrrolcarbonsäuren oft nur unter harschen Bedingungen, d.h. langdauerndem Erhitzen bei hoher Temperatur, reagiert, was zur Zersetzung des Produktes führen kann. Weiterhin wäre auch die Aufarbeitung schwierig, da sich freie Guanidiniumverbindungen säulen-chromatographisch sehr schlecht reinigen lassen. Die Variante mit mono-geschütztem Guanidin hingegen lässt sich bei milden Bedingungen durchführen und die entstehende Verbindung ist einfacher zu reinigen.

Die Synthese des Triethers **33** geht vom Gallsäureethylester **38** aus. Dieser soll im ersten Schritt mit Dodecylbromid zu Verbindung **36** verethert werden. Darauf folgend soll die Ester-zur Alkoholfunktion reduziert werden, wodurch man zu dem zweiten Baustein **33** gelangt. Diese Synthese ist literaturbekannt und in wenigen Schritten mit hohen Ausbeuten durchführbar.<sup>[103]</sup>

Alternativ lässt sich die Verknüpfung des Pyrrolbausteins mit dem lipophilen Triether auch unter Umkehrung der Reaktivität durchführen (**Abb. 47**), im Folgenden als „nukleophile Esteroute“ bezeichnet. Dafür setzt man die freie Säure der Pyrrolverbindung **32** ein, die in einer Substitutionsreaktion zweiter Ordnung mit dem elektrophilen Benzylbromid **39** reagieren soll. Die nukleophile Position ist hier also die freie Carbonsäure bzw. das Carboxylat von Pyrrolverbindung **32**. Die Synthese der Pyrrolcarbonsäure **32** wurde in der ersten Strategie beschrieben. Für das Benzylbromid **39** geht man vom Triether **33** aus, dessen Alkoholfunktion durch ein Bromierungsreagenz zum Bromid umgewandelt wird.

Diese Route hat den Vorteil, dass die Kupplung der Pyrrolcarbonsäure **32** mit dem Alkoholbaustein **33** umgangen wird. Die relativ geringe Nukleophilie des benzyli-schen Sauerstoffs führt bei derartigen Reaktionen oft zu niedrigen Ausbeuten. Zwar ist auch das Carboxylat als Nukleophil nicht besonders stark, dies sollte aber durch die hohe Elektrophilie der Bromverbindung ausgeglichen werden. Für die Herstellung des Benzylbromids ist ein Reaktionsschritt mehr notwendig, die Umwandlung von Hydroxy- zu Bromidfunktionen ist jedoch schnell durchzuführen und liefert gewöhnlich hohe Ausbeuten.

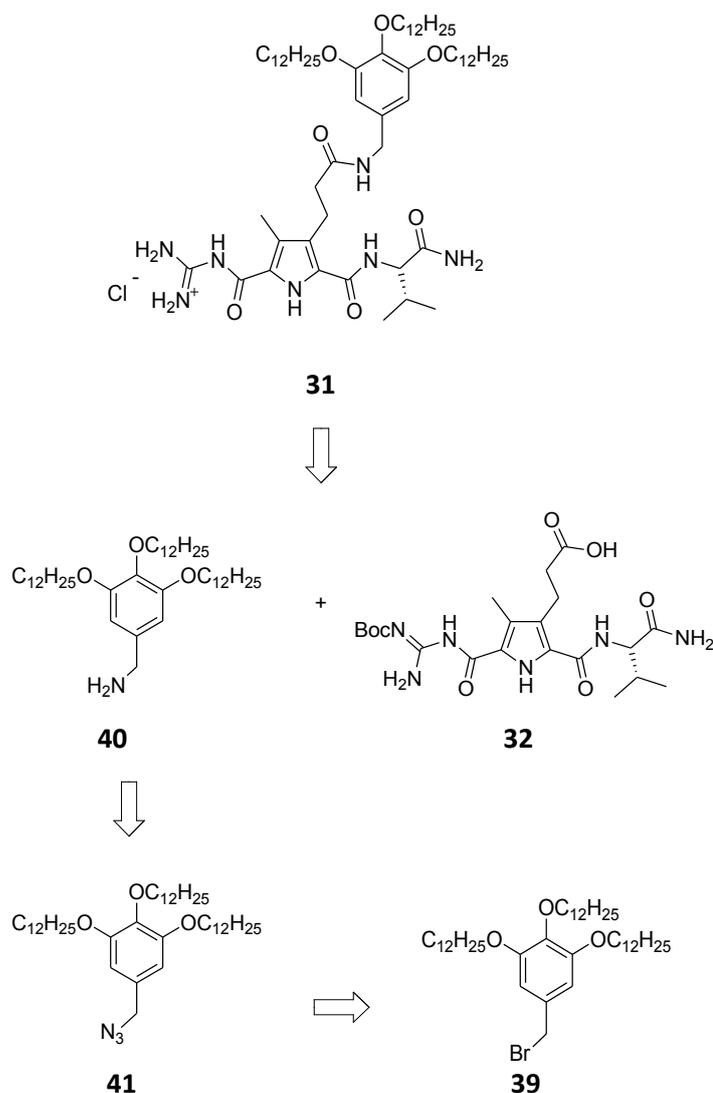


**Abb. 47** Retrosynthese nach zweiter Strategie („Nukleophile Esterroute“).

Bei der dritten Alternative (**Abb. 48**), der Amidroute, wird statt einer Ester- eine Amidbindung geknüpft, so dass man zu Verbindung **31** gelangt. Dies soll durch eine Kupplungsreaktion zwischen dem bereits beschriebenen Pyrrolbaustein **32** und dem Benzylamin **40** erreicht werden. Der Aufbau desamins ausgehend von der Bromverbindung **39** ist auf verschiedenen Wegen denkbar, eine vielversprechende Möglichkeit ist der über die Azidverbindung **41** und anschließende Reduktion zum gewünschten Amin **40**.

Auf diesem Weg kann die Kupplung mit dem reaktiven Amin **40** durchgeführt werden, was eine höhere Ausbeute im entscheidenden Kupplungsschritt bedeutet und gleichzeitig die Eigenschaften des entstehenden Transportermoleküls nicht wesentlich verändert. Zur Herstellung des Benzylamins sind zwei zusätzliche Schritte nötig, was einen etwas höheren

Zeiteinsatz erfordert. Die Einführung eines Amins wäre auch über eine Gabrielsynthese oder alternativ eine Mitsunobu-Reaktion aus dem entsprechenden Alkohol **33** möglich, der Vorteil der Azidroute ist die hohe Reaktivität des Nukleophils sowie die guten Ausbeuten und die leichte Aufarbeitung.

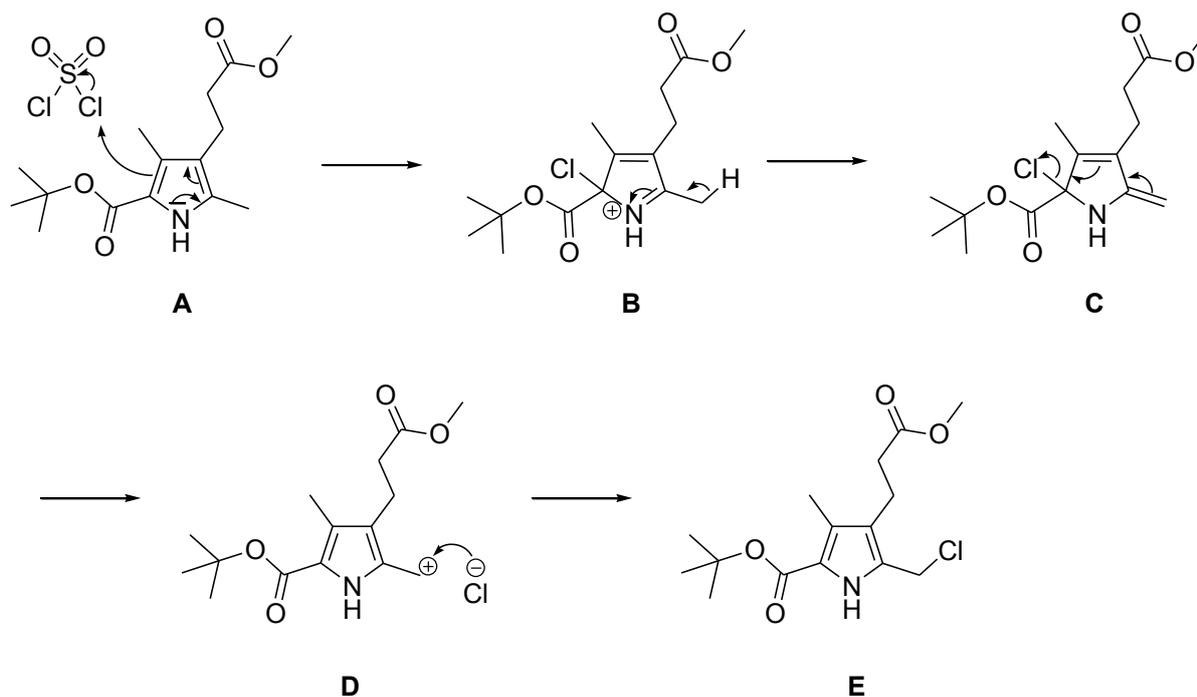


**Abb. 48** Retrosynthese nach dritter Strategie (Amidroute).

Die Ergebnisse der Durchführung der verschiedenen Syntheserouten werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

### 5.1.1 Die elektrophile Esterroute

Zu Beginn der ersten Synthesesequenz stand die Herstellung des Pyrroltricarboxylats **29** aus dem Diester **37** (siehe **Abb. 50**). Diese Synthese ist wie der vorherige Aufbau der Diesterverbindung literaturbeschrieben,<sup>[102, 104]</sup> jedoch führte die Oxidationsreaktion immer wieder zu Problemen und stark variierenden Ausbeuten. Deswegen wurde versucht, die Synthese zu verbessern. Der Mechanismus der Reaktion ist gegen die allgemeine Erwartung als ionisch nachgewiesen, entsprechende Reaktionen laufen auch im Dunkeln und unter Zusatz von Radikalfängern ab.<sup>[105-107]</sup> Substitutionen mit Chlorierungsreagenzien wie elementarem Chlor oder hier Sulfurylchlorid an Methylgruppen in  $\alpha$ -Position von Pyrrolverbindungen reagieren über nichtkonventionelle aromatische Substitutionen. Der wahrscheinliche Mechanismus der Reaktion ist in **Abb. 49** dargestellt. Die geschwindigkeitsbestimmende Zwischenstufe ist die Bildung eines  $\sigma$ -Komplex mit einem Chlorsubstituenten in 2-Position (**B**), der bei ähnlichen Pyrrolen bei Temperaturen unter  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  sogar isoliert werden kann.<sup>[108]</sup> Diese Verbindung wird nun deprotoniert, was als nächstes zu einer Zwischenstufe mit zwei konjugierten Doppelbindungen (**C**) führt, die daraufhin rearomatisiert unter Bildung einer kationischen Zwischenstufe (**D**).<sup>[106]</sup> Das Chloridion dissoziiert aber nicht vollständig, sondern greift wohl unter Bildung eines Kontaktionenpaares intramolekular das Benzylkation an, was zur Bildung des Produktes **E** führt. Derartige Reaktionen sind hochselektiv für die  $\alpha$ -Methylgruppe bei Pyrrolen, was durch den Mechanismus nicht auf den ersten Blick ersichtlich wird, da auch die  $\beta$ -Methylgruppe in 3-Position auf die gleiche Art chloriert werden könnte. Eine mögliche Erklärung liegt in der Stabilität der kationischen Zwischenstufe **D**, deren positive Ladung an der  $\alpha$ -Methylgruppe aufgrund der höheren Elektronendichte in 2- und 5-Position des Pyrrolrings besser stabilisiert ist. Die intramolekulare Natur der Halogenverschiebung ist durch Halogenierungen mit isotope markiertem Chlor sowie mit bromsubstituierten Pyrrolen, die bei Umsetzungen mit Chlor auch eine Bromierung der  $\alpha$ -Methylgruppe zeigten, nachgewiesen worden.<sup>[109]</sup>



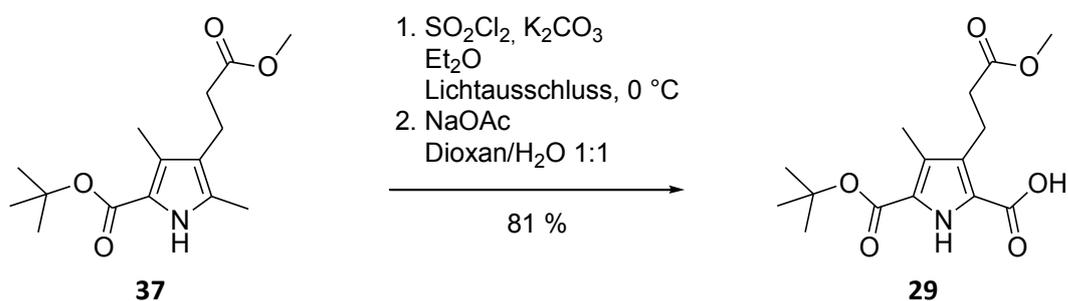
**Abb. 49** Vermutlicher Mechanismus der Chlorierung der Pyrrol- $\alpha$ -Methylgruppe mit Sulfurylchlorid.

Im Gegensatz zur Halogenierung der  $\alpha$ -Methylgruppe von Pyrrolen laufen Halogenierungen über einen radikalischen Mechanismus auch an der  $\beta$ -Methylgruppe ab.<sup>[103]</sup> Zwar ist die Reaktivität auch für die radikalische Reaktion an der  $\alpha$ -Methylgruppe höher, doch im Gegensatz zu der ionischen Halogenierung treten beträchtliche Nebenprodukte von Produkten auf, die in  $\beta$ -Position halogeniert sind.

Bei der literaturbeschriebenen Synthese von Verbindung **29**<sup>[101]</sup> wurde eine Umsetzung mit Sulfurylchlorid unter anfänglicher Kühlung auf  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in trockenem Diethylether zum Trichlorid und anschließende Hydrolyse zur Carbonsäure durchgeführt. Trotz des Einsatzes von vollständig trockenen Reagenzien unter Schutzgas konnte bei der Durchführung immer wieder die Bildung von Blasen bereits bei der Lösung des Sulfurylchlorids im Diethylether beobachtet werden, die nicht auf die Hydrolyse des Sulfurylchlorids zurückgehen konnte. Es schienen radikalische Reaktionen mit dem Diethylether aufzutreten, wodurch einerseits das eingesetzte Reagenz verbraucht wurde. Andererseits konnte eine radikalische Reaktionsführung möglicherweise zum falschen Produkt führen, das an der  $\beta$ -Methylposition oxidiert wurde.

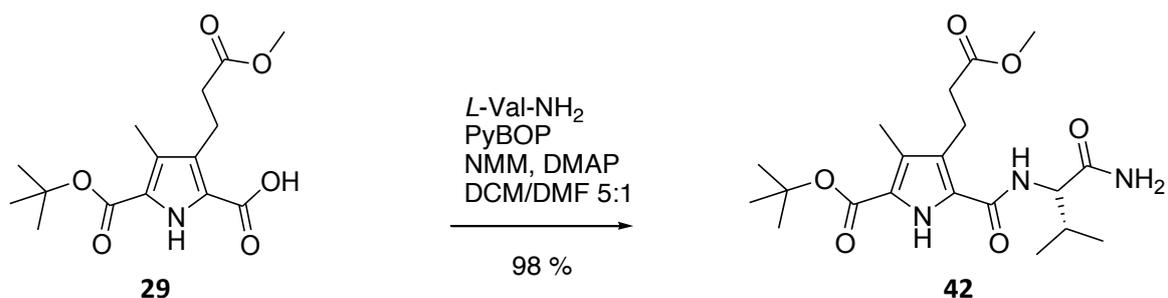
Deswegen wurde die Reaktion derart angepasst, dass radikalische Nebenreaktionen weitgehend ausgeschlossen werden konnten. Das Sulfurylchlorid wurde nicht mehr vor der

Zugabe in Diethylether gelöst, sondern in reiner Form zugegeben und die Reaktion wurde unter Lichtausschluss und Kühlung auf lediglich 0 °C durchgeführt, um dem entstehenden  $\sigma$ -Komplex die Weiterreaktion zu ermöglichen. Zum Schluss wurde auf Raumtemperatur erwärmt anstatt zum Rückfluss zu erhitzen. Dadurch konnten die Ausbeute von 49 % auf 81 % gesteigert werden und zusätzlich war die Reaktion wesentlich zuverlässiger, d.h. die Ausbeuten schwankten nicht mehr so stark. Denkbar wäre auch der Ersatz des Diethylethers durch Methyl-*tert*-butylether oder der Einsatz von Radikalfängern gewesen.



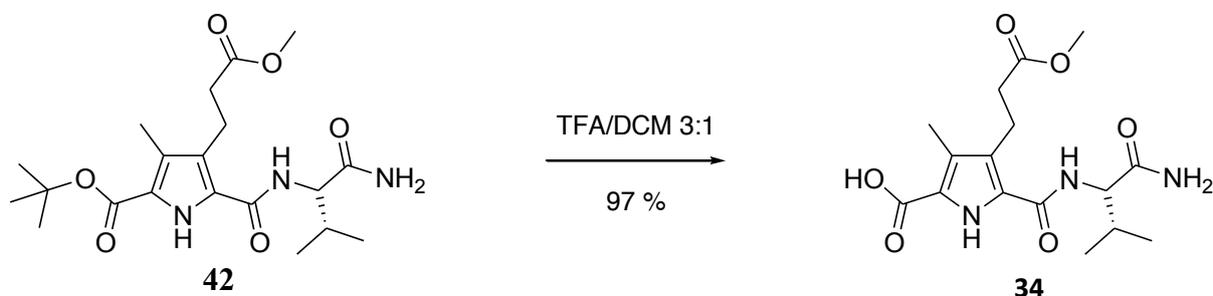
**Abb. 50** Verbesserte Oxidation der Pyrrol- $\alpha$ -Methylgruppe von **37** mit Sulfurylchlorid.

An die freie Carbonsäurefunktion von **29** wurde mittels einer Aktivestercupplung mit PyBOP als Reagenz *L*-Valinamid angebracht. PyBOP- und HCTU-Kupplungen laufen umso besser ab, je unpolarer das Lösungsmittel ist. Deswegen wurde das Lösemittelgemisch von Dichlormethan und DMF so eingestellt, dass sich die Edukte gerade lösen, unter möglichst wenig Einsatz von DMF, um die Reaktivität so hoch wie möglich zu halten. NMM als Base und DMAP als Katalysator wurden zugegeben und die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt, bis nach zwei Tagen Rühren bei Raumtemperatur das Edukt komplett reagiert hatte und nach säulenchromatographischer Aufarbeitung die neue Verbindung **42** in 98 %iger Ausbeute erhalten werden konnte.



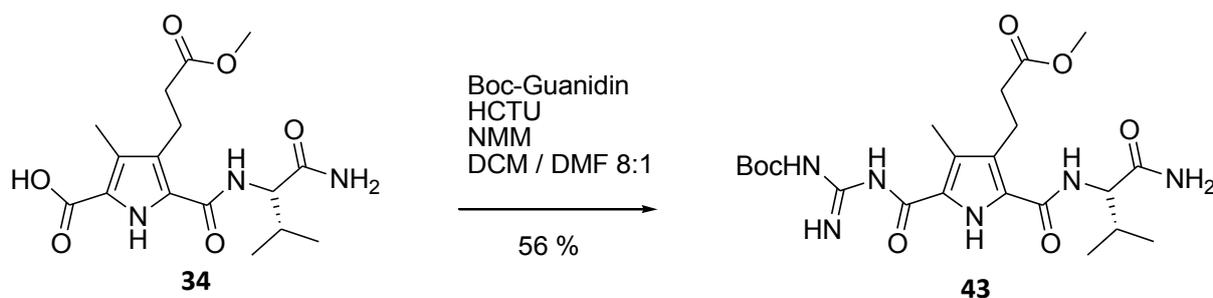
**Abb. 51** Aktivestercupplung von Valinamid an die freie Säurefunktion von **29**.

Die *tert*-Butylgruppe von **42** wurde durch TFA in Dichlormethan abgespalten. Auch hier wurde die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt und nach 5 h nach der vollständigen Reaktion des Edukts aufgearbeitet, so dass man fast quantitativ Verbindung **34** erhielt.



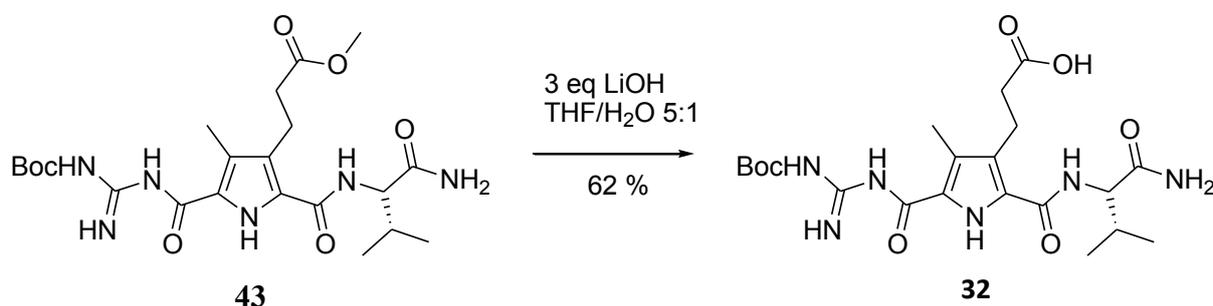
**Abb. 52** Abspaltung der *tert*-Butylgruppe von **42** im Sauren.

An Verbindung **34** wurde das mono-Boc-geschützte Guanidin<sup>[102]</sup> wiederum mittels Aktivesterkupplung angefügt. Nach Schwierigkeiten bei der Aufarbeitung mit PyBOP, die zu niedrigen Ausbeuten führten, wurde stattdessen HCTU benutzt, das eine recht ähnliche Reaktivität zeigt, dessen Abbauprodukte sich aber in der anschließenden säulenchromatographischen Aufarbeitung leichter abtrennen ließen. Zur einfacheren dünnschichtchromatographischen Verfolgung wurde zudem auf DMAP als Katalysator verzichtet und es reichte bereits ein Lösemittelverhältnis von DCM/DMF 8:1 zur vollständigen Lösung. Dennoch ist die Ausbeute von Verbindung **43** mit 56 % deutlich geringer als bei der vorherigen Aktivesterkupplung. Sie liegt damit jedoch im häufig beobachteten Bereich von Reaktionen von einfach geschütztem Guanidin mit Pyrrolcarbonsäuren. Besonders in 2- und 5-Position am Pyrrolring sind diese in ihrer Elektrophilie deutlich herabgesetzt, was zu weniger vollständigem Umsatz mit dem mäßigen Nukleophil mono-Boc-geschütztes Guanidin führt.



**Abb. 53** Aktivesterkupplung von mono-Boc-geschütztem Guanidin an die freie Carbonsäurefunktion von **34**.

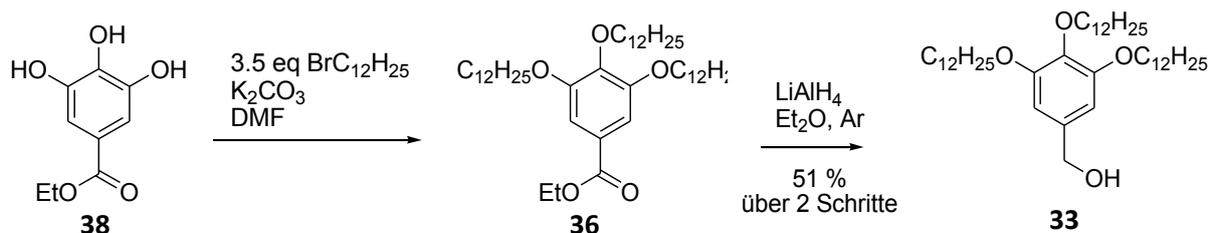
Zur Verseifung des Methylesters **43** wurde Lithiumhydroxid im dreifachen Überschuss in einer Mischung aus THF und Wasser im Verhältnis 5:1 eingesetzt. In der dünnschichtchromatographischen Verfolgung wurde nach 3 h das Auftreten eines Nebenprodukts beobachtet, dessen Konzentration in der Folge anstieg, während aber immer noch Edukt vorhanden war. Wahrscheinlich wurde bei längerer Reaktionsführung auch das geschützte Guanidin abgespalten. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Reaktion nach 5 h abgebrochen wurde, auch wenn noch leichte Spuren an Edukt zu sehen waren, jedoch überwog danach der Verlust durch die Nebenreaktion. Verbindung **32** konnte mit einer maximalen Ausbeute von 62 % erhalten werden.



**Abb. 54** Verseifung des Methylesters von **43** mit Lithiumhydroxid.

Damit war die Synthese des Pyrrolbausteins erfolgreich abgeschlossen, es folgte die Herstellung der Trietherverbindung **33**.

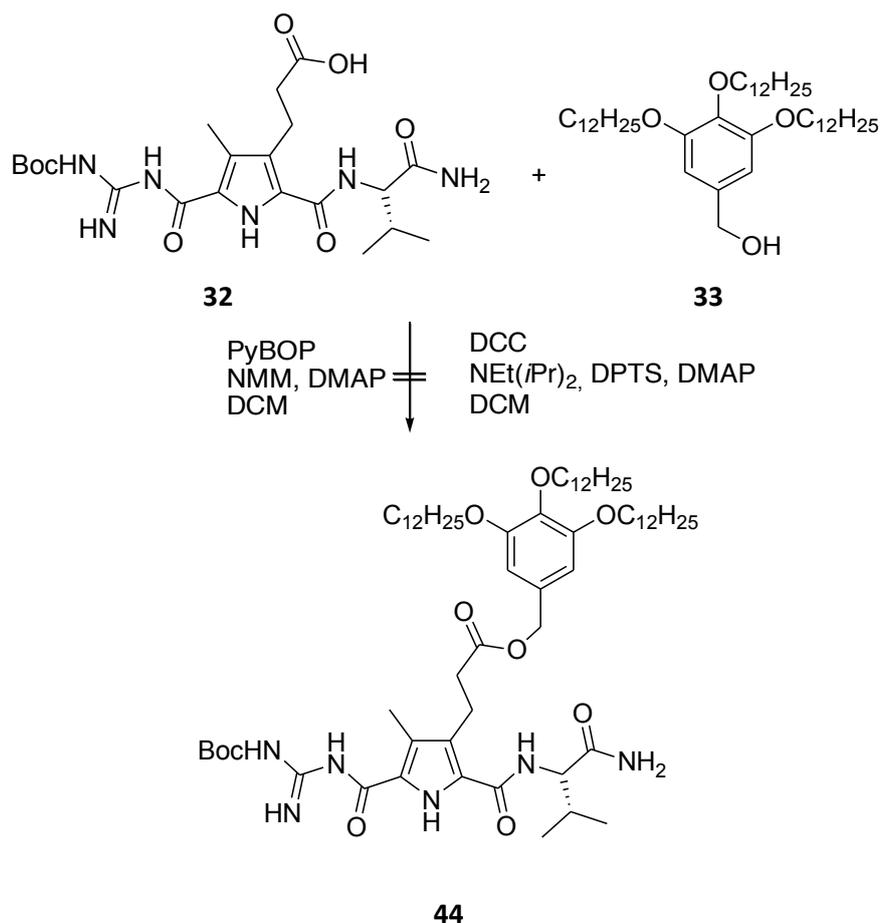
Käuflicher Gallussäureethylester **38** wurde mit einem Überschuss Dodecylbromid sowie Kaliumcarbonat zur Deprotonierung der Hydroxygruppen in DMF suspendiert und unter Erhitzen auf 60 °C für 12 h stark gerührt, bis das komplette Edukt gemäß Dünnschichtchromatographie verbraucht war, wobei nur ein Produktpot entstanden war. Die Reaktionsmischung wurde säulenchromatographisch gereinigt, jedoch konnte das Dodecylbromid auf diesem Wege auch nach mehrfachem Säulen nicht vollständig abgetrennt werden. In der verwendeten Literatur waren keine Aufarbeitungsschritte angegeben.<sup>[103]</sup> Im NMR war zu sehen, dass ausschließlich das gewünschte Produkt **36** und Dodecylbromid vorlagen. Im nächsten Schritt sollte die Estergruppe zur Hydroxyfunktion reduziert werden, was eine Erniedrigung des Retentionsfaktors des Triethers zur Folge haben sollte, während eine Reduktion des Dodecylbromids zum Dodekan eher zu einer leichten Erhöhung führen sollte. Da die Esterzwischenstufe nicht weiter benötigt wurde, wurde deswegen das verunreinigte Rohprodukt direkt weiter umgesetzt und die Reinigung des Produkts erst im nächsten Schritt durchgeführt.



**Abb. 55** Veretherung des Gallussäureethylesters **38** und anschließende Reduktion des Ethylesters zum Alkohol.

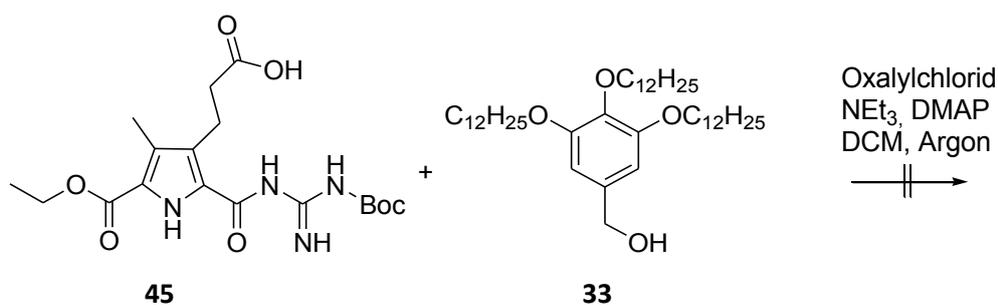
In trockenem Diethylether unter Schutzgas wurde ein circa 1.5-facher Überschuss an Lithiumaluminiumhydrid vorgelegt und unter Rühren wurde langsam das vorher erhaltene Rohprodukt zugegeben. Während der folgenden 4 h konnte die Entstehung des Produktes auf der DC-Folie verfolgt werden, wobei sich der Retentionsfaktor mit reinem Dichlormethan als Laufmittel von 0.9 auf 0.5 verringerte. Nach wässriger Aufarbeitung und Abtrennung des entstandenen Aluminiumhydroxids wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt. Dabei konnte das erwünschte Produkt **33** vom entstandenen Dodekan abgetrennt werden und somit in 51 %iger Ausbeute über die zwei Reaktionsschritte erhalten werden.

Im letzten Schritt der Synthesesequenz sollte die Pyrrolcarbonsäure **32** mit dem Benzylalkohol **33** verestert werden. Dies wurde wiederum mit einer PyBOP-vermittelten Aktivesterkupplung versucht. Als Base wurde NMM zugegeben und DMAP als Katalysator. Trotz Rühren bei Raumtemperatur oder Erhitzen auf 40 °C für mehrere Tage konnte im DC zwar die Entstehung eines Produkts beobachtet werden, dieses war aber nach der wässrigen Aufarbeitung nicht mehr zu sehen, so dass es sich wahrscheinlich um den Aktivester gehandelt hatte. Auch der Einsatz von DCC anstelle von PyBOP und Diisopropylethylamin als Base blieb erfolglos. Die Alkoholfunktion von **33** scheint nicht reaktiv genug für die Kupplungsreaktion zu sein.



**Abb. 56** Versuchte Aktivester-Kupplungen des Benzylalkohols von **33** an die freie Carbonsäurefunktion von **32**.

Da durch die verschiedenen Ansätze fast die gesamte Pyrrolverbindung **32** verbraucht worden war, wurde in der Folge noch eine Testreaktionen mit Oxalylchlorid an der ähnlichen Verbindung **45** durchgeführt. In dieser Reaktion wurde das korrespondierende Säurechlorid erzeugt, das die Veresterung mit dem Alkohol **33** ermöglichen sollte. Jedoch führte die Reaktion zu keiner Umsetzung, auch hier war die Reaktivität scheinbar nicht hoch genug.



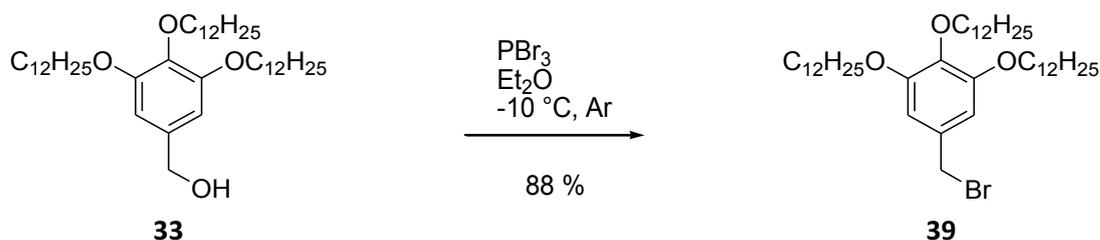
**Abb. 57** Versuchte Veresterung des Benzylalkohols **33** mit Carbonsäure **45** über das Säurechlorid.

Die zweite Syntheseroute, die nukleophile Esteroute, hatte zur gleichen Zeit bereits Erfolge gezeigt, deswegen wurden weitere Versuche auf dem bisherigen Weg nicht mehr unternommen. Stattdessen wurde die folgende alternative Route beschrrieben.

### 5.1.2 Die nukleophile Esteroute

Die nukleophile Esteroute unterscheidet sich erst in den letzten Schritten von der elektrophilen Variante, so dass lediglich die Alkoholfunktion von **33** in ein Bromid umgewandelt werden musste und anschließend die Verknüpfung der beiden Bausteine vorgenommen werden konnte.

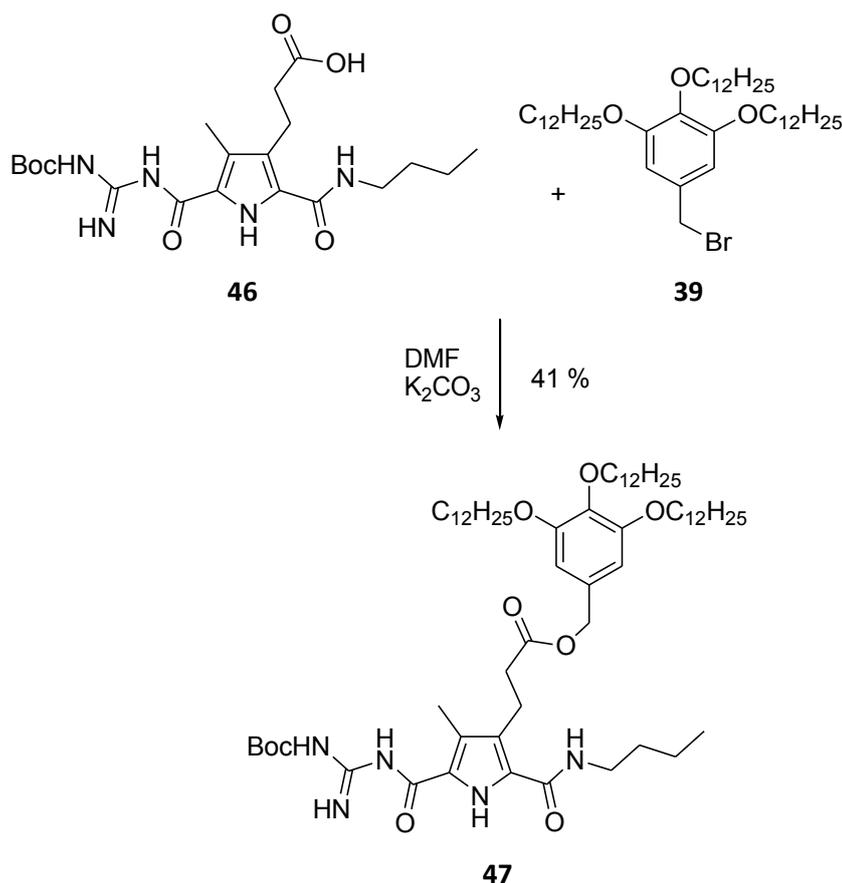
Der Triester **33** wurde mit Phosphortribromid in Diethylether bei  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Argon umgesetzt. Ohne Notwendigkeit einer säulenchromatographischen Aufarbeitung erhielt man **39** in reiner Form in einer Ausbeute von 88 %.



**Abb. 58** Umwandlung der Hydroxyfunktion von **33** in ein Bromid.

Die nächste Reaktion war die Reaktion der freien Carbonsäure **32** mit dem eben beschriebenen Benzylbromid. Da zum Zeitpunkt der Synthese die Pyrrolverbindung **32** fast komplett verbraucht war, jedoch die sehr ähnliche Verbindung **46** vorlag, wurde zunächst die folgende Testreaktion durchgeführt.

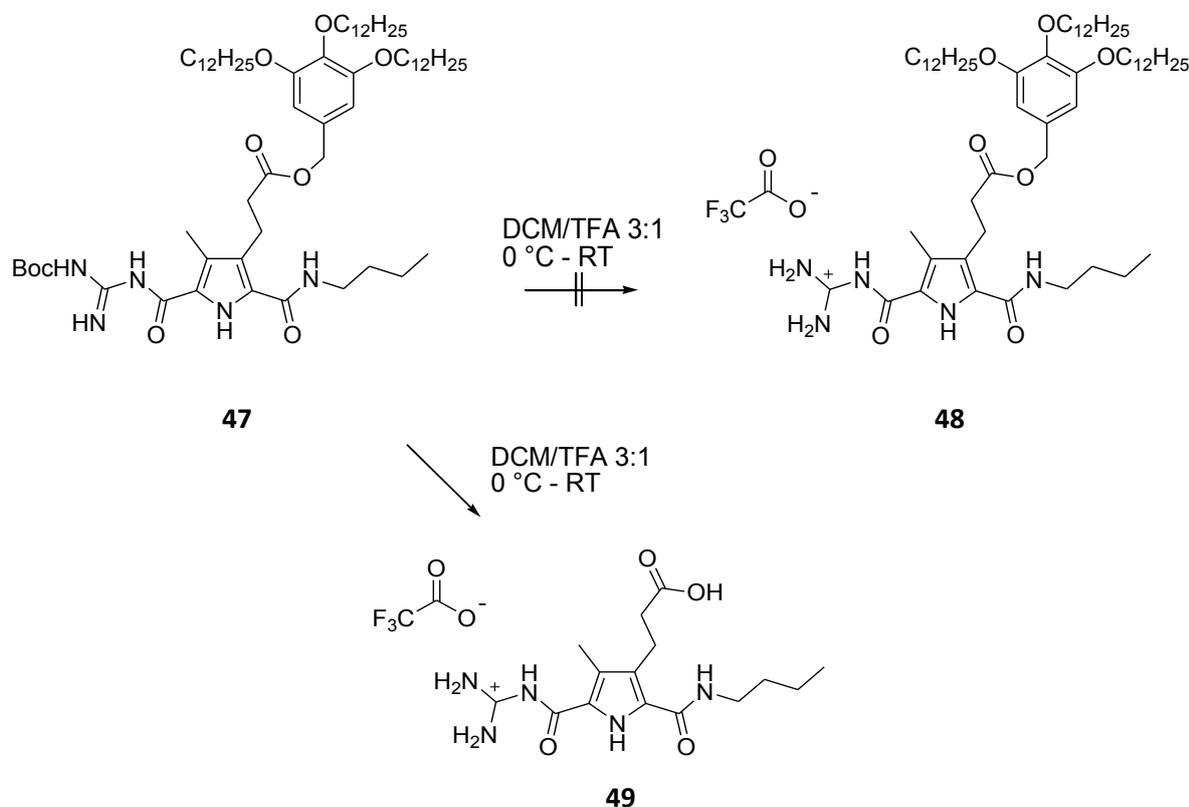
In einer nukleophilen Substitutionsreaktion zweiter Ordnung sollte die freie Carbonsäure **46** mit dem Benzylbromid **39** reagieren. Dazu wurden die Edukte mit Kaliumcarbonat zur Deprotonierung der Säurefunktion in DMF suspendiert und bei Raumtemperatur einen Tag lang intensiv gerührt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung konnte der gewünschte Benzylether **47** daraufhin in 41 %iger Ausbeute erhalten werden.



**Abb. 59** Nukleophile Substitution des Bromids von **39** durch das Carboxylat von **46**.

Der nächste und letzte Schritt der Synthesesequenz war die Abspaltung der Boc-Gruppe, um das freie Guanidiniumkation zu erhalten. Diese Reaktion wurde ebenfalls zuerst mit der Testverbindung **47** durchgeführt. Dazu wurde die Verbindung mit einer 25 %igen Lösung von TFA in DCM bei 0 °C umgesetzt. Nachdem nach 2 h keine Reaktion in der dünnschichtchromatographischen Verfolgung zu beobachten war, wurde auf Raumtemperatur erwärmt. Nach weiteren 5 h war der Eduktspot verschwunden und ein neuer Spot entstanden, der einen  $R_f$ -Wert von annähernd 0 aufwies. Da bei der Entschützung nur flüchtige Nebenprodukte entstehen sollten, wurde das Lösemittel abdestilliert, was zum reinen Produkt führen sollte. In NMR- und Massenspektrum zeigte sich jedoch eine Produktmischung aus verschiedenen Komponenten. Wie im Roh-NMR zu sehen war, war nicht nur die Boc-Gruppe abgespalten worden, sondern ebenfalls der Benzylester, so dass die freie Carbonsäure **49** vorlag (**Abb. 60**). Dieses überraschende Resultat konnte durch eine Literaturrecherche zur Säurenlabilität ähnlicher Tris-Alkoxy-Benzylester schließlich bestätigt werden.<sup>[110]</sup> Durch die Einführung der drei elektronenschiebenden Ethersubstituenten scheint die Benzylgruppe ein

Carbeniumion in der benzylichen Stellung so gut zu stabilisieren, dass sie im Endeffekt durch saure Bedingungen abgespalten wird.



**Abb. 60** Abspaltung der Boc-Schutzgruppe des Guanidins von **47** unter gleichzeitigem Verlust des Benzylesters.

Durch noch mildere Bedingungen mit geringeren TFA-Konzentrationen bei niedrigeren Temperaturen wäre eventuell eine selektive Entschützung möglich gewesen. Sicherlich hätte man aber keine quantitative Ausbeute erhalten, so dass weitere Aufarbeitungsschritte nötig gewesen wären. Aufgrund dieser Unsicherheit und der möglicherweise schwierigen Aufarbeitung der ionischen Verbindung wurde die dritte Syntheseroute eingeschlagen, da die dort entstehende Amidbindung deutlich beständiger gegenüber sauren Bedingungen ist als der analoge Ester.

### 5.1.3 Die Amidroute

Die dritte Herangehensweise beinhaltet im entscheidenden Schritt eine Kupplung zwischen der Carbonsäure von Pyrrolverbindung **32** und dem Benzylamin **40**. Zur Einführung der Aminfunktion waren verschiedene Vorgehensweisen denkbar. Am einfachsten schien es durch eine Gabrielsynthese aus dem analogen Bromid **39** herzustellen zu sein.

Dazu wurde Verbindung **39** mit Kaliumphthalimid in DMF suspendiert und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem in der dünnschichtchromatographischen Reaktionskontrolle das Edukt verschwunden war und sich ein Produkt gebildet hatte, wurde basisch aufgearbeitet, woraufhin ein Feststoff ausfiel und das entstehende Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt wurde. So erhielt man Verbindung **51** in der relativ geringen Ausbeute von 67 %, jedoch wurde die Reaktion nur einmal durchgeführt und nicht optimiert. Vermutlich waren während der säulenchromatographischen Reinigung Teile des Produktes verloren worden.

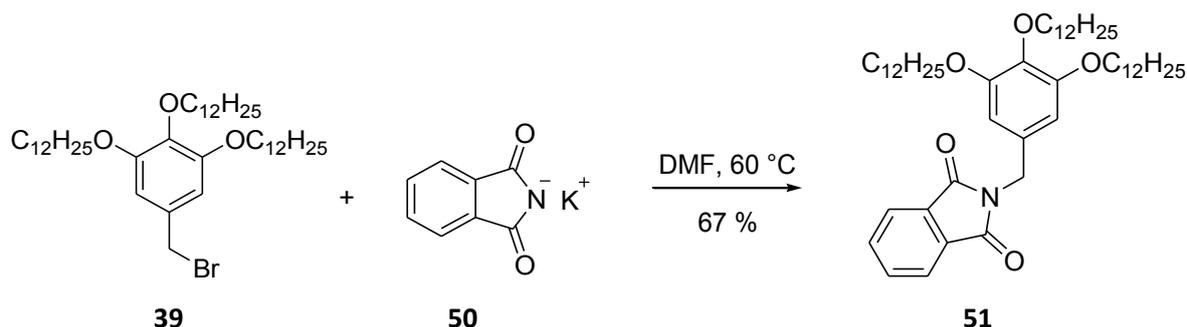
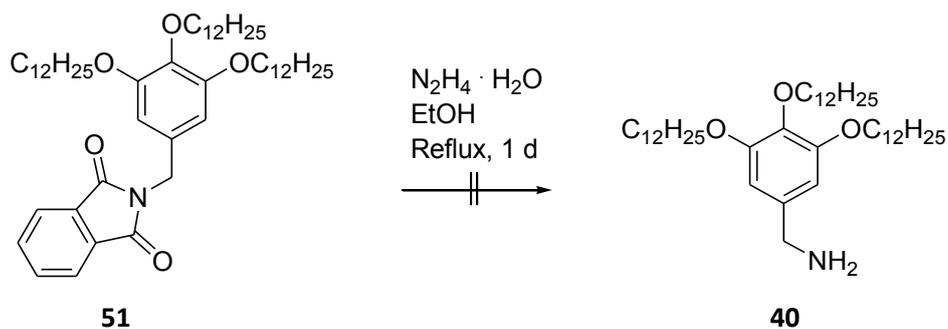


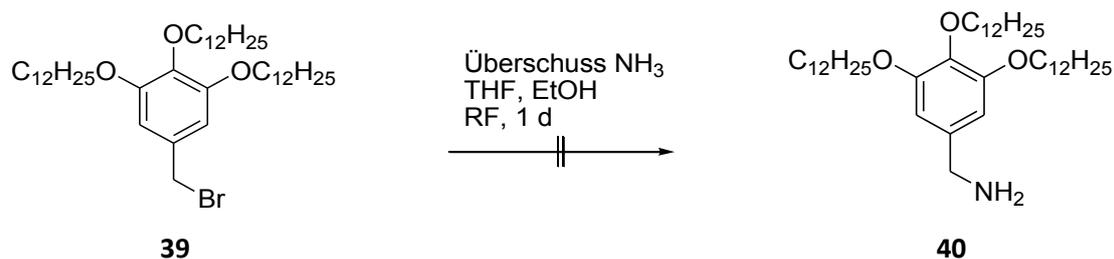
Abb. 61 Substitution des Bromids von **39** durch Phthalimid **50**.

Durch Umsetzung mit Hydrazin sollte das Amin **40** freigesetzt werden. Da nach einigen Stunden bei Raumtemperatur keine Reaktion zu beobachten war, wurde bei Rückfluss über Nacht gerührt. Auch nach 24 h konnte die entstandene Aminfunktion mittels Ninhydrin-Test nur in sehr geringen Spuren festgestellt werden, die nicht isoliert werden konnten. Der Großteil der Verbindung lag immer noch als Edukt vor.



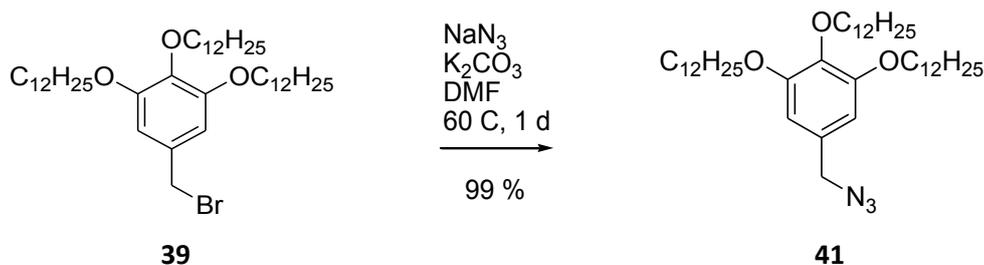
**Abb. 62** Versuchte Herstellung des Amins aus dem Phthalimid von **51** durch Umsetzung mit Hydrazin.

Simultan wurde versucht, Verbindung **40** durch Substitution des Bromids mit Ammoniak herzustellen. Nach Rühren bei Rückfluss über Nacht mit einem Überschuss an Ammoniak konnte nach säulenchromatographischer Aufarbeitung zwar ein Produkt isoliert werden, das ein vielversprechendes  $^1\text{H-NMR}$  aufwies, jedoch konnte kein korrektes Massenspektrum erhalten werden und außerdem lag die Ausbeute des Produkts unter 10 %, so dass dieser Ansatz nicht weiterverfolgt wurde.



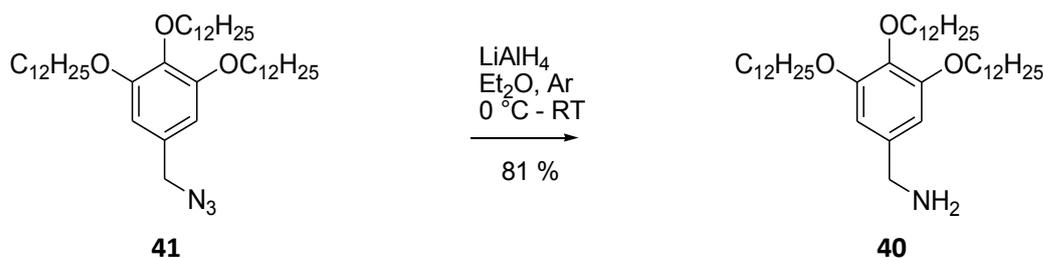
**Abb. 63** Versuchte Substitution des Bromids von **39** durch Ammoniak.

Alternativ sollte die Stickstofffunktion über den Umweg des Azids eingeführt werden. Da dieses ausgezeichnete Eigenschaften als Nukleophil besitzt, sollte es auch mit der relativ elektronenreichen Benzylposition in Verbindung **39** reagieren. Die Umsetzung wurde in DMF bei  $60\text{ }^\circ\text{C}$  über einen Zeitraum von 24 h durchgeführt, wobei ein großer Überschuss Kaliumcarbonat zugegeben wurde, um das eventuelle Entstehen explosiver Stickstoffsäure auszuschließen. Nach wässriger und säulenchromatographischer Aufarbeitung konnte das gewünschte Azid **41** in 99 %iger Ausbeute erhalten werden.



**Abb. 64** Substitution des Bromids von **39** durch Azid.

Es wurde auf verschiedenen Wegen versucht, die Azidverbindung **41** zum Amin zu reduzieren. Erfolglos blieb der Versuch durch Hydrierung in einer Wasserstoffatmosphäre unter Zugabe von Palladium auf Aktivkohle zum Produkt zu gelangen. Hier war keinerlei Umsetzung zu beobachten. Eine Staudinger-Reaktion durch Umsetzung mit Triphenylphosphan führte hingegen zum gewünschten Produkt. Hierbei konnte das Benzylamin **40** in Ausbeuten bis 65 % erhalten werden, jedoch war die Abtrennung des entstehenden Phosphanoxids schwierig, da es einen ähnlichen Retentionsfaktor besaß wie das erwünschte Produkt. Als effektivste Variante erwies sich die Umsetzung mit Lithiumaluminiumhydrid unter Kühlung auf 0 °C und unter Schutzgasatmosphäre in trockenem Diethylether. Nach der wässrigen Aufarbeitung konnte so das Produkt **40** sauber ohne die Notwendigkeit einer säulenchromatographischen Aufarbeitung in 81 %iger Ausbeute erhalten werden.



**Abb. 65** Reduktion des Azids **41** durch Lithiumaluminiumhydrid.

Somit waren die zwei Bausteine der Amidroute erfolgreich synthetisiert und sollten in der Folge zum Zielmolekül gekuppelt werden.

Die Umsetzung der Pyrrolverbindung **32** mit dem Benzylamin **40** gelang durch Umsetzung mit dem Kupplungsreagenz HCTU und NMM als Base in Dichlormethan mit möglichst

wenig DMF, in diesem Fall einer 2:1 Mischung. Der Reaktionsansatz wurde 3 d bei Raumtemperatur gerührt und nach wässriger Aufarbeitung säulenchromatographisch gereinigt. Die Ausbeute lag bei 58 % und die Verbindung war stabil gegenüber 1 %iger Essigsäure in der Laufmittelmischung.

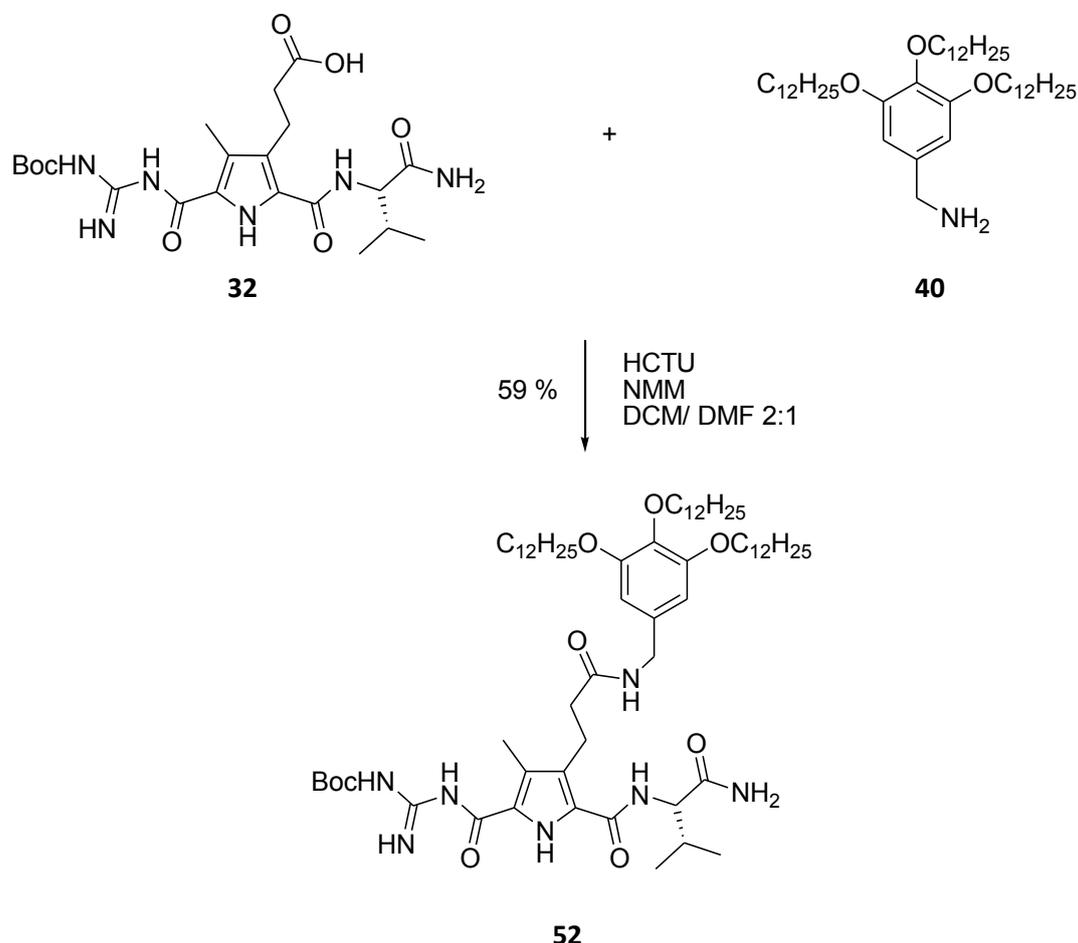
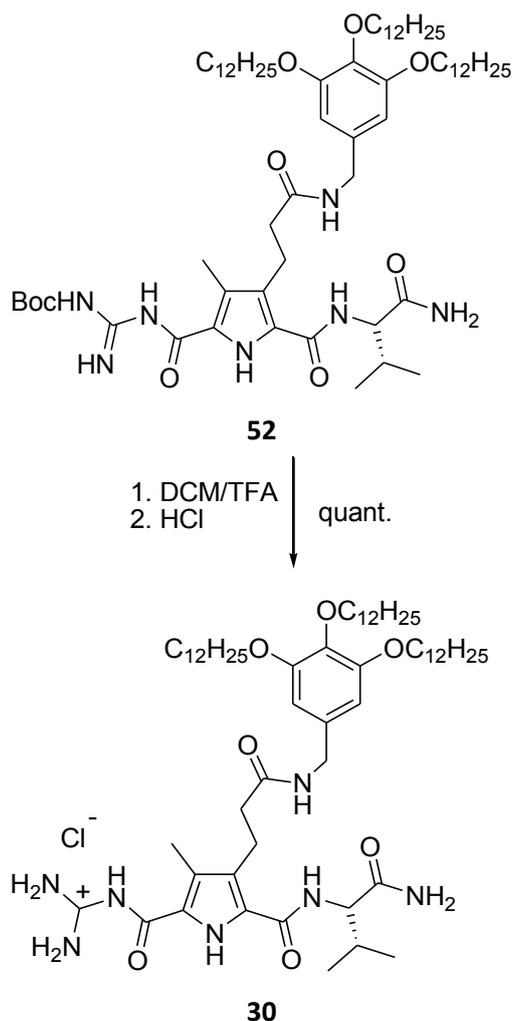


Abb. 66 Kupplung des Benzylamins **40** mit der freien Carbonsäure von **32**.

Die Entschützung des Boc-Guanidins erfolgte durch vierstündiges Rühren in einer 20 %igen Lösung von TFA in DCM. Nach Entfernen des Lösemittels erhielt man das TFA-Salz des freien Guanidins. Dieses wurde durch mehrmaliges Suspendieren in 5 %iger HCl und anschließendes Lyophilisieren zum Chloridsalz umgesetzt. Man erhielt Verbindung **30** in quantitativer Ausbeute. Es waren keine Anzeichen von Zersetzung der Verbindung zu sehen, offensichtlich war das Benzylamid stabil genug, dass es auch in stark saurer Umgebung beständig war.



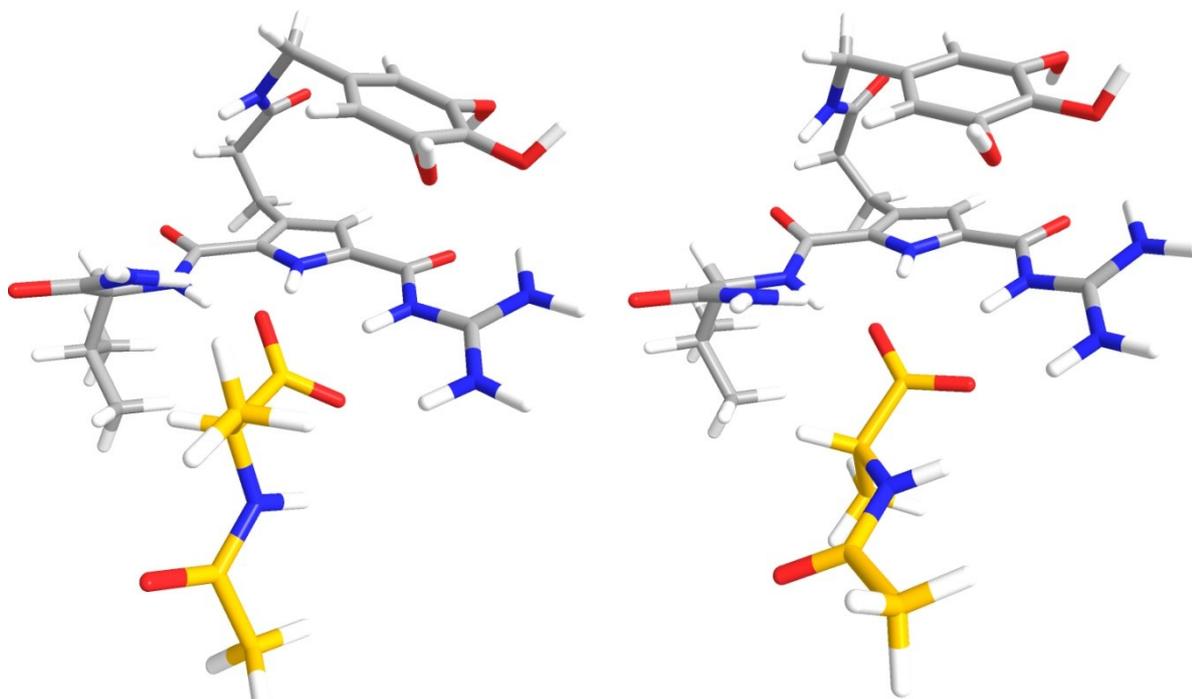
**Abb. 67** Entschützung des Boc-Guanidins und Umsalzen zum Rezeptor **30**.

Somit war die Synthese des Zielmoleküls **30** geglückt und auch die Stabilität der Verbindung war zufriedenstellend. Zudem sind die Einzelschritte leicht anzupassen, um eventuell einen anderen Seitenarm oder einen veränderten lipophilen Baustein einzubauen. Um die Bindungs- und Transporteigenschaften der Verbindung zu testen, wurden nun verschiedene Extraktions- und Transportversuche unternommen. Parallel dazu wurden Kraftfeldrechnungen zur Visualisierung der Komplexgeometrien durchgeführt.

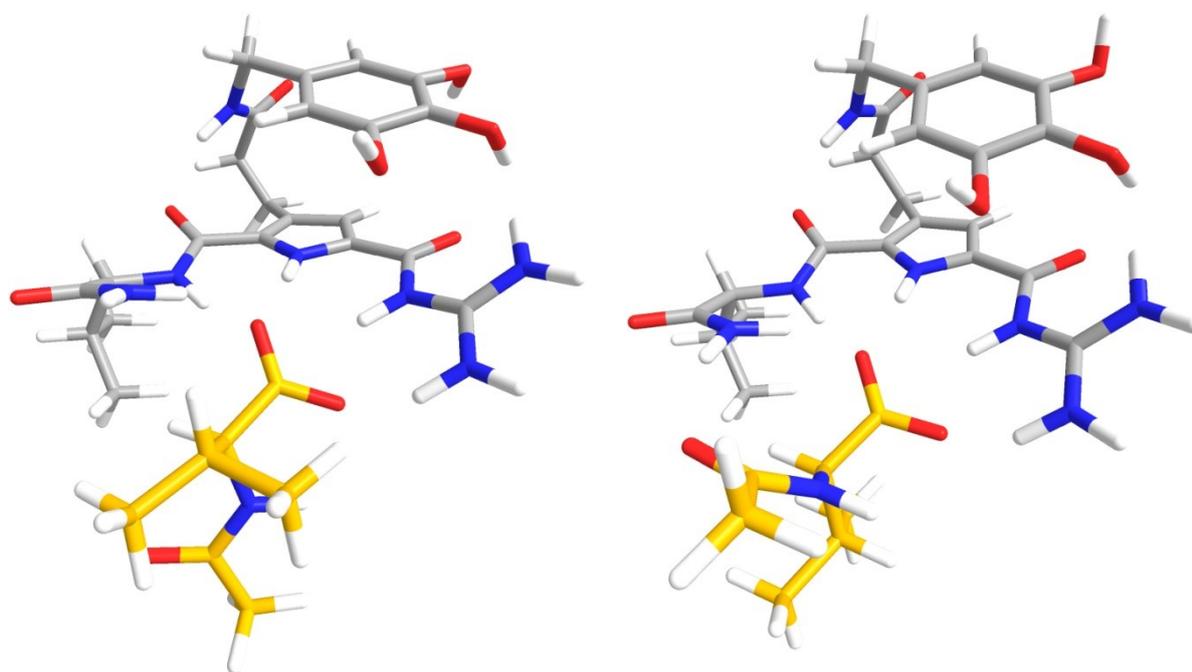
## 5.2 Kraftfeldrechnungen

Die Kraftfeldrechnungen wurden mit dem Programm Macromodel 8 durchgeführt. Es wurde das Amber\*-Kraftfeld verwendet mit einem GB/SA solvation model von Chloroform und konstanter Dielektrizitätskonstante. Mittels Monte-Carlo-Konformationssuche wurden energieminierte Strukturen berechnet (50,000 Schritte).<sup>[111]</sup> Die Konformationssuche sollte bis zum Finden eines eindeutigen globalen Minimums durchgeführt werden. Deswegen wurden die Komplexe mit Butylresten anstelle von Dodecylresten gerechnet, um die erforderliche Rechenleistung einzuschränken und um ein deutlicheres globales Minimum zu erhalten. Auch so wurden teilweise mehrere Strukturen, die sehr nahe am globalen Minimum lagen, erhalten. Diese unterschieden sich jedoch meist nur in der Ausrichtung der Alkylketten des Trietherbausteines. Die erhaltenen Strukturen sind in den Abbildungen **Abb. 68** bis **Abb. 72** für die Komplexe von Rezeptor **30** mit den *D*- und *L*-Enantiomeren von Alanin, Valin, Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan dargestellt. In den Abbildungen sind die Alkylketten des Triethers der Übersichtlichkeit wegen weggelassen.

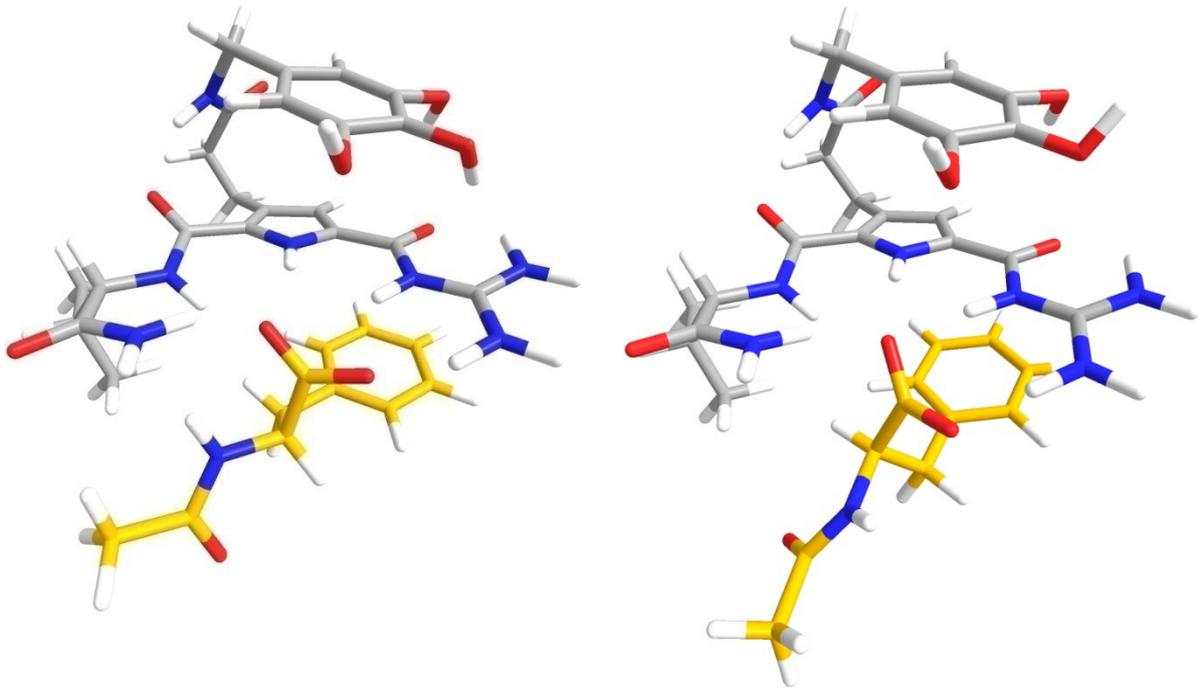
In den erhaltenen Strukturen liegt das Carboxylat der Aminosäure in der Bindungstasche, gebildet aus Guanidiniumgruppe, Pyrrol und Pyrrolseitenarm. Es sind fünf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Carboxylat und den Wasserstoffen des Guanidiniums, des Pyrrol-NHs und den beiden Amidfunktionen des Seitenarmes zu sehen. Da das primäre Amid des Pyrrolseitenarms in das Wasserstoffbrückenmuster integriert ist, dreht sich der Isopropylrest in die entgegengesetzte Richtung und zeigt keine Interaktion mit dem Substrat. Die Benzylgruppe mit den drei Ethersubstituenten bildet einen  $\pi$ -stack mit der Guanidinium-Gruppe. Die Alkylketten des Triethers, die in den Abbildungen weggelassen wurden, standen meist von Rezeptor und Substituent weg, manchmal legten sie sich an den Komplex an. Da sie, ähnlich wie das Lösemittel Chloroform, sehr lipophil sind, ist von ihnen wohl auch keine entscheidende Wechselwirkung zu erwarten. Lösemittelmoleküle können wahrscheinlich ähnliche oder sogar bessere Wechselwirkungen mit der Komplexoberfläche ausüben, zusätzlich machen entropische Faktoren eine enge Anlagerung der Dodecylketten ungünstig.



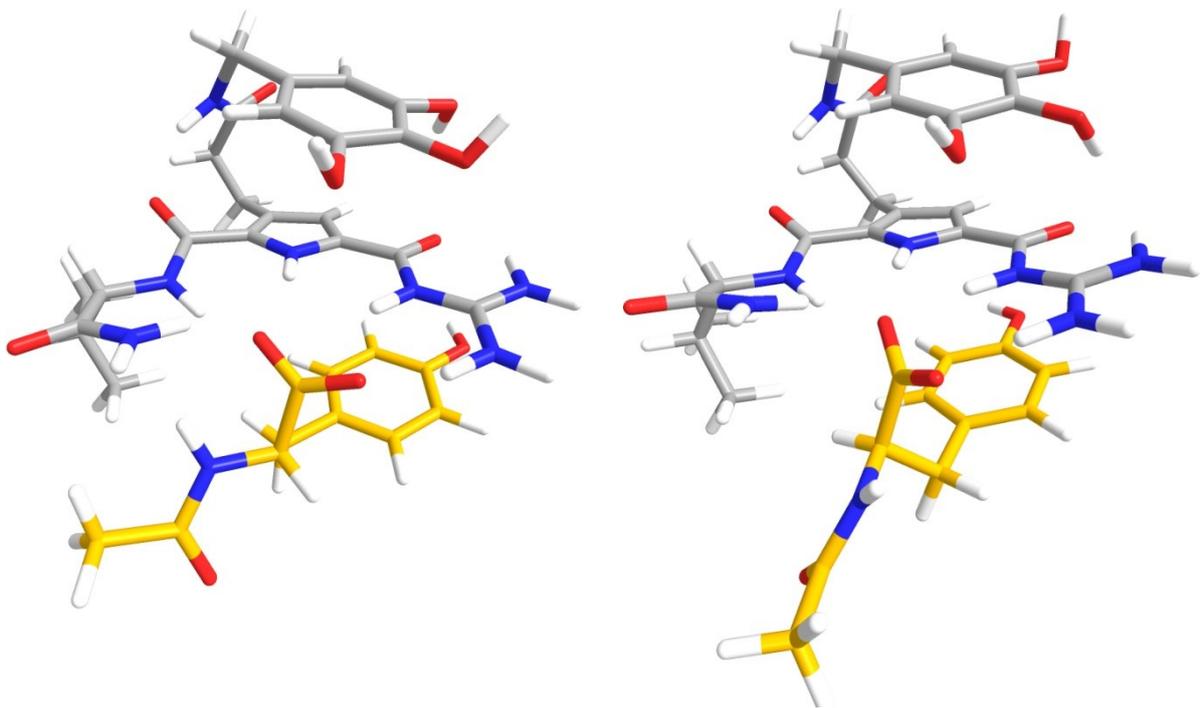
**Abb. 68** Ergebnisse der Kraftfeldrechnungen der Komplexe von *L*- und *D*-Alanin mit Rezeptor **30**.



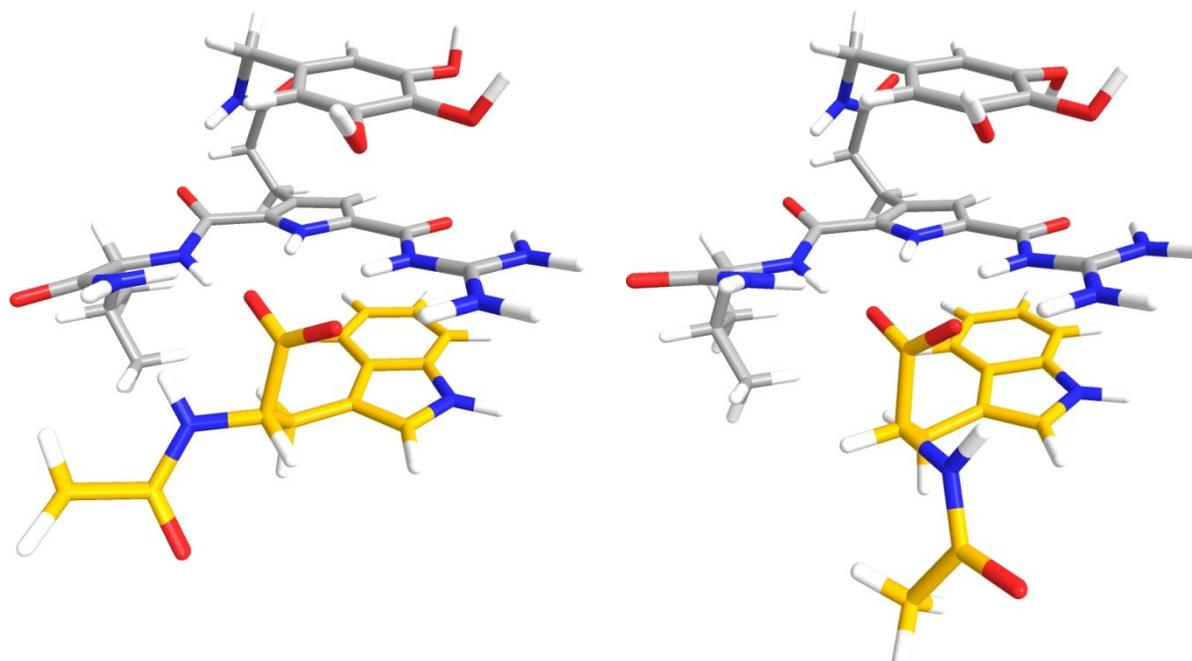
**Abb. 69** Ergebnisse der Kraftfeldrechnungen der Komplexe von *L*- und *D*-Valin mit Rezeptor **30**.



**Abb. 70** Ergebnisse der Kraftfeldrechnungen der Komplexe von *L*- und *D*-Phenylalanin mit Rezeptor **30**.



**Abb. 71** Ergebnisse der Kraftfeldrechnungen der Komplexe von *L*- und *D*-Tyrosin mit Rezeptor **30**.



**Abb. 72** Ergebnisse der Kraftfeldrechnungen der Komplexe von *L*- und *D*-Tryptophan mit Rezeptor **30**.

Die Komplexe mit Alanin und Valin zeigen so gut wie keine Wechselwirkung ihrer Reste mit dem Rezeptor. Dies folgt aus dem Umstand, dass nur eine starke Wechselwirkung, nämlich zwischen Carboxylat und der Bindungstasche, vorliegt. Dadurch ist der Rest des Substrats relativ frei beweglich und nimmt eine Ausrichtung ein, die sterische Abstoßungen minimiert. Das Wasserstoffatom des stereogenen Zentrums zeigt in Richtung des Pyrrolseitenarmes. Der Aminosäurerest als auch die acetylierte Aminfunktion stehen in die entgegengesetzte Richtung zum Rezeptor, wodurch die sterischen Wechselwirkungen minimiert werden. Speziell bei Alanin kann man diese recht bewegliche Struktur auch in den Ergebnissen der computergestützten Konformationssuche wiederfinden. Man erhält zwei verschiedene mögliche Ausrichtungen des Substrates, die beide sehr nahe am globalen Minimum liegen. Sie unterscheiden sich nur in der Neigung des Methylrestes und der acetylierten Aminfunktion. Dies zeigt, dass in diesem Bereich kaum Wechselwirkungen auftreten, die das Substrat in einer Konformation festhalten.

Bei den aromatischen Aminosäuren ist die Situation etwas anders. Hier tritt ein zusätzlicher  $\pi$ -stack zwischen Aminosäurerest und Guanidiniumfunktion auf. Durch diese zweite Wechselwirkung werden die Substrate räumlich fixiert und die beiden Substituenten am stereogenen Zentrum sind nicht mehr so frei beweglich. Bei den *L*-Formen der Aminosäuren steht das Amid der Aminosäure stärker in Richtung des Pyrrolseitenarms. Dies kann eventuell sterisch ungünstig sein. Andererseits tritt hier aber auch eine zusätzliche Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen dem Amid der Aminosäure und dem primären Amid des

Seitenarms auf. Bei den *D*-Formen der aromatischen Aminosäuren steht das Wasserstoffatom des stereogenen Zentrums in Richtung des Pyrrolseitenarms. Dadurch kommt es nur zu geringen sterischen Abstoßungen und das Carboxylat der Aminosäure hat mehr Spielraum, um sich optimal in die Bindungstasche einzupassen. Die Amidfunktion des Substrates übt hier jedoch auch keine günstigen Wechselwirkungen mit dem Rezeptor aus. Welcher der beiden isomeren Komplexe energetisch günstiger ist, lässt sich aus den Kraftfeldrechnungen nicht ableiten.

Somit ist anzunehmen, dass aromatische Substrate einen enthalpisch günstigeren Komplex erzeugen werden. Zudem werden dort eventuelle enantioselektive Unterscheidungen höchstwahrscheinlich stärker zu beobachten sein, da die Substrate in der räumlichen Ausrichtung stärker eingeschränkt sind und zusätzliche Wechselwirkungen mit dem Pyrrolseitenarm auftreten.

## 5.3 Extraktionsversuche

In den Extraktionsversuchen wurden zuerst geeignete Bedingungen für die kommenden Experimente gesucht. Darauf aufbauend sollten Selektivität und Bindungsvermögen des Rezeptors gegenüber verschiedenen Substraten bestimmt werden.

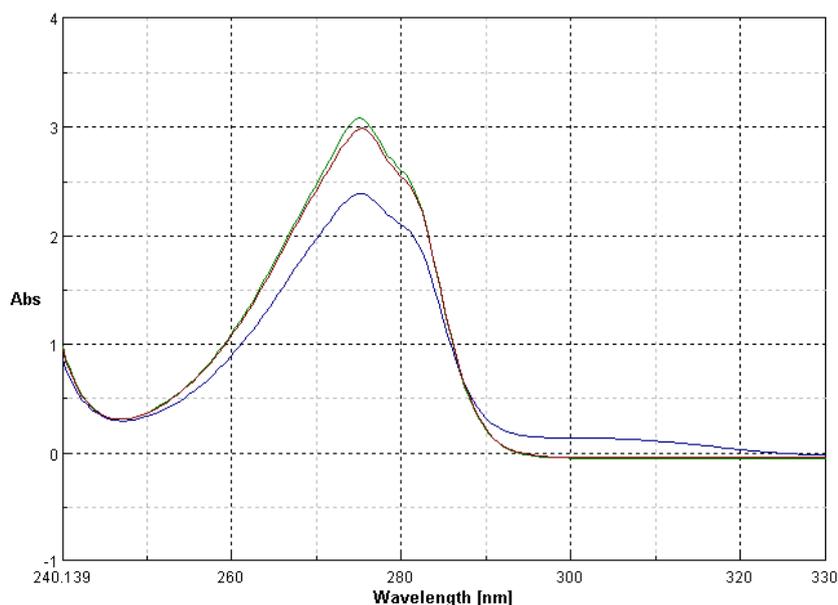
### 5.3.1 Versuchsaufbau

Die Extraktionsversuche wurden in verschließbaren 4 ml-Glasgefäßen angesetzt, in welche die verschiedenen organischen und wässrigen Lösungen eingefüllt und manuell gegeneinander ausgeschüttelt wurden. Nach Absetzen der Phasen wurden daraufhin Proben von 800  $\mu\text{l}$  von der wässrigen Phase entnommen und im UV-Spektrometer zur Analyse des Extraktionsvorgangs gemessen. Nach der Messung wurden die entnommenen Proben in die Gläschen zurückgefüllt.

Anfangs wurden in Wasser gelöste acetylierte Aminosäuren in 2 mM Konzentration mit dem gleichen Volumen einer 1 mM Lösung des Rezeptors in verschiedenen organischen Lösemitteln ausgeschüttelt. Als Lösemittel wurden Dichlormethan und Chloroform verwendet, zudem wurden Blindproben mit reinem Lösemittel ohne Rezeptor durchgeführt. Es wurde 1 ml der jeweiligen Lösungen von Substrat und Rezeptor in einem Gefäß zusammengegeben und für 10 min geschüttelt. Dann wurde für weitere 10 min stehen gelassen und Proben der wässrigen Phase entnommen, die entweder pur oder im Falle von Tryptophan auf ein zehntel verdünnt UV-spektroskopisch vermessen wurden. Die Werte wurden anhand von vorher bestimmten Extinktionskoeffizienten bei den jeweiligen Absorptionsmaxima der Substrate den Konzentrationen zugeordnet.

In der wässrigen Phase wurde ein pH-Wert von ca. 3.4 gemessen, so dass der Rezeptor, dessen  $\text{pK}_s$ -Wert nahe 6.9 liegt,<sup>[12]</sup> protoniert vorlag. Die Substratkonzentration in der wässrigen Phase wurde gemessen und durch die Subtraktion von der Startkonzentration die Konzentration von Substrat beziehungsweise Rezeptor-Substrat-Komplex in der organischen Phase berechnet. Zusätzlich wurden nach zwei Wochen nochmals die Konzentrationen gemessen, um zu überprüfen, ob sich das Verteilungsgleichgewicht noch verändert hatte. Als Substrate wurden acetyliertes *L*-Tryptophan, *L*-Phenylalanin und *L*-Tyrosin vermessen, die

aufgrund ihrer UV-Aktivität gut spektroskopisch zu beobachten waren. Von Tryptophan und Phenylalanin wurden zusätzlich die *D*-konfigurierten Enantiomere vermessen. Zusätzlich wurden die Extraktionen ohne Rezeptor zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten für die reinen acetylierten Aminosäuren durchgeführt. Ein Beispiel für die Messung der verschiedenen Proben im Falle von Ac-*L*-Tyr-OH ist in **Abb. 73** zu sehen.



**Abb. 73** UV-Spektrogramm von 3 verschiedenen Proben bei den Extraktionsversuchen. Grün: 2 mM Lösung von Ac-*L*-Tyr-OH; rot: wässrige Phase nach Extraktion mit Chloroform ohne Rezeptor; blau: wässrige Phase nach Extraktion mit Rezeptor. Der Peak bei 275 nm entstammt der Bande des aromatischen Restes von Ac-*L*-Tyr-OH. Bei der blauen Linie ist schwach die Bande des Rezeptors bei 300 nm zu erkennen.

Die grüne Linie entspricht hierbei einer 2 mM Lösung von Ac-*L*-Tyr-OH, dessen Absorptionsmaximum bei 275 nm liegt. Die rote Linie wurde für die wässrige Phase nach der Extraktion mit reinem Chloroform gemessen. Nur ein geringer Unterschied zur reinen Probe ist zu sehen, da das Substrat einen recht niedrigen Verteilungskoeffizienten besitzt. Die blaue Linie ist die Aufnahme der wässrigen Phase nach der Extraktion gegen eine 1 mM Lösung von Rezeptor in Chloroform. Durch die Bildung des Rezeptor-Substrat-Komplexes ist zusätzliches Substrat in die organische Phase übergegangen, so dass eine deutlich geringere Absorption der wässrigen Phase im Absorptionsmaximum von Ac-*L*-Tyr-OH resultiert. Die leichte Schulter zu höheren Wellenlängen hin stammt vom Rezeptor, dessen Absorptionsmaximum bei ungefähr 300 nm liegt. Auf der linken Seite des Spektrums sieht man die Absorption wiederum ansteigen als Resultat der Sättigung der wässrigen Phase mit Chloroform, welches bei niedrigeren Wellenlängen absorbiert. Dadurch ist unterhalb von

240 nm keine Messung mehr möglich, so dass beispielsweise die Carbonylbande der Substrate nicht zugänglich ist.

### 5.3.2 Ergebnisse der Extraktionen mit UV-Auswertung

In Dichlormethan löste sich der Rezeptor nur langsam, anfangs war noch eine leichte Trübung zu sehen, die sich erst durch Erwärmen auflöste. Die Ergebnisse der Extraktionen sind in **Tab. 1** und **Tab. 2**, sowie **Abb. 74** zusammengefasst. In den Verteilungen ohne Rezeptor fand sich für Tryptophan und Phenylalanin eine Konzentration von 0.21-0.29 bzw. 0.25-0.33 mM in der organischen Phase. Somit kann die auftretende Messungenauigkeit konservativ mit maximal 30 % abgeschätzt werden. Bei der Messung der Verteilung von Tyrosin war der Verteilungskoeffizient so niedrig, dass durch die Messungenauigkeit die Absorption des Substrates in der wässrigen Phase sogar höher schien. Generell war bei den Experimenten mit Tyrosin eine starke Schaumbildung zu beobachten, die eine saubere Probenentnahme erschwerte. Zudem konnten im Bereich des Schaumes eventuell andere Konzentrationen vorliegen, was auch im übrigen Bereich die Konzentrationen verfälscht hätte.

Die Extraktion mit Rezeptor war deutlich stärker, für Tryptophan lag die Konzentration von Substrat in der organischen Phase bei 0.86-0.88 mM, also fast genauso hoch wie die Rezeptorkonzentration. Für Phenylalanin erhielt man etwas niedrigere Werte mit 0.52-0.53 mM und für Tyrosin die geringsten mit 0.25 mM. Diese Konzentrationen geben jeweils die Konzentration von freiem Substrat zusammen mit Rezeptor-Substrat-Komplex an. Die verschiedenen Enantiomere zeigten eine leicht unterschiedliche Extraktion, die jedoch innerhalb des Messfehlers liegt. In der wässrigen Phase konnten jeweils auch eine schwache Absorptionsbande des Rezeptors festgestellt werden, der sein Absorptionsmaximum bei ungefähr 300 nm hat. Unter Annahme eines Extinktionskoeffizienten von mindestens  $20,000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  für ähnliche Rezeptoren<sup>[112]</sup> kann somit auf eine Konzentration von unter 10  $\mu\text{M}$  geschlossen werden, das heißt weniger als 1 % des Rezeptors befindet sich in der organischen Phase. Bei der Messung nach zwei Wochen sind die Werte allgemein leicht erhöht. Dies kann jedoch durch eine leichte Verdunstung der oberen wässrigen Phase in dem Zeitraum verursacht worden sein. Relativ zueinander und zur Blindprobe bleiben die Verhältnisse annähernd gleich. Die Messung von Tyrosin war nicht möglich, da die wässrige

Phase trüb war und zusätzlich durch Schaumbildung die Entnahme einer sauberen Probe nicht möglich war.

**Tab. 1** Ergebnisse der Extraktion von verschiedenen Aminosäuren ohne (Blindprobe) und mit Rezeptor in Dichlormethan. Angegeben sind die Konzentration von Substrat in organischer Phase, also freies Substrat sowie Rezeptor-Substrat-Komplex.

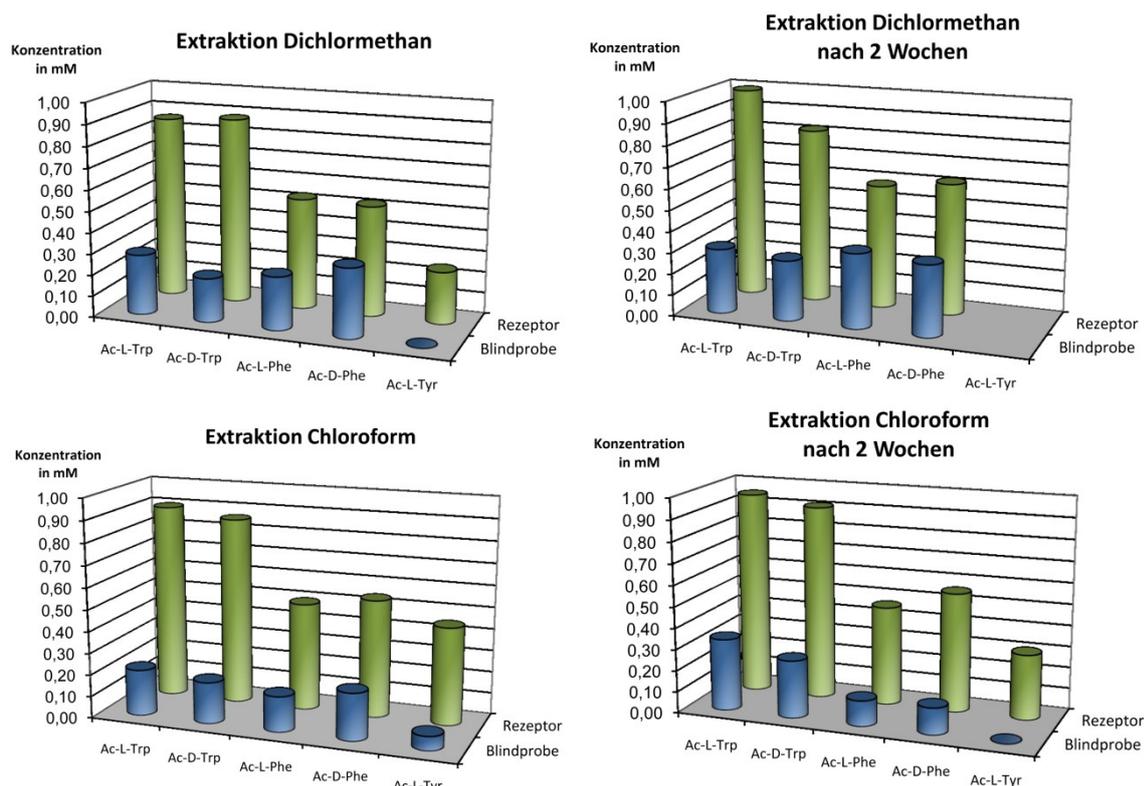
Dichlormethan	1. Messung (org. Phase in mmol/l)		2. Messung (org. Phase in mmol/l)	
	<i>Blindprobe</i>	<i>Mit Rezeptor</i>	<i>Blindprobe</i>	<i>Mit Rezeptor</i>
Ac-L-Trp-OH	0.29	0.86	0.31	0.99
Ac-D-Trp-OH	0.21	0.88	0.29	0.82
Ac-L-Phe-OH	0.25	0.53	0.35	0.58
Ac-D-Phe-OH	0.33	0.52	0.34	0.62
Ac-L-Tyr-OH	n/a	0.25	n/a	n/a

**Tab. 2** Ergebnisse der Extraktion von verschiedenen Aminosäuren ohne (Blindprobe) und mit Rezeptor in Chloroform. Angegeben sind die Konzentration von Substrat in organischer Phase, also freies Substrat sowie Rezeptor-Substrat-Komplex.

Chloroform	1. Messung (org. Phase in mmol/l)		2. Messung (org. Phase in mmol/l)	
	<i>Blindprobe</i>	<i>Mit Rezeptor</i>	<i>Blindprobe</i>	<i>Mit Rezeptor</i>
Ac-L-Trp-OH	0.21	0.90	0.34	0.95
Ac-D-Trp-OH	0.19	0.86	0.27	0.91
Ac-L-Phe-OH	0.16	0.49	0.12	0.47
Ac-D-Phe-OH	0.22	0.54	0.13	0.56
Ac-L-Tyr-OH	0.06	0.45	n/a	0.31

Die Versuche in Chloroform zeigten ein ähnliches Bild wie in Dichlormethan, im Unterschied war der Rezeptor hier aber leichter zu lösen. Die Verteilungen der Substrate ohne Rezeptor lagen generell etwas stärker auf der Seite der wässrigen Phase, jedoch war im Unterschied zur Messung in Dichlormethan für Tyrosin diesmal ein positiver Messwert erhalten worden. Auch hier wurde Tryptophan vom Rezeptor am besten extrahiert mit einer Konzentration 0.86-0.90 mM in der organischen Phase, gefolgt von Phenylalanin mit 0.49-0.54 mM, am wenigsten gut Tyrosin mit 0.45 mM, was im Vergleich zur Messung in Dichlormethan die größte Änderung war. Bei der ersten Messung waren somit die Extraktionswerte mit Rezeptor

gleich oder höher, während die Verteilung der Substrate ohne Rezeptor stärker auf Seite der wässrigen Phase lag. Es ergab sich eine leicht unterschiedliche Extraktion der verschiedenen Enantiomere, die Unterschiede waren aber relativ gering. Es war eine leichte Bevorzugung des *L*-Enantiomers bei Tryptophan und des *D*-Enantiomers bei Phenylalanin zu sehen, was aber durch den auftretenden Messfehler verursacht worden sein konnte. Auch hier konnte die Absorptionsbande des Rezeptors in der wässrigen Phase beobachtet werden, die ebenfalls eine Konzentration von unter 10  $\mu\text{M}$  nahelegte. Bei der Messung nach zwei Wochen blieben die Werte für die Extraktion mit Rezeptor annähernd gleich, mit der Ausnahme von Tyrosin, dessen Konzentration in der organischen Phase deutlich sank. Die Konzentration von Substrat in der organischen Phase bei den Extraktionen ohne Rezeptor stieg für die zweite Messung im Falle von Tryptophan an und sank bei Phenylalanin. Für Tyrosin konnte wiederum aufgrund von Trübung und Schaumbildung kein Wert ermittelt werden. Die Veränderungen sind wahrscheinlich der stattgefundenen Verdunstung zuzuschreiben.



**Abb. 74** Graphische Darstellung der Extraktion der verschiedenen Substrate mit und ohne Rezeptor in den verschiedenen Lösemitteln.

Insgesamt scheinen die Werte nach zwei Wochen weniger verlässlich zu sein, da in den verwendeten Gläsern der Flüssigkeitsspiegel leicht gesunken war. Durch die vorherige

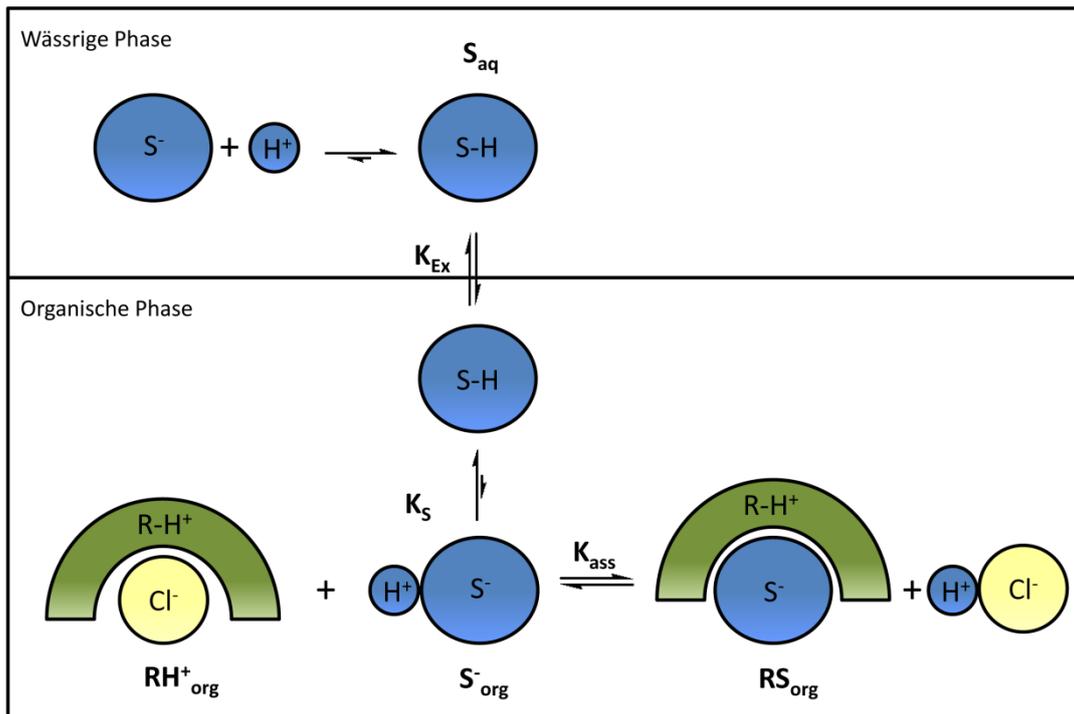
Messung verbunden mit Entnahme von großen Teilen der wässrigen Phase, waren sicherlich Verluste und Verfälschungen aufgetreten, zudem war im Falle von Tyrosin die Messung durch den immer vorhandenen Schaum erschwert oder unmöglich. So scheinen die ersten Messungen deutlich verlässlicher und wurden für weitere Auswertungen benutzt. Die relativ geringen Unterschiede bei der Extraktion der verschiedenen Enantiomere im Falle von Phenylalanin und Tryptophan in Verbindung mit dem wohl relativ großen Messfehler erschweren einen möglichen Nachweis von Stereoselektivität.

Die effektivere Extraktion mit Rezeptor wurde in Chloroform beobachtet. Die Verteilung ohne Rezeptor tendierte dort stärker zur wässrigen Phase als im Falle von Dichlormethan, was mit der geringeren Dielektrizitätskonstante erklärt werden kann. Deshalb wurde dieses Lösemittel auch für spätere Transportversuche verwendet. Die Selektivität bei der Extraktion mit Rezeptor für die verschiedenen Aminosäuren folgte in den absoluten Werten ihrer Lipophilie, das heißt die unpolaren Substrate Tryptophan und Phenylalanin wurden am besten extrahiert, etwas weniger gut hingegen Tyrosin, ein Trend, den man auch im entsprechenden Verhalten ohne Rezeptor erkennen kann. Jedoch ist bei Tryptophan die Verstärkung der Extraktion höher als bei Phenylalanin. Bei Tyrosin ist diese ebenfalls sehr hoch, aber der relativ geringe Wert für die Blindprobe kann mit einem größeren Fehler verbunden sein.

### 5.3.3 Berechnung der Bindungskonstanten aus den Extraktionsdaten

Zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften des Rezeptors zu den verschiedenen Substraten sollen die zugrundeliegenden Prozesse im Folgenden genauer analysiert werden. Der Extraktionsvorgang mit Rezeptor wird schematisch in **Abb. 75** dargestellt. Die acetylierten Aminosäuren (S-H) liegen in der wässrigen Phase im Gleichgewicht mit der dissoziierten Form in Proton und Carboxylat vor. Da es sich um schwache Säuren handelt und in stark saurem pH gearbeitet wurde, liegt dieses Gleichgewicht aber auf der Seite der Carbonsäure. Der  $pK_s$ -Wert des Guanidiniocarbonylrezeptors konnte aufgrund fehlender Löslichkeit in wässrigen Lösemitteln nicht bestimmt werden, stattdessen wird der Wert des sehr ähnlichen Rezeptors **1** ohne lipophilen Rest benutzt, welcher bei 6.9 liegt.<sup>[12]</sup> Somit ist der Rezeptor bei dem vorliegenden pH-Wert nahezu vollständig protoniert. Bei der Extraktion wird nun die Carbonsäure nach dem Nernstschen Verteilungsgesetz entsprechend ihres Verteilungskoeffizienten  $K_{Ex}$  auf die verschiedenen Phasen verteilt. Näherungsweise kann

man davon ausgehen, dass hierbei die dissoziierte Form der Carbonsäure komplett in der wässrigen Phase verbleibt. In der organischen Phase befindet sich der Rezeptor, der mit der Carbonsäure den Rezeptor-Substrat-Komplex bildet. Dadurch wird das freie Substrat aus dem Verteilungsgleichgewicht entfernt, das heißt mehr Substrat wird durch das dynamische Gleichgewicht in die organische Phase befördert. Wie in den Experimenten gezeigt wurde, liegen Rezeptor und Rezeptor-Substrat-Komplex annähernd vollständig (>99 %) in der organischen Phase vor. Unter Einbeziehung der verschiedenen Näherungen wurde eine neue Formel für die Bildungskonstante  $K_{ass}$  des Rezeptor-Substrat-Komplexes aufgestellt.



**Abb. 75** Gleichgewichtsdiagramm für die Extraktion bei  $pH < 3.5$  mit gleichzeitiger Bildung des Rezeptor-Substrat-Komplexes.

Das Massenwirkungsgesetz definiert die Assoziationskonstante:

$$K_{ass} = \frac{c_{org}(RS)}{c_{org}(S^-) \cdot c_{org}(RH^+)} \quad (5.1)$$

wobei  $c_{org}(RS)$  die Konzentration des Rezeptor-Substrat-Komplexes,  $c_{org}(S^-)$  die Konzentration des freien Substrats in deprotonierter Form und  $c_{org}(RH^+)$  die Konzentration des freien Rezeptors jeweils in der organischen Phase ist.

Bei der skizzierten Komplexbildung wird die Assoziationskonstante relativ zum Rezeptor mit Chlorid als Gegenion erhalten. Die Dissoziation des Chloridions senkt prinzipiell die Komplexbildungskonstanten, da sie der Bildung des Rezeptor-Substrat-Komplexes vorgelagert ist. Der entstehende Carboxylat-Komplex ist jedoch wahrscheinlich deutlich stärker, so dass die Dissoziation des Chloridions in der Berechnung nicht berücksichtigt wird. Auch die Verteilung von Chlorid zwischen organischer Phase und wässriger Phase wird somit nicht berücksichtigt, da hier zudem auch keine Werte vorliegen.

Der Rezeptor wird hier nur zu sehr geringen Anteilen in die wässrige Phase extrahiert, zu weniger als 1 %. Man kann annehmen:

$$c_{aq}(RS) \ll c_{org}(RS)$$

$$\Rightarrow c_{org}(RS) \approx c(RS)$$

$$\Rightarrow c_{org}(R) \approx c(R)$$

Die Dissoziation des Substrates in Carboxylat und Proton wird im wässrigen Medium durch seinen  $pK_s$ -, bzw.  $K_s$ -Wert beschrieben. In reinem Chloroform ist dieser an sich nicht definiert. Hier wird in Chloroform, das mit Wasser gesättigt ist, gearbeitet und der  $K_s$ -Wert liegt dadurch wahrscheinlich bei etwas niedrigeren Werten als in Wasser, da die entstehenden Hydroxonium-Ionen in dem relativ unpolaren Umfeld schlechter stabilisiert sind. In den folgenden Gleichungen werden die  $K_s$ -Werte dennoch zur Abschätzung der ionischen Komplexbildungskonstante verwendet, da keine entsprechenden Werte mit Chloroform als Lösemittel zugänglich sind.

Im organischen Medium wird angenommen:

$$K_{S\ aq}(S) \approx \frac{c_{org}(S^-) \cdot c_{org}(H^+)}{c_{org}(SH)} = \frac{c_{org}(S^-)^2}{c_{org}(SH)}$$

bzw.

$$c_{org}(S^-) \approx \sqrt{K_{S\ aq}(S) \cdot c_{org}(SH)} \quad (5.2)$$

Durch die Messung der Konzentration des Substrats in der wässrigen Phase  $c_{aq}(SH)$  kann man bei Kenntnis der Startkonzentration  $c_0(SH)$  und bei gleichen Volumina von wässriger und organischer Phase auf die Größe  $c_{org}(SH + RS)$ , die gemeinsame Konzentration von Substrat und Rezeptor-Substrat-Komplex in der organischen Phase, schließen:

$$c_0(SH) = c_{org}(SH + RS) + c_{aq}(SH) \quad (5.3)$$

Die Konzentration  $c_{org}(SH + RS)$  setzt sich aus Konzentration von freiem Substrat  $c_{org}(SH)$  und Rezeptor-Substrat-Komplex  $c(RS)$  zusammen:

$$c_{org}(SH + RS) = c_{org}(SH) + c(RS) \quad (5.4)$$

Die Konzentration an freiem Substrat in der organischen Phase lässt sich im Gleichgewichtszustand über den Nernstschen Verteilungssatz bestimmen:

$$c_{org}(SH) = K_{ex}(S) \cdot c_{aq}(SH) \quad (5.5)$$

wobei  $K_{ex}(S)$  der Extraktionskoeffizient des Substrates ist.

Die Gesamtkonzentration an Rezeptor  $c_0(R)$  setzt sich aus der Konzentration an freiem Rezeptor und Konzentration des Rezeptor-Substrat-Komplexes zusammen:

$$c_0(R) = c(RH^+) + c(RS) = c_{org}(RH^+) + c_{org}(RS) \quad (5.6)$$

(5.4) und (5.5) in (5.6):

$$\begin{aligned} c_{org}(RH^+) &= c_0(R) - [c_{org}(SH + RS) - c_{org}(SH)] \\ &= c_0(R) - [c_{org}(SH + RS) - K_{ex}(S) \cdot c_{aq}(SH)] \end{aligned} \quad (5.7)$$

Beim Einsetzen von (5.2), (5.4), (5.5) und (5.7) in (5.1) ergibt sich die neue Gleichung:

$$K_{ass} = \frac{c_{org}(SH + RS) - K_{ex}(S) \cdot c_{aq}(SH)}{\sqrt{K_{S\ aq}(S) \cdot K_{ex}(S) \cdot c_{aq}(SH) \cdot [c_0(R) - c_{org}(SH + RS) + K_{ex} \cdot c_{aq}(SH)]}} \quad (5.8)$$

Damit lässt sich unter den gemachten Annahmen bei Kenntnis von  $c_{aq}(SH)$  bzw.  $c_{org}(SH + RS)$ ,  $K_{ex}(S)$ ,  $K_{S\,aq}(S)$  und  $c_0(R)$  die Bindungskonstante  $K_{ass}$  des Rezeptors berechnen. Wie bereits erwähnt, ist der Wert für  $K_s$  wahrscheinlich zu hoch. Da  $K_s$  in der Formel im Nenner eingeht, sind die resultierenden Werte somit tendenziell etwas zu niedrig. Da der Wert unter einer Wurzel steht, ist das Ausmaß dieses Fehlers aber begrenzt.

Für die Bestimmung der Bindungskonstante muss in beiden Phasen die gleiche Ionenstärke vorliegen. Da jedoch kein Puffer verwendet wurde und die Ionenkonzentration relativ gering ist, kann man etwaige Salzeffekte vernachlässigen.<sup>[113]</sup>

Die berechneten Verteilungskoeffizienten und Bindungskonstanten sind in **Tab. 3** und **Tab. 4** zusammengefasst.

**Tab. 3** Verteilungskoeffizienten und Bindungskonstanten verschiedener Substrate, ermittelt durch Extraktionsexperimente von Wasser gegen Chloroform mit Rezeptor **30** ( $c(\text{Rez}) = 1 \text{ mM}$ ,  $c(\text{Substrat}) = 2 \text{ mM}$ )

Chloroform	$K_{Ex}$ ( $c_{org}/c_{aq}$ )	$K_{ass} [M^{-1}]$	$K_{ass} [M^{-1}]$ ( $\emptyset$ beide Enantiomere)	$K_{ass} [M^{-1}]$ (nach 2 Wochen)
Ac-L-Trp-OH	0.111	$3.17 \cdot 10^4$	$2.77 \cdot 10^4$	$4.63 \cdot 10^4$
Ac-D-Trp-OH		$2.44 \cdot 10^4$		$3.40 \cdot 10^4$
Ac-L-Phe-OH	0.105	$3.94 \cdot 10^3$	$4.49 \cdot 10^3$	$3.54 \cdot 10^3$
Ac-D-Phe-OH		$5.09 \cdot 10^3$		$5.63 \cdot 10^3$
Ac-L-Tyr-OH	0.031	$9.71 \cdot 10^3$	$9.71 \cdot 10^3$	n/a

**Tab. 4** Verteilungskoeffizienten und Bindungskonstanten verschiedener Substrate, ermittelt durch Extraktionsexperimente von Wasser gegen Dichlormethan mit Rezeptor **30** ( $c(\text{Rez}) = 1 \text{ mM}$ ,  $c(\text{Substrat}) = 2 \text{ mM}$ )

Dichlormethan	$K_{Ex}$ ( $c_{org}/c_{aq}$ )	$K_{ass} [M^{-1}]$	$K_{ass} [M^{-1}]$ ( $\emptyset$ beide Enantiomere)	$K_{ass} [M^{-1}]$ (nach 2 Wochen)
Ac-L-Trp-OH	0.141	$1.83 \cdot 10^4$	$1.93 \cdot 10^4$	$4.69 \cdot 10^4$
Ac-D-Trp-OH		$2.04 \cdot 10^4$		$1.47 \cdot 10^4$
Ac-L-Phe-OH	0.170	$2.42 \cdot 10^3$	$2.38 \cdot 10^3$	$3.36 \cdot 10^3$
Ac-D-Phe-OH		$2.33 \cdot 10^3$		$4.11 \cdot 10^3$

Zur Bestimmung der Assoziationskonstanten wurden jeweils die Mittelwerte der Verteilungskoeffizienten aus der ersten Messung verwendet, da die zweite Messung einen größeren Fehler aufweist. Zum Vergleich der unterschiedlichen Substrate wurden zudem aus den Messwerten der jeweiligen *D*- und *L*-Formen der ersten Messung Mittelwerte berechnet und aus diesen ebenfalls die Bindungskonstante bestimmt.

Die höchste Bindungskonstante in Chloroform ergibt sich für Tryptophan mit  $2.77 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  für den mittleren Wert der Extraktionsdaten, gefolgt von Tyrosin mit  $9.71 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  und dann Phenylalanin mit  $4.49 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ . Für Tryptophan und Phenylalanin entspricht die Substratselektivität somit dem Verhalten gegenüber einem ähnlichen Rezeptor in wässrigen Lösemitteln,<sup>[12]</sup> für Tyrosin liegen keine Vergleichsdaten vor. Im Vergleich der einzelnen Enantiomere scheint bei Tryptophan eine Bevorzugung des *L*-Enantiomers zu erkennen zu sein, und zwar mit einem Faktor von 1.3, bei Phenylalanin eine Bevorzugung des *D*-Enantiomers mit einem Faktor von 1.3, jeweils für die erste Messung. In der zweiten Messung sieht man den gleichen Trend sogar noch stärker, jedoch sind die Werte dort wohl ungenauer. Die entsprechenden Substrate zeigten in Versuchen in wässriger Lösung mit dem analogen Rezeptor ohne den lipophilen Rest Enantioselektivität, mit gleichartiger Bevorzugung von *L*- und *D*-Enantiomer. Diese konnte durch sterische Abstoßung des Substrats vom Isopropylrest des Rezeptors erklärt werden.<sup>[12]</sup> Der hier auftretende Messfehler, der mit 30 % abgeschätzt wurde, bedingt jedoch, dass nicht sicher davon ausgegangen werden kann, dass auch hier Enantioselektivität vorliegt.

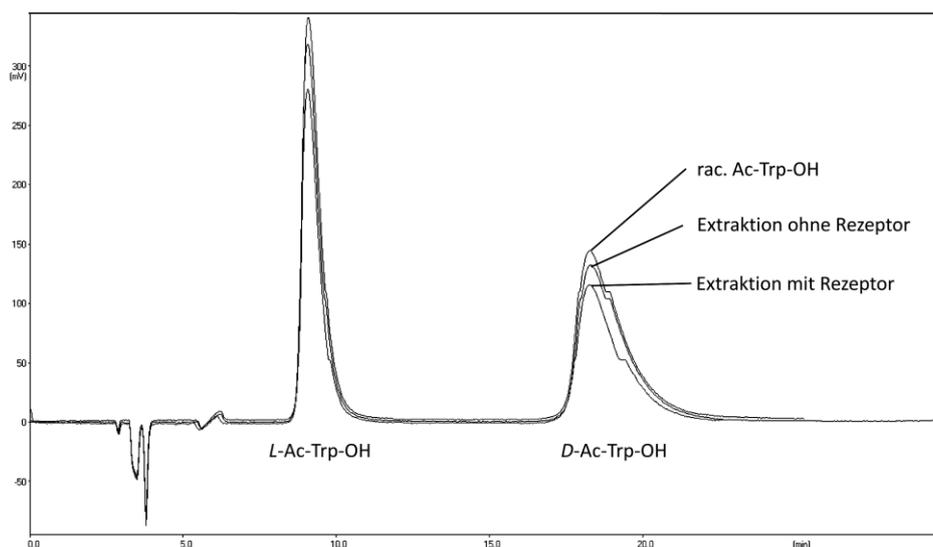
Die Daten für die Extraktion aus Dichlormethan zeigen eine deutlich höhere Differenz der Werte zwischen den beiden Messungen. Bei der Bestimmung der Enantioselektivität liegt der Faktor bei der ersten Messung für die verschiedenen Substrate zudem jeweils unter 1.1. Verbunden mit dem auftretenden Fehler können hier also keinerlei Aussagen über die Stereoselektivität gemacht werden. Die Substratselektivität ist entsprechend den Verhältnissen in Chloroform, Ac-Trp-OH wird stärker gebunden als Ac-Phe-OH, die Durchschnittswerte der beiden Enantiomere ergeben Bindungskonstanten von  $1.93 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  für Tryptophan und  $2.38 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  für Phenylalanin, für Tyrosin konnte aufgrund fehlender Werte für den Verteilungskoeffizienten keine Bindungskonstante bestimmt werden. Somit ist die relative Substratselektivität sehr ähnlich wie in Chloroform, die absoluten Werte liegen jedoch etwas niedriger. Dies lässt sich durch die erhöhte Polarität von Dichlormethan erklären, durch die elektrostatische Wechselwirkungen, sowie Wasserstoffbrückenbindungen und andere van-der-Waals-Kräfte im Rezeptor-Substrat-Komplex in ihrer Stärke herabgesetzt werden.

Die Daten liegen im Vergleich zu den Messungen mit dem ähnlichen Rezeptor **1** im wässrigen Medium ca. eine Größenordnung höher.<sup>[12]</sup> Dort wurde in 40 % Wasser/DMSO gemessen, während hier in Chloroform, bzw. Dichlormethan gemessen wurde, die mit Wasser gesättigt waren (ca. 1-2 %). Da die hier verwendeten Lösemittel somit deutlich unpolarer sind, kann man Komplexbildungskonstanten im gemessenen Bereich erwarten. Die Selektivität zwischen den unterschiedlichen Substraten kann durch bessere  $\pi$ -stacking-Eigenschaften des größeren aromatischen Restes von Tryptophan im Vergleich zu Phenylalanin erklärt werden. Der Phenylrest von Tyrosin trägt einen Hydroxysubstituenten, der den Aromaten dadurch elektronenreicher macht und zu verbesserten Stapelungswechselwirkungen mit dem elektronenarmen Guanidinium-Kation im Vergleich zu Phenylalanin und somit zu einer höheren Bindungskonstante führen kann.

#### **5.3.4 Ergebnisse der Messungen mit HPLC-Auswertung**

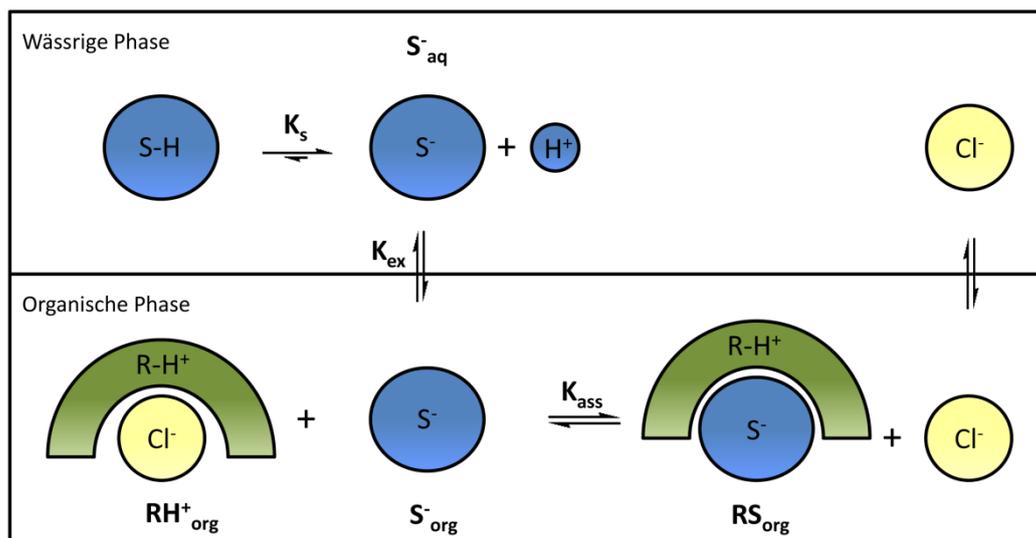
Die Genauigkeit der UV-spektroskopischen Auswertung war bei einigen der Messungen nicht optimal, vor allem bei Messungen, in denen der Verteilungskoeffizient nahe bei Null lag, so dass der Unterschied vor und nach Ausschütteln mit Chloroform relativ gering war. Zudem war die Methode auf UV-aktive Substanzen beschränkt, also vor allem auf aromatische Aminosäuren. Deswegen wurde eine andere Methode angewandt, um genauere Daten zu erhalten und die Auswahl der möglichen Substrate zu erweitern. Mit Hilfe von RP-HPLC mit angeschlossenem UV-Detektor konnten deutlich genauere Werte erhalten werden, während die Probenentnahme einfacher wurde. Es musste weniger Probenmaterial entnommen werden, lediglich ca. 50  $\mu$ l, während bei der bisherigen UV-Methode ca. 800  $\mu$ l benötigt wurde, also fast das gesamte vorhandene Volumen. Dadurch wurden auch die Probleme bei der Messung des Tyrosinderivats umgangen, bei dem stets starke Schaumbildung auftrat und die Messung erschwerte. Durch die säulenchromatographische Auftrennung konnte mit dem UV-Detektor bei 220 nm, also bei der Carbonyl-Bande gemessen werden, ohne eine Überlagerung von anderen Substanzen wie z.B. Lösemittel, die ebenfalls bei dieser Wellenlänge absorbieren, befürchten zu müssen. Dadurch konnten auch nichtaromatische Substrate vermessen werden, auch der Einsatz von Puffer zur Einstellung eines gewünschten pH-Wertes war möglich. Durch die Benutzung einer chiralen HPLC-Säule konnten auch racemische Gemische von

Aminosäuren gleichzeitig extrahiert und ausgewertet werden, so dass ein direkter Vergleich und somit eine bessere Aussage über Stereoselektivität möglich war (**Abb. 76**).



**Abb. 76** Vergleichendes Chromatogramm dreier Messungen. Die obere Linie entspricht der Messung von 10 mM rac. Ac-Trp-OH, die mittlere ist von einer Probe der wässrigen Phase nach der Extraktion ohne Rezeptor, die untere Linie von einer Probe mit Rezeptor. Der Einspritzpeak ist bei  $t=3.5$  min zu sehen, der Peak bei  $t=9.1$  entspricht L-Ac-Trp-OH, der Peak bei  $t=18.3$  D-Ac-Trp-OH. Das Spektrum wurde bei 220 nm aufgenommen.

Für die neuen Experimente wurde mittels eines BIS-TRIS-Puffers mit einer Konzentration von 100 mM ein pH-Wert von 6.0 eingestellt. Bei diesem pH-Wert liegen die Substrate in deprotonierter Form vor, während der Rezeptor protoniert ist (**Abb. 77**). Der Verteilungskoeffizient  $K_{ex}(S^-)$  ist ein anderer als bei protoniertem Substrat, da die ionische Form der acylierten Aminosäuren weniger leicht in die organische Phase extrahiert werden kann.



**Abb. 77** Gleichgewichtsdiagramm für die Extraktion bei pH=6 mit gleichzeitiger Bildung des Rezeptor-Substrat-Komplexes.

Analog zur Formel (5.8) bei niedrigerem pH-Wert lässt sich hier durch Ersetzen von  $K_{ex}(S)$  durch  $K_{ex}(S^-)$  und den verschiedenen Erwähnungen von SH durch  $S^-$  ein mathematischer Zusammenhang für die Bindungskonstante  $K_{ass}$  herstellen. Es entfällt zudem die Notwendigkeit der Benutzung von  $K_s$  zur Berechnung der anionischen Substratkonzentration, da das Substrat bei pH 6 bereits so gut wie vollständig deprotoniert vorliegt.

Dadurch kommt man zu folgendem Zusammenhang:

$$K_{ass} = \frac{c_{org}(S^- + RS) - K_{ex}(S^-) \cdot c_{aq}(S^-)}{K_{ex}(S^-) \cdot c_{aq}(S^-) \cdot [c_0(R) - c_{org}(S^- + RS) + K_{ex}(S^-) \cdot c_{aq}(S^-)]} \quad (5.9)$$

Es wurden die acetylierten Aminosäuren von Valin, Tyrosin und Tryptophan in racemischer Form eingesetzt, um eventuelle Stereoselektivität zu bestimmen. Die Konzentration der racemischen Substrate war 10 mM, die des Rezeptors wie zuvor 1 mM bei jeweils 1 ml Volumen der verschiedenen Phasen. Es wurde in Chloroform extrahiert, auf die gleiche Art wie weiter oben beschrieben. Bei einer Mischung von verschiedenen Substraten, hier den verschiedenen Enantiomeren, lässt sich Formel (5.9) zur Bestimmung der Bindungskonstante im Prinzip nicht anwenden, da eine kompetitive Bindung vorliegt. Zur Abschätzung der Größendimension der Bindungskonstante wurde sie aber dennoch benutzt, zumal die Bindungskonstanten der verschiedenen Enantiomere einigermaßen ähnlich sind und der Fehler dadurch relativ klein ausfällt. Bei stärker werdender Abweichung wird der Unterschied

zwischen den Bindungskonstanten tendenziell verstärkt, da das stärker bindende Substrat das schwächer bindende zunehmend leichter aus dem Komplex verdrängen kann. Die Verteilungskoeffizienten sowie die Ergebnisse der Berechnungen sind in **Tab. 5** zusammengefasst.

**Tab. 5** Verteilungskoeffizienten und ungefähre Bindungskonstanten verschiedener Substrate, ermittelt durch Extraktionsexperimente von racemischen Substratgemischen in BIS-TRIS-Puffer mit pH=6 gegen Chloroform und Rezeptor **30** ( $c(\text{Rez}) = 1 \text{ mM}$ ,  $c(\text{rac. Substrat}) = 10 \text{ mM}$ ).

Chloroform	$K_{\text{ex}} (c_{\text{org}}/c_{\text{aq}})$	$\sim K_{\text{ass}}[\text{M}^{-1}]$
Ac-L-Val-OH	0.149	$4.45 \cdot 10^3$
Ac-D-Val-OH		$4.20 \cdot 10^3$
Ac-L-Tyr-OH	0.046	$1.73 \cdot 10^4$
Ac-D-Tyr-OH		$1.24 \cdot 10^4$
Ac-L-Trp-OH	0.071	$1.84 \cdot 10^4$
Ac-D-Trp-OH		$1.01 \cdot 10^7$

Die Werte liegen in einem ähnlichen Bereich wie die der ersten Messung in Chloroform. Der Verteilungskoeffizient ist wie erwartet deutlich niedriger für Tryptophan, im Falle von Tyrosin jedoch etwas höher als in der ersten Messung. Wahrscheinlich war dort die relativ starke Schaumbildung bei den Messungen mit diesem Substrat für eine Verfälschung der Werte verantwortlich. Bei den Messungen mit Hilfe der HPLC fällt aufgrund des geringen Volumens der Probenentnahme dieser Effekt weg. Der Verteilungskoeffizient des Valinderivats ist mit 0.149 unerwartet hoch, da freies Valin weniger lipophil als Tryptophan ist. Die Werte für die Bindungskonstanten sind, wie bereits bemerkt, Abschätzungen, die tatsächlichen Werte können etwas von den berechneten Werten abweichen. Mit  $4.20\text{-}4.45 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  zeigt Ac-Val-OH die schwächste Bindung, Ac-Tyr-OH mit  $1.24\text{-}1.73 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  und Ac-Trp-OH mit  $1.01\text{-}1.84 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  liegen in einem ähnlichen Bereich. Es ergeben sich also für Tyrosin und Tryptophan ähnliche Werte wie bei der Extraktion bei pH 6, wo mittlere Bindungskonstanten von  $9.71 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  bzw.  $2.77 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  erhalten wurde. Die Ähnlichkeit der bei den beiden Bedingungen bestimmten Bindungskonstanten ist ein Beleg, dass die verschiedenen Formeln zur Bestimmung trotz der auftretenden Messfehler sinnvolle Werte ergeben. Für das Verhältnis der Bindungskonstanten von *L*- zu *D*-

Enantiomer erhält man beim Valinderivat mit 1.06 den geringsten Wert, das Tyrosinderivat zeigt ein Verhältnis von 1.39, das Tryptophanderivat 1.82. Somit erhält man für Tryptophan die gleiche Bevorzugung für das *L*-konfigurierte Substrat wie beim Versuch bei niedrigerem pH-Wert, was ein weiteres Indiz für eine mögliche Stereoselektivität ist. Der hier erhaltene Wert ist jedoch sicherlich zu hoch, da, wie weiter oben beschrieben, beide Enantiomere gleichzeitig eingesetzt wurden und somit die Selektivität in der Berechnung der Bindungskonstante überbewertet wird.

Die Bindungskonstanten liegen bei den unterschiedlichen Substraten für die bei pH 6 bestimmte Komplexbildung im mittleren Bereich von  $10^3$  bis über  $10^4 \text{ M}^{-1}$ . Die aromatischen Aminosäurederivate liegen von ihrer Bindungskonstante her hierbei eine halbe Größenordnung höher als das Valinderivat, wohl verursacht durch zusätzlich mögliche Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen. Mit größer werdendem aromatischem Rest scheint auch eine mögliche Stereoselektivität stärker zu werden. Beim Substrat Tryptophan mit dem größten aromatischen System erhält man die größten Unterschiede zwischen *L*- und *D*-Enantiomer.

Die Extraktionsexperimente zeigten somit, dass der synthetisierte Rezeptor in der Tat in der Lage ist, Aminosäurecarboxylate in die organische Phase zu überführen. Der Extraktionsprozess wurde mittels UV-Spektroskopie verfolgt, zur Verbesserung der Genauigkeit und zur Trennung verschiedener Enantiomere wurde später zusätzlich HPLC eingesetzt. Es wurden zwei neue Formeln aufgestellt, mit denen man bei Kenntnis der Verteilungskoeffizienten, der Konzentration in der wässrigen Phase und, im Falle von Messungen bei pH-Werten unter 3.5, des  $\text{pK}_s$ -Wertes der eingesetzten Substrate die zugehörigen Bindungskonstanten berechnen kann. Hierbei erhielt man Werte in einem Rahmen von  $10^3$  bis über  $10^4 \text{ M}^{-1}$ . Der Rezeptor zeigte eine Selektivität für die Substrate mit großen und elektronenreichen aromatischen Resten, das Tryptophan- und das Tyrosinderivat wurden am stärksten gebunden, mit Bindungskonstanten über  $10^4 \text{ M}^{-1}$ . Das Phenylalanin- und das Valinderivat wurden weniger stark gebunden, mit Werten im mittleren  $10^3 \text{ M}^{-1}$ -Bereich. In den UV Experimenten schien das *D*-Enantiomer von Phenylalanin bzw. das *L*-Enantiomer von Tryptophan etwas stärker gebunden zu werden, jedoch war dort der Messfehler recht hoch. In den HPLC-Experimenten schienen die *L*-Enantiomere von Valin-, Tyrosin- und Tryptophanderivat etwas stärker gebunden zu werden, jedoch waren die Unterschiede gering, nur im Falle von Tryptophan etwas deutlicher.

Nachdem die Extraktionsexperimente erfolgreich durchgeführt worden waren und mit einer neuen Formel zugehörige Bindungskonstanten berechnet werden konnten, sollten diese nun durch eine zusätzliche Messmethode verifiziert werden.

## 5.4 ITC Experimente

### 5.4.1 Wahl der Messmethode

Die berechneten Bindungskonstanten sollten durch eine unabhängige Messmethode bestätigt werden. Mögliche Methoden umfassen NMR-Titrationsen, UV- und Fluoreszenztitrationsen oder ITC. Bei der Auswahl der geeigneten Messmethode muss bedacht werden, dass verlässliche Messungen von Bindungskonstanten durch spektroskopische Methoden nur in einem bestimmten Teil der Titrationskurve möglich sind.<sup>[114, 115]</sup> Das Bindungsexperiment kann über den P-Wert

$$P = \frac{[RS]}{[S]_0} \quad (5.10)$$

beschrieben werden, der durch die Konzentration des gebildeten Komplexes geteilt durch die Startkonzentration des Gastes gebildet wird. Um mathematisch aussagekräftige Werte zu erhalten, sollte dieser Wert zwischen 0.2 und 0.8 liegen. Dies bedeutet in Bezug auf die Bindungskonstanten K einen Bereich von:

$$\frac{0.1}{K} \leq [S]_0 \leq \frac{10}{K} \quad (5.11)$$

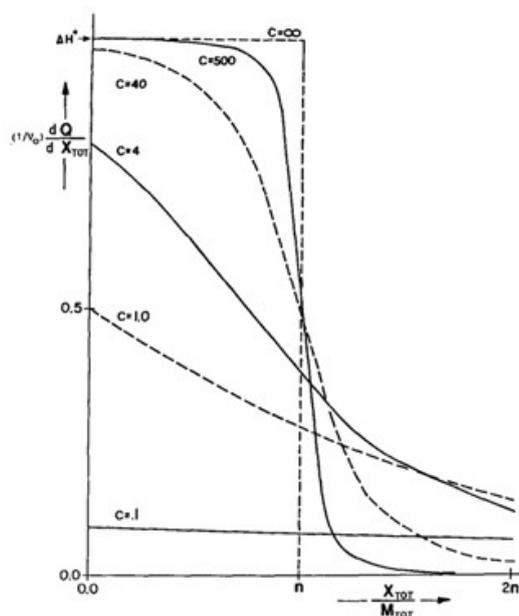
Außerhalb dieses Bereichs ist der Unterschied zwischen den Titrationsisothermen von starken und schwachen Komplexen zu gering, als dass verlässliche Werte erzeugt werden können.<sup>[116]</sup> Unter Annahme der berechneten Bindungskonstanten im Bereich von  $10^3$ - $10^4$  M<sup>-1</sup> ergibt sich somit ein optimaler Konzentrationsbereich von  $10^{-2}$ - $10^{-5}$  mol/l für die Substrate. Die verschiedenen denkbaren Messmethoden für Titrationsexperimente liegen in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen. NMR-Methoden sind auf Konzentrationsbereiche von  $10^{-2}$ - $10^{-4}$  M beschränkt, UV-Vis-Methoden und Fluoreszenzspektroskopie auf den Bereich  $10^{-3}$ - $10^{-5}$  M.

In ITC-Messungen ist die Wärme entscheidend, die bei der Reaktion entsteht, somit ist kein definierter Konzentrationsbereich vorhanden, prinzipiell sind Messungen im gesamten

Konzentrationspektrum möglich. Als eine Faustregel zur Bestimmung der passenden Konzentrationen wird hier der  $c$ -Wert verwendet. Dieser ist definiert als

$$c = n \cdot [A]K_{\text{assoc}} \quad (5.12)$$

wobei  $n$  der stöchiometrische Faktor,  $[A]$  die Konzentration der vorgelegten Komponente und  $K_{\text{assoc}}$  die Bindungskonstante ist. Für eine gute Auswertbarkeit sollte dieser Wert im Bereich von 5-1000 liegen (**Abb. 78**).<sup>[117]</sup>



**Abb. 78** Abhängigkeit der ITC-Isotherme vom  $c$ -Wert. Aufgetragen ist das Molverhältnis von Substrat gegen Rezeptor auf der Abszisse, die Wärme pro Substrat auf der Ordinate.<sup>[117]</sup>

Bei einer Bindungskonstante von  $5 \cdot 10^3 - 3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  und einer angenommenen Komplexstöchiometrie von 1 ergäbe sich somit ein Konzentrationsbereich von ca. 0.2-500 mM für die Rezeptorkonzentration. Dies liegt in einem Bereich, in dem man ausreichende Bindungswärme erhalten sollte.

Vom Bereich her sind also alle Messmethoden prinzipiell anwendbar. Bei UV- und Fluoreszenzspektroskopie besteht allerdings die Möglichkeit, dass die Eigenabsorption des Lösemittels Chloroform die Messung beeinträchtigt. Da dieses Problem bei ITC-Messungen nicht auftritt und zusätzlich zu den Bindungskonstanten auch noch zahlreiche weitere Parameter ermittelt werden, wurde ITC angewandt. Durch den hohen Automatisierungsgrad ist zudem eine einfache experimentelle Handhabbarkeit sowie höhere Verlässlichkeit der erhaltenen Werte gegeben.

### 5.4.2 Grundlagen der ITC

Zur Verifizierung der berechneten Bindungskonstanten, zur Bestimmung der Stöchiometrie des Rezeptor-Substrat-Komplexes und zum Erhalt der thermodynamischen Kenngrößen sollte isothermale Kalorimetrie (ITC) durchgeführt werden. Man erhält durch Auswertung der entstehenden Bindungsisotherme zahlreiche Parameter, die Reaktionsenthalpie  $\Delta H$ , die freie Reaktionsenthalpie  $\Delta G$ , die Stöchiometrie des gebildeten Komplexes, die Entropie  $\Delta S$ , sowie vor allem die Bindungskonstante  $K$  des gebildeten Komplexes.

Nach der Definition der Enthalpie  $H$  gilt:

$$H = U + p \cdot V \quad (5.13)$$

wobei  $U$  die innere Energie,  $p$  der Druck und  $V$  das Zellvolumen ist.

Eine Änderung der inneren Energie bei konstantem Druck kann durch Zufuhr von Wärme  $Q$  oder Verrichtung von Volumenarbeit geschehen.

$$\Delta U = Q - p \cdot \Delta V \quad (5.14)$$

Bei konstantem Druck und Volumen gilt somit:

$$\Delta H = \Delta U = Q \quad (5.15)$$

Die entstehende Wärmemenge ist proportional zur Änderung der molaren Enthalpie  $\Delta H^0$  multipliziert mit der Stoffmenge  $n_{RS}$  des entstehenden Komplexes, bzw. der Konzentration des Komplexes  $[RS]$  mal Volumen.

$$\Delta Q = \Delta H^0 \cdot n_{RS} = \Delta H^0 \cdot [RS] \cdot V \quad (5.16)$$

Bei einem 1:1 Komplex kann man aus dem Massenwirkungsgesetz für die Assoziationskonstante  $K$  ableiten:

$$\frac{d[RS]}{d[S]} = \frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{(1+r)}{2} - \frac{S_r}{2}}{\sqrt{S_r^2 - 2S_r(1-r) + (1+r)^2}} \quad (5.17)$$

mit

$$r = \frac{1}{K \cdot [R]}$$

$$S_r = \frac{[S]}{[R]}$$

und somit:

$$\frac{1}{V} \frac{dQ}{d[S]} = \Delta H^0 \cdot \left( \frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{(1+r)}{2} - \frac{S_r}{2}}{\sqrt{S_r^2 - 2S_r(1-r) + (1+r)^2}} \right) \quad (5.18)$$

Mit Hilfe der Gibbs-Helmholtz-Gleichung für die molare freie Reaktionsenthalpie  $\Delta G^0$  kann bei Kenntnis der Temperatur T zusätzlich die molare Entropie  $\Delta S^0$  berechnet werden:

$$\Delta G^0 = -RT \cdot \ln K = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0 \quad (5.19)$$

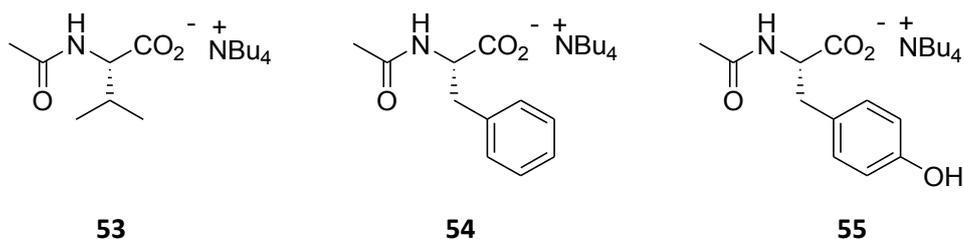
Bei den Experimenten wird die freiwerdende Wärme gemessen und durch Bezug auf das Molverhältnis  $S_r$  die Bindungsisotherme aufgestellt. Aus der mathematischen Auswertung mit Hilfe von Gleichung (5.19) ergeben sich die verschiedenen thermodynamischen Parameter. Ein mögliches Problem bei dieser Methode ist, dass nur die Gesamtsumme der Wechselwirkungen gemessen werden kann. Probleme treten auf, wenn mehrere Prozesse gleichzeitig auftreten, zum Beispiel eine schrittweise Komplexierung oder eine vor- oder nachgelagerte Aggregation. Außerdem wird die Bindungskonstante durch die freie Enthalpie der Reaktion bestimmt, die sich aus Entropie und Enthalpie zusammensetzt. Die entstehende Wärmemenge hängt hingegen nur von der Enthalpie ab. Wenn die Terme von Entropie und Enthalpie das gleiche Vorzeichen haben, sind deren Einzelbeiträge zu einer bestimmten freien Enthalpie somit relativ klein, während bei umgekehrten Vorzeichen, die Einzelbeiträge deutlich größer sein können. Somit resultiert aus den Vorzeichen der Einzelbeiträge eine unterschiedliche Genauigkeit, die sich erst während der Messung zeigt. Möglich ist sogar, dass der Prozess rein entropisch getrieben ist, in welchem Fall gar keine Wärmeentwicklung zu beobachten wäre.

In der hier durchgeführten Messung war dieser Fall jedoch unwahrscheinlich. In wässrigen Medien ist die Komplexbildung von Guanidiniocarbonylpyrrolen mit Oxo-Anionen ein

entropisch getriebener Prozess, der enthalpisch ungünstig ist. Substrat und Rezeptor haben relativ feste Hydratationshüllen, die bei der Bindung freigesetzt werden, was einerseits enthalpisch ungünstig ist, jedoch durch den hohen entropischen Beitrag mehr als ausgeglichen wird.<sup>[112]</sup> Bei Messungen in Chloroform ist hingegen davon auszugehen, dass ein günstiger Enthalpiebeitrag die Komplexbildung treibt.<sup>[118]</sup> Der Entropiebeitrag ist wahrscheinlich kleiner und hat keinen entscheidenden Einfluss.

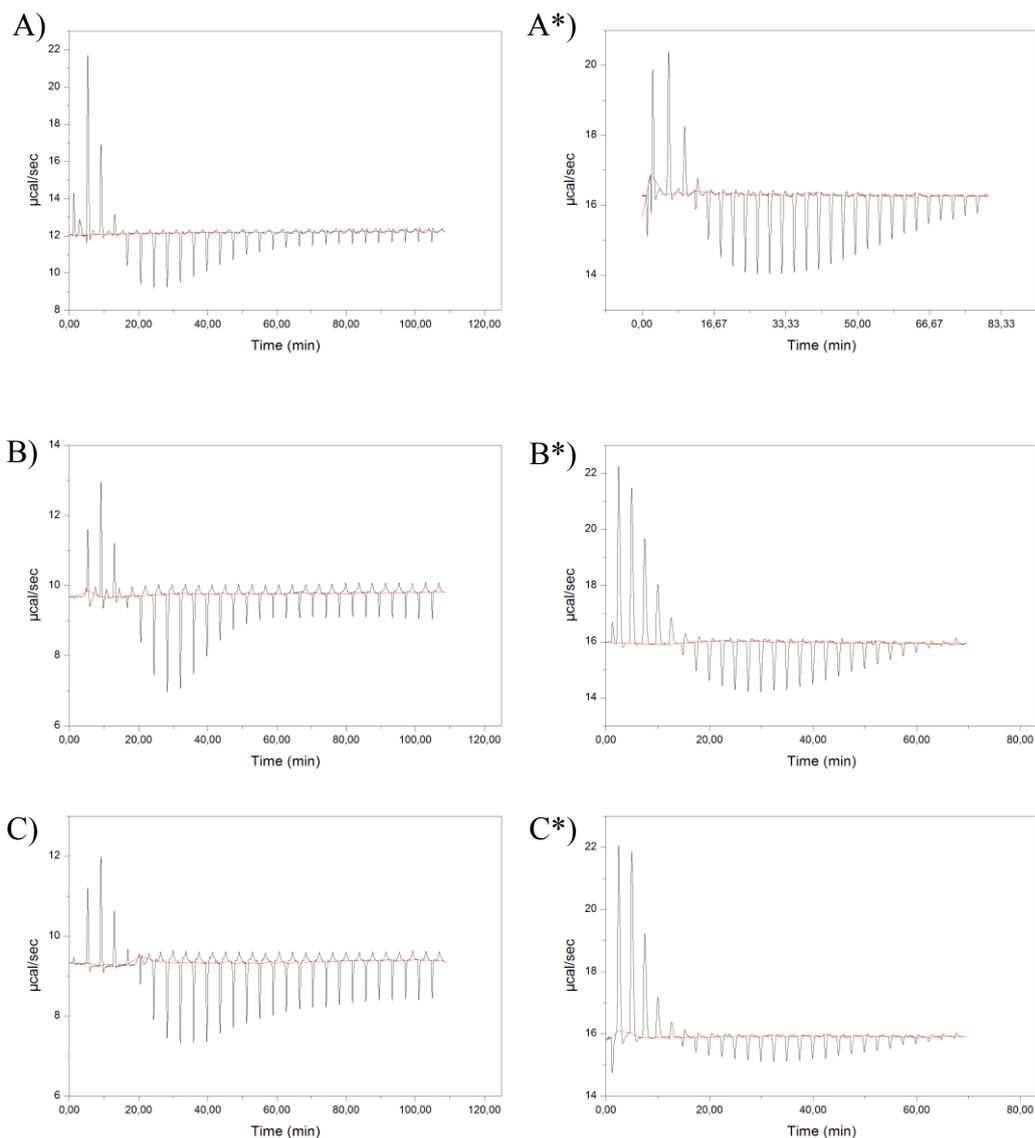
### 5.4.3 Ergebnisse der Messungen

Es sollte die Komplexbildungskonstante  $K_{\text{ass}}$  für die Komplexbildung aus den ionischen Ausgangsverbindungen bestimmt werden. Deswegen wurden die Substrate als Tetrabutylammoniumsalze eingesetzt, die gute Löslichkeit in organischen Lösemitteln wie Chloroform zeigen. Anfangs sollten die Derivate von Phenylalanin, Tyrosin und Valin vermessen werden (**Abb. 79**), um einerseits den Einfluss des aromatischen Restes im Vergleich zu aliphatischen Systemen zu sehen und zusätzlich verschiedenen elektronenreiche aromatische Systeme zu vergleichen. Als Rezeptor wurde das Chloridsalz des Rezeptors **30** eingesetzt, das gute Lösungseigenschaften in Chloroform zeigte. Anfangs sollte eine Rezeptorkonzentration von 0.2 mM eingesetzt werden, die im Falle von zu flachen Kurvenverläufen eventuell erhöht werden sollte. Es wurde etwas mehr als das zweifache Äquivalent von Substrat in ca. 20 Schritten zugegeben, wodurch eine komplette und genaue Darstellung der Isotherme gewährleistet war. Zusätzlich wurden Hintergrundmessungen aufgenommen, sowohl von Rezeptor gegen reines Lösemittel, als auch reines Lösemittel gegen Substrat, um etwaige Wärmeentwicklungen durch die Verdünnung zu überprüfen und gegebenenfalls von der Bindungsisotherme abzuziehen. Es wurden entgaste Lösemittel verwendet. Um zu überprüfen, welchen Einfluss die Entgasung auf die Werte hatte, wurden auch Messungen in nicht entgasten Lösemitteln durchgeführt. Die Rohdaten einiger Messungen sind in **Abb. 80** beispielhaft dargestellt.



**Abb. 79** Verwendete Substrate bei den ITC-Messungen

Man erkennt, dass sich die Messung aus zwei gegenläufigen Prozessen zusammensetzt. Am Anfang tritt zunächst ein endothermer Prozess auf, der sofort stark abnimmt und schließlich ab ca. einem halben Äquivalent Zugabe von Substrat in eine exotherme Bindungsisotherme übergeht. Dieses Aussehen findet man in allen Messungen unabhängig von Substrat, Konzentration, Temperatur, Entgasung des Lösemittels und Anzahl und Volumen der Einzelzugaben. Bei einigen Messungen, vor allem B) und C) in **Abb. 80** endet die Isotherme nicht bei 0, sondern bei einem niedrigerem Wert, was wohl durch inkorrekten Nullabgleich des Geräts verursacht wurde und durch anschließende Addition dieses Wertes ausgeglichen werden musste. Die Höhe der endothermen Ausschläge war relativ ungleichmäßig, während die exothermen Beiträge in ihrem absoluten Wert, der direkt von der Enthalpie abhängt, für das jeweilige Substrat ziemlich ähnlich waren. Die Messungen in nicht entgastem Lösemittel sollten zeigen, ob mangelnde Entgasung diesen anfänglichen positiven Ausschlag verursachte. Jedoch hatte der störende Nebenprozess in allen Bindungsisothermen ein ähnliches Aussehen, während er bei den verschiedenen Hintergrundmessungen ohne Substrat oder ohne Rezeptor mit reinem Chloroform unabhängig vom Entgasungsgrad jeweils nicht zu sehen war.

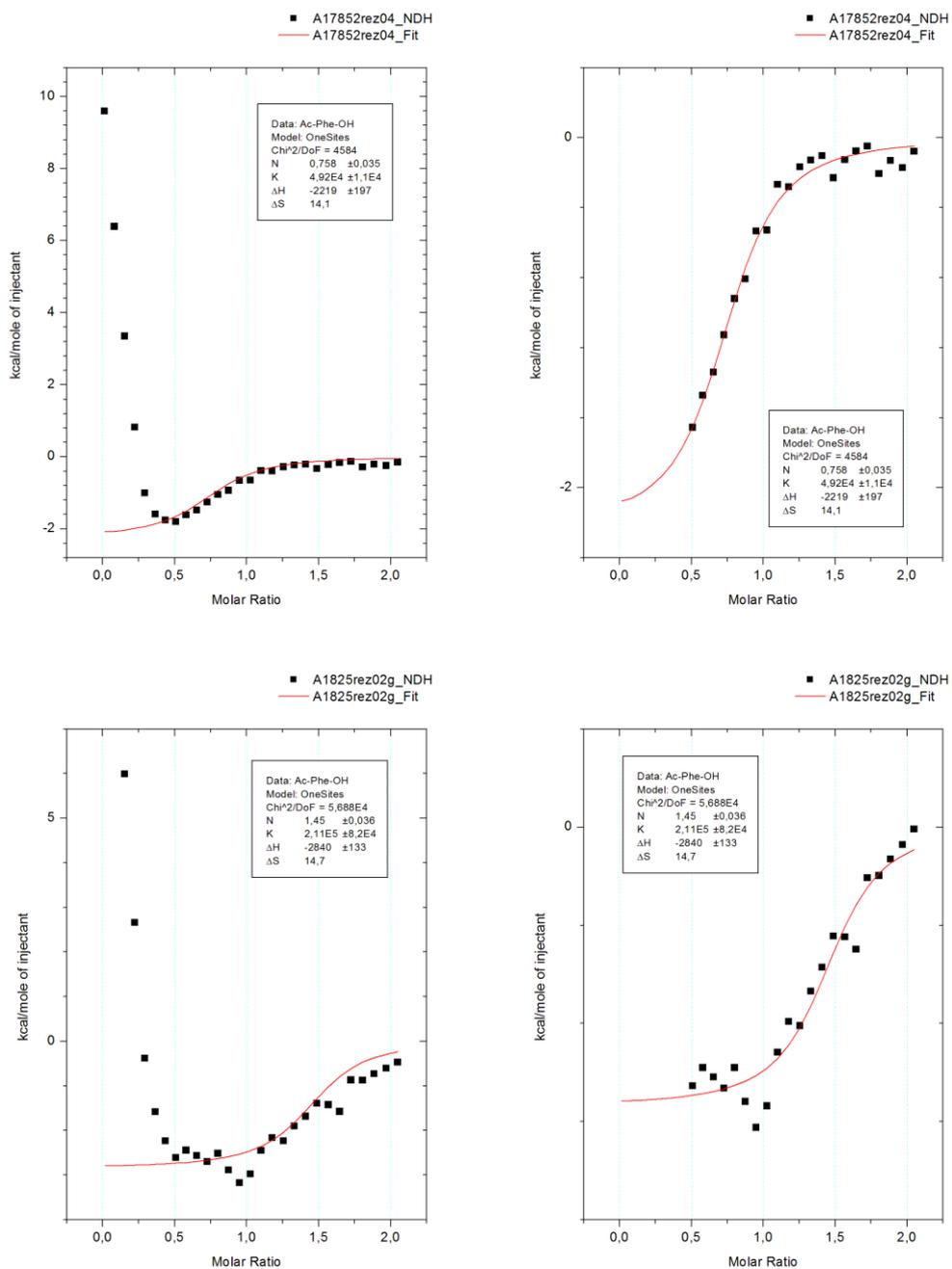


**Abb. 80** Rohdaten beispielhafter ITC-Messungen für verschiedene Substrate in entgastem oder nicht entgastem (\*) Lösemittel; A) Tetrabutylammonium-acetylphenylalanincarboxylat **54**; B) Tetrabutylammonium-acetyltyrosincarboxylat **55**; C) Tetrabutylammonium-acetylvalincarboxylat **53**

Die Komplexbildung von Guanidiniocarbonylpyrrolen mit Oxo-Anionen ist bei zunehmend unpolaren Lösemittel ein enthalpisch günstiger Vorgang.<sup>[112]</sup> Deswegen kann davon ausgegangen werden, dass auch hier die Komplexbildung der exotherme Prozess ist, während die endothermen Beiträge durch eine Überlagerung durch einen anderen Prozess entstanden sind. Denkbar wäre eine Aggregation des Rezeptor-Substrat-Komplexes mit reinem Substrat oder Rezeptor. Die genaue Ursache lässt sich jedoch durch die Untersuchung der ITC-Spektren nicht ermitteln. Bei ITC-Experimenten mit Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren wurden bereits ähnliche Spektren mit sowohl endothermen als auch exothermen Beiträgen beobachtet.<sup>[116]</sup> Dort wurde ein komplexeres Bindungsmodell vermutet, das durch Betrachten

einzelner Bereiche eventuell auf fundamentalere Modelle zurückgeführt werden könnte. Dies bedeutet, dass kein einzelner Bindungsvorgang auftritt, sondern eine schrittweise Komplexierung, eventuell auch eine vor- oder nachgelagerte Aggregation, was die Bindungsisotherme kompliziert. Die Schwierigkeit bei einer solchen Betrachtung liegt allerdings in der Möglichkeit teilweiser Überlappung und dadurch Unsicherheit der erhaltenen Daten. Bei den vorliegenden Daten scheint eine solche Auswertung auf den ersten Blick möglich. Die endotherme Reaktion erstreckt sich vor allem auf den Bereich bis zu 0.5 Äquivalenten, der Großteil der Bindungsisotherme der exothermen Reaktion scheint somit abgetrennt auswertbar zu sein. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass bei der Berechnung von Enthalpie und Bindungskonstante eher zu kleine Werte auftreten, da die überlagernde endotherme Reaktion die Werte eventuell erhöht und somit die Isotherme abflacht.

Zur Auswertung wurde deswegen nur der Bereich ab einem Äquivalentverhältnis von 0.5 herangezogen (**Abb. 81**). Die Wärmetönung der Verdünnung des Rezeptors mit Chloroform war vernachlässigbar klein, so dass lediglich die Verdünnung des Substrates nach linearer Regression von den Rohdaten abgezogen wurde. Zudem wurde, falls nötig, eine Konstante addiert, bzw. subtrahiert, so dass die Werte bei Substrat-Rezeptorverhältnissen größer als 2 gegen Null gingen. Bei dem so erhaltenen Spektrum wurde nun eine nichtlineare Kurvenanpassung durchgeführt. Für die Fälle, in denen diese konvergierte, sind die Werte in **Tab. 6** dargestellt.



**Abb. 81** Bindungsisotherme von Tetrabutylammonium-Acetylphenylalanincarboxylat **54** gegen Rezeptor **30**. Links sind alle Messpunkte zu sehen, rechts nur der Teil, der zur Auswertung herangezogen wurde. In Rot ist die nichtlinear angepasste Kurve dargestellt. Die oberen Graphen sind in entgastem, die beiden unteren in nicht entgastem Lösemittel aufgenommen.

**Tab. 6** Thermodynamische Kennwerte der ITC-Titrationen von verschiedenen Substraten. Bedingungen: 27 °C, Rezeptorkonzentration 0.2 mM, Substratkonzentration 2 mM, Zugabe von 2.1 Äquivalenten an Substrat in 28 Einzelschritten. Es sind alle auswertbaren Titrationen gezeigt.

Chloroform	Entgast	N	K	H	S
			[M <sup>-1</sup> ]	[cal/mol]	[cal/K]
Ac-Phe-O <sup>-</sup> 54	J	0.76 (±0.04)	4.92·10 <sup>4</sup> (±1.1·10 <sup>4</sup> )	-2219 (±197)	14.1
	N	1.45 (±0.04)	2.11·10 <sup>5</sup> (±8.2·10 <sup>4</sup> )	-2840 (±133)	14.7
	N	1.49 (±0.03)	2.04·10 <sup>5</sup> (±6.6·10 <sup>4</sup> )	-2409 (±91)	16.1
Ac-Val-O <sup>-</sup> 53	J	0.85 (±0.04)	2.95·10 <sup>5</sup> (±2.0·10 <sup>5</sup> )	-1158 (±143)	21.2
	N	1.65 (±0.02)	3.64·10 <sup>5</sup> (±1.3·10 <sup>5</sup> )	-1281 (±44)	21.1
Ac-Tyr-O <sup>-</sup> 55	J	0.70 (±0.03)	3.51·10 <sup>5</sup> (±1.8·10 <sup>5</sup> )	-3276 (±401)	14.5
	J	0.70 (±0.03)	2.96·10 <sup>5</sup> (±7.9·10 <sup>4</sup> )	-3783 (±261)	12.4
	N	1.59 (±0.03)	2.00·10 <sup>5</sup> (±5.4·10 <sup>4</sup> )	-3024 (±124)	13.9

Die Komplexstöchiometrie ist bei den Messungen in entgastem Lösemittel deutlich unterschiedlich zu der in nicht entgastem. Im entgastem Lösemittel wird, vermutlich verursacht durch den störenden Nebenprozess, bei der mathematischen Auswertung eine Stöchiometrie zwischen 0.70 und 0.85 erhalten, während im entgastem Lösemittel diese zwischen 1.45 und 1.65 für die verschiedenen Substrate liegt. Der Gasgehalt des Lösemittels scheint also einen Einfluss auf den Nebenprozess zu haben. Die ermittelte Bindungskonstante unterliegt besonders beim Phenylalaninderivat starker Variation, wo sie fast um eine Größenordnung schwankt. Durch das Fehlen des vorderen Bereiches bei der Auswertung der Bindungsisotherme schwankt besonders dieser Wert stark und ist somit nicht sehr verlässlich. Eine bessere Vergleichbarkeit und geringere Schwankungen weisen die Werte von Enthalpie sowie Entropie auf. Die größte Enthalpieänderung kann man beim Tyrosinderivat mit Werten von 3.0-3.8 kcal/mol beobachten, gefolgt vom Phenylalaninderivat mit 2.2-2.8 kcal/mol, am geringsten ist der Wert beim Valinderivat mit 1.2-1.4 kcal/mol. Diesen Unterschied könnte man über die zusätzliche Wechselwirkung des  $\pi$ -stackings von Guanidinium und dem aromatischem Rest erklären, die durch die passenden elektronischen Verhältnisse im Falle des Tyrosinderivats besonders ausgeprägt ist. Im Falle des entropischen Beitrages liefert das Valinderivat den günstigsten Beitrag mit einer positiven Entropie in Höhe von ca. 21 cal/mol, gefolgt vom Phenylalanin- und Tyrosinderivat, die Entropien im Bereich von 14-16 cal/mol bzw. 12-15 cal/mol aufweisen. Überraschend ist, dass dieser Wert im positiven Bereich liegt.

Prinzipiell sind bei Komplexbildungen zwei entgegengesetzte Einflüsse auf die Entropie vorhanden. Einerseits bildet sich aus Rezeptor und Substrat der Komplex, was zahlreiche Freiheitsgrade, vor allem die Translation der beteiligten Teilchen einschränkt und somit zu einer Entropie  $\Delta S < 0$  führen würde. Gleichzeitig werden allerdings auch die Solvatisierungshüllen der Reaktionspartner freigesetzt und eine neue Solvatisierungshülle des Rezeptor-Substrat-Komplexes gebildet. Die Solvatisierung der einzelnen Reaktionspartner ist oft enger und es sind mehr Lösemittelmoleküle beteiligt, besonders wenn geladene Teilchen vorliegen sind. Daraus resultiert ein positiver Entropiebeitrag durch die zusätzlichen Freiheitsgrade der Lösemittelmoleküle. Welcher der beiden Beiträge überwiegt, lässt sich im Voraus nicht mit Sicherheit sagen. Es scheint, dass auch im recht unpolaren Lösemittel Chloroform eine starke Solvatisierung der beteiligten Verbindungen vorliegt, die bei Freigabe der solvatisierenden Lösemittelmoleküle zu dem beobachteten positiven Entropiewert führt. Der relative Unterschied zwischen dem aliphatischen und den aromatischen Substraten kann erneut über die zusätzlichen Stapelwechselwirkungen erklärt werden, welche zu einem kompakterem und somit weniger beweglichen Komplex und damit verbunden einem niedrigeren Entropiewert führen.

Die gemessenen Bindungskonstanten schwanken durch den überlagernden Prozess sehr stark und sind wohl nicht sehr verlässlich. Die angegebenen Fehler in **Tab. 6** beziehen sich nur auf die mathematische Anpassung, während die tatsächlichen Abweichungen wahrscheinlich noch größer sind. Von der Größenordnung her liegen die Komplexbildungskonstanten jedoch einigermaßen nahe an den berechneten Werten aus den Extraktionsexperimenten. Dort wurden Werte im Bereich von  $10^3$ - $10^4$   $M^{-1}$  erhalten, während die Auswertung der ITC-Experimente zu Werten von  $10^4$ - $10^5$   $M^{-1}$  führte. Dies legt nahe, dass bei der vorgenommenen partiellen Betrachtung der richtige Bereich der Kurve ausgewählt wurde, der den Vorgang der Komplexbildung beschreibt. Die Größe des Fehlers lässt aber keinen relativen Vergleich der Komplexbindungskonstanten zu.

Durch die Überlagerung mit dem Nebenprozess und damit verbunden dem Fehlen des vorderen Isothermenabschnittes bei der Auswertung sind leider keine Informationen über die Komplexstöchiometrie zugänglich. Sowohl in entgastem als auch in nicht entgastem Lösemittel ergibt sich kein ganzzahliger Wert, zudem unterscheiden sich die Werte bei den verschiedenen Bedingungen sehr stark.

Relativ geringe Schwankungen weisen hingegen die Werte für die Enthalpieänderung auf. Da der überlagernde Prozess endotherm ist, erscheinen die berechneten Werte eher niedriger, als

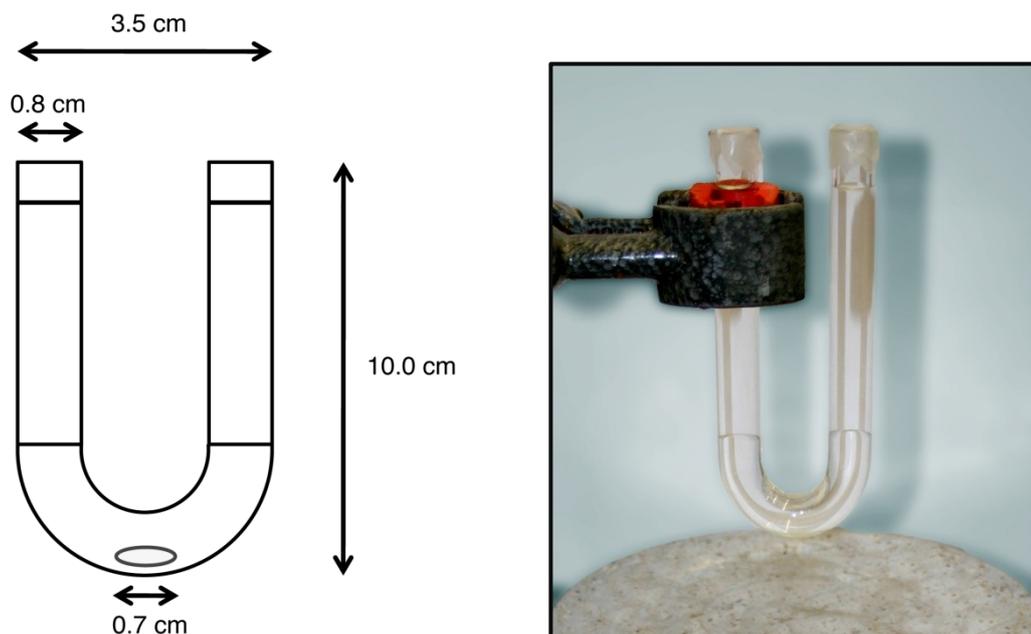
sie tatsächlich sind. Die relative Reihenfolge folgt nachvollziehbaren Strukturelementen, nämlich den zusätzlichen aromatischen Wechselwirkungen des Aminosäurerestes. Es scheint somit, dass die Komplexbildung in Chloroform ein exothermer Vorgang ist, der auch entropisch günstig ist. Die Exothermie bei Titrationen ähnlicher Guanidiniocarbonylverbindungen gegen Oxo-Anionen wurde auch schon in Methanol festgestellt, während die Bindungsvorgänge in zunehmend wässrigen Lösemitteln endotherm waren.<sup>[112]</sup>

## 5.5 Transportexperimente

### 5.5.1 Versuchsaufbau und Grundlagen

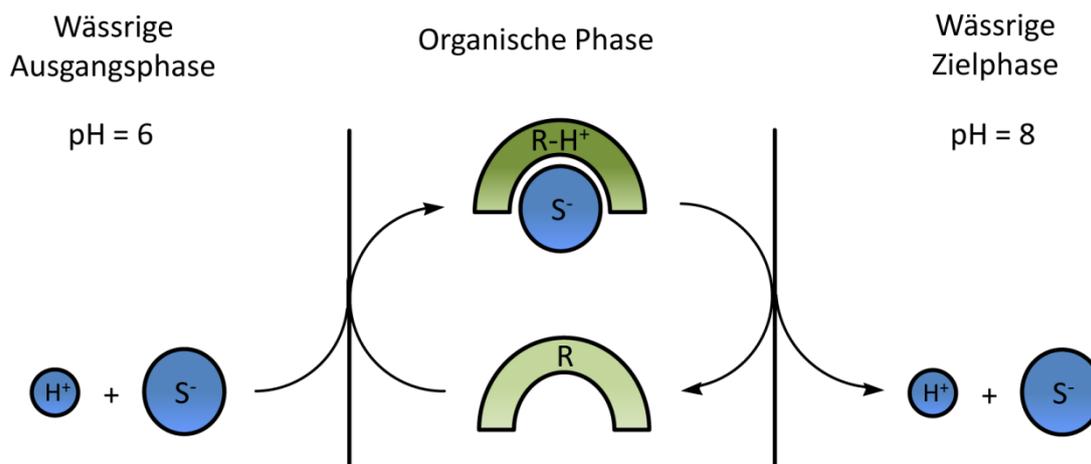
Die verwendeten Substrate und der Rezeptor wurden nun in Transportversuchen untersucht. Als Lösemittel wurde Chloroform verwendet, da dieses in den bisherigen Experimenten für den Rezeptor die besten Lösungseigenschaften aufwies. In den Extraktionsversuchen lieferte es zudem höhere Bindungskonstanten und man erhielt Hinweise auf eine Enantioselektivität bei einigen Substraten.

Als Versuchsaufbau wurde das U-Rohr gewählt. Dies erschien am zweckmäßigsten, da noch keine vorherigen Untersuchungen durchgeführt worden waren, es am einfachsten zu handhaben war und nur geringe Ansprüche an das Rezeptordesign gestellt werden (siehe Kap. 3.1). Die organische Phase war aufgrund der höheren Dichte somit im unteren Teil in der Mitte, die wässrigen Phasen in den Schenkeln des U-Rohres. Aussehen und Dimensionen sind in **Abb. 82** gezeigt. Zum Rühren der organischen Phase wurde ein Rührfisch benutzt, der eine stiftförmige Form besaß und mit 1250 Umdrehungen pro Minute gedreht wurde. Das Volumen der organischen Phase betrug 3.5 ml. Bei diesem Volumen lagen die Phasengrenzen weit genug oben in den Seitenarmen des U-Rohrs, dass keine signifikanten Leckeffekte durch die Bewegung beim Rühren zwischen den wässrigen Phasen auftraten. Die wässrigen Phasen hatten ein Volumen von 3 ml, wodurch ca. 1 cm bis zum oberen Rand des U-Rohres verblieb, was eine leichte Probenentnahme ermöglichte.



**Abb. 82** Aussehen und Dimensionen des U-Rohrs.

Die Konzentrationen der Substrate in Start- und Zielphase wurde mittels HPLC und angeschlossenem UV-Detektor vermessen. Dadurch konnte bei der Carbonylbande von 220 nm gemessen werden, was auch die Messung von aliphatischen Aminosäuren möglich machte. Als Substrate wurden die acetylierten Aminosäuren Alanin, Valin, Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan eingesetzt. Damit ein Vergleich mit literaturbekannten Systemen möglich war, wurden ähnliche Konzentrationen wie in dortigen Versuchen gewählt. Die organische Phase bestand aus Chloroform, das den Rezeptor in 1 mM Konzentration enthielt. Für die ersten Versuche wurde in der wässrigen Ausgangsphase Substrat in 50 mM Konzentration eingesetzt. Die beiden wässrigen Phasen bestanden aus einem BIS-TRIS-Puffer in 100 mM Konzentration, der in der Ausgangsphase auf einen pH-Wert von 6 und in der Zielphase auf 8 eingestellt war. Durch den pH-Gradienten sollte erreicht werden, dass gerichteter Transport nur in Richtung der Zielphase stattfand. Der höhere pH-Wert in der Zielphase sollte dafür sorgen, dass der Rezeptor an der Grenzfläche deprotoniert wird und kein Substrat für den Rücktransport aufnehmen kann. An der Grenzfläche zur Startphase wird er in Folge wieder protoniert und gewinnt seine Fähigkeit zur Bindung des Substrats zurück (**Abb. 83**).



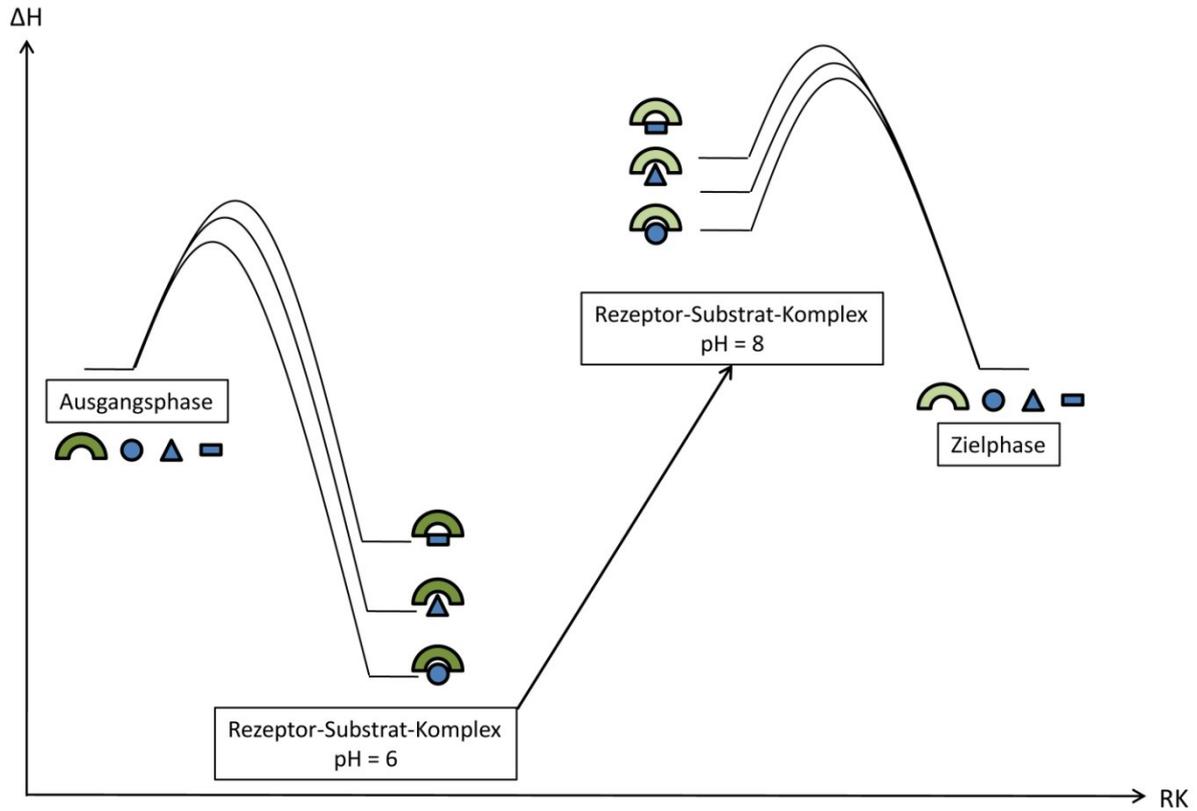
**Abb. 83** Schematischer Transport von acetylierten Aminosäurecarboxylaten (S) durch Rezeptor **30** (R) in U-Rohr-Versuchen.

Wie man in **Abb. 83** erkennen kann, findet ein Symport von Proton und acetyliertem Aminosäurecarboxylat statt. Der Protonentransport sorgt für einen zunehmenden Ausgleich des pH-Gradientens und ist somit neben dem Konzentrationsgefälle des Substrats die treibende Kraft des Transports. Das Proton ist dabei kovalent gebunden, das acetylierte Aminosäurecarboxylat durch nichtkovalente Wechselwirkungen.

Der Transportprozess ist ein dynamischer Prozess, es spielen nicht nur die Assoziation, sondern auch die anschließende Dissoziation und die Austauschgeschwindigkeit des Komplexes eine Rolle. Diese Geschwindigkeit hängt vor allem von der Energiebarriere ab, die im Übergangszustand bei der Komplexbildung auftritt. Nach dem Bell-Evans-Polanyi-Prinzip ist in einer Reihe von ähnlichen Reaktionen die Aktivierungsenthalpie  $\Delta H_a$  annähernd linear zur Reaktionsenthalpie  $\Delta H_r$  gemäß der folgenden Gleichung (A und B sind reaktionspezifische Konstanten):<sup>[119, 120]</sup>

$$\Delta H_a = A + B\Delta H_r$$

Die Substrate sind sich hier wahrscheinlich hinreichend ähnlich, so dass man dieses Prinzip auf die Bildung des Rezeptor-Substrat-Komplexes anwenden kann. Stärker bindende acetylierte Aminosäurecarboxylate mit negativen  $\Delta H_r$ -Werten sollten also bei der Assoziation zum Rezeptor-Substrat-Komplex eine niedrigere Energiebarriere überwinden müssen und sich schneller bilden als solche mit weniger hohen Bindungskonstanten. Bei der Dissoziation werden sich hingegen weniger starke Komplexe schneller auflösen (**Abb. 84**).



**Abb. 84** Enthalpie-Verlauf entlang der Reaktionskoordinate beim Transport verschiedener Rezeptor-Substrat-Komplexe durch die organische Phase.

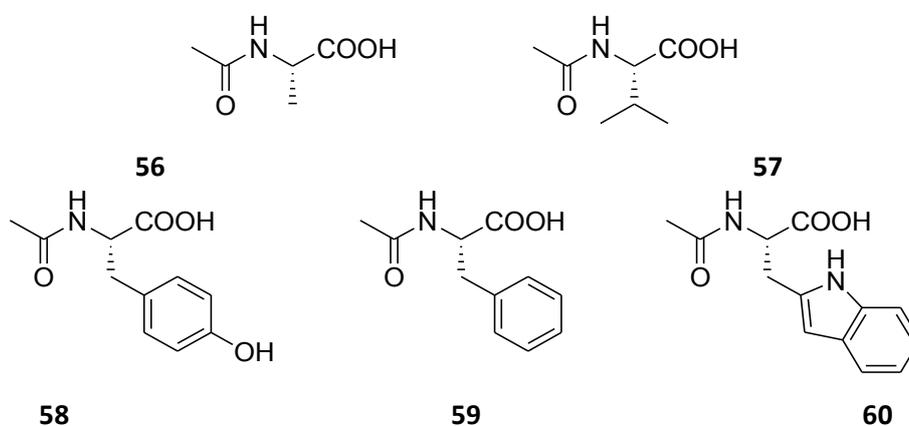
Durch die Einführung des pH-Gradienten mit dem höheren pH-Wert von 8 in der Zielphase sollte sich die Geschwindigkeit des Transports erhöhen, da dadurch wahrscheinlich die Aktivierungsenergie der Dissoziation gesenkt wird. Der Rezeptor, welcher einen  $pK_s$ -Wert von ca. 7 besitzt, wird deprotoniert und verliert die Fähigkeit, das Substrat effektiv zu binden. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird nun dadurch bestimmt, welcher der zwei Prozesse, also Assoziation oder Dissoziation, die höhere Aktivierungsenergie aufweist, Abhängig davon werden nun entweder stärker oder schwächer bindende Substrate bevorzugt transportiert.

## 5.5.2 Ergebnisse der Messungen

Im Folgenden werden die verschiedenen durchgeführten Messungen beschrieben. Zuerst wurden Einzelmessungen durchgeführt, bei denen die Transportgeschwindigkeiten der verschiedenen Substrate ermittelt wurden, deren Diffusion durch das Transportermolekül erleichtert war. Daraufhin wurde überprüft, ob der Transporter Enantioselektivität zeigte, indem der Versuch mit einem racemischen Substrat durchgeführt wurde. Zudem sollte ein aktiver Transportmodus erreicht werden, bei dem mit gleichen Anfangskonzentrationen in Ausgangs- und Zielphase begonnen wurde und die zum Transport entgegen des Konzentrationsgradienten führen sollten. Zuletzt wurden U-Rohr-Versuche mit verschiedenen Substraten im gleichen Ansatz durchgeführt, bei denen die direkte Konkurrenz der unterschiedlichen Substrate untersucht werden sollte.

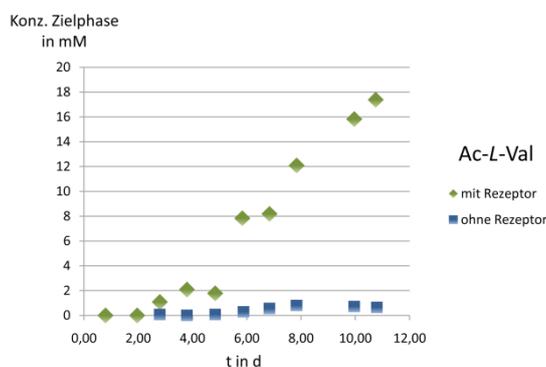
### 5.5.2.1 Einzelmessungen

Als Substrate wurden Ac-Ala-OH **56**, Ac-Val-OH **57**, Ac-Tyr-OH **58**, Ac-Phe-OH **59** und Ac-Trp-OH **60** eingesetzt (**Abb. 85**). Diese decken einen breiten Bereich in der Lipophilie ab und enthalten sowohl aliphatische als auch unterschiedlich große und elektronenreiche aromatische Reste.



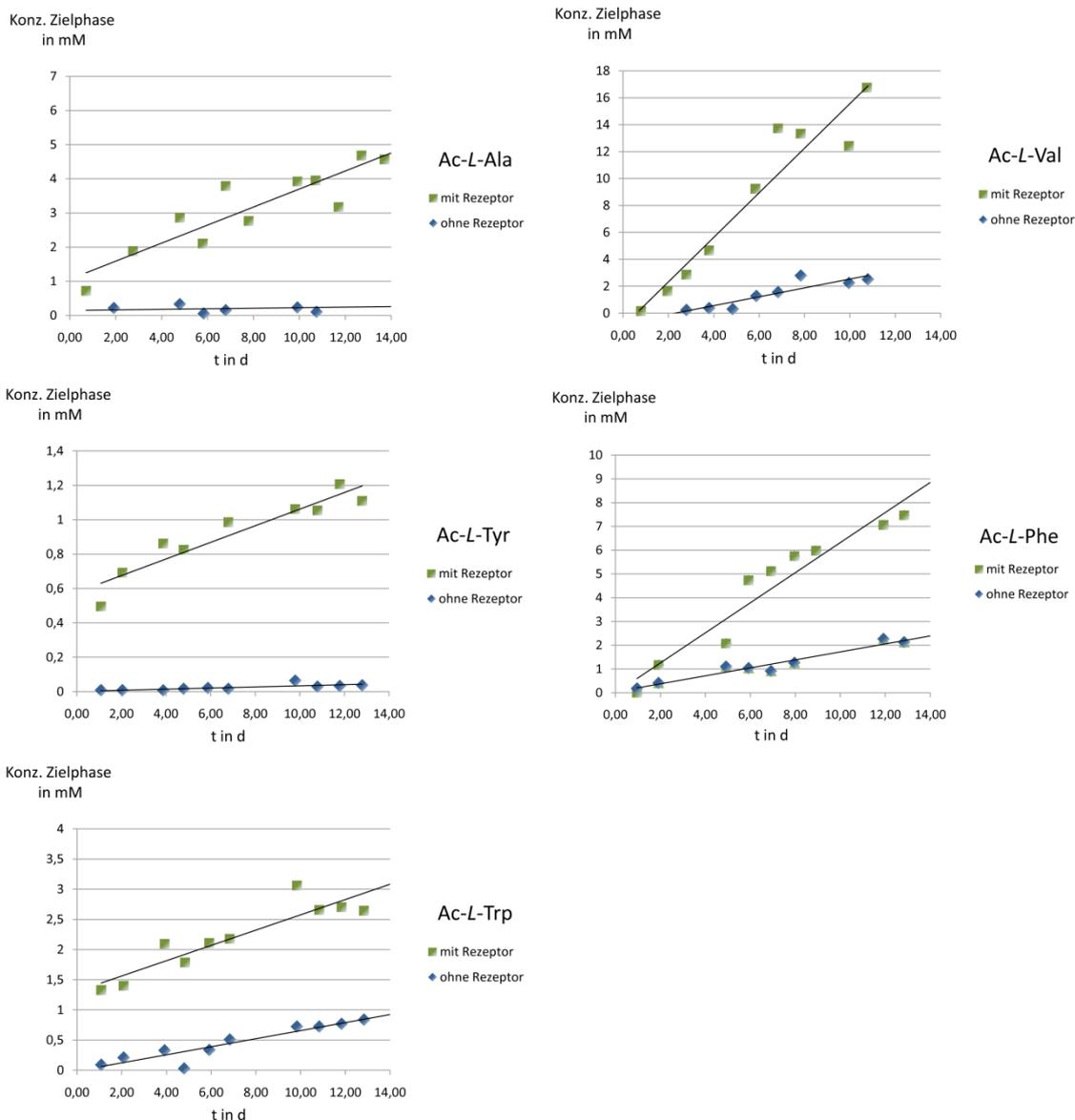
**Abb. 85** Verwendete Substrate in den Transportexperimenten.

Es wurden jeweils zwei U-Rohr-Versuche mit Rezeptor und zwei ohne Rezeptor als Blindprobe durchgeführt. In der Ausgangsphase befanden sich die verschiedenen Substrate, während die Zielphase anfangs noch kein Substrat enthielt. Die organische Phase mit oder ohne Rezeptor wurde vor Beginn der Transportexperimente mit der wässrigen Startphase durch 5minütiges Ausschütteln äquilibriert. Dadurch wurde die organische Phase mit Substrat gesättigt und der Rezeptor unter Abgabe des Chloridanions mit dem acetylierten Aminosäurecarboxylat beladen. Ohne diesen Schritt beobachtete man eine zeitlich variable, teilweise länger als einen Tag andauernde Induktionsphase, bevor der Transportprozess begann. Beim dem Transportversuch von Ac-Val-OH in **Abb. 86**, bei dem keine Äquilibration stattgefunden hatte, sieht man zwei Tage lang keinerlei Transport, erst ab Tag 3 steigt die Konzentration des Substrats in der Zielphase messbar. Dagegen sieht man in den Diagrammen in **Abb. 87**, bei denen eine Äquilibration durchgeführt worden war, einen sofortigen Beginn des Transports. Teilweise springt die Konzentration des Substrates nach einem Tag sofort auf einen relativ hohen Wert, um dann konstant weiterzusteigen (z.B. Ac-Tyr-OH und Ac-Trp-OH). Zur Auswertung wurde die Steigung der Kurve ohne den anfänglichen steilen Anstieg herangenommen. Es wurden jeden Tag Proben der Zielphase genommen, die mittels HPLC ausgewertet wurden. Aufgrund des relativ geringen Querschnitts des U-Rohres und dem damit verbundenen geringen Durchsatz wurden die Versuche für die langsameren Systeme bis zu 14 Tage durchgeführt. Bei einigen Ansätzen beobachtete man an den Phasengrenzen die Bildung von Schaum, der sich meist nach einem Tag aufgelöst hatte. Speziell bei den Versuchen mit Ac-Tyr-OH konnte sich der Schaum jedoch für mehrere Tage halten, ob er eine Veränderung der Transportgeschwindigkeit nach sich zog, kann nicht ausgeschlossen werden. Die Geschwindigkeit des Transports veränderte sich jedoch nach der Auflösung des Schaumes nach 4-5 Tagen nicht erkenntlich (**Abb. 86**), so dass der Einfluss gering gewesen sein muss.



**Abb. 86** Transportdiagramm von Ac-Val-OH ohne vorheriges Äquilibrieren.

Aus den Steigungswerten der Kurven wurde durch lineare Regression die Transportgeschwindigkeit für den steady-state ermittelt. Die Steigungen unterlagen einer gewissen Schwankung, der auftretende Fehler konnte bei den Messungen mit Rezeptor konservativ mit  $\pm 10\text{-}20\%$  abgeschätzt werden (bei Ac-Tyr-OH aufgrund der stärkeren Schaumbildung  $\pm 30\%$ ). Bei den Blindmessungen ohne Rezeptor war aufgrund der geringeren Konzentrationen der Fehler wohl noch etwas höher. Beim Alaninderivat konnte kein Wert für den Flux ohne Rezeptor bestimmt werden, da die Konzentration von Substrat zu gering war. Beispiele für die erhaltenen Transportdiagramme für die verschiedenen Substrate sind in **Abb. 87** dargestellt.

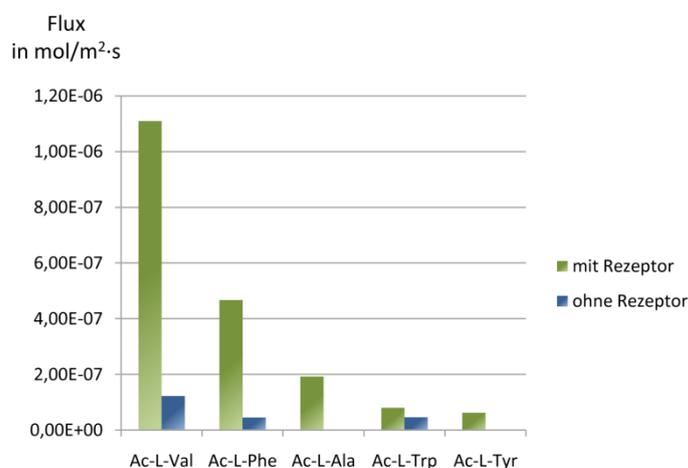


**Abb. 87** Transportdiagramme der verschiedenen Substrate im Vergleich zu den Blindproben.

Es wurden die Mittelwerte aus den vorliegenden Messungen berechnet. Man erhielt den Anstieg der Konzentration in der Zielphase pro Tag. Durch Division durch das Volumen der Zielphase und den Durchmesser des U-Rohres erhielt man den Flux des Substrates durch die organische Phase, d.h. den Durchsatz an Stoffmenge pro Querschnittsfläche pro Sekunde. Die Ergebnisse der Einzelmessungen sind in **Tab. 7**, sowie in graphischer Form und nach Höhe des Fluxes geordnet in **Abb. 88** zusammengefasst.

**Tab. 7** Durchschnittswerte des Fluxes für die verschiedenen Substrate in den Einzelmessungen.

	Flux mit Rezeptor [mol/m <sup>2</sup> s]	Flux ohne Rezeptor [mol/m <sup>2</sup> s]
Ac-Ala-OH <b>56</b>	$1.92 \cdot 10^{-7}$	n/a
Ac-Val-OH <b>57</b>	$1.11 \cdot 10^{-6}$	$1.23 \cdot 10^{-7}$
Ac-Tyr-OH <b>58</b>	$6.24 \cdot 10^{-8}$	$2.20 \cdot 10^{-9}$
Ac-Phe-OH <b>59</b>	$4.67 \cdot 10^{-7}$	$4.54 \cdot 10^{-8}$
Ac-Trp-OH <b>60</b>	$8.05 \cdot 10^{-8}$	$4.62 \cdot 10^{-8}$



**Abb. 88** Durchschnittlicher Flux der verschiedenen Substrate in den U-Rohr Einzelmessungen.

Bis auf Ac-Ala-OH, für das in der Blindprobe aufgrund der geringen Konzentrationen verbunden mit der geringen UV-Absorption kein Flux ermittelt werden konnte, liegen die Transportraten mit Rezeptor im Vergleich zur gemessenen Hintergrunddiffusion meist ungefähr eine Größenordnung höher. Die höchsten Transportraten wurden für Ac-Val-OH gefunden, das mehr als doppelt so schnell wie das nächstschnellere Substrat Ac-Phe-OH transportiert wird, welches wiederum ca. doppelt so schnell wie Ac-Ala-OH war. Noch

dreimal langsamer wurden die Substrate Ac-Tyr-OH und Ac-Trp-OH transportiert. Relativ gesehen wurde der Transport von Ac-Tyr-OH am stärksten beschleunigt, fast um das dreißigfache. Allerdings war die Hintergrunddiffusion die niedrigste von allen gemessenen, so dass hier vielleicht ein größerer Fehler auftrat. Bei Ac-Ala-OH konnte kein Wert für die Hintergrunddiffusion ermittelt werden, so dass man über die relative Veränderung nichts aussagen kann. Da der absolute Wert für den Flux aber noch höher als bei Ac-Tyr-OH ist, kann diese durchaus noch höher sein. Ac-Val-OH und Ac-Phe-OH waren beide um das ca. 10fache beschleunigt, während die Beschleunigung bei Ac-Trp-OH mit unter dem 2fachen Wert am geringsten war. Abgesehen von Ac-Ala-OH, wo kein Hintergrundwert verfügbar war und Ac-Tyr-OH, wo der sehr niedrige Wert eventuell zu einem starken Fehler geführt hat, ist die relative Veränderung der Transportgeschwindigkeit für Ac-Val-OH, Ac-Phe-OH und Ac-Trp-OH indirekt proportional zu den Bindungskonstanten aus den Extraktionsmessungen. Auch beim Vergleich der absoluten Werte des Transports mit den thermodynamischen Daten fällt auf, dass die stärker gebundenen Substrate Ac-Trp-OH und Ac-Tyr-OH, die Bindungsaffinitäten im Bereich von  $1\text{-}3\cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  zeigten, in den Transportversuchen relativ geringe Fluxraten aufweisen. Die schwächer gebundenen Substrate Ac-Phe-OH und besonders Ac-Val-OH mit Bindungsaffinitäten von  $3\text{-}4\cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  wurden hingegen deutlich schneller transportiert. Dieses Verhalten ließe sich über die verschiedenen Aktivierungsenergien bei der Dissoziation des Rezeptor-Substrat-Komplexes erklären, welche für hohe Bindungskonstanten am größten sind (**Abb. 84**). Somit würden die schwächer gebundenen Substrate beim Transport schneller ausgetauscht, was den höheren Flux erklären würde. Das am stärksten gebundene Substrat Ac-Trp-OH zeigte hingegen nur eine sehr geringe Erhöhung der Transportgeschwindigkeit im Vergleich zur Hintergrunddiffusion.

Zum Vergleich mit literaturbeschriebenen Daten muss man vor allem den steroidalen Guanidiniumrezeptor **28** von *Davis, de Mendoza* und *de Vries* heranziehen, der das einzige Beispiel für den Transport von acetylierten Aminosäuren darstellt (siehe Kap. 3.3). Bei einem sehr ähnlichen experimentellen Aufbau konnten dort Transportraten von ca.  $2.8\cdot 10^{-6} \text{ mol/m}^2\text{s}$  für racemisches Ac-Phe-OH gemessen werden, was als einziges Substrat im Transportexperiment untersucht wurde.<sup>[98]</sup> Im Vergleich dazu ist in der vorliegenden Arbeit der Transport von Ac-Phe-OH mit  $4.67\cdot 10^{-7} \text{ mol/m}^2\text{s}$  etwas langsamer, jedoch wird hier Ac-Val-OH in einer ähnlichen Größenordnung mit einer Geschwindigkeit von  $1.11\cdot 10^{-6} \text{ mol/m}^2\text{s}$  transportiert. Der untersuchte Rezeptor zeigt also ein gutes Transportvermögen, das nahe am besten literaturbekanntem System liegt.

### 5.5.2.2 Enantioselektive Messungen

Es wurden Messungen an racemischem Ac-Phe-OH durchgeführt, die zeigen sollten, ob enantioselektiver Transport vorlag. Dazu wurde das zuvor skizzierte U-Rohr-Experiment aus den Einzelversuchen mit einem racemischen Gemisch dieser Aminosäure durchgeführt. Die Zielphase wurde mittels chiraler RP-HPLC bis zu einem Substratumsatz von nur 10 % vermessen, da die Enantioselektivität mit zunehmender Transportdauer prinzipiell abnimmt. Es konnte nach vier Tagen nur ein geringer Unterschied zwischen dem Transportverhalten der verschiedenen Enantiomere festgestellt werden, der im Bereich der Messungenauigkeit lag, die Konzentrationen von *L*- und *D*-Form waren nahezu gleich (**Tab. 8**).

**Tab. 8** Transportraten der verschiedenen Enantiomere von racemischem Ac-Phe-OH.

	Flux [mol/m <sup>2</sup> s]
Ac- <i>L</i> -Phe-OH	6.21·10 <sup>-7</sup>
Ac- <i>D</i> -Phe-OH	6.12·10 <sup>-7</sup>

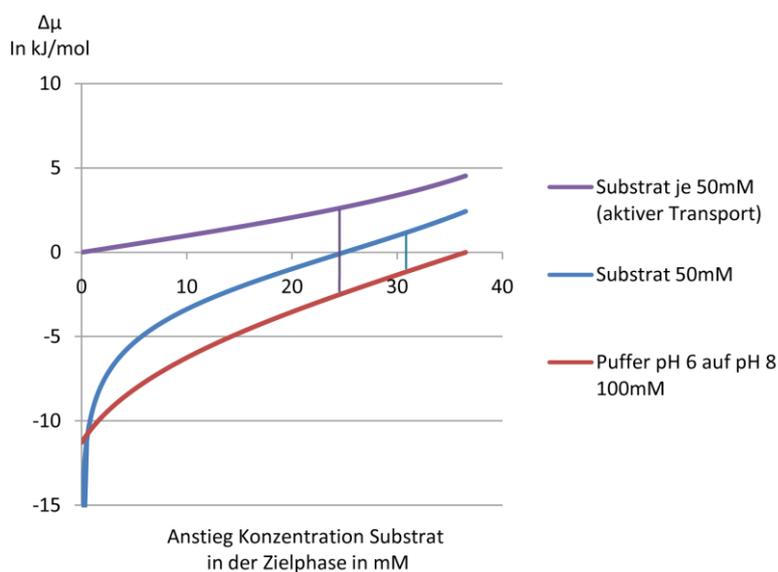
### 5.5.2.3 Aktiver Transport

Es wurde nun überprüft, ob der Transportvorgang auch aktiv betrieben werden kann, d.h. ob die Substrate auch gegen das Konzentrationsgefälle transportiert werden. Die treibende Kraft des aktiven Transports in diesem Fall wäre der Konzentrationsgradient der H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>-Ionen, d.h. es sollte sekundärer aktiver Transport erzielt werden. Zwischen den beiden wässrigen Phasen liegt für die H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>-Ionen und das Substrat eine Potentialdifferenz vor von:

$$\Delta\mu = RT \ln \frac{c_2}{c_1} \quad (5.20)$$

$\mu$  ist hierbei das chemische Potential,  $R$  die Gaskonstante,  $T$  die Temperatur in Kelvin und  $c_1$  bzw.  $c_2$  die Konzentration in Ausgangs-, bzw. Zielphase. In der Formel wurden die Konzentrationen anstelle der Aktivitäten verwendet, da bei den geringen Konzentrationen diese annähernd gleich groß sind. Bei Einsetzen der H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>-Konzentrationen für 1·10<sup>-6</sup> M<sup>-1</sup> in der Ausgangsphase, bzw. 1·10<sup>-8</sup> M<sup>-1</sup> in der Zielphase erhält man eine anfängliche

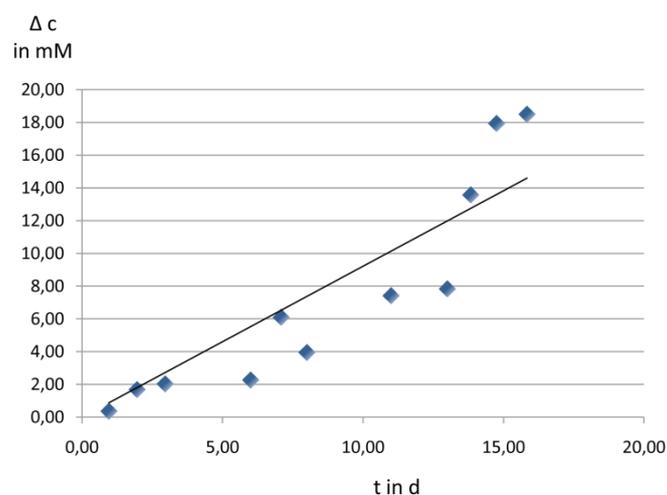
Potentialdifferenz von  $-11.3 \text{ kJ/mol}$ . Durch den verwendeten BIS-TRIS-Puffer mit einem  $\text{pK}_s$ -Wert von 6.5 kann ein pH-Gradient bis zu einem Anstieg der Substratkonzentration von ca.  $36.5 \text{ mM}$  aufrechterhalten werden. An diesem Punkt werden die  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Konzentrationen in Ausgangs- und Zielphase schließlich gleich groß. In **Abb. 89** ist der Potentialverlauf von Substrat- und Hydroxoniumionen-Konzentration gezeigt. Die blaue Kurve entspricht der Situation für die bisherigen Einzelmessungen, bei denen  $50 \text{ mM}$  Substrat in der Ausgangsphase vorlag und die Zielphase anfangs kein Substrat enthielt, während die rote Kurve das Potential der Hydroxoniumionen über den Verlauf des Transportversuchs beschreibt. Bei diesen Experimenten lag kein aktiver Transport vor, da das Potential für das Substrat anfangs ebenfalls negativ war, das heißt der Transportprozess energetisch günstig war. Erst ab einer Konzentration von  $25 \text{ mM}$  in der Zielphase überschreitet die blaue Kurve die Abszisse. Von dort bis zu einer Konzentration von ca.  $30.7 \text{ mM}$ , was in der Abbildung durch den senkrechten blauen Strich dargestellt ist, hätte aktiver Transport stattgefunden. Jedoch wurden die Versuche nicht soweit fortgeführt, dass man diesen Punkt erreicht hätte. Der Maximalwert von  $30.7 \text{ mM}$  erklärt sich dadurch, dass an diesem Punkt die Potentiale von Substrat und Hydroxoniumionen-Gradient gleich groß werden, d.h. die Triebkraft des aktiven Transportes nicht mehr groß genug wäre, um das Substrat höher in der Zielphase zu konzentrieren.



**Abb. 89** Verlauf der Potentialdifferenz zwischen Ausgangs- und Zielphase. Es werden die Potentialverläufe für verschiedene Substratkonzentrationen beim Transport sowie für die  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionen bei Einsatz des BIS-TRIS Puffers dargestellt. Für die Berechnung der  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionenkonzentration wurde die Henderson-Hasselbalch-Gleichung angewendet. Die senkrechten Linien markieren jeweils die Punkte, an denen sich die Potentialdifferenzen von  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionen und Substrat auf Null addieren, d.h. die Punkte, bis zu denen jeweils maximal aktiver Transport möglich sein sollte.

Für die Messung von aktivem Transport müsste von diesem Punkt an gemessen werden. Deswegen wurde ein Transportversuch entworfen, bei dem sowohl in Ausgangs- als auch in Zielphase zu Beginn des Versuchs eine Substratkonzentration von 50 mM vorgelegt wurde. Dies entspricht in **Abb. 89** der violetten Kurve. Wie zu sehen ist, beginnt das Potential für den Transport des Substrates bei Null und steigt dann kontinuierlich an. In diesem Falle wäre der maximale Wert, an denen sich die beteiligten Potentiale ausgleichen, nach einem Konzentrationsanstieg von ca. 24.2 mM erreicht (violette Linie in **Abb. 89**), d.h. in der Zielphase könnte eine Substratkonzentration von ca. 74.2 mM bei 25.8 mM Konzentration in der Ausgangsphase erreicht werden.

Der erwartete Transportmodus sollte in einem Einzelversuch überprüft werden. Dazu wurde ein U-Rohr-Versuch durchgeführt, bei dem sowohl in Ausgangs- als auch Zielphase Ac-Phe-OH in einer Konzentration von 50 mM in einem 100 mM BIS-TRIS-Puffer vorlag. In der Ausgangsphase wurde wie bisher ein pH-Wert von 6, in der Zielphase ein pH-Wert von 8 eingestellt. In der Tat trieb dieser Ionengradient den aktiven Transport von Phenylalanin. In **Abb. 90** sieht man die Differenz von Ziel- und Ausgangsphase gegen die Zeit aufgetragen. Die Bestimmung der Fluxrate (**Tab. 9**) zeigt, dass so gut wie kein Unterschied zwischen dem Transport gegen den Konzentrationsgradienten im Vergleich zum Einzelversuch vorliegt, bei dem passiver Transport vorlag. Der Wert für den aktiven Transport scheint sogar etwas höher zu sein, was aber innerhalb des Messfehlers liegt.



**Abb. 90** Aktiver Transport von Ac-Phe-OH. In Ausgangs- und Zielphase befand sich jeweils Substrat in einer Konzentration von 50 mM. Zu sehen ist die Differenz der Konzentration von Ziel- minus Ausgangsphase.

**Tab. 9** Transportrate von Ac-Phe-OH bei ausschließlich aktivem Transport im Vergleich zum Einzelexperiment mit aktivem als auch passivem Transport.

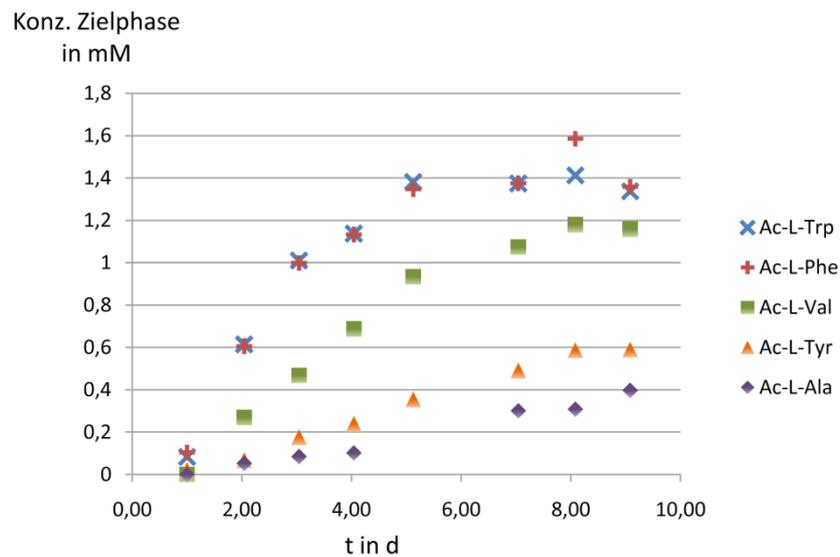
	Flux (aktiver Transport) [mol/m <sup>2</sup> s]	Flux (Einzelversuch) [mol/m <sup>2</sup> s]
Ac-Phe-OH	4.91·10 <sup>-7</sup>	4.67·10 <sup>-7</sup>

Es konnte also die Fähigkeit des Transportermoleküls zu aktivem Transport bestätigt werden. Es lag sekundärer aktiver Transport vor, der Hydroxoniumionen-Gradient diene als Triebkraft. Die Geschwindigkeit des Transports von Ac-Phe-OH war gleich wie beim Transport in den vorherigen Versuchen, bei denen anfangs kein Substrat in der Zielphase vorlag. Die Potentiale von Substrat und Hydronium-Ionen-Gradient waren in den vorherigen Einzelmessungen beide negativ, was den Transport günstiger erscheinen lässt. Für die Geschwindigkeit des Transportes ist die Potentialdifferenz aber nicht entscheidend. Die Geschwindigkeit wird von kinetischen Aspekten wie der Austauschgeschwindigkeit des Komplexes oder der Diffusionsgeschwindigkeit bestimmt.

#### 5.5.2.4 Kompetitive Messungen

Als nächstes wurde die relative Selektivität gegenüber den verschiedenen Substraten bei direkter Konkurrenz um das Transportermolekül untersucht. Dazu wurde eine Mischung aus den fünf verschiedenen Substraten in jeweils 2 mM Konzentration in der wässrigen Startphase aus 100 mM BIS-TRIS-Puffer hergestellt, in der organischen Phase befand sich der Rezeptor **30** in 1 mM Konzentration. Dadurch mussten die verschiedenen Substrate um dieselbe Bindungsstelle direkt konkurrieren. Die Konzentrationen in der Zielphase sind in **Abb. 91** dargestellt. Anders als in den Einzelversuchen zeigen hier Ac-Trp-OH und Ac-Phe-OH die höchste, annähernd gleiche Transportgeschwindigkeit für die ersten fünf Tage (**Tab. 10**), etwas langsamer ist Ac-Val-OH, zuletzt folgen Ac-Tyr-OH und Ac-Ala-OH. Dies ist eine deutliche Veränderung zu den Einzelversuchen, wo Ac-Val-OH deutlich vor Ac-Phe-OH und noch weiter vor Ac-Ala-OH lag, während Ac-Trp-OH und Ac-Tyr-OH am langsamsten waren (**Abb. 88**). Außerdem sind die Transportselektivitäten von Ac-Tyr-OH und Ac-Ala-OH genau umgekehrt wie in den Einzelversuchen. Auch der Vergleich der Fluxraten mit denen aus den Einzelversuchen ist aufschlussreich. Während Ac-Tyr-OH und

Ac-Trp-OH ähnliche oder höhere Werte zeigen, ist der Wert von Ac-Phe-OH um die Hälfte geringer, die Werte von Ac-Val-OH und Ac-Ala-OH sogar um ungefähr eine ganze Dimension. Dass der Wert für den Flux von Ac-Trp-OH hier sogar höher liegt als beim Einzelexperiment, kann durch die niedrige Substratkonzentration von 2 mM bedingt sein. Dadurch liegt ein großer Anteil der bevorzugt gebundenen Substrate nach dem anfänglichen Ausschütteln vor dem Transportversuch bereits im Transporter-Substrat-Komplex vor, woraus ein scheinbar schnellerer Transport resultiert. Dies gilt für diejenigen Substrate mit einer hohen Bindungsstärke zum Rezeptor.

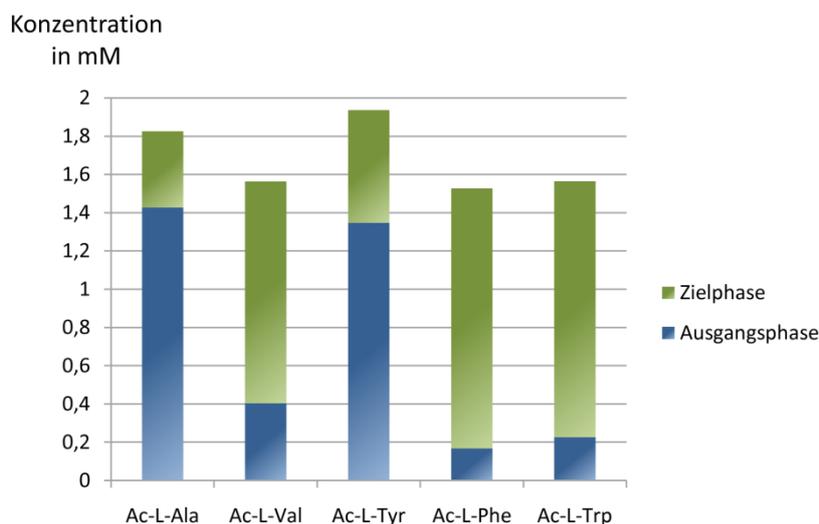


**Abb. 91** Kompetitiver Transportversuch mit den verschiedenen Substraten in jeweils 2 mM Konzentration in der Ausgangsphase.

**Tab. 10** Transportraten für die ersten 5 Tage beim kompetitiven Transportversuch im Vergleich zum Einzelexperiment.

	Flux (kompetitiv) [mol/m <sup>2</sup> s]	Flux (einzeln) [mol/m <sup>2</sup> s]
Ac-Ala-OH	$2.30 \cdot 10^{-8}$	$1.92 \cdot 10^{-7}$
Ac-Val-OH	$1.54 \cdot 10^{-7}$	$1.11 \cdot 10^{-6}$
Ac-Tyr-OH	$5.65 \cdot 10^{-8}$	$6.24 \cdot 10^{-8}$
Ac-Phe-OH	$2.03 \cdot 10^{-7}$	$4.67 \cdot 10^{-7}$
Ac-Trp-OH	$2.10 \cdot 10^{-7}$	$8.05 \cdot 10^{-8}$

Bei direkter Konkurrenz um das Transportermolekül haben diejenigen Substrate mit hoher Bindungsaffinität in den Extraktionsversuchen einen klaren Vorteil gegenüber solchen mit niedrigerer Komplexbildungskonstante, aber höherer Transportrate. Da das Verhältnis von Rezeptor zur Konzentration aller Substrate zusammen mit 1:10 relativ niedrig ist, erhält man vor allem die Rezeptor-Substrat-Komplexe mit der höchsten Bindungsstärke, also Ac-Trp-OH und Ac-Tyr-OH, welche dann relativ normale Transportwerte zeigen. Die Werte für Ac-Val-OH liegen hingegen nur geringfügig über der gemessenen Hintergrunddiffusion in den Einzelversuchen, bei denen allerdings auch eine höhere Substratkonzentration vorlag. Die Kurven für die schneller transportierten Substrate steigen auf einen Wert über 1 mM in der Zielphase, d.h. es liegt am Ende mehr Substrat in der Zielphase vor, als in der Ausgangsphase. Dort erreichen sie ein Plateau, das sie nicht mehr übersteigen. Dies liegt wohl daran, dass immer noch ein Gleichgewicht zwischen freiem Substrat in der wässrigen Phase und Rezeptor-Substrat-Komplex in der organischen Phase vorliegt, wodurch nicht das gesamte Substrat die Zielphase erreicht. Dafür spricht auch, dass ab dem Punkt des Plateaus die langsameren Substrate nicht schneller transportiert werden, da offensichtlich der Rezeptor immer noch von den besseren Bindern in Anspruch genommen ist. **Abb. 92** zeigt die Verteilung auf die verschiedenen Phasen nach neun Tagen, wie sie in HPLC-Messungen der Ausgangs- und der Zielphase festgestellt wurde.



**Abb. 92** Verteilung der Substrate auf die unterschiedlichen Phasen nach neun Tagen.

Die besser transportierten Substrate sind von der Verteilung auf die wässrigen Phasen her zu 80-90 % in der Zielphase zu finden, während von den langsameren Substraten nur 25-30 %

dort angekommen sind. Somit lag für die schnelleren Substrate aktiver Transport vor. Der fehlende Bereich zur Konzentration von 2 mM, also das restliche Substrat ist wohl in der organischen Phase zu finden. Insgesamt fehlen in der Summe von allen Substraten 1.6 mM an Konzentration, das entspricht 4.8  $\mu\text{mol}$ . Davon liegen 3.5  $\mu\text{mol}$ , also ca. drei Viertel im Transporter-Substrat-Komplex vor. Die restlichen 1.3  $\mu\text{mol}$  sind als freies Substrat auf die organische Phase verteilt. Von den relativ lipophilen Substraten Ac-Val-OH, Ac-Phe-OH und Ac-Trp-OH ist ca. ein Viertel der Gesamtmenge in der organischen Phase. Die weniger lipophilen Substrate Ac-Ala-OH und Ac-Tyr-OH sind zu über 90 % in den wässrigen Phasen zu finden.

Der gemeinsame Transport ist eine stärkere Abbildung der Bindungsaffinitäten der verschiedenen Substrate. Bei einem Angebot von mehreren möglichen Substraten ist somit der Einfluss der Austauschgeschwindigkeit weniger entscheidend, da bei einem begrenzten Angebot an Transportermolekülen eine schnelle einzelne Transportgeschwindigkeit keinen Vorteil bringt. Der Wettbewerb der Substrate dafür sorgt, dass nur die besten Binder transportiert werden, auch wenn dies langsamer geschieht als bei den schlechteren Bindern. Ähnlich hohe Transportraten wie in den Einzelversuchen wurden deswegen nur für die Substrate mit den höchsten Bindungskonstanten erreicht.

Bei den Einzelversuchen beobachtete man eine Selektivität von Tyr < Trp < Ala < Phe < Val von 1 : 1.3 : 3.1 : 7.5 : 17.8 für die Fluxwerte, bei den kompetitiven Versuchen änderte sich der Trend zu Ala < Tyr < Val < Phe < Trp von 1 : 2.5 : 6.7 : 8.8 : 9.1. In den Einzelversuchen war der relative Unterschied vom besten zu den übrigen Substraten also stärker betont, während man bei den kompetitiven Versuchen eine gleichmäßigere Verteilung mit insgesamt niedrigeren Werten erhielt.

Mit den Transportversuchen konnte somit die Fähigkeit von Verbindung **30** zum Transport von Carboxylaten bestätigt werden. Der Transport war in den Einzelversuchen für Ac-Val-OH am schnellsten, wo ein recht hoher Flux von  $1.11 \cdot 10^{-6} \text{ mol/m}^2\text{s}$  erreicht wurde. Die anderen Substrate folgten in der Reihe Ac-Phe-OH, Ac-Ala-OH, am langsamsten waren Ac-Tyr-OH und Ac-Trp-OH, die um mehr als eine Größenordnung langsamer als Ac-Val-OH transportiert wurden. Durch Experimente mit gleichen Konzentrationen in Ausgangs- und Zielphase konnte der Transportmodus sekundärer aktiver Transport erzielt werden. Ein enantioselektiver Transport konnte in Experimenten mit racemischen Gemischen hingegen nicht nachgewiesen werden. Beim direkten kompetitiven Vergleich der verschiedenen Substrate in einem gemeinsamen Transportexperiment wurde eine Veränderung der

Selektivität beobachtet. Hier wurden die Substrate, die in den Extraktionsexperimenten die höheren Bindungsaffinitäten aufwiesen, vor allem Ac-Trp-OH und Ac-Phe-OH, am schnellsten transportiert, während die schnellsten Substrate in den Einzelmessungen, vor allem Ac-Val-OH, im Vergleich deutlich langsamere Transportgeschwindigkeiten aufwiesen. Der Unterschied in den Ergebnissen der verschiedenen Versuchsanordnungen konnte durch einen Vergleich mit den Werten für die Bindungskonstanten erklärt werden. In den Einzelversuchen waren Substrate mit niedrigen Bindungskonstanten und damit hohen Austauschgeschwindigkeiten bevorzugt. Bei den kompetitiven Versuchen änderte sich dieses Verhalten, nun waren Verbindungen mit hohen Bindungskonstanten eher bevorzugt. Der Grund hierfür wurde in der Konkurrenz der verschiedenen Substrate um das Transportermolekül gesehen. Schwache Binder wurden nun von den stärker gebundenen Substraten aus dem Komplex verdrängt, unabhängig von den Transportgeschwindigkeiten im Einzelexperiment. Als Resultat war nun Ac-Trp-OH am schnellsten, das zwar eine relativ geringe Einzeltransportgeschwindigkeit, aber gleichzeitig auch die höchste Bindungskonstante aufweist. Knapp danach folgte Ac-Phe-OH, welches eine geringere Bindungskonstante, dafür aber eine recht hohe Einzeltransportgeschwindigkeit besitzt.

Der Situation in einer realen Zelle ist der zweite Aufbau ähnlicher, auch dort liegen mehrere Substrate nebeneinander vor und konkurrieren um die gleichen Bindungsstellen. In dieser Konkurrenzsituation findet sich also ein Zusammenspiel beider Faktoren, vor allem eine hohe Bindungsstärke, möglichst aber auch eine schnelle Austauschgeschwindigkeit bewirken dann den schnellstmöglichen Transport.

## 6 Zusammenfassung

Die Erforschung von synthetischen Membrantransportern ist ein aktuelles Thema in der supramolekularen Chemie. Während für den Transport einfacher kationischer und anionischer Substrate wie Kalium- oder Chloridionen zahlreiche Beispiele existieren, finden sich für größere anionische Substrate wie zum Beispiel Aminosäurecarboxylate relativ wenige Beispiele in der Literatur. Für den Membrantransport werden vor allem zwei Mechanismen angewandt, über Kanäle oder mit mobilen Transportermolekülen. Während Kanäle die höchsten Transportraten aufweisen und meist nur relativ kleine Ionen oder Moleküle befördern, sind mobile Transportermoleküle selektiver für die einzelnen Substrate und können prinzipiell an jedes beliebige Substrat angepasst werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein synthetischer Membrantransporter für acetylierte Aminosäurecarboxylate entworfen und hergestellt werden. Als Bindungsstelle für die Carboxylate wurde das Guanidiniocarbonylpyrrol-Motiv von *Schmuck* verwendet. In den Seitenarm des Pyrrols wurde ein *L*-Valinamid-Rest eingebracht, um die Möglichkeit zu zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen zu bieten und gegebenenfalls Substrat- und Enantioselektivität zu erreichen. Zur Herstellung der Löslichkeit in unpolaren Medien wie dem Inneren der Zellmembran musste eine lipophile Gruppe eingebracht werden. Als Löslichkeitsvermittelnder Rest wurde Tris-(Dodecyloxy)phenylmethylen ausgewählt, das drei lange unpolare Alkylreste trägt. Zusammengenommen ergab sich so ein Rezeptor für Oxo-Anionen und speziell für Aminosäurecarboxylate mit erhöhter Löslichkeit in organischen Medien (Abb. 93). Somit sollte die Fähigkeit zu Membrantransport gegeben sein.

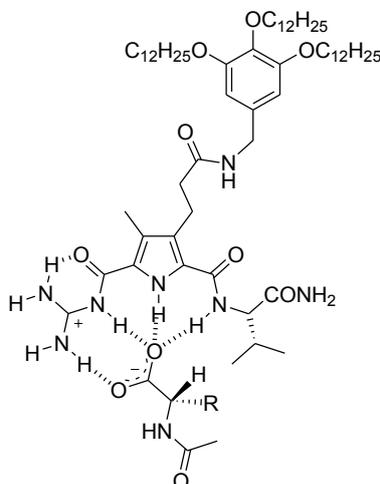
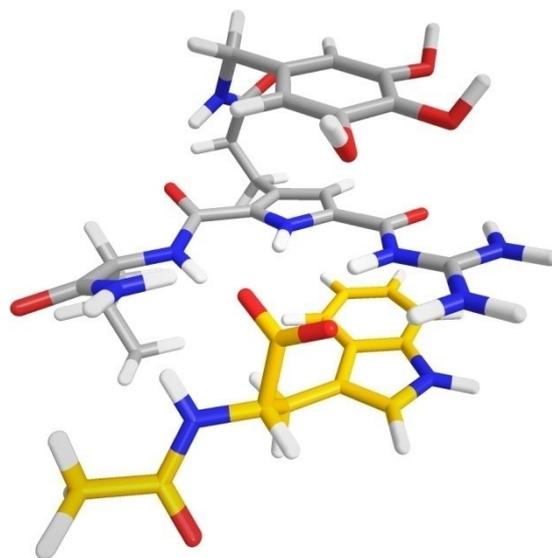


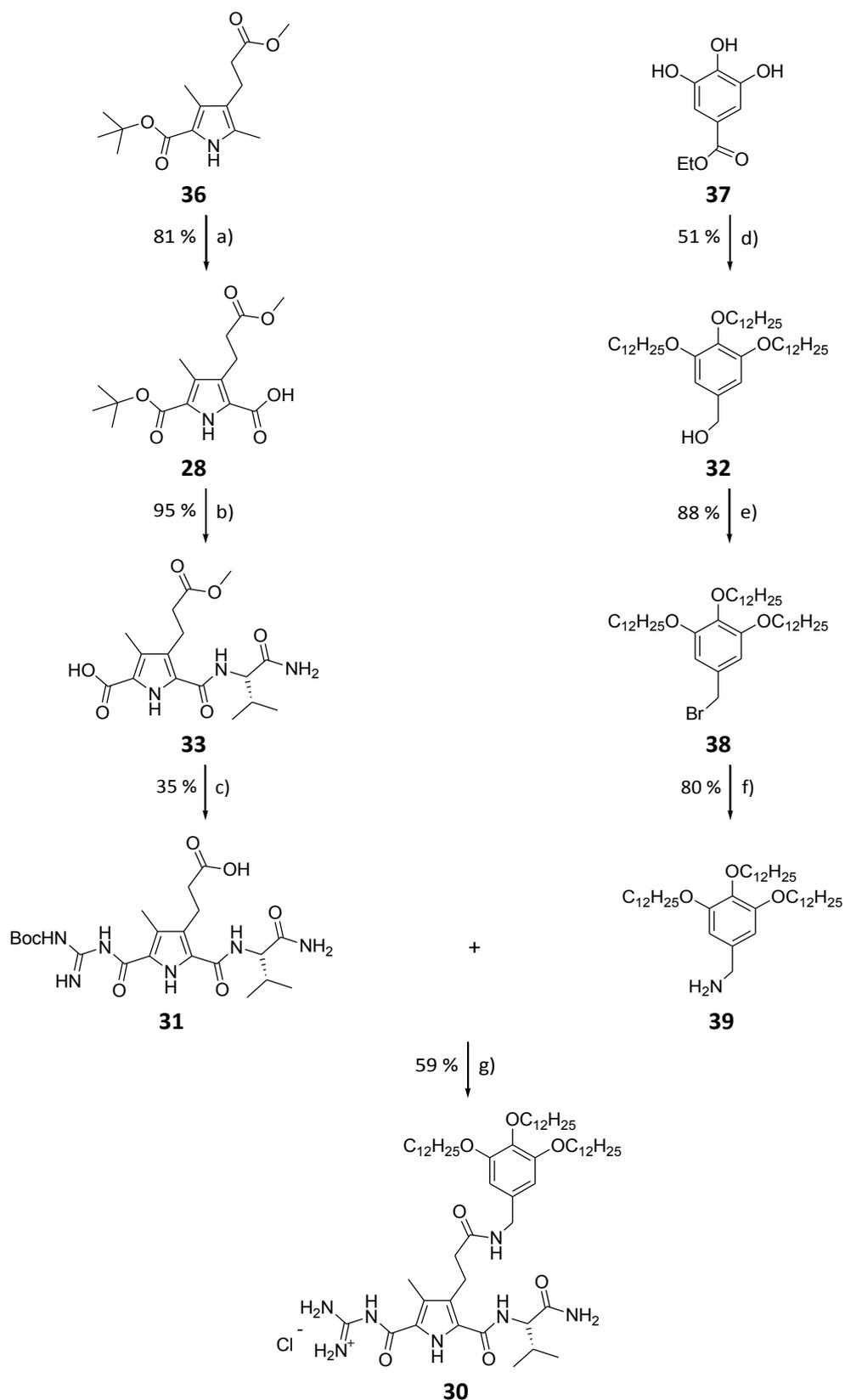
Abb. 93 Schema des Rezeptor-Substrat-Komplex.

In Kraftfeldrechnungen erhielt man die vermutliche Struktur des Rezeptor-Substrat-Komplexes, der eine Kombination aus einer Salzbrücke, Wasserstoffbrückenbindungen und  $\pi$ -stacking von Guanidinium-Kation, Benzylgruppe und ggf. aromatischem Rest des Aminosäuresubstrates aufweist (**Abb. 94**).



**Abb. 94** Kraftfeldrechnung des Komplexes aus Rezeptor **30** und Ac-L-Trp-OH (rechts). Die Dodecylketten des Rezeptors wurden der Übersichtlichkeit wegen weggelassen.

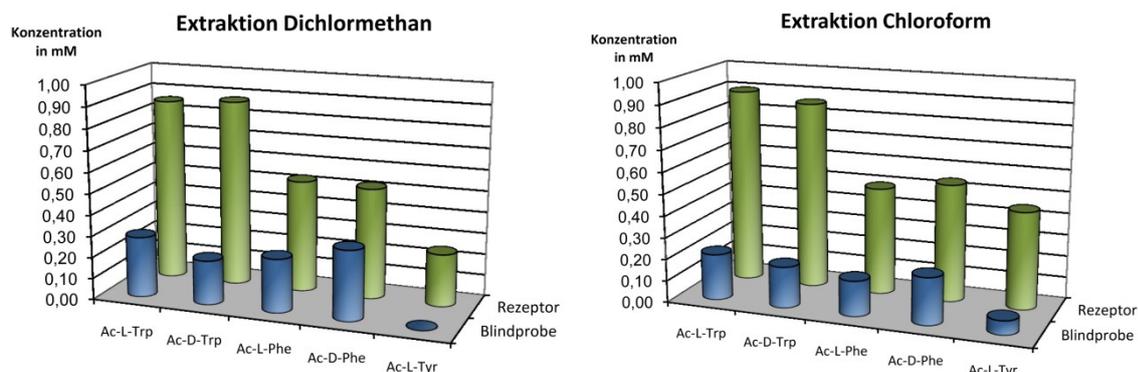
Die Synthese ging von dem Pyrrolgrundkörper **36** aus, der eine Vorstufe zu einem Pyrroltriester mit drei orthogonalen Esterschutzgruppen ist. Dadurch ließen sich die erwünschten Bestandteile nacheinander in das Molekül einbringen, so dass das gewünschte Zielmolekül **30** erfolgreich hergestellt werden konnte. Das vollständige Syntheschema ist in **Abb. 95** gezeigt.



**Abb. 95** Syntheschema des Membrantransporters **30**:

a) 1. 3.5 eq  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ ; 2.  $\text{NaOAc}$ ,  $\text{H}_2\text{O}/\text{Dioxan}$  1:1; b) 1. L-Val- $\text{NH}_2$ , PyBOP, NMM, DMAP,  $\text{DCM}/\text{DMF}$  5:1; 2. TFA/ $\text{DCM}$  3:1; c) 1. Boc-Guanidin, HCTU, NMM,  $\text{DCM}/\text{DMF}$ ; 2.  $\text{LiOH}$ ,  $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ ; d) 1.  $\text{BrC}_{12}\text{H}_{25}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{DMF}$ ; 2.  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , Ar; e)  $\text{PBr}_3$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ ; f) 1.  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{DMF}$ ; 2.  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , Ar; g) 1. HCTU, NMM,  $\text{DCM}$ ,  $\text{DMF}$ ; 2.  $\text{DCM}/\text{TFA}$ ; 3.  $\text{HCl}$ .

Nach erfolgreicher Synthese wurde in Extraktionsexperimenten die Fähigkeit des Rezeptors erprobt, Aminosäurecarboxylate aus einer wässrigen in eine organische Phase zu überführen. Dazu wurden wässrige Lösungen der acetylierten *D*- und *L*- Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan gegen eine Lösung von Rezeptor **30** in Chloroform oder Dichlormethan ausgeschüttelt (**Abb. 96**).



**Abb. 96** Ergebnisse der Extraktion der acetylierten aromatischen Aminosäuren in Wasser durch Rezeptor **30** in Chloroform und Dichlormethan. Gezeigt ist die Konzentration in der organischen Phase.

Die Konzentrationen der Substrate wurden durch UV-Messungen der wässrigen Phase bestimmt. Man erhielt das beste Extraktionsvermögen für Ac-Trp-OH, gefolgt von Ac-Phe-OH und Ac-Tyr-OH.

Es wurde eine neue Formel aufgestellt, mit der aus den  $pK_S$ -Werten der Substrate und den Extraktionsdaten mit und ohne Rezeptor die Bindungskonstanten der Rezeptor-Substrat-Komplexe berechnet werden konnten (**Tab. 11**).

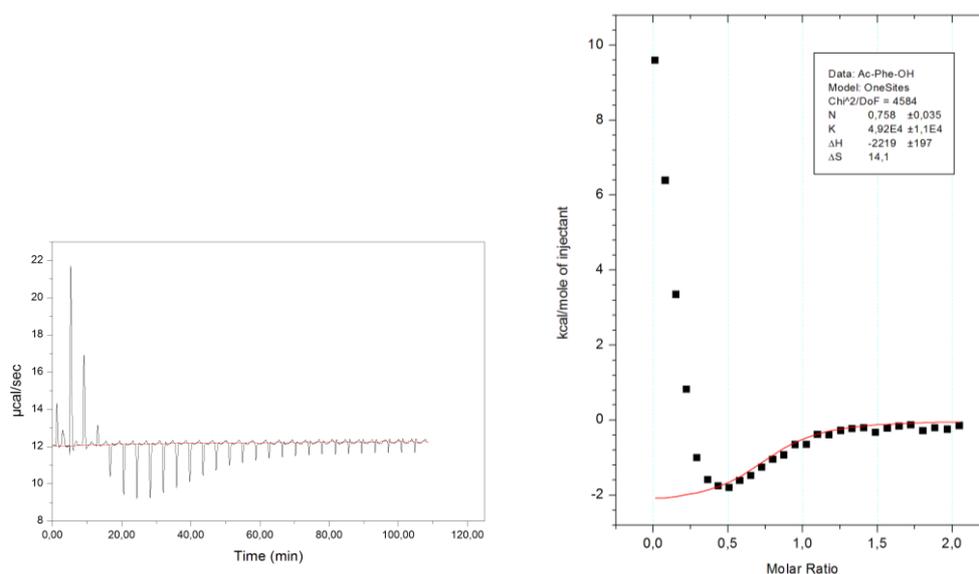
**Tab. 11** Berechnete Bindungskonstanten für die Extraktion acetylierter aromatischer Aminosäuren in Wasser durch Rezeptor **30** in Chloroform.

Chloroform	$K_{ass} [M^{-1}]$	$K_{ass} [M^{-1}]$ (Ø beide Enantiomere)
Ac-L-Trp-OH	$3.17 \cdot 10^4$	$2.77 \cdot 10^4$
Ac-D-Trp-OH	$2.44 \cdot 10^4$	
Ac-L-Phe-OH	$3.94 \cdot 10^3$	$4.49 \cdot 10^3$
Ac-D-Phe-OH	$5.09 \cdot 10^3$	
Ac-L-Tyr-OH	$9.71 \cdot 10^3$	$9.71 \cdot 10^3$

Die Größe der Bindungskonstanten entsprach der Reihenfolge  $\text{Trp} > \text{Tyr} > \text{Phe}$ . In den Kraftfeldrechnungen für die entsprechenden Komplexe liegt ein  $\pi$ -stacking zwischen Guanidiniumkation und aromatischem Rest der Aminosäure vor (**Abb. 94**). Dies erklärt die gefundene Reihenfolge der Bindungskonstanten, bei der große und elektronenreiche aromatische Reste bevorzugt extrahiert werden.

Zur Bestätigung der Bindungskonstanten wurden ITC-Messungen durchgeführt. Zusätzlich wurden dabei die thermodynamischen Parameter Enthalpie, Entropie und die Stöchiometrie der gebildeten Komplexe bestimmt. Es wurden Messungen des Rezeptors **30** in Chloroform mit den *tert*-Butylammoniumsalzen der acetylierten Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Valin durchgeführt.

Die Bindungsisotherme, die sich aus den Messungen ergab, war durch einen gleichzeitig ablaufenden Nebenprozess überlagert. Dadurch war keine einfache Auswertung möglich, es wurde stattdessen eine Auswertung eines relativ ungestörten Teilbereichs versucht, indem nur der Bereich über 0.5 Äquivalenten Substrat verwendet wurde.

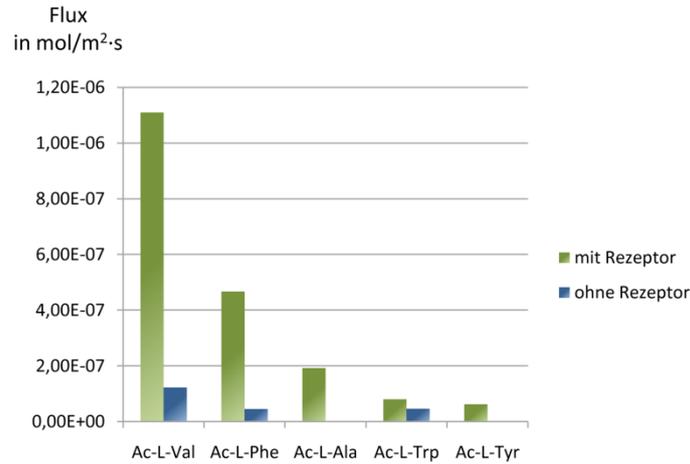


**Abb. 97** Messungsrohdaten der ITC-Titration von Tetrabutylammonium-Acetylphenylalanincarboxylat gegen Rezeptor **30** (links). Bindungsisotherme mit nichtlinearer Anpassung (rot).

Für die Werte von Enthalpie und Entropie konnten bei dieser Auswertung konsistente Werte ermittelt werden. Diese lagen für das Tyrosinderivat bei  $3.0\text{-}3.7 \cdot 10^3$  cal/mol bzw. 12-15 cal/K,

für das Phenylalaninderivat bei  $2.2-2.8 \cdot 10^3$  cal/mol bzw. 14-16 cal/k und für das Valinderivat bei  $1.2-1.3 \cdot 10^3$  cal/mol bzw. 21 cal/K. Diese Abstufung entspricht dem Einfluss des aromatischen Restes, der durch das  $\pi$ -stacking mit dem Guanidinium-Kation die Bindungswärme erhöht und durch den damit verbundenen engeren Komplex den Wert für die Entropie senkt. Bei der Bestimmung der Bindungskonstanten und Komplexstöchiometrie waren aufgrund des überlagernden Nebenprozesses keine genauen Werte erhältlich. Von der Größenordnung her lag die Bindungskonstante für die verschiedenen Substrate jedoch im einheitlichen Bereich von  $10^4-10^5$  M<sup>-1</sup>, was den Ergebnissen aus den Extraktionsexperimenten recht nahe kam.

Für die Evaluierung des Transportvermögens wurden U-Rohr-Versuche verschiedener Art durchgeführt. In den ersten Versuchen wurden die Transportgeschwindigkeiten für die acetylierten Aminosäuren Alanin, Valin, Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan mit Rezeptor **30** bestimmt. Es wurde ein Gradient von pH 6 in der Ausgangsphase auf pH 8 in der Zielphase eingesetzt, wodurch der Rezeptor an der Grenzfläche zur Zielphase deprotoniert wurde. Dadurch wurden die Substrate an dieser Stelle leichter abgegeben, was zu gerichtetem Transport führte. Die Transportgeschwindigkeiten wurden durch Messungen der Konzentration in der Zielphase mittels HPLC und angeschlossenen UV-Detektor ermittelt. Es ergaben sich recht starke Unterschiede für die Fluxwerte der einzelnen Substraten, die der Reihenfolge Val > Phe > Ala > Trp > Tyr folgten. Dabei wurde das Valinderivat um den Faktor 17 schneller als das Tyrosinderivat befördert, mit dem recht hohen Flux von  $1.11 \cdot 10^{-6}$  mol/m<sup>2</sup>·s, was nahe an den höchsten literaturbekannten Wert für acetylierte Aminosäuren heranreicht (**Abb. 98**).



**Abb. 98** Fluxwerte der verschiedenen Substrate in den U-Rohr Einzelmessungen bei Substratkonzentration von 50 mM in der Ausgangsphase und Rezeptorkonzentration von 1 mM in der organischen Phase.

Durch Verwendung gleicher Substratkonzentrationen in Start- und Zielphase konnte aktiver Transport nachgewiesen werden, d.h. Transport gegen das Konzentrationsgefälle. Die Triebkraft des Transportes war der Gradient von pH 6 auf pH 8 zwischen Ausgangs- und Zielphase, der durch den Symport von Substrat und einem Proton ausgeglichen wurde. Die gemessene Geschwindigkeit war dabei annähernd gleich wie im Einzelversuch.

Bei einem kompetitiven Versuch mit einer Mischung der verschiedenen Substrate in der Ausgangsphase wurden veränderte Fluxwerte und Selektivitäten festgestellt. Die neue Reihenfolge der Transportgeschwindigkeit war nun Trp > Phe > Val > Tyr > Ala, wobei die Fluxwerte durchgehend niedriger waren als im Einzelversuch, außer bei Tryptophan, das einen leicht erhöhten Wert aufwies (**Tab. 12**).

**Tab. 12** Vergleich der Fluxwerte aus dem kompetitiven Experiment mit den Einzelwerten. Bei den kompetitiven Experimenten befanden sich die Substrate in je 2 mM Konzentration in der Ausgangsphase, die organische Phase bestand aus einer 1 mM Lösung des Rezeptors in Chloroform.

	Flux (kompetitiv) [mol/m²s]	Flux (einzeln) [mol/m²s]
Ac-Trp-OH	$2.10 \cdot 10^{-7}$	$8.05 \cdot 10^{-8}$
Ac-Phe-OH	$2.03 \cdot 10^{-7}$	$4.67 \cdot 10^{-7}$
Ac-Val-OH	$1.54 \cdot 10^{-7}$	$1.11 \cdot 10^{-6}$
Ac-Tyr-OH	$5.65 \cdot 10^{-8}$	$6.24 \cdot 10^{-8}$
Ac-Ala-OH	$2.30 \cdot 10^{-8}$	$1.92 \cdot 10^{-7}$

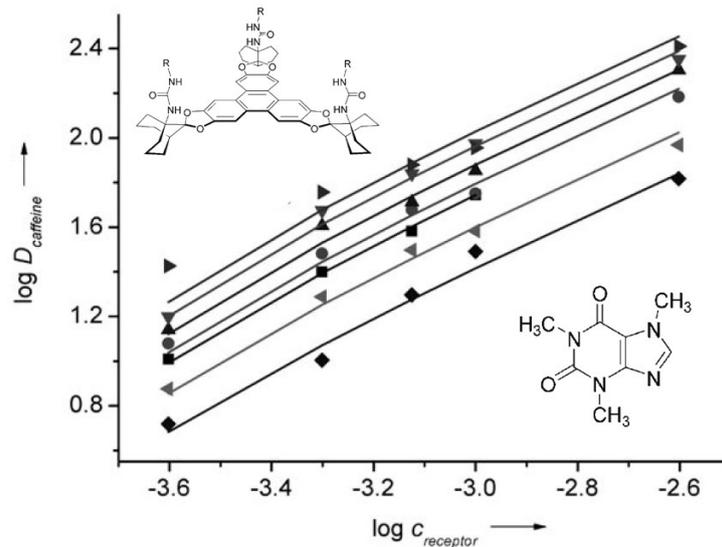
Die Veränderung der Werte erschließt sich bei Vergleich mit den thermodynamischen Daten aus den Extraktionsexperimenten. In den Einzelversuchen bestimmten die Austauschgeschwindigkeiten der Substrate, also letztendlich die Aktivierungsenergien der Übergangszustände, die verschiedenen schnellen Transportraten. Bei direkter Konkurrenz um den Rezeptor wurden hingegen diejenigen Substrate mit den höchsten Bindungskonstanten bevorzugt, unabhängig von ihrer Transportgeschwindigkeit. Die schwächer bindenden Substrate wurden aus dem Komplex verdrängt und wiesen deswegen niedrigere Transportwerte auf. So zeigt das Tryptophanderivat, welches die höchste Bindungskonstante aufwies, in den kompetitiven Experimenten auch die höchste Transportgeschwindigkeit, während es in den Einzelversuchen das zweitlangsamste Substrat war. Das Phenylalaninderivat mit einer deutlich niedrigeren Bindungskonstante, welches in den Einzelversuchen am zweitschnellsten war, war im kompetitiven Versuch um mehr als die Hälfte langsamer. Der kompetitive Versuch ist somit eine stärkere Abbildung der Bindungsstärke und entspricht eher der Situation in einer realen Zelle.

Der Entwurf des Membrantransporters führte nach erfolgreicher Synthese zu einem neuen Transporter, der in verschiedenen Arten von Experimenten seine beachtlichen Extraktions-, Bindungs- und Transporteigenschaften gegenüber acetylierten Aminosäuren gezeigt hat. Es fand sich selektive und starke Bindung, sowie selektiver und aktiver Transport mit hohen Fluxwerten.

## 7 Ausblick

In dieser Arbeit ist ein neuer Membrantransporter für Oxo-Anionen auf der Basis des Guanidiniocarbonylpyrrolmotivs von *Schmuck* entwickelt worden. Es wurde seine Fähigkeit zur Extraktion und zum Membrantransport von Aminosäurecarboxylaten nachgewiesen. Es wurden ITC-Experimente durchgeführt, um zusätzliche Einsichten in die thermodynamischen Parameter der Komplexbildung zu erhalten.

Für die Auswertung der Extraktionsversuche wurde eine neue Formel entwickelt, um Aussagen über Bindungskonstanten des Rezeptors machen zu können. Die gemessenen Bindungswerte könnten durch zusätzliche Messungen bei veränderten Konzentrationen von Substrat und Rezeptor bestätigt werden. Durch Senkung der Konzentration der Substrate in der wässrigen Phase sollte eine Erhöhung der Genauigkeit möglich sein, da dann größere relative Unterschiede bei den spektroskopischen Messungen auftreten würden. Eine Variation der Konzentration des Rezeptors könnte zudem zur Bestimmung der Komplexstöchiometrie benutzt werden. Dazu könnte man eine Auftragung von  $\log D$  gegen  $\log c_{\text{rezeptor}}$  benutzen. Hierbei ist  $D$  der Quotient der Substratkonzentrationen in organischer und wässriger Phase. Man erhielte einen Graphen wie in **Abb. 99** gezeigt, der für die Extraktion von Koffein durch verschiedene künstliche Rezeptoren aufgenommen wurde.<sup>[121]</sup> Die Rezeptoren mit verschiedenen Resten  $R$ , was in der Grafik durch verschiedene geometrische Symbole beschrieben wird, zeigen eine gleichartige Steigung im Plot von ca. 1. Dies ist ein Beleg für eine 1:1 Stöchiometrie der Rezeptor-Substrat-Komplexe. Die Linien im Plot werden durch nichtlineare Regressionsanalyse berechnet.



**Abb. 99**  $\log D$  gegen  $\log c_{\text{rezeptor}}$  plot zur Bestimmung der Stöchiometrie. Gezeigt ist ein Beispiel für die Extraktion von Koffein (unten) durch künstliche Rezeptoren mit variablen Resten R (oben).<sup>[121]</sup>

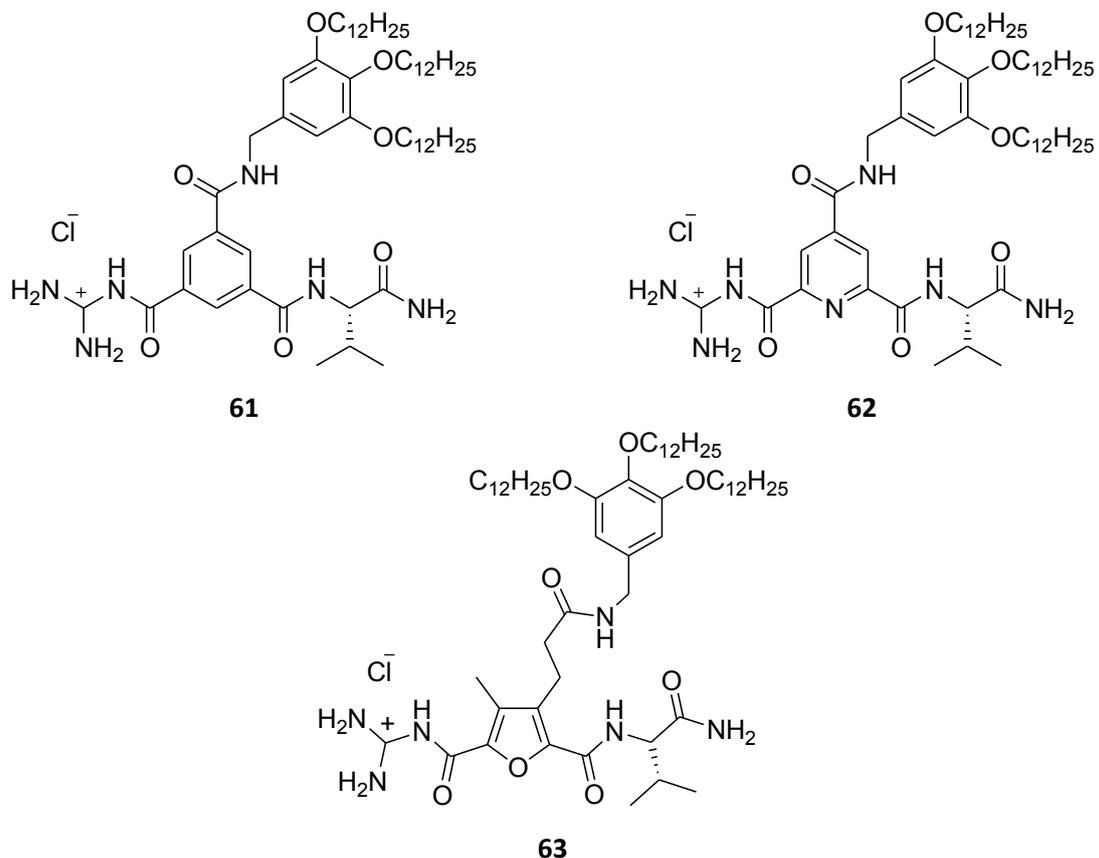
Zusätzlich könnten die bestimmten Bindungskonstanten durch weitere Messmethoden bestätigt werden. Die Höhe der Bindungskonstanten von  $10^3$ - $10^4$   $\text{M}^{-1}$  ließe Messungen durch NMR-, UV- oder Fluoreszenz-Methoden zu. Da hierbei keine Zwei-Phasen-Systeme eingesetzt werden können, müssen die Substrate mit lipophilen Gegenionen eingesetzt werden, um sie in den organischen Lösemitteln löslich zu machen. Möglich sind Tetrabutylammoniumsalze der Aminosäuren, eventuell würden auch Tetraethylammoniumsalze bereits die erwünschte Löslichkeit zeigen. Die Änderung des Gegenions sollte nur zu geringen Unterschieden der Bindungskonstanten führen. Bei den UV- oder Fluoreszenzmessungen könnten allerdings Probleme mit der Eigenabsorption von Chloroform auftreten.

Die Reihe der Substrate könnte in den Extraktions- und Transportversuchen auf andere Oxo-Anionen erweitert werden. So ist eine hohe Affinität zu Phosphorsäureestern wie zum Beispiel den Nukleotiden AMP oder ADP zu erwarten. Auch Schwefel- oder Salpetersäureester könnten Bindungs- und Transporteigenschaften zeigen.

Bei den Transportversuchen könnte die Art der organischen Phase verändert werden, um einen schnelleren Transport und eine höhere Genauigkeit der Messung zu erzielen. Die Lipophilie des Transporters scheint hoch genug zu sein, um sich auch für einen Einsatz in Supported Liquid Membranes zu eignen. Dort darf der Transporter nicht oder nur zu sehr geringen Anteilen in die wässrige Phase übertreten und er darf in der Membran nicht auskristallisieren (siehe Kap. 3.1.2). Bei diesem Aufbau würde das Rühren der Phasen in den U-Rohren und die Schaumbildung an den Phasengrenzen wegfallen, wodurch störende

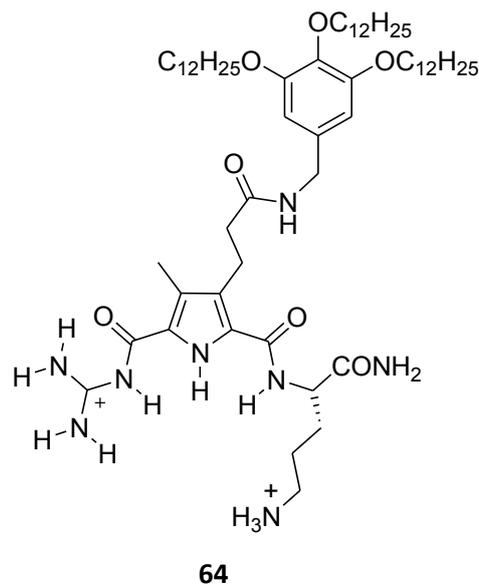
Einflüsse vermindert würden. Die größere Phasengrenzfläche solcher Membranen würde die Umprotonierung des Rezeptors wahrscheinlich einfacher und somit den gerichteten oder aktiven Transport effektiver machen. Auch Experimente mit Vesikeln könnten durchgeführt werden, hier müssten aber erst geeignete Liposome gefunden werden, in denen sich der Rezeptor löst. Dabei würde sich auch zeigen, ob der Rezeptor die Lipiddoppelschicht unbeschadet lässt und auch dort Transportereigenschaften besitzt oder als Detergenz wirkt, was für weiterführende Anwendungen ungünstig wäre.

Die Optimierung des Transportermotivs wäre auf vielfältige Weise möglich. Relativ schwierig wäre eine Veränderung des Bindungsmotivs. Allerdings könnten durch Austausch des Pyrrols gegen andere Grundkörper wie Pyridin, Benzol oder Furan eventuell die Austauschgeschwindigkeiten der Substrate erhöht werden und somit ein schnellerer Transport resultieren (**Abb. 100**). Verbindungen dieser Art ohne lipophilen Rest wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits untersucht und zeigten meist leicht schwächere Bindungseigenschaften, was aber vielleicht eine schnellere Austauschgeschwindigkeit der Substrate und somit einen schnelleren Transport bedingen könnte. Bei einem Furangrundkörper wäre jedoch die relativ geringe Säurestabilität der Verbindungen problematisch.<sup>[122, 123]</sup>



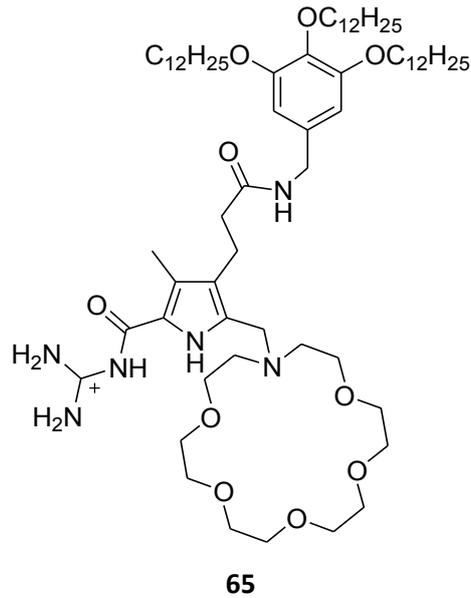
**Abb. 100** Transportermoleküle mit verändertem Grundkörper.

Synthetisch einfacher wäre es, den Pyrrol-Seitenarm zu variieren. Eine veränderte Aminosäuresequenz zu verwenden, würde wahrscheinlich nicht unbedingt zu einer wesentlich höheren Selektivität führen, da der Seitenarm wohl nicht intensiv genug mit dem Substrat wechselwirkt. Effektiver wäre aber vielleicht die Einführung einer zweiten Ladung im Seitenarm, beispielsweise durch die Aminosäure Ornithin (**Abb. 101**), die eine günstige Kohlenstoffkettenlänge für die Komplexierung von Carboxylaten aufweist.<sup>[112]</sup> Dadurch entstünde ein engerer Verband mit dem Substrat und der Seitenarm würde wahrscheinlich stärker mit dem Substrat wechselwirken. Außerdem könnten di-anionische Substrate wie Aspartat, Glutamat oder auch Diphosphate wie z.B. ADP effektiver transportiert werden. Daraus könnte nach Art des 3-Punkt-Bindungsmodells eine stärkere Substrat- und Enantioselektivität resultieren.<sup>[124, 125]</sup> Die stärkere Polarität des Rezeptors müsste allerdings gegebenenfalls durch zusätzliche lipophile Gruppen ausgeglichen werden, um Löslichkeit in der unpolaren Phase zu gewährleisten.



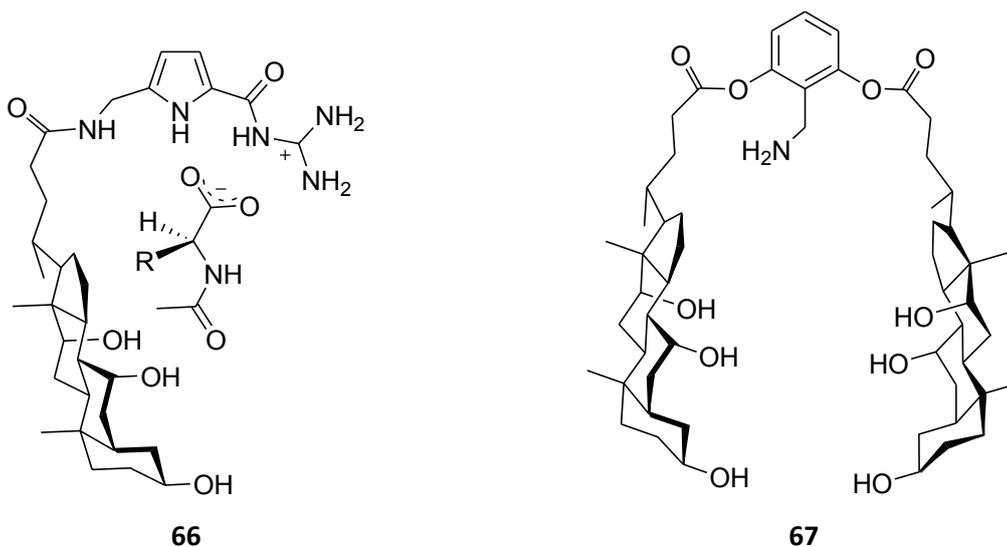
**Abb. 101** Transporter mit zusätzlicher positiver Ladung zur Erhöhung der Selektivität und zum Transport von Di-Anionen.

Das Rezeptormotiv könnte zudem dahingehend verändert, dass es den Transport von freien Aminosäuren erleichtern würde. Dafür müsste man eine Bindungsstelle für die Ammoniumgruppe der freien Aminosäure einfügen, wie z.B. einen Kronenether oder Aza-Kronenether (**Abb. 102**). Eine anionische Gruppe wäre wohl nicht empfehlenswert, da es bei selbstkomplementären Gruppen wie Phosphat und Guanidinium zu einer zu starken Aggregation des Rezeptors kommen könnte.



**Abb. 102** Transporter mit zusätzlicher Bindungsstelle für eine Ammoniumfunktion.

Ein weiterer Ansatz zur Erhöhung der Substrat- und Enantioselektivität ergäbe sich durch die Einführung chiraler Reste als lipophile Gruppe anstelle des Tris-dodecylethers. Dafür böten sich vor allem steroidale Gruppen an, da sie zahlreiche stereogene Zentren besitzen und gleichzeitig hinreichend lipophil sind, um für die nötige Lipophilie zu sorgen. Die Einführung der Gruppe wäre an zwei Stellen denkbar, entweder wie bisher in der Peripherie, also an Position 3 des Pyrrolrings, oder auch im Seitenarm des Pyrrols in Position 2 oder 5 (**Abb. 103**). Bei Einbringen in dieser Position wäre die chirale Information näher an der Bindungsstelle und würde wahrscheinlich eine stärkere enantioselektive Diskriminierung ergeben. Gleichzeitig würde allerdings die Wasserstoffbrückenbindung des Amidrestes wegfallen, der bisher in dieser Position war, so dass eventuell eine geringere Bindungsstärke resultieren würde. Um stärkeren Kontakt mit den polaren Substraten herzustellen, sollte auf Bausteine mit zusätzlichen Wasserstoffbrückendonoren oder -akzeptoren zurückgegriffen werden, wie z.B. Cholsäure, die drei zusätzliche Hydroxygruppen trägt.



**Abb. 103** Rezeptor mit Cholsäuresubstituent für stärker enantioselektive Bindung und Aminosäurecarboxylat als Substrat (links). Lipophiler Baustein mit mehreren chiralen Cholsäuresubstituenten (rechts).

Falls die Lipophilie der Steroide nicht ausreichend für die Löslichkeit ist, können diese Elemente auch mehrfach eingebracht werden, z.B. über den bisher verwendeten Gallsäurebaustein. Eventuell könnte auch ein anderes Substitutionsmuster verwendet werden, z.B. 2,6-Dihydroxybenzoesäure als Grundbaustein, um die chiralen Gruppen stärker in die Richtung der Bindungsstelle zu orientieren (**Abb. 103**).

## 8 Experimentalteil

### 8.1 Allgemeiner experimenteller Teil

#### Lösemittel und Reagenzien:

Alle verwendeten Lösemittel wurden destilliert. Wasserfreie Lösemittel wurden wie folgt erhalten:

Diethylether und THF wurden mit Natrium und Benzophenon als Indikator, Dichlormethan und Triethylamin mit Calciumhydrid unter Rückfluss erhitzt. Alle vier Lösemittel wurden anschließend destilliert. Dimethylformamid wurde über Calciumhydrid unter vermindertem Druck zum Sieden erhitzt und anschließend destilliert, wobei 20 Volumenprozent Vorfraktion verworfen wurden. Chloroform wurde kommerziell analysenrein bezogen. Hochreines Wasser für die Chromatographie sowie spektroskopische Messungen wurde mittels MicroPure Wasseraufbereitungssystem der Firma *TKA* durch Behandlung von vollentsalztem Wasser erzeugt.

Bei den eingesetzten Reagenzien handelt es sich, soweit nicht anders vermerkt, um kommerziell erhältliche Chemikalien der Firmen *Merck*, *Sigma-Aldrich*, *Fluka*, *Lancaster*, *Iris Biotech*, *Bachem*, *GL Biochem* (Shanghai) oder *Aldrich*, die ohne weitere Reinigung eingesetzt wurden. Die deuterierten Lösemittel wurden von der Firma *Deutero* bezogen.

#### Schutzgas:

Als Schutzgas wurde Argon (99.998 %) der Firma *Linde* verwendet. Alternativ kam auch Stickstoff (99.996 %) der Firma *Linde*, der zuvor über Calciumchlorid und Blaugel getrocknet wurde, zum Einsatz.

#### Dünnschichtchromatographie (DC):

Es wurden Kieselgel-Fertigfolien des Typs Kieselgel 60 F<sub>254</sub> mit einer Schichtdicke von 0.2 mm der Firma *Merck* verwendet. Laufmittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben. Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht bei  $\lambda = 254$  nm. Nicht UV-aktive

Substanzen wurden durch folgende Methoden angefärbt: Carbonylverbindungen durch Behandlung in einer Jodkammer bzw. Amine durch Besprühen mit einer Ninhydrin-Lösung (90 ml Ethanol, 10 ml Essigsäure, 500 mg Ninhydrin, 1 ml Trifluoressigsäure).

### **Säulenchromatographie:**

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel des Typs MP-Silica 32-63, 60 Å der Firma *MP Biomedicals GmbH* verwendet. Die jeweiligen Lösemittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben. Die Säulenlänge und -dicke wurde dem jeweiligen Trennproblem individuell angepasst. Das zu reinigende Produkt wurde entweder als Lösung im jeweiligen Laufmittelgemisch oder auf Silicagel aufgezogen aufgetragen.

## 8.2 Generelle analytische Methoden

### Schmelzpunktbestimmung:

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Glaskapillaren mit einer Schmelzpunktbestimmungsapparatur SMP 20 nach Dr. Tottoli der Firma *Büchi* bestimmt. Die angegebenen Schmelzpunkte wurden an einem kalibrierten Thermometer durchgeführt und sind unkorrigiert.

### Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie):

Die Kernresonanzspektren wurden, sofern nicht anders angegeben, an einem AVANCE 400 NMR-Spektrometer der Firma *Bruker* bei 25 °C aufgenommen. Die Angaben der chemischen Verschiebungen beziehen sich auf deuterierte Lösemittel (DMSO-*d*<sub>6</sub> oder CDCl<sub>3</sub>) als internen Standard und sind in  $\delta$ -Werten in ppm angegeben. Kopplungen werden in Hz angegeben. Für die Signalmultiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet:

s = Singulett, brs = verbreitertes Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dublett, t = Triplet, q = Quartett, quin = Quintett, m = Multiplett und quat. = quaternär. Die Spektren wurden nach erster Ordnung interpretiert, wobei die Zuordnung der <sup>1</sup>H-, und <sup>13</sup>C- Signale, soweit vorhanden, mittels Literatur<sup>[126-128]</sup> oder Vergleich mit Spektren ähnlicher Verbindungen erfolgte.

### Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR-Spektroskopie):

Die Infrarotspektren wurden an einem FT-IR 410 der Firma *Jasco* gemessen. Es wurde ein ATR-Diamant-Messkristall verwendet. Die Lage der Banden wurde in Wellenzahlen  $\tilde{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>) und deren Bandenintensitäten mit den Buchstaben s (strong), m (medium) und w (weak) bezeichnet.<sup>[127]</sup>

**Ultraviolettspektroskopie (UV-Spektroskopie):**

UV/Vis-Spektren wurden mit einem *Jasco* V-530-Spektrometer bzw. *Jasco* V-660-Spektrometer aufgenommen. Dazu wurden Standard-Quarzglasküvetten für die UV-Spektroskopie mit Schichtdicke von 10 mm verwendet. Die Baseline-Messung erfolgte bei leerem Gerät. Die Referenzküvette wurde leer eingesetzt. Die Wellenlängen sind in nm angegeben.

**Isothermale Mikrokolorimetrie (ITC):**

Die Untersuchungen erfolgten mit einem VP-ITC-Mikrokolorimeter der Firma *MicroCal* (Northampton, USA). Die Referenzzelle des Kalorimeters wurde mit hochreinem und entgastem Wasser oder Chloroform pa befüllt. Zur Auswertung der Messdaten wurde ein Plugin des Herstellers in *ORIGIN 7* der Firma *Origin Lab* implementiert. Für die genaue Vorgehensweise siehe Kap. 8.5.

**pH-Meter**

Die pH-Werte wurden mit der pH-Elektrode pH-Meter 766 Calimatic der Firma *Knick* gemessen. Die Kalibrierung der pH-Elektrode erfolgte durch kommerziell erhältliche Pufferlösungen (pH = 4.01 und pH = 7.00).

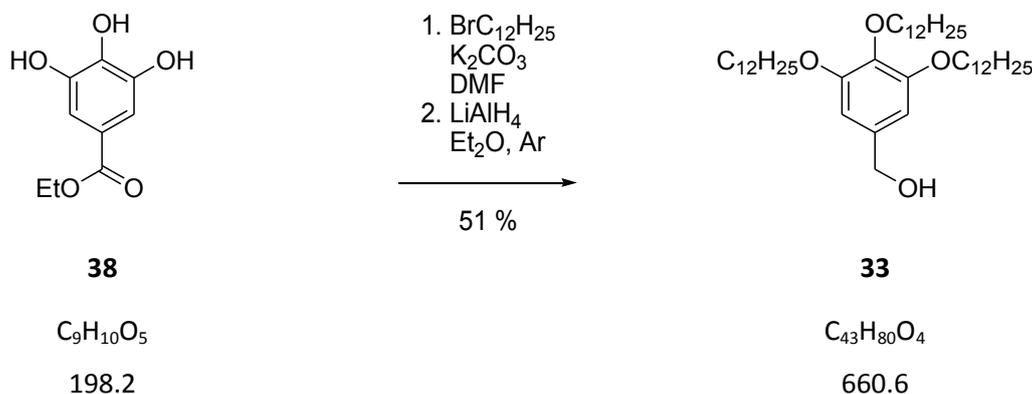
**Massenspektrometrie:**

Die Massenspektren wurden mit einem *Finnigan* MAT 900 S bzw. mit einem *Bruker Daltonics* MicroTOF focus aufgenommen. Die Zuordnung der Peaks wurde mittels gängiger Literatur vorgenommen.

## 8.3 Syntheseteil

### 8.3.1 Synthese des lipophilen Substituenten

#### 8.3.1.1 Synthese von [3,4,5-Tris(dodecyloxy)phenyl]methanol



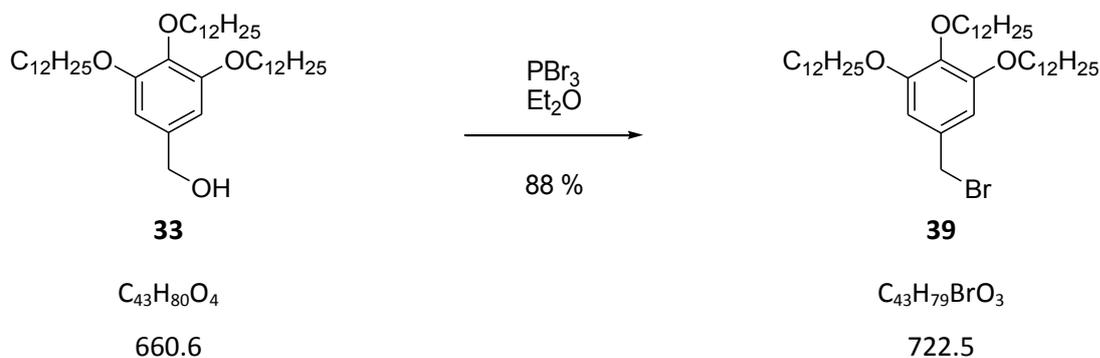
Gallussäureethylester **37** (5.00 g, 25.2 mmol, 1 eq) und Kaliumcarbonat (25.0 g, 180 mmol) wurden in DMF (65 ml) suspendiert und unter Rühren auf 60 °C erhitzt. Über einen Zeitraum von 15 min wurde Dodecylbromid (22.0 g, 88.3 mmol, 3.5 eq) zugegeben. Die Mischung wurde für 12 h bei 60 °C stark gerührt. Das Lösemittel wurde im Hochvakuum entfernt und der Rückstand in DCM (100 ml) suspendiert. Das Kaliumcarbonat wurde abfiltriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt, so dass ein blassgelber Feststoff zurückblieb.

Unter Argon wurde LiAlH<sub>4</sub> (1.30 g, 34.3 mmol, 1.35 eq) in trockenem Diethylether (50 ml) vorgelegt. Bei Raumtemperatur wurde unter Rühren langsam der blassgelbe Feststoff zugegeben. Die Mischung wurde für 4 h stark gerührt. Anschließend wurde vorsichtig Wasser (20 ml) zugegeben, wobei eine starke Schaumentwicklung zu beobachten war. Der entstandene farblose Niederschlag wurde abfiltriert, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit Diethylether (3 x 20 ml) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, das Lösemittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Feststoff mittels Säulenchromatographie gereinigt (SiO<sub>2</sub>, DCM). Man erhielt **32** als farblosen Feststoff (8.50 g, 12.9 mmol, 51 %).

**Smp.** 46 °C

<b>R<sub>f</sub></b>	0.50 (SiO <sub>2</sub> , DCM)
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ = 0.88 (t, 3JH-H = 6.82, 9H, CH <sub>3</sub> ), 1.20-1.40 (m, 48H, CH <sub>2</sub> δ-λ), 1.41-1.51 (m, 6H, OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 1.68-1.86 (m, 6H, OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 3.92-3.99 (m, 6H, OCH <sub>2</sub> ), 4.59 (s, 2H, Benzyl-CH <sub>2</sub> ), 6.56 (s, 2H, Phenyl-CH).
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ = 14.3 (CH <sub>3</sub> ), 22.8 (λ-CH <sub>2</sub> ), 26.3, 26.3 (γ-CH <sub>2</sub> ), 29.5, 29.5, 29.6, 29.6, 29.8, 29.8, 29.9, 29.9, 29.9 (CH <sub>2</sub> ), 32.1, 32.1 (κ-CH <sub>2</sub> ), 65.8 (Benzyl-CH <sub>2</sub> ), 69.3, 73.6 (α-CH <sub>2</sub> ), 105.6 (Phenyl-CH), 136.2, 137.8, 153.5 (Phenyl-C).
<b>FT-IR</b>	(Feststoff) $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 2916 (s), 2850 (s), 1590 (m), 1506 (w), 1468 (m), 1435 (s), 1381 (w), 1336 (m), 1224 (m), 1123 (s), 1069 (w), 995 (w), 827 (w), 808 (w), 720 (m), 620 (m).

### 8.3.1.2 Synthese von 5-(Brommethyl)-phenyl-1,2,3-tris-dodecylether

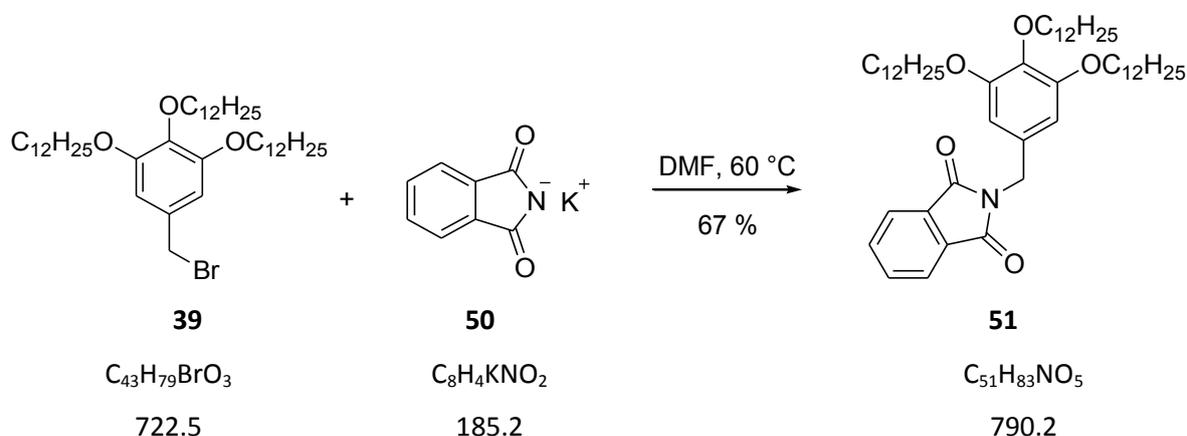


Benzylalkohol **32** (4.05 g, 6.13 mmol) wurde in trockenem Diethylether (50 ml) gelöst und mit einer Eis/Kochsalz-Mischung auf -10 °C abgekühlt. Phosphortribromid (2.03 g, 7.49 mmol) wurde zugegeben, die Kältemischung wurde entfernt und die Mischung 1.5 h gerührt. Anschließend wurde unter Rühren vorsichtig eine gesättigte, wässrige Lösung von Natriumhydrogencarbonat zugegeben. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase mit Brine (3 x 25 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat

getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Man erhielt **38** (3.91 g, 5.41 mmol, 88 %) als blassgelben Feststoff.

<b>Smp.</b>	48 °C
<b>R<sub>f</sub></b>	1.00 (SiO <sub>2</sub> , DCM)
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ = 0.88 (t, <sup>3</sup> J <sub>H-H</sub> = 6.80, 9H, CH <sub>3</sub> ), 1.21-1.40 (m, 48H, CH <sub>2</sub> δ-λ), 1.41-1.50 (m, 6H, OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 1.68-1.82 (m, 6H, OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 3.92-3.99 (m, 6H, OCH <sub>2</sub> ), 4.43 (s, 2H, Benzyl-CH <sub>2</sub> ), 6.57 (s, 2H, Phenyl-CH).
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ = 14.3 (CH <sub>3</sub> ), 22.8 (λ-CH <sub>2</sub> ), 26.5 (γ-CH <sub>2</sub> ), 29.5, 29.8, 29.8, 29.9 (CH <sub>2</sub> ), 32.1 (κ-CH <sub>2</sub> ), 69.3 (α-CH <sub>2</sub> ), 153.3 (Phenyl-C).
<b>MS</b>	(pos. ESI): <i>m/z</i> = 1470 [2M+Na] <sup>+</sup> , 748 [M+Na] <sup>+</sup> .
<b>HRMS</b>	(pos. ESI): <i>m/z</i> = 745.5101 [M+Na] <sup>+</sup> (ber. für C <sub>43</sub> H <sub>79</sub> BrNaO <sub>3</sub> <sup>+</sup> : 745.5105).
<b>FT-IR</b>	(Feststoff) $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 2919 (s), 2851 (s), 1591 (m), 1505 (w), 1462 (m), 1439 (m), 1393 (w), 1332 (m), 1245 (m), 1211 (m), 1127 (s), 1113 (s), 827 (w), 722 (m), 674 (m), 657 (s).

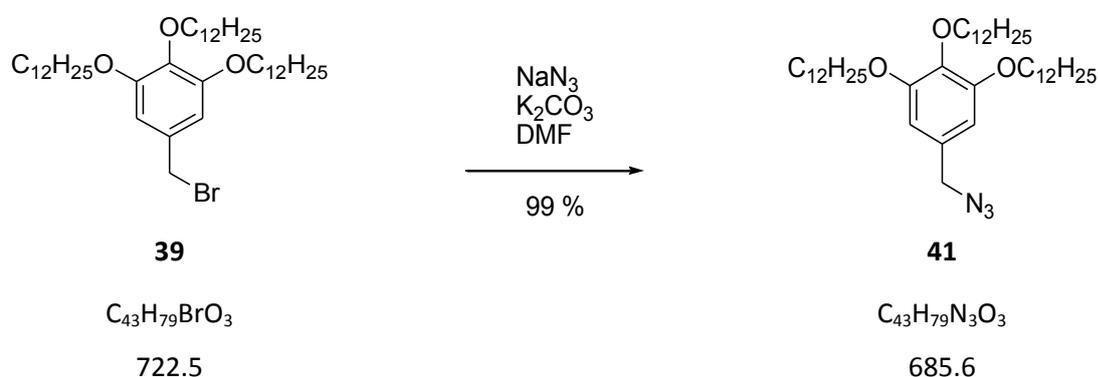
### 8.3.1.3 Synthese von 2-(3,4,5-tris(Dodecyloxy)benzyl)isoindolin-1,3-dion



Eine Suspension von **38** (256 mg, 0.345 mmol) und Kaliumphthalimid **49** (96.0 mg, 0.518 mmol) in trockenem DMF (20 ml) wurde 3 h bei 60 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde eine 0.5 M Lösung von Natriumhydroxid (5 ml) und Wasser (10 ml) zugegeben. Der resultierende weiße Niederschlag wurde abfiltriert und säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan/Ethylacetat 8:1 + 0.1 %NEt<sub>3</sub>). Man erhielt Verbindung **50** (182 mg, 0.230 mmol, 67 %) als weißen Feststoff.

<b>Smp.</b>	53 °C
<b>R<sub>f</sub></b>	0.41 (SiO <sub>2</sub> , Cyclohexan/Ethylacetat 8:1)
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ = 0.88 (t, <sup>3</sup> J <sub>H-H</sub> = 6.82, 9H, CH <sub>3</sub> ), 1.21-1.38 (m, 48H, CH <sub>2</sub> δ-λ), 1.39-1.50 (m, 6H, OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 1.60-1.83 (m, 6H, OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 3.88-3.97 (m, 6H, OCH <sub>2</sub> ), 4.72 (s, 2H, Benzyl-CH <sub>2</sub> ), 6.65 (s, 2H, Phenyl-CH), 7.69-7.72 (m, 2H, Isoindolin- <i>o</i> -CH), 7.83-7.86 (m, 2H, Isoindolin- <i>m</i> -CH).
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ = 14.3 (CH <sub>3</sub> ), 22.8 (λ-CH <sub>2</sub> ), 26.3 (γ-CH <sub>2</sub> ), 29.5, 29.6, 29.6, 29.8, 29.8, 29.8, 29.8, 29.9, 29.9, 29.9, 30.4 (CH <sub>2</sub> ), 32.1 (κ-CH <sub>2</sub> ), 42.1 (Benzyl-CH <sub>2</sub> ), 69.3, 73.5 (α-CH <sub>2</sub> ), 107.6 (Phenyl-CH), 123.4, 134.1 (Isoindolin-CH), 131.5, 132.3 (Isoindolin-C), 138.0, 153.5 (Phenyl-C).
<b>HRMS</b>	(pos. ESI): <i>m/z</i> = 790.6344 [M+Na] <sup>+</sup> (ber. für C <sub>51</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>5</sub> <sup>+</sup> : 790.6344).
<b>FT-IR</b>	(Feststoff) $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 2916 (s), 2849 (s), 1767 (w), 1708 (s), 1590 (m), 1504 (w), 1466 (m), 1433 (m), 1392 (s), 1331 (m), 1235 (m), 1116 (s), 1097 (s), 734 (s), 714 (m).

## 8.3.1.4 Synthese von 5-(Azidomethyl)-phenyl-1,2,3-tris-dodecylether



Eine Suspension von Verbindung **38** (300 mg, 0.415 mmol), Kaliumcarbonat (300 mg) und Natriumazid (600 mg, 9.23 mmol) in trockenem DMF (20 ml) wurde für 17 h bei 60 °C gerührt. Anschließend wurde Wasser zugegeben (20 ml) und die Lösung wurde mit Diethylether (3 x 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan/Essigester 8:1). Man erhielt **40** (281 mg, 0.410 mmol, 99 %) als farblosen Feststoff.

**Smp.** 35 °C

**R<sub>f</sub>** 0.77 (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan/Ethylacetat 8:1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6.82, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.21-1.40 (m, 48H, CH<sub>2</sub> δ-λ), 1.41-1.51 (m, 6H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.69-1.85 (m, 6H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.92-4.01 (m, 6H, OCH<sub>2</sub>), 4.24 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 6.49 (s, 2H, Phenyl-CH).

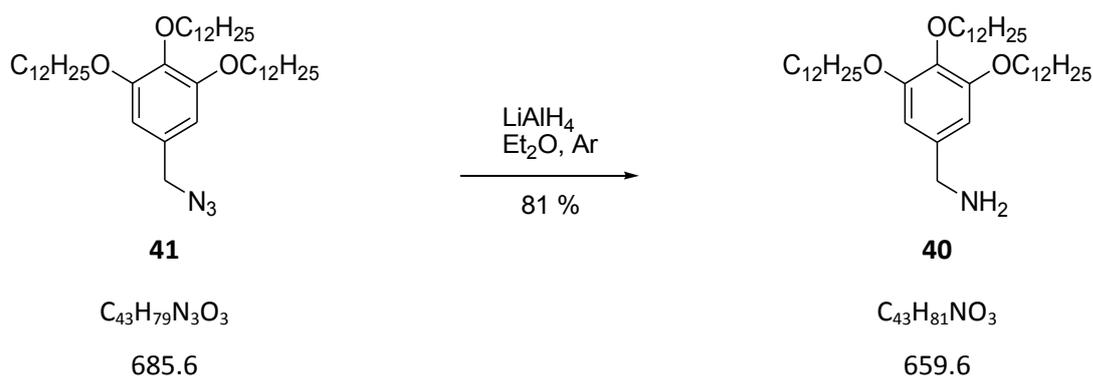
**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 14.3 (CH<sub>3</sub>), 22.8 (λ-CH<sub>2</sub>), 26.3, 26.3 (γ-CH<sub>2</sub>), 29.5, 29.6, 29.6, 29.8, 29.8, 29.8, 29.9, 29.9, 29.9, 30.5 (CH<sub>2</sub>), 32.1, 32.1 (κ-CH<sub>2</sub>), 55.4 (Benzyl-CH<sub>2</sub>), 69.4, 73.6 (α-CH<sub>2</sub>), 106.8 (Phenyl-CH), 106.8 (Phenyl-CH), 136.2, 137.8, 153.5 (Phenyl-C).

**MS** (MALDI-TOF, DCTB): *m/z* = 685 [M]<sup>+</sup>.

**HRMS** (pos. ESI): *m/z* = 708.6000 [M+Na]<sup>+</sup> (ber. für C<sub>43</sub>H<sub>79</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub><sup>+</sup>: 708.6014).

**FT-IR** (Feststoff)  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2917 (s), 2847 (s), 2059 (m), 1592 (m), 1506 (w), 1466 (m), 1438 (m), 1392 (m), 1346 (w), 1329 (m), 1252 (m), 1237 (m), 1121 (s), 1065 (w), 986 (w), 817 (m), 720 (s).

### 8.3.1.5 Synthese von [3,4,5-tris(dodecyloxy)phenyl]methylamin



Verbindung **40** (200 mg, 0.292 mmol) wurde unter Argon in trockenem Diethylether (20 ml) gelöst und im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Unter Rühren wurde Lithiumaluminiumhydrid (50 mg, 1.32 mmol) zugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und die Mischung wurde 2 h lang gerührt. Anschließend wurde vorsichtig Wasser (20 ml) zugegeben. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase wurde nacheinander mit Wasser (2 x 20 ml) und Brine (3 x 20 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Man erhielt **39** (155 mg, 0.235 mmol, 81 %) als blassgelbes Öl.

**R<sub>f</sub>** 0.35 ( $\text{SiO}_2$ , DCM/MeOH 20:1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.88 (t,  $^3J_{\text{H-H}} = 6.88$ , 9H,  $\text{CH}_3$ ), 1.21-1.40 (m, 48H,  $\text{CH}_2$   $\delta$ - $\lambda$ ), 1.41-1.50 (m, 6H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.69-1.83 (m, 6H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.79 (s, 2H, Benzyl- $\text{CH}_2$ ), 3.90-4.00 (m, 6H,  $\text{OCH}_2$ ), 6.52 (s, 2H, Phenyl- $\text{CH}$ ).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 14.2 ( $\text{CH}_3$ ), 22.8 ( $\lambda$ - $\text{CH}_2$ ), 26.3 ( $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ), 29.5, 29.5, 29.6, 29.6, 29.8, 29.9, 29.9, 29.9, 30.5 ( $\text{CH}_2$ ), 32.1 ( $\kappa$ - $\text{CH}_2$ ), 46.6 (Benzyl-

CH<sub>2</sub>), 69.3, 73.6 ( $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 105.9 (Phenyl-C<sub>o</sub>), 137.4 (Phenyl-C<sub>i,p</sub>) 153.3 (Phenyl-C<sub>m</sub>).

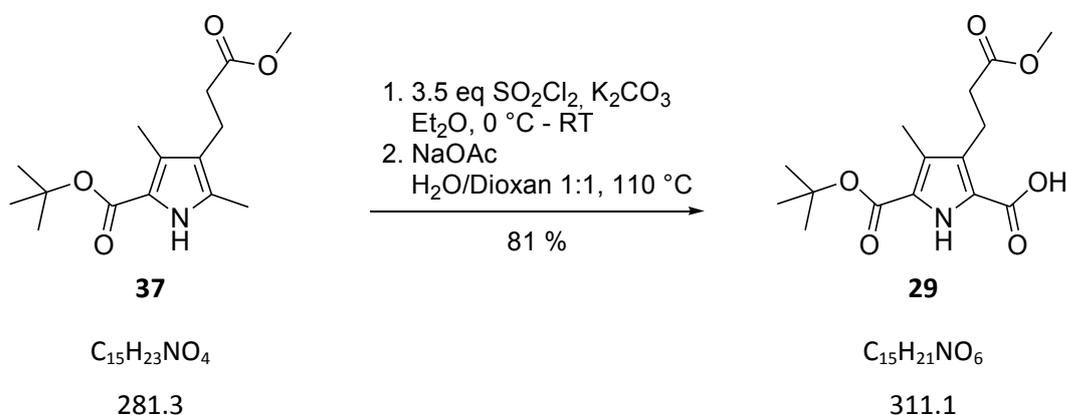
**MS** (MALDI-TOF, HCAA):  $m/z = 643 [M-NH_2]^+$ , 660  $[M]^+$ , 683  $[M+Na]^+$ .

**HRMS** (pos. ESI):  $m/z = 1320.2486 [2M+H]^+$  (ber. für C<sub>86</sub>H<sub>163</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup>: 1320.2506).

**FT-IR** (Öl)  $\tilde{\nu} [cm^{-1}] = 2917$  (s), 2850 (s), 1673 (w), 1627 (w), 1590 (m), 1506 (w), 1466 (m), 1436 (s), 1379 (w), 1330 (m), 1226 (m), 1188 (m), 1116 (s), 996 (w), 816 (w), 751 (m), 720 (s), 695 (s).

### 8.3.2 Synthese des Pyrrolgrundkörpers

#### 8.3.2.1 Synthese von 3-[2-(methoxycarbonyl)ethyl]-4-methyl-5-tert-butylester-pyrrol-2-carbonsäure



Diester **36** (2.00 g, 7.11 mmol, 1 eq) und Kaliumcarbonat (4.00 g, 28.9) wurden in trockenem Diethylether (50 ml) suspendiert und in einer abgedunkelten Apparatur mit Trockenrohr auf 0 °C gekühlt. Durch ein Septum wurde mittels einer Spritze frisch destilliertes Sulfurylchlorid (2.33 ml, 24.9 mmol, 3.5 eq) langsam zugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und die Mischung 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Von dem Reaktionsgemisch wurde eine Probe entnommen und diese mit einem Überschuss von einer 0.5 M Lösung von Natriumacetat in Wasser/Dioxan 1:1 versetzt und geschüttelt. Von der so aufbereiteten Probe wurde ein Dünnschichtchromatogramm angefertigt. Bei vollständiger Umsetzung war hauptsächlich nur

noch ein spot mit einem  $R_f$ -Wert von 0.39 ( $\text{SiO}_2$ , Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 + 1 % HOAc) zu sehen. Zeigten sich mehrere spots, wurde die Reaktion weiter gerührt und diese Prozedur in Abständen einer halben Stunde wiederholt.

Bei vollständiger Umsetzung wurde das Lösemittel ohne Erhitzen bei vermindertem Druck abdestilliert. Der ölige Rückstand wurde mit einer Lösung von Natriumacetat (5.00 g, 61.0 mmol) in Wasser/Dioxan (1:1, 100 ml) versetzt und eine Stunde bei 110 °C gerührt. Dünnschichtchromatographisch wurde auf Vollständigkeit der Hydrolyse überprüft. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 eingestellt. Anschließend wurde mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung extrahiert (3 x 50 ml). Die wässrige Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und unter starkem Rühren mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH von 2 gebracht. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen (3 x 50 ml). Man erhielt Verbindung **28** (1.79 g, 5.76 mmol, 81 %) als einen weißen Feststoff.

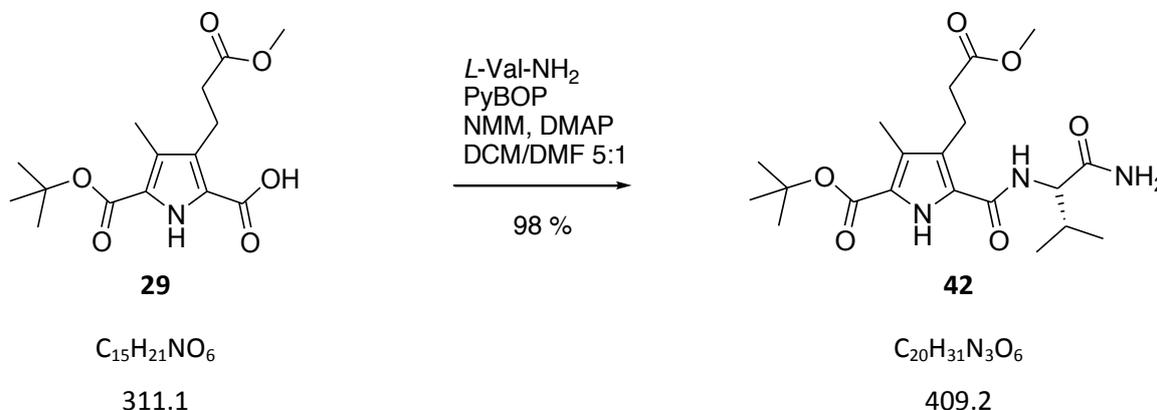
**Smp.** 169 °C

**$R_f$**  0.39 ( $\text{SiO}_2$ , Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 + 1 % HOAc)

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 1.52 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.17 (s, 3H, Pyrrol- $\text{CH}_3$ ), 2.44 (t,  $^3J_{\text{H-H}}$  = 8.10, 2H, Pyrrol- $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.90 (t, 2H,  $^3J_{\text{H-H}}$  = 8.10, Pyrrol- $\text{CH}_2$ ), 3.57 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 11.2 (s, 1H, Pyrrol- $\text{NH}$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 9.7 (Pyrrol- $\text{CH}_3$ ), 19.7 (Pyrrol- $\text{CH}_2$ ), 28.0 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 34.3 (Pyrrol- $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 51.2 ( $\text{OCH}_3$ ), 80.5 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 119.3, 122.4, 125.0 (Pyrrol- $\text{C}$ ), 159.9, 161.8, 172.7 (Carbonyl- $\text{C}$ ).

### 8.3.2.2 Synthese von 5-[(*R*)-1-carbamoyl-2-methylpropylcarbamoyl]-4-[2-(methoxycarbonyl)ethyl]-3-methyl-pyrrol-2-tert-butylester



Eine Lösung von Carbonsäure **28** (500 mg, 1.61 mmol, 1 eq), *L*-Val-NH<sub>2</sub> (369 mg, 2.41 mmol, 1.5 eq), HCTU (797 mg, 1.92 mmol, 1.2 eq) und DMAP (30 mg, 0.245 mmol) in DCM/DMF 5:1 (25 ml) mit NMM (1 ml) wurde einen Tag bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde im Hochvakuum entfernt und der ölige Rückstand mittels Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH 15:1 + 1 % HOAc) gereinigt. Man erhielt **41** als farblosen, pulverigen Feststoff (643 mg, 1.57 mmol, 98%).

**Smp.** 202 °C

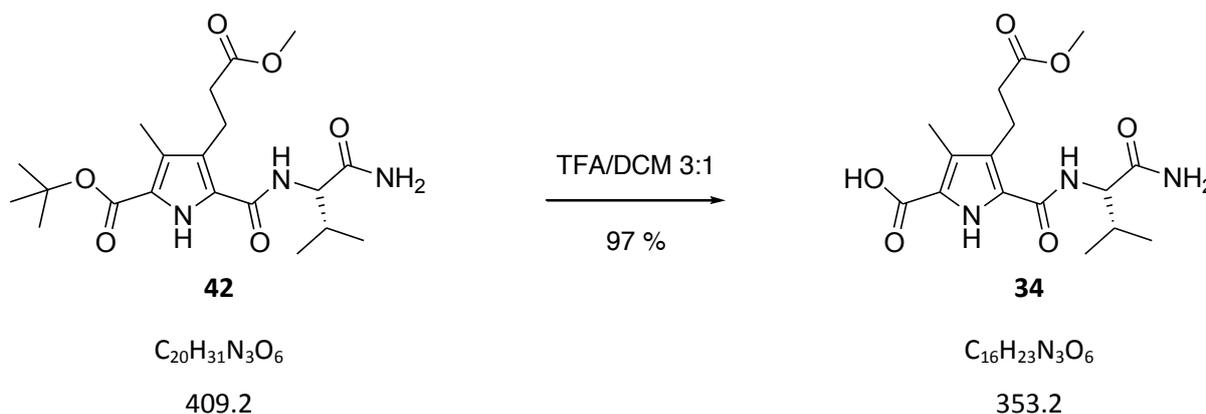
**R<sub>f</sub>** 0.48 (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH 20:1 + 1 %HOAc)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.05 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.28, 6H, CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.56 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.24 (s, 3H, Pyrrol-CH<sub>3</sub>), 2.26-2.31 (m, 1H, CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.63 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.26, 2H, Pyrrol-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.05 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.32, Pyrrol-CH<sub>2</sub>), 3.65 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.45 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.72, CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 6.20 (s, 1H), 8.40 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.72, 1H, Amid-NH), 10.8 (s, 1H, Pyrrol-NH).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 10.5 (Pyrrol-CH<sub>3</sub>), 19.6 (CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 20.6 (Pyrrol-CH<sub>2</sub>), 28.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 30.6 (CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 34.6 (Pyrrol-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 51.7 (OCH<sub>3</sub>), 58.9 (CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 82.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 122.3, 124.8, 126.0 (Pyrrol-C), 161.0, 162.4, 171.0, 174.2 (Carbonyl-C).

<b>MS</b>	(MALDI-TOF, HCAA): $m/z = 410 [M+H]^+$ .
<b>HRMS</b>	(pos. ESI): $m/z = 432.2107 [M+Na]^+$ (ber. für $C_{20}H_{31}N_3NaO_6^+$ : 432.2105)
<b>FT-IR</b>	(Feststoff) $\tilde{\nu} [cm^{-1}] = 3316 (w), 3189 (w), 2961 (w), 1734 (w), 1673 (s), 1619 (s), 1534 (w), 1433 (m), 1368 (w), 1309 (m), 1247 (m), 1149 (s), 1099 (w), 975 (w), 837 (s), 781 (m), 664 (m), 619 (w)$ .

### 8.3.2.3 Synthese von 5-[(*R*)-1-carbamoyl-2-methylpropylcarbamoyl]-4-(2-(methoxycarbonyl)ethyl)-3-methyl-pyrrol-2-carbonsäure



Butylester **41** (367 mg, 0.896 mmol) wurde in TFA/DCM 3:1 (20 ml) gelöst und für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser suspendiert und lyophilisiert. Man erhielt **33** (308 mg, .872 mmol, 97 %) als farblosen Feststoff.

<b>Smp.</b>	205 °C
<b>R<sub>f</sub></b>	0.17 (SiO <sub>2</sub> , DCM/MeOH 20:1 + 1 %HOAc)
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta = 0.88 (d, {}^3J_{H-H} = 6.76, 6H, CHCH(CH_3)_2), 2.02 (q, {}^3J_{H-H} = 6.82, 1H, CHCH(CH_3)_2), 2.16 (s, 3H, Pyrrol-CH_3), 2.41 (t, {}^3J_{H-H} = 7.74, 2H, Pyrrol-CH_2CH_2), 2.90 (t, 2H, {}^3J_{H-H} = 7.76, Pyrrol-CH_2), 3.52 (s, 3H,$

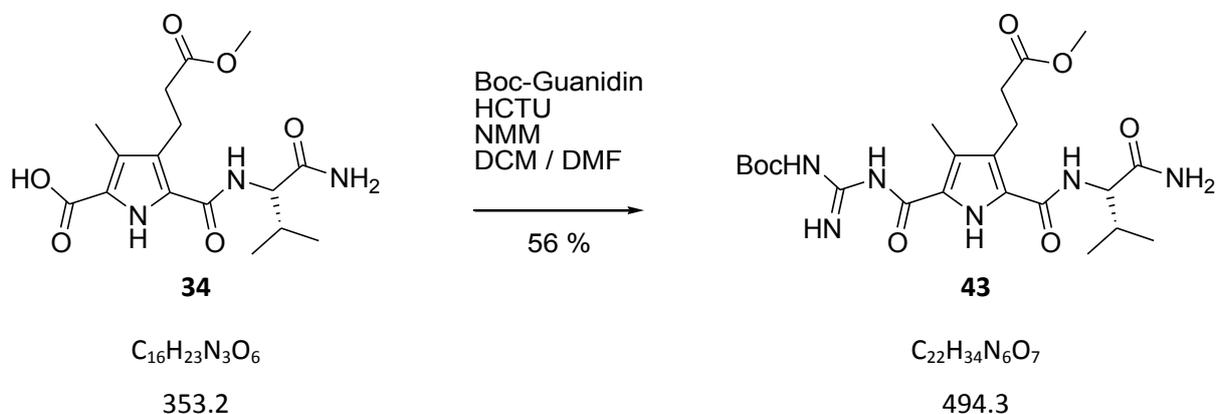
OCH<sub>3</sub>), 4.24 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 4.14, CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 6.99 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 8.19 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.32, 1H, Amid-NH), 11.88 (s, 1H, Pyrrol-NH).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 10.0 (Pyrrol-CH<sub>3</sub>), 18.8 (CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 20.4 (Pyrrol-CH<sub>2</sub>), 30.6 (CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 34.7 (Pyrrol-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 51.8 (OCH<sub>3</sub>), 58.3 (CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 120.1, 124.7, 126.0, 128.6 (Pyrrol-C), 160.7, 162.9, 173.8, 174.1 (Carbonyl-C).

**HRMS** (pos. ESI): *m/z* = 376.1484 [M+Na]<sup>+</sup> (ber. für C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>6</sub><sup>+</sup>: 376.1479).

**FT-IR** (Feststoff)  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3315 (m), 2959 (w), 1676 (s), 1615 (s), 1576 (w), 1540 (w), 1487 (m), 1436 (m), 1305 (m), 1272 (s), 1242 (m), 1196 (w), 1169 (s), 981 (w), 898 (w), 834 (w), 720 (m).

### 8.3.2.4 Synthese von 2-Mono-Boc-guanidinocarbonyl-5-[(*R*)-1-carbamoyl-2-methylpropylcarbamoyl]-3-methyl-pyrrol-4-propionsäuremethylester

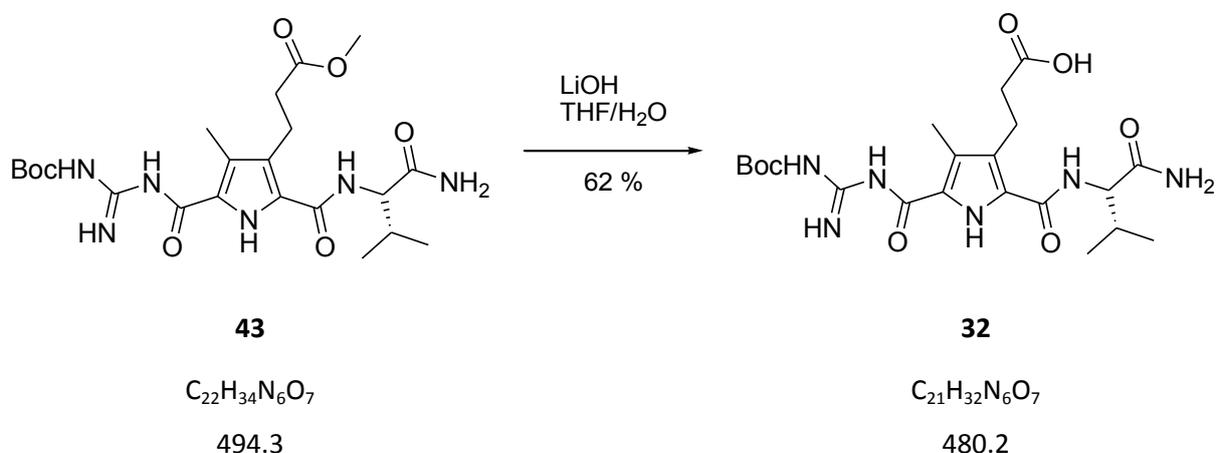


Eine Lösung von Carbonsäure **33** (680 mg, 1.93 mmol, 1 eq), HCTU (865 mg, 2.10 mmol, 1.1 eq) und Boc-Guanidin (334 mg, 2.10 mmol, 1.1 eq) in DCM/DMF 5:1 (24 ml) mit NMM (1 ml) wurde 1 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Wasser zugegeben (20 ml), die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im

Hochvakuum entfernt. Der entstandene Feststoff wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH 20:1). Man erhielt **42** (536 mg, 1.08 mmol, 56 %) als farblosen Feststoff.

<b>Smp.</b>	149 °C (Zers.)
<b>R<sub>f</sub></b>	0.28 (SiO <sub>2</sub> , DCM/MeOH 20:1)
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ = 1.04 (dd, <sup>3</sup> J <sub>H-H</sub> = 6.76, <sup>4</sup> J <sub>H-H</sub> = 2.76, 6H, CHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 1.49 (s, 9H, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 2.35 (s, 3H, Pyrrol-CH <sub>3</sub> ), 2.26-2.38 (m, 1H, CHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.67 (t, <sup>3</sup> J <sub>H-H</sub> = 7.02, 2H, Pyrrol-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 3.01 (m, 2H, Pyrrol-CH <sub>2</sub> ), 3.64 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 4.44 (t, 1H, <sup>3</sup> J <sub>H-H</sub> = 8.02, CHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 6.26 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 8.39 (d, <sup>3</sup> J <sub>H-H</sub> = 8.20, 1H, Amid-NH), 8.71 (s, 1H), 10.3 (s, 1H, Pyrrol-NH).
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ = 10.7 (Pyrrol-CH <sub>3</sub> ), 18.9 (CHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 20.3 (Pyrrol-CH <sub>2</sub> ), 28.1 (C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 30.1 (CHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 34.1 (Pyrrol-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 52.1 (OCH <sub>3</sub> ), 59.5 (CHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 119.5, 128.4 (Pyrrol-C), 162.1, 174.9 (Carbonyl-C).
<b>HRMS</b>	(pos. ESI): <i>m/z</i> = 517.2378 [M+Na] <sup>+</sup> (ber. für C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> NaO <sub>7</sub> <sup>+</sup> : 517.2381).
<b>FT-IR</b>	(Feststoff) $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3391 (w), 1725 (w), 1672 (w), 1625 (s), 1541 (m), 1434 (m), 1309 (m), 1238 (s), 1147 (s), 835 (s), 625 (m), 611 (w).

### 8.3.2.5 Synthese von 2-Mono-Boc-guanidinocarbonyl-5-[(*R*)-1-carbamoyl-2-methylpropylcarbamoyl]-3-methyl-pyrrol-4-propionsäure



Eine Mischung von Methylester **42** (250 mg, 0.505 mmol, 1 eq) und Lithiumhydroxid (36.5 mg, 1.52 mmol, 3 eq) in THF/H<sub>2</sub>O 5:1 (24 ml) wurde bei Raumtemperatur für 5 h gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und zum Rückstand wurde 1M HCl gegeben, bis ein pH-Wert von 4 erreicht worden war. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und lyophilisiert. Man erhielt **31** (150 mg, 0.312 mmol, 62 %) als farblosen Feststoff.

**Smp.** 216 °C (Zers.)

**R<sub>f</sub>** 0.17 (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH 20:1 + 1 %NEt<sub>3</sub>)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.91 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6.72, 6H, CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.49 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.03-2.11 (m, 1H, CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.31 (s, 3H, Pyrrol-CH<sub>3</sub>), 2.38 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.82, 2H, Pyrrol-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.86-2.92 (m, 2H, Pyrrol-CH<sub>2</sub>), 4.30 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.64, CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 7.03 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 8.18 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.60, 1H, Amid-NH), 8.81 (s, 1H), 9.58 (s, 1H), 11.66 (s, 1H, Pyrrol-NH).

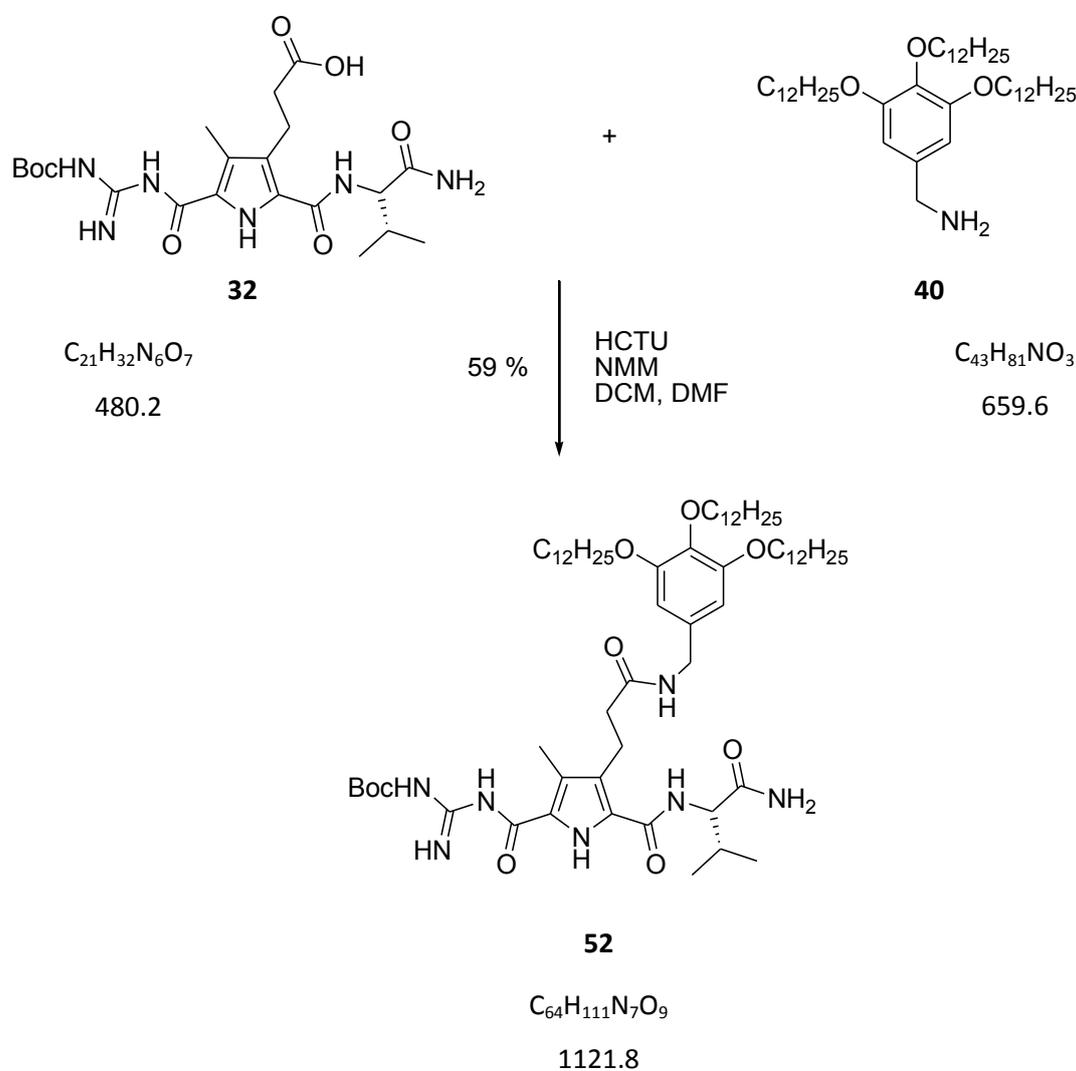
**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 10.2 (Pyrrol-CH<sub>3</sub>), 18.3 (CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 19.9 (Pyrrol-CH<sub>2</sub>), 27.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 30.2 (CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 34.4 (Pyrrol-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 57.7 (CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 67.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 127.8 (Pyrrol-C), 160.2, 173.1, 174.3 (Carbonyl-C).

**HRMS** (pos. ESI):  $m/z = 503.2230$   $[M+Na]^+$  (ber. für  $C_{21}H_{32}N_6NaO_7^+$ : 503.2225).

**FT-IR** (Feststoff)  $\tilde{\nu}$   $[cm^{-1}] = 3318$  (w), 2965 (w), 1670 (m), 1626 (s), 1537 (s), 1409 (m), 1285 (s), 1147 (s), 1091 (w), 845 (w), 754 (m), 619 (m).

### 8.3.3 Synthese des kompletten Rezeptors

#### 8.3.3.1 Synthese von 2-Mono-Boc-guanidinocarbonyl-3-methyl-4-ethyl-pyrrol-5-[(*R*)-3-methyl-2-carbamoyl]-butylamid

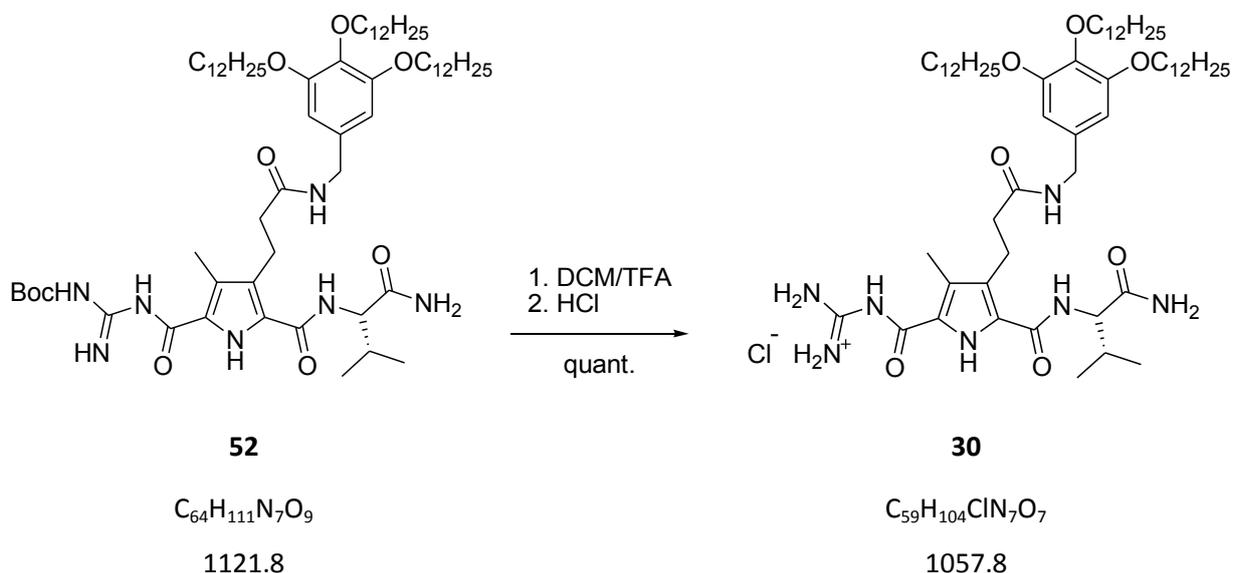


Eine Lösung von Carbonsäure **31** (110 mg, 0.229 mmol, 1 eq), Benzylamin **39** (190 mg, 0.288 mmol, 1.25 eq) und HCTU (119 mg, 0.288 mmol, 1.25 eq) in DCM/DMF 2:1 (15 ml)

mit NMM (0.5 ml) wurde 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Wasser (15 ml) zugegeben und die Phasen wurden voneinander getrennt. Die wässrige Phase wurde mit DCM (3 x 15 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan/Essigester 1:1 + 1 % HOAc). Man erhielt **51** (153 mg, 0.136 mmol, 59 %) als farblosen Feststoff.

<b>Smp.</b>	92 °C
<b>R<sub>f</sub></b>	0.48 (SiO <sub>2</sub> , Cyclohexan/Essigester 1:1 + 1 % HOAc)
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ = 0.88 (t, <sup>3</sup> J <sub>H-H</sub> = 6.82, 9H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.04 (d, <sup>3</sup> J <sub>H-H</sub> = 6.72, 6H, CHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 1.18-1.37 (m, 49H, CH <sub>2</sub> δ-λ), 1.39-1.47 (m, 6H, OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 1.49 (s, 8H, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.67-1.80 (m, 6H, OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 2.25-2.33 (m, 1H, CHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.35 (s, 3H, Pyrrol-CH <sub>3</sub> ), 2.45-2.66 (m, 2H, Pyrrol-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 2.95-3.13 (m, 2H, Pyrrol-CH <sub>2</sub> ), 3.87-3.91 (m, 6H, OCH <sub>2</sub> ), 4.19-4.30 (m, 2H, Benzyl-CH <sub>2</sub> ), 4.46 (t, 1H, <sup>3</sup> J <sub>H-H</sub> = 7.58, CHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 6.38 (s, 2H, Phenyl-CH), 6.71 (s, 1H), 8.60 (br, 1H, Amid-NH).
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ = 10.9 (Pyrrol-CH <sub>3</sub> ), 14.2 (CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 19.5 (CHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 22.8 (Pyrrol-CH <sub>2</sub> ), 22.8 (λ-CH <sub>2</sub> ), 26.3 (γ-CH <sub>2</sub> ), 28.1 (C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 29.5, 29.5, 29.6, 29.8, 29.8, 29.8, 29.9, 29.9, 29.9, 30.5 (δ-ι CH <sub>2</sub> ), 32.1 (Pyrrol-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 44.2 (Benzyl-CH <sub>2</sub> ), 59.6 (CHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 69.3, 73.6 (α-CH <sub>2</sub> ), 105.9 (Phenyl-C <sub>o</sub> ), 133.1 (Pyrrol-C), 137.7 (Phenyl-C <sub>i,p</sub> ), 153.4 (Phenyl-C <sub>m</sub> ), 161.8, 172.9, 175.0 (Carbonyl-C).
<b>MS</b>	(MALDI-TOF, DHB): <i>m/z</i> = 1023 [M-Boc+H] <sup>+</sup> , 1123 [M+H] <sup>+</sup> , 1145 [M+Na] <sup>+</sup> .
<b>HRMS</b>	(pos. ESI): <i>m/z</i> = 1122.8516 [M+H] <sup>+</sup> (ber. für C <sub>64</sub> H <sub>112</sub> N <sub>7</sub> O <sub>9</sub> <sup>+</sup> : 1122.8516).
<b>FT-IR</b>	(Feststoff) $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3330 (w), 2917 (s), 2850 (s), 1673 (m), 1628 (s), 1536 (m), 1465 (w), 1437 (m), 1369 (w), 1320 (m), 1287 (m), 1217 (m), 1150 (s), 1115 (s), 1092 (w), 1018 (w), 852 (w), 816 (w), 754 (m), 720 (m), 655 (w), 624 (m).

### 8.3.3.2 Synthese von 5-[(R)-1-carbamoyl-2-methylpropylcarbamoyl]-3-methyl-4-{2-[3,4,5-Tris(dodecyloxy)phenyl]methyl-carbamoyl}ethyl-pyrrol-2-carbonyl-guanidiniumchlorid



Eine Lösung von **51** (40.0 mg, 35.7  $\mu$ mol) in DCM/TFA 4:1 (20 ml) wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und man erhielt das Trifluoacetat-Salz von **30** als farblosen Feststoff.

Zum Erhalt des Chlorid-Salzes wurde der Feststoff viermal unter Zugabe von 5%iger Salzsäure (10 ml) lyophilisiert. Man erhielt **30** (37.7 mg, 35.6  $\mu$ mol, 100 %) als farblosen Feststoff.

**Smp.** 237 °C

**R<sub>f</sub>** 0.0 (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan/Essigester 1:1 + 1 % HOAc)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.87 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6.82, 9H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.05 (br, 6H, CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.15-1.37 (br, 48H, CH<sub>2</sub>  $\delta$ - $\lambda$ ), 1.38-1.48 (br, 6H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.67-1.80 (m, 6H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.24 (s, 3H, Pyrrol-CH<sub>3</sub>), 2.50-2.64 (br, 2H, Pyrrol-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.85-3.10 (m, 2H, Pyrrol-CH<sub>2</sub>), 3.82-3.95 (m, 6H, OCH<sub>2</sub>), 4.07-4.17 (m, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H</sub>, CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.18-4.35 (m, 2H, Benzyl-

$CH_2$ ), 6.42 (s, 2H, Phenyl-CH), 6.76 (s, 1H), 8.33 (br, 2H), 8.88 (br, 1H), 11.3 (s, 1H), 11.5 (s, 1H).

**$^{13}C$ -NMR** (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 10.3 (Pyrrol- $CH_3$ ), 14.3 ( $CH_2CH_3$ ), 19.4 (Pyrrol- $CH_2$ ), 19.7 ( $CHCH(CH_3)_2$ ), 22.8 ( $\lambda$ - $CH_2$ ), 26.3 ( $\gamma$ - $CH_2$ ), 29.5, 29.8, 30.3, 30.5, 30.6 ( $\delta$ - $\iota$   $CH_2$ ), 32.1 (Pyrrol- $CH_2CH_2$ ), 44.9 (Benzyl- $CH_2$ ), 60.8 ( $CHCH(CH_3)_2$ ), 69.1, 73.9 ( $\alpha$ - $CH_2$ ), 112.2 (Phenyl-C), 128.5, 142.0 (Pyrrol-C), 160.4, 172.6, 176.8 (Carbonyl-C).

**MS** (MALDI-TOF, DHB):  $m/z$  = 1023  $[M+H]^+$ , 1045  $[M+Na]^+$ .

**HRMS** (pos. ESI):  $m/z$  = 1022.7992  $[M+H]^+$  (ber. für  $C_{59}H_{104}N_7O_7^+$ : 1022.7992)

**IR** (Feststoff)  $\tilde{\nu}$  [ $cm^{-1}$ ] = 3306 (w), 2922 (s), 2852 (s), 1639 (m), 1488 (w), 1464 (m), 1431 (m), 1377 (w), 1285 (s), 1202 (s), 1118 (s), 835 (w), 799 (w), 755 (w), 720 (m).

## 8.4 Extraktionsexperimente

Für die Extraktionsexperimente wurden jeweils zwei Lösungen, eine wässrige und eine organische, hergestellt. In den wässrigen Lösungen wurden die acetylierten Aminosäuren Valin, Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan gelöst. Bei der ersten Variante von Extraktionsexperimenten wurden diese in 2 mM Konzentration in 1 ml hochreinem Wasser gelöst. Bei der zweiten Variante wurden die racemischen Gemische in 10 mM Konzentration in 1 ml einer 100 mM Lösung von BIS-TRIS Puffer gelöst. Es wurde ein pH-Wert von 6 mittels Zugabe von 0.1 mM HCl bzw. 0.1 mM NaOH-Lösung eingestellt.

Die organische Phase bestand aus 1 ml einer 1 mM Lösung von Rezeptor **31** in Chloroform bzw. Dichlormethan.

Die verschiedenen Lösungen wurden in 4 ml Rollrandgläsern mit PE-Schnappdeckel zusammengeführt. Zusätzlich wurden Blindproben hergestellt, indem die wässrigen Lösungen mit den acetylierten Aminosäuren mit reinem Chloroform bzw. Dichlormethan ohne Rezeptor zusammengeführt wurden. Die zweiphasigen Gemische wurden 10 min manuell geschüttelt und danach mindestens weitere 10 min oder bis zum Verschwinden des entstandenen Schaumes stehen gelassen. Zusätzlich wurden die reinen wässrigen Lösungen der Aminosäuren für die im Folgenden beschriebenen Messungen herangezogen.

Mittels einer 1 ml Spritze wurden ca. 800  $\mu$ l der wässrigen Phase entnommen und zur Analyse in 1 ml UV-Küvetten gegeben. Nach erfolgter Messung wurden die Proben in die Rollrandgläser zurückgegeben. Für die HPLC-Messungen wurden entweder mittels einer 1 ml Spritze 50  $\mu$ l der wässrigen Phase entnommen und direkt in das Rheodyne-Ventil der HPLC eingespritzt. Für die stärker absorbierenden Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan wurden die Proben vor dem Einspritzen gegebenenfalls mit hochreinem Wasser auf einen passenden Wert verdünnt, um das Absorptionsmaximum des angeschlossenen UV-Detektors nicht zu überschreiten.

Die verschiedenen Lösungen und Gemische wurden bis zur zweiten Messung nach 2 Wochen mit Parafilm abgedichtet und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Vor der zweiten Messung wurden die zweiphasigen Gemische nicht erneut geschüttelt.

## 8.5 ITC-Experimente

Das ITC-System bestand aus zwei geldstückgroßen identischen Zellen, die beide ein Fassungsvermögen von 1.4514 ml besaßen und von der Umgebung isoliert waren. Die Temperatur, bei denen die Experimente durchgeführt wurden, lag mit 27 °C etwa um 5 bis 10 °C über der Umgebungstemperatur, um einen leicht kühlenden Wärmefluss zu gewährleisten. Beide Zellen waren immer komplett gefüllt, die Referenzzelle mit hochreinem Wasser und die Messzelle mit einer Rezeptorlösung in Chloroform. Alternativ wurde die Referenzzelle auch mit Chloroform gefüllt, was jedoch keine Veränderung der Werte ergab. Die Substratlösung wurde in 10 bis 20fach höherer Konzentration mittels einer Spritze mit integrierter Rührereinheit schrittweise zugegeben. Die Rührergeschwindigkeit wurde auf 372 rpm eingestellt, um eine gute Durchmischung und einheitliche Wärmeübertragung zu gewährleisten. Die Referenzzelle wurde fortlaufend mit einer Temperaturdifferenz von 0.01 °C über der Temperatur des isolierenden Kühlmantels geheizt. Dadurch lag immer eine konstante Spannung mit einer eingestellten Referenz-Heiz-Leistung von 10 µcal/s an. Für ein typisches Experiment wurden etwa 3 ml der Rezeptorlösung erst mittels Ultraschall und dann unter Vakuum entgast. Die Messzelle wurde anschließend mit 1 ml dieser Lösung gespült und anschließend komplett mit 1.4514 ml befüllt. Die Substratlösung wurde analog zur Rezeptorlösung entgast. Die Spritze wurde mit 150 µl dieser Lösung gespült und danach mit ungefähr 250 µl befüllt. Anschließend wurde die Spritze dreimal automatisiert entleert und wieder aufgezogen, um Lufteinschlüsse zu vermeiden. Die Titration erfolgte automatisiert. Es wurden 26 Titrationsschritte mit je 10.0 µl im Abstand von 230 s injiziert. Die Injektionsdauer betrug 20 s und die Anfangs-Verzögerung 60 s. Weitere Einstellungen waren ein hohes Ansprechverhalten und schnelle Gleichgewichtseinstellung. Für ein typisches Experiment wurden eine 0.2 mM Lösung des Rezeptors und eine 2 mM Lösung des Substrates hergestellt. Die Gesamtmenge von Substrat lag letztendlich bei ungefähr zwei Äquivalenten.

Um etwaige Wärmeentwicklungen, die nicht durch die Komplexbildung hervorgerufen wurden, wie z. B. beim Verdünnen sowohl der Stammlösung als auch der Rezeptorlösung, während der Titration zu ermitteln, wurden Kontrollexperimente (Verdünnungsexperimente) unter identischen Versuchsbedingungen durchgeführt. Zum einen wurde reines Chloroform zur vorgelegten Stammlösung titriert, während in einem anderen Experiment die Rezeptorlösung zu reinem Chloroform titriert wurde. Die erhaltenen Wärmeentwicklungen wurden anschließend ggf. vom eigentlichen Experiment abgezogen. Dabei wurde die

Wärmeentwicklung aus dem Verdünnungsexperiment der Rezeptorlösung linear als Konstante subtrahiert.

Zur Bestimmung der Assoziationskonstanten, Enthalpie, Entropie und der Komplexstöchiometrie wurden die Parameter unter Verwendung des Programms *Origin 7* mit einem Plug-In von MicroCal für ITC-Messungen an die korrigierten Wärmemengen angepasst. Es wurde ein für die Komplexierung entsprechendes single site Bindungsmodell gewählt und die detektierte Wärmemenge gegen die Zeit aufgetragen. Die berechneten Reaktionsenthalpien wurden in  $\text{cal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , die Entropien in  $\text{cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$  und die Bindungskonstanten in  $\text{M}^{-1}$  erhalten.

## 8.6 Transportexperimente

Das Aussehen und die Dimensionen des U-Rohres sind bereits in Kap 5.5.1 beschrieben (siehe **Abb. 82**).

Für die Transportexperimente wurden drei verschiedene Lösungen hergestellt, für die wässrige Ausgangsphase, die wässrige Zielphase und die organische Phase.

Die Lösung für die wässrige Ausgangsphase bestand bei den Einzelsubstratexperimenten und den enantioselektiven Experimenten aus 3 ml einer 50 mM Lösung der jeweiligen acetylierten Aminosäure bzw. des racemischen Gemisches in einer 100 mM Lösung von BIS-TRIS-Puffer in hochreinem Wasser. Bei den Experimenten zum aktiven Transport lag eine Substratkonzentration von 10 mM vor. Bei den kompetitiven Experimenten lagen die fünf eingesetzten acetylierten Aminosäuren in einer Konzentration von jeweils 2 mM vor. Die verschiedenen Lösungen wurden mittels Zugabe von 0.1 mM HCl bzw. 0.1 mM NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 6 eingestellt.

Die Lösung für die wässrige Zielphase bestand bei den Einzelsubstratexperimenten, den enantioselektiven Experimenten und den kompetitiven Experimenten aus 3 ml einer 100 mM Lösung von BIS-TRIS-Puffer. Bei den Experimenten zum aktiven Transport war zusätzlich die verwendete acetylierte Aminosäure in 50 mM Konzentration gelöst. Die verschiedenen Lösungen wurden mittels Zugabe von 0.1 mM HCl bzw. 0.1 mM NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 8 eingestellt.

Die organische Phase bestand aus 3.5 ml einer 1 mM Lösung des Rezeptors **30** in Chloroform.

Die wässrige Ausgangsphase wurde vor Beginn des Experiments mit der organischen Phase zur Äquilibrierung ausgeschüttelt. Dazu wurden die beiden Lösungen in einem 10 ml Rollrandglas mit PE-Deckel zusammengegeben und 5 min lang manuell geschüttelt. Anschließend wurden die Mischungen mindestens 10 min oder bis zum Verschwinden des entstandenen Schaumes stehen gelassen.

Beim Einfüllen in die U-Rohre mit einem 7 mm langen stabförmigen Magnetrührstäbchen wurde zunächst die organische Phase mittels einer 5 ml Spritze zugegeben. Daraufhin wurden gleichzeitig die beiden wässrigen Phasen ebenfalls mit 5 ml Spritzen zugegeben. Eventuell im Rollrandglas verbliebene Reste der organischen Phase wurden dabei beim Einfüllen der wässrigen Ausgangsphase mit aufgezogen und eingefüllt. Die oberen Enden der U-Rohre

wurden mittels Parafilm abgedichtet. Der Versuch wurde durch Anlegen einer Rührgeschwindigkeit von 1250 rpm durch den darunter stehenden Magnetrührer gestartet.

Für die HPLC-Messungen wurden mittels einer 1 ml Spritze 50 µl der wässrigen Zielphase entnommen und direkt in das Rheodyne-Ventil der HPLC eingespritzt. Für die stärker absorbierenden Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan wurden die Proben vor dem Einspritzen gegebenenfalls mit hochreinem Wasser auf einen passenden Wert verdünnt, um das Absorptionsmaximum des angeschlossenen UV-Detektors nicht zu überschreiten. Bei den kompetitiven Experimenten wurden beide Methoden angewandt. Bei den Experimenten zum aktiven Transport wurden zudem Proben der wässrigen Ausgangsphase entnommen.

## 8.7 HPLC-Experimente

Für die HPLC-Auswertungen in den Extraktions- und Transportversuchen wurde eine HPLC-Anlage der Firma Shimadzu mit folgenden Komponenten verwendet:

Pumpe	LP-6A Liquid Chromatograph
Controller	SCL-6B System Controller
Auto-Injektor	SIL-6B Auto Injector
UV-Detektor	SPD-6A Spectrophotometric Detector
Ventil	Rheodyne 7125 mit 20 $\mu$ l Probenschleife
Säulen	Supelcosil <sup>TM</sup> LC-8 25cm x 4.6mm, 5 $\mu$ m Astec Chirobiotic T

Die Messungen wurden wie folgt durchgeführt:

Vor den eigentlichen Messungen wurden jeden Tag Kalibrierungslösungen der untersuchten Aminosäuren gemessen. Es wurden drei Lösungen der Konzentrationen 0.5 mM, 1 mM und 2 mM gemessen. Aus den erhaltenen Absorptionswerten wurde eine Eichgerade erstellt, auf deren Basis in der Folge die Konzentrationen der untersuchten Lösungen bestimmt wurden.

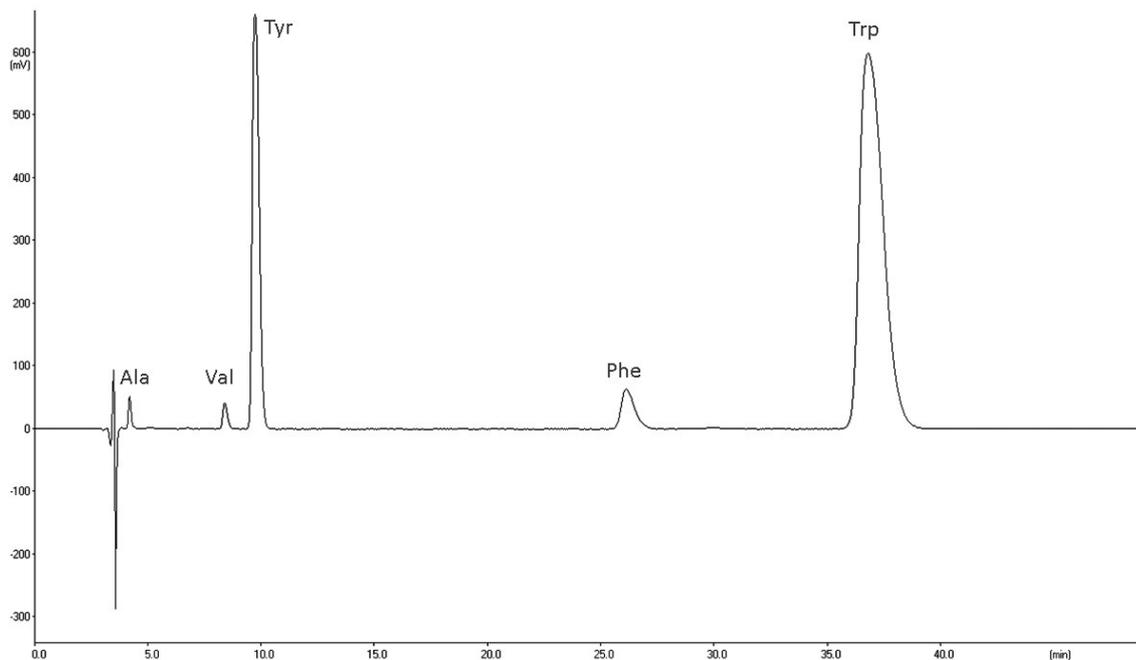
Für die Eichmessungen als auch die regulären Messungen wurden die gleichen Messparameter verwendet. Als mobile Phase wurde ein konstant bleibendes Lösemittelgemisch verwendet. Für die RP 8-Säule war dies 10% Methanol in Wasser mit einem TFA-Anteil von 1%. Bei niedrigerem TFA-Anteil wurde eine unvollständige Protonierung der Substrate beobachtet. Für die chirale Säule wurde eine 0.25%ige Tetraethylammoniumacetatlösung (pH 4.1) mit Methanol im Verhältnis 80/20 verwendet. Bei der RP 8-Säule wurde zum Ende der Messungen eine Verringerung der Retentionszeiten beobachtet, was auf eine Auflösung des Säulenmaterials zurückgeführt wurde. Eventuell wäre der Einsatz eines Tetraethylammoniumpuffers anstelle von TFA schonender für die Säule.

Die Flussrate betrug konstant 1ml/min, der Absorptionskoeffizient des UV-Detektors wurde auf Werte zwischen 0.005 und 0.01 eingestellt, die gemessene Wellenlänge betrug 220 nm.

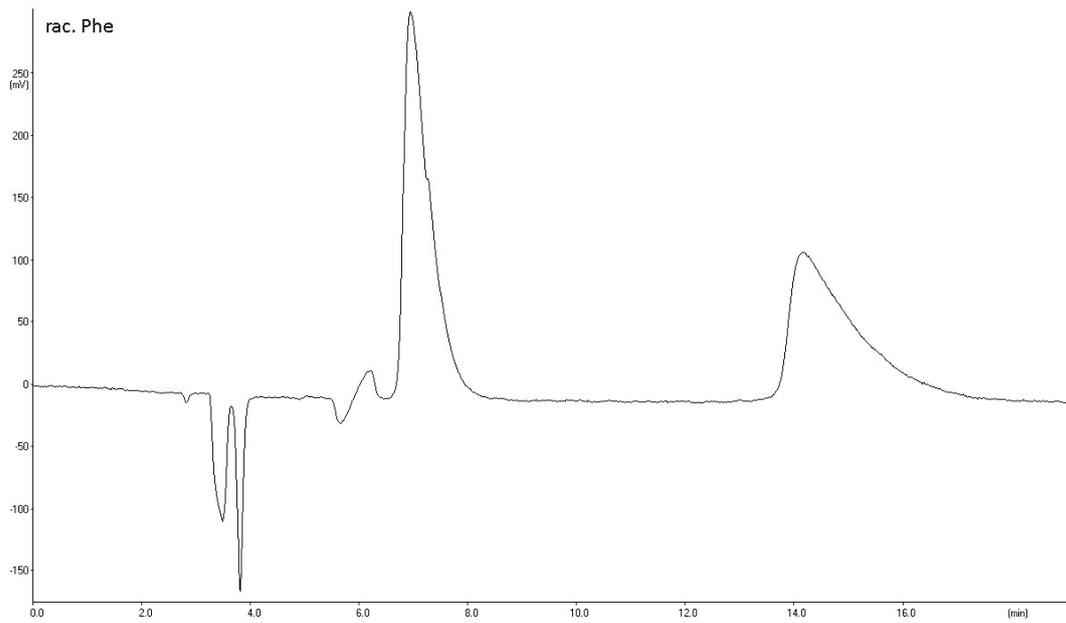
Die Proben wurden entweder direkt aus der untersuchten Lösung entnommen und mittels HPLC-Aufsatz in das Rheodyne Ventil eingespritzt oder im Falle der stärker absorbierenden Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin auf angemessene Werte, meist ein Zehntel, verdünnt und dann eingespritzt. Beim Einspritzen wurde eine 20 µl Probenschleife verwendet, die durch Zugabe von ca. 40 µl Lösung gefüllt wurde. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass die Probenschleife komplett gefüllt war und somit exakt gleiche Volumina gemessen wurden.

Die Aufnahme und Auswertung der Messkurven erfolgte mit dem Programm Chromstar 6.3.

Die folgenden Abbildungen **Abb. 104** und **Abb. 105** zeigen das generelle Aussehen der erhaltenen Spektren.



**Abb. 104** Spektrum einer Mischung der acetylierten Aminosäuren Alanin, Valin, Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan in jeweils 2 mM Konzentration auf der Säule Supelcosil TM LC-8 25cm x 4.6mm, 5µm. Links ist der Einspritzpeak zu sehen. Laufbedingungen siehe Text. Der Absorptionskoeffizient des UV-Detektors betrug 0.01.

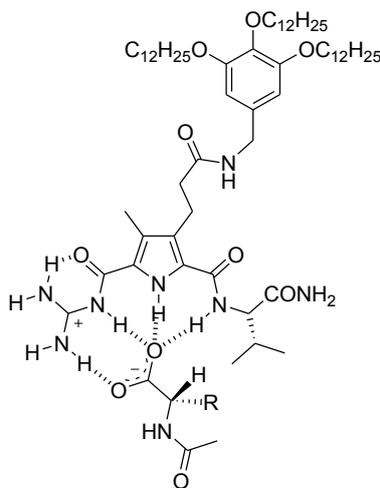


**Abb. 105** Spektrum einer 2.5 mM Lösung von rac. Ac-Phe-OH auf der Säule Astec Chirobiotic T. Links ist der Einspritzpeak zu sehen. Laufbedingungen siehe Text. Der vordere peak entspricht dem *L*-Enantiomer, der hintere dem *D*-Enantiomer. Der Absorptionskoeffizient des UV-Detektors betrug 0.005.

## 9 Summary

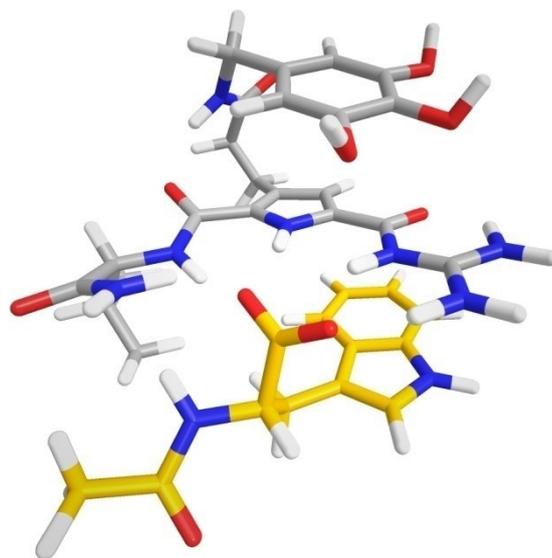
The investigation of synthetic membrane transporters is a current goal of supramolecular chemistry. There are plenty of examples for transporters of simple cationic or anionic substrates such as potassium or chloride ions, whereas relatively few examples for bigger anionic substrates such as amino acid carboxylates can be found in the literature. For membrane transport mainly two mechanisms are applied, the use of channels or mobile carrier molecules. Channels possess the highest transport rates and transport primarily small ions or molecules, whereas mobile carrier molecules are more selective for the individual substrates and on principle can be adjusted to any substrate.

Within the scope of this work a new membrane carrier for acetylated amino acids was to be designed and synthesized. For the binding site of the carboxylate the guanidino-carbonylpyrrole motif by *Schmuck* was selected. In the pyrrole's side chain an *L*-valinamide residue was introduced, to allow for additional hydrogen bonding and potentially achieve substrate- and enantioselectivity. For solubility in nonpolar media such as the inner part of the cell membrane a lipophilic group had to be introduced. Tris-(dodecyloxy)-phenylmethylene, which bears three long, nonpolar alkyl chains, was selected to procure the desired solubility. All in all this yielded a receptor for oxo-anions and especially for amino acid carboxylates with increased solubility in organic media (**Fig. 106**). This design should result in the ability for membrane transport.



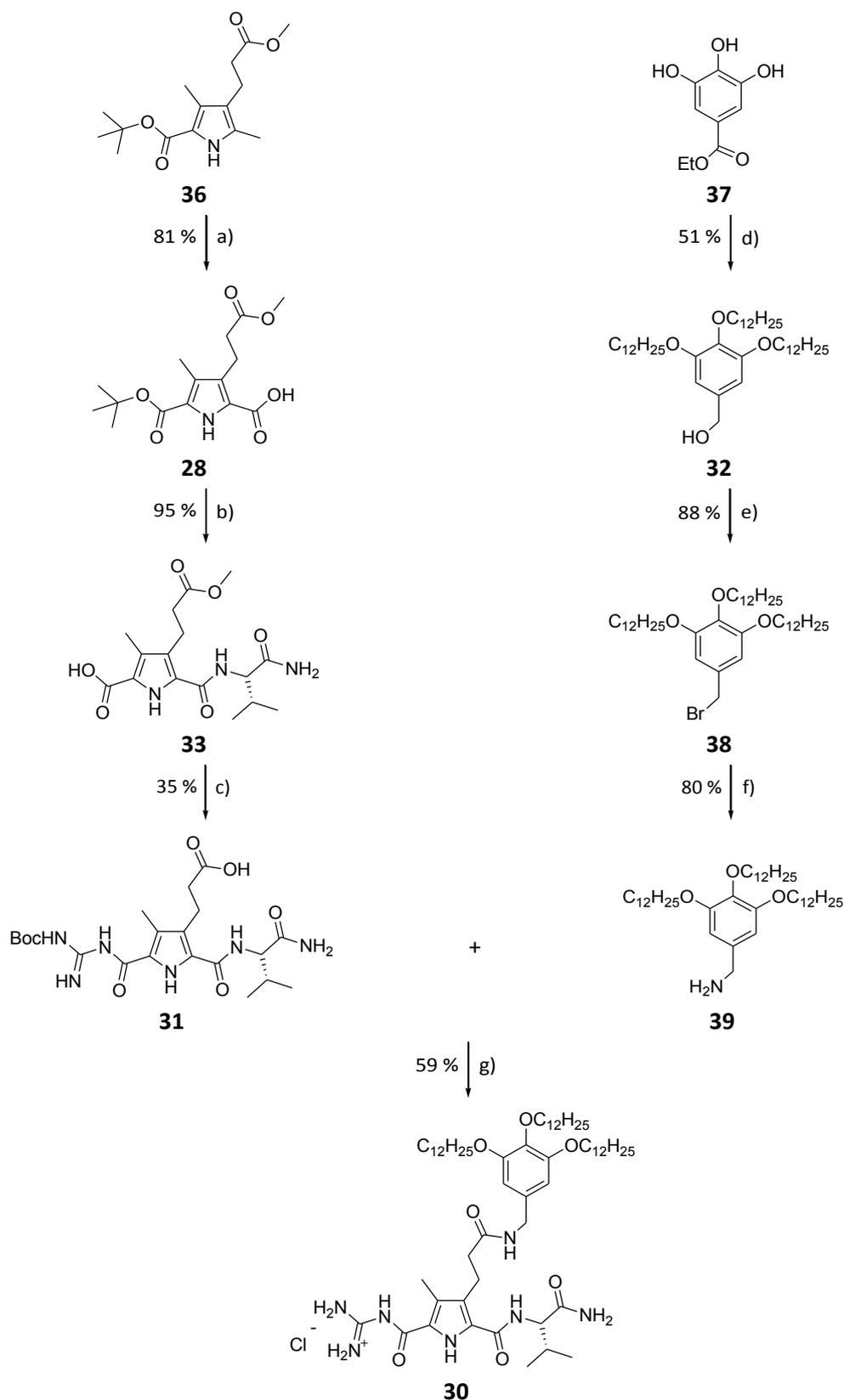
**Fig. 106** Scheme of the receptor-substrate-complex.

In force field calculations the probable structure of the receptor-substrate-complex was obtained. It showed a combination of a salt bridge, hydrogen bonds and  $\pi$ -stacking between the guanidinium cation, the benzyl group and, if applicable, the amino acid's aromatic residue (**Fig. 107**).



**Fig. 107** Force field calculation of receptor **30** and Ac-*L*-Trp-OH. The dodecyl chains of the receptor were omitted for reasons of clarity.

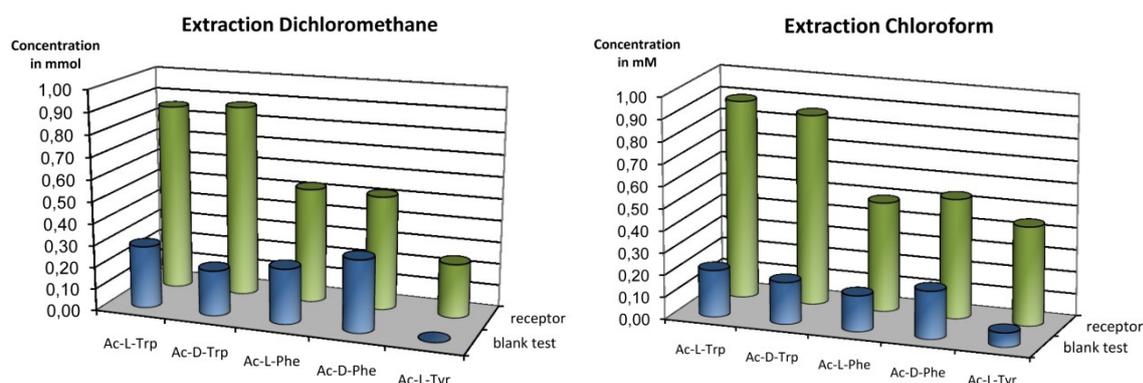
The synthesis started from the pyrrole building block **36**, which is a precursor of a pyrrole triester with three orthogonal ester protecting groups. This allowed introducing the desired components step by step into the molecule, resulting in the successful synthesis of the target molecule **30**. The complete synthesis scheme is shown in **Fig. 108**.



**Fig. 108** Synthesis scheme of membrane transporter **30**:

a) 1. 3.5 eq  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ ; 2.  $\text{NaOAc}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ /dioxane 1:1; b) 1. *L*-Val- $\text{NH}_2$ , PyBOP, NMM, DMAP, DCM/DMF 5:1; 2. TFA/DCM 3:1; c) 1. Boc-guanidine, HCTU, NMM, DCM / DMF; 2.  $\text{LiOH}$ , THF/ $\text{H}_2\text{O}$ ; d) 1.  $\text{BrC}_{12}\text{H}_{25}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF; 2.  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , Ar; e)  $\text{PBr}_3$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ ; f) 1.  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF; 2.  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , Ar; g) 1. HCTU, NMM, DCM, DMF; 2. DCM/TFA; 3.  $\text{HCl}$ .

After the successful synthesis, extraction experiments were carried out to test the receptor's ability to transfer amino acid carboxylates from an aqueous into an organic phase. Aqueous solutions of the acetylated *D*- and *L*-amino acids phenylalanine, tyrosine and tryptophane were extracted with a solution of receptor **30** in chloroform or dichloromethane (**Fig. 109**).



**Fig. 109** Results of the extraction of 2 mM solutions of the aromatic acetylated amino acids in water by a 1 mM solution of receptor **30** in chloroform and dichloromethane. In the diagrams the concentration in the organic phase is shown.

The substrate concentration was determined by UV-measurements of the aqueous phase. The best extractability was attained for Ac-Trp-OH, followed by Ac-Phe-OH and Ac-Tyr-OH.

A new equation was established to calculate the binding constants of the receptor-substrate-complexes with the known  $pK_S$ -values of the substrates and the extraction data with and without receptor (**Tab. 13**).

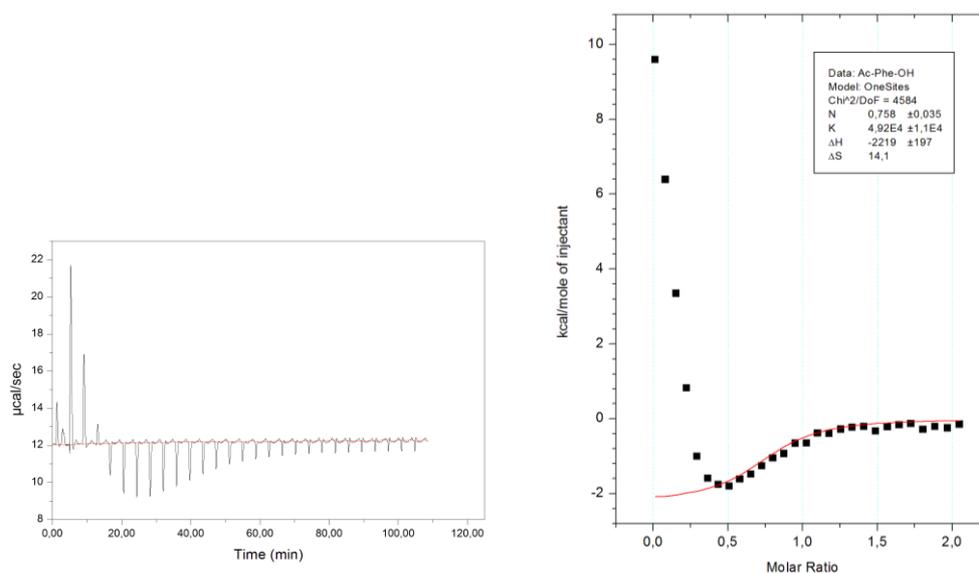
**Tab. 13** Calculated binding constants for the extraction of aromatic acetylated amino acids in water by receptor **30** in chloroform.

Chloroform	$K_{\text{ass}} [\text{M}^{-1}]$	$K_{\text{ass}} [\text{M}^{-1}]$ ( $\emptyset$ both enantiomers)
Ac- <i>L</i> -Trp-OH	$3.17 \cdot 10^4$	$2.77 \cdot 10^4$
Ac- <i>D</i> -Trp-OH	$2.44 \cdot 10^4$	
Ac- <i>L</i> -Phe-OH	$3.94 \cdot 10^3$	$4.49 \cdot 10^3$
Ac- <i>D</i> -Phe-OH	$5.09 \cdot 10^3$	
Ac- <i>L</i> -Tyr-OH	$9.71 \cdot 10^3$	$9.71 \cdot 10^3$

The values of the binding constants followed the order  $\text{Trp} > \text{Tyr} > \text{Phe}$ . In the force field calculations for the complex with the tryptophane derivative a  $\pi$ -stack between the guanidinium cation and the aromatic residue of the amino acid could be seen (**Fig. 107**). This explains the found order of the binding constants, which shows preference for big and electron-rich aromatic residues.

To confirm the binding constants, ITC experiments were conducted. Additionally the thermodynamic parameters enthalpy, entropy and the stoichiometry of the complexes should be determined. Measurements of receptor **30** in chloroform with the *tert*-butylammonium salts of the acetylated amino acids phenylalanine, tyrosine and valine were conducted.

The binding isotherms, which resulted from the measurements, were overlaid by a simultaneous side process. Therefore simple analysis was not possible; instead a partial analysis of an undisturbed area was carried out. Only the area above 0.5 equivalents of substrate was used (**Fig. 110**).

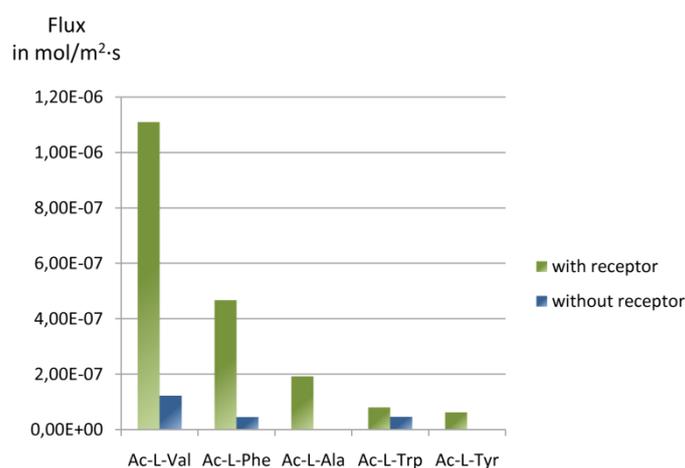


**Fig. 110** Raw data of the ITC titration of tetrabutylammonium-acetylphenylalaninecarboxylate with receptor **30** (left). Binding isotherm with nonlinear regression (red).

For the enthalpy and entropy consistent values could be determined. These were  $3.0\text{--}3.7 \cdot 10^3$  cal/mol resp.  $12\text{--}15$  cal/K for the tyrosine derivative,  $2.2\text{--}2.8 \cdot 10^3$  cal/mol resp.  $14\text{--}16$  cal/K for the phenylalanine derivative and  $1.2\text{--}1.3 \cdot 10^3$  cal/mol resp.  $21$  cal/K for the valine derivative. This incrementation complies with the influence of the aromatic residue, which

increases the binding heat by the  $\pi$ -stacking and decreases the value of the entropy because of the resulting tighter complex. For the binding constant and complex stoichiometry no exact values could be determined because of the overlaying side process. The dimension of the binding constant for the different substrates was in the range of  $10^4$ - $10^5$   $M^{-1}$ , which is quite close to the values from the extraction experiments.

For the evaluation of the transport capabilities various U-tube experiments were conducted. In the first experiments the transport velocities for the acetylated amino acids alanine, valine, tyrosine, phenylalanine and tryptophane with receptor **30** were determined. A gradient from pH 6 in the source phase to pH 8 in the target phase was employed, which led to deprotonation of the receptor near the interface to the target phase. Therefore the substrates were released more easily at this position, resulting in directed transport. The transport velocities were determined by measurements of the concentration of substrate in the target phase by HPLC connected to a UV detector. There were quite strong differences for the substrates' flux values, which followed the order of Val > Phe > Ala > Trp > Tyr. The valine derivative was transported 17 times faster than the tyrosine derivative, with a quite high flux of  $1.11 \cdot 10^{-6}$  mol/m<sup>2</sup>·s. This is close to the highest literature-known value for acetylated amino acids (Fig. 111).



**Fig. 111** Flux values of the different substrates in the U-tube single experiments with substrate concentrations of 50 mM in the source phase and receptor concentrations of 1 mM in the organic phase.

By employing analogous substrate concentrations in the source and target phase, active transport, that is transport against the concentration gradient, could be achieved. The driving force of the transport was the gradient from pH 6 to pH 8 between the source and target phase,

which was diminished by the symport of substrate and a proton. The measured transport velocity was nearly the same as in the single experiment.

In a competitive experiment with a mixture of the various substrates in the source phase different values for flux and selectivity were found. The new order of the transport velocities was now Trp > Phe > Val > Tyr > Ala. Nearly all of the flux values were lower than before with the exception of tryptophane, which had a slightly higher value (**Tab. 14**).

**Tab. 14** Comparison of the flux values of the competitive experiment with the single values. In the competitive experiments the substrates were in 2 mM concentration in the source phase and the organic phase consisted of a 1 mM solution of the receptor in chloroform.

	Flux (competitive) [mol/m <sup>2</sup> s]	Flux (single) [mol/m <sup>2</sup> s]
Ac-Trp-OH	2.10·10 <sup>-7</sup>	8.05·10 <sup>-8</sup>
Ac-Phe-OH	2.03·10 <sup>-7</sup>	4.67·10 <sup>-7</sup>
Ac-Val-OH	1.54·10 <sup>-7</sup>	1.11·10 <sup>-6</sup>
Ac-Tyr-OH	5.65·10 <sup>-8</sup>	6.24·10 <sup>-8</sup>
Ac-Ala-OH	2.30·10 <sup>-8</sup>	1.92·10 <sup>-7</sup>

The change of the values can be explained by the comparison with the thermodynamic data from the extraction experiments. In the single experiments the transport rates were determined by the exchange velocity of the substrates, deriving from the activation energies of the transition states. With direct competition for the receptor, the substrates with higher binding constants were preferred, independent of their transport velocity. The substrates with weaker binding were expelled from the complex and now showed lower transport values. For example, the tryptophane derivative, which showed the highest binding constant, consequently also had the highest transport rate in the competitive experiments, whereas in the single experiments it was the second slowest of all substrates. The phenylalanine derivative with significantly weaker binding strength, which was the second fastest in the single experiments, was slower by more than half in the competitive experiments. The competitive transport experiment is therefore a better depiction of the binding strength and comes closer to the situation in a real cell.

The design of the membrane transporter led, after successful synthesis, to a new transporter, which, in a variety of experiments, showed its notable extraction, binding and transport capabilities for acetylated amino acids. Selective and strong binding was found as well as selective and active transport with high flux values.

## 10 Appendix

### 10.1 Literaturverzeichnis

- [1] Reproduced from  
[http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Biological\\_cell.svg&filetimestamp=20061015174714](http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Biological_cell.svg&filetimestamp=20061015174714) under creative commons licence 2.5.
- [2] D. A. Doyle, J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, J. M. G. Anling Kuo, S. L. Cohen, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Science* **1998**, *280*, 69-77.
- [3] M. A. Hediger, M. F. Romero, J.-B. Peng, A. Rolfs, H. Takanaga, E. A. Bruford, *Pflugers Arch* **2004**, *447*, 465–468.
- [4] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985-2993.
- [5] D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, *44*, 98-104.
- [6] J. M. Lehn, *Pure Appl. Chem.* **1978**, *50*, 871-892.
- [7] J. M. Lehn, *Angew. Chem.* **1988**, *1*, 91-116.
- [8] J. M. Lehn, *Supramolecular Chemistry*, Wiley VCH, Weinheim, **1985**.
- [9] F. Vögtle, *Supramolekulare Chemie*, Teubner, Stuttgart, **1992**.
- [10] D. J. Cram, *Angew. Chem.* **1988**, *27*, 1009-1112.
- [11] C. Schmuck, *Chem. Comm.* **1999**, 843-844.
- [12] C. Schmuck, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 709 - 718.
- [13] C. Schmuck, "Carboxylate Binding by 2-(Guanidiniocarbonyl)pyrrole Receptors in Aqueous Solvents: Improving the Binding Properties of Guanidinium Cations through Additional Hydrogen Bonds" *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 709 - 718. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.
- [14] D. Voet, J. Voet, *Lehrbuch der Biochemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.

- [15] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Biochemie 3. Auflage*, Springer, Heidelberg, **2001**.
- [16] T. M. Devlin, *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 5 ed., Wiley, New-York, **2002**.
- [17] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of The Cell*, 5th ed., Garland Publishing, New York, **2008**.
- [18] D. M. Engelman, *Nature* **2005**, *438*, 578-580. Reproduced with permission. Copyright 2005 Nature Publishing Group.
- [19] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5 ed., Palgrave Macmillan, Greenwich, **2009**.
- [20] J. C. Skou, *Biochim. Biophys. Acta.* **1957**, *23*, 394-401.
- [21] J. W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, Wiley VCH, West Sussex, **2000**.
- [22] L.-O. Essen, U. Koert, *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C* **2008**, *104*, 165-188. - Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry. <http://dx.doi.org/10.1039/b703980h>.
- [23] H. C. Visser, D. N. Reinhoudt, F. d. Jong, *Chem. Soc. Rev.* **1994**, *23*, 75-81.
- [24] B. D. Smith, S. J. Gardiner, T. A. Munro, M.-F. Paugam, J. A. Riggs, *J. Incl. Phenom.* **1998**, *32*, 121-131.
- [25] G. W. Gokel, O. Murillo, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 425-432.
- [26] T. W. Bell, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 711-716.
- [27] G. W. Gokel, A. Mukhopadhyay, *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 274-286.
- [28] J. M. Boon, B. D. Smith, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 749-756.
- [29] T. M. Fyles, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 335-347.
- [30] S. Licena, F. D. Riccardisb, I. Izzob, P. Tecilla, *Curr. Drug Disc. Technol.* **2008**, *5*, 86-97.
- [31] A. P. Davis, D. N. Sheppard, B. D. Smith, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 348-357.

- [32] B. A. McNally, W. M. Leevy, B. D. Smith, *Supramol. Chem.* **2007**, *19*, 29-37.
- [33] J. Stankovic, S. H. Heinemann, J. M. Delfino, F. J. Sigworth, S. L. Schreiber, *Science* **1989**, *244*, 813-817.
- [34] C. J. Stankovic, S. H. Heinemann, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3702-3704.
- [35] G. L. Reddy, T. Iwamoto, J. M. Tomichs, M. Montal, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 14608-14615.
- [36] M. R. Ghadiri, J. R. Granja, L. K. Buehler, *Nature* **1994**, *369*, 301-304.
- [37] M. Engels, D. Bashford, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9151-9158.
- [38] T. D. Clark, L. K. Buehler, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 651-656.
- [39] Reproduced with permission from M. Engels, D. Bashford, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9151-9158. Copyright 1995 American Chemical Society.
- [40] N. Voyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1818-1821.
- [41] N. Voyer, M. Robitaille, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6599-6600.
- [42] Reproduced with permission from N. Voyer, M. Robitaille, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6599-6600. Copyright 1995 American Chemical Society.
- [43] I. Tabushi, Y. Kuroda, K. Yokota, *Tet. Lett.* **1982**, *23*, 4601-4604.
- [44] Reproduced with permission from I. Tabushi, Y. Kuroda, K. Yokota, *Tet. Lett.* **1982**, *23*, 4601-4604. Copyright 1982 Elsevier.
- [45] T. M. Fyles, T. D. James, A. Pryhitka, M. Zojaji, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7456-7468.
- [46] V. E. Carmichael, P. J. Dutton, T. M. Fyles, T. D. James, J. A. Swan, M. Zojaji, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 767-769.
- [47] T. M. Fyles, T. D. James, K. C. Kaye, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12315-12321.
- [48] Reproduced with permission from T. M. Fyles, T. D. James, A. Pryhitka, M. Zojaji, *J. Org. Chem.* 1993, *58*, 7456-7468. Copyright 1993 American Chemical Society.
- [49] G. W. Gokel, *Chem. Comm.* **2000**, *1*, 1-9.

- [50] M. E. Weber, P. H. Schlesinger, G. W. Gokel, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 636-642.
- [51] W. M. Leevy, G. M. Donato, R. Ferdani, W. E. Goldman, P. H. Schlesinger, G. W. Gokel, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9022-9023.
- [52] Reproduced with permission from M. E. Weber, P. H. Schlesinger, G. W. Gokel, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 636-642. Copyright 2005 American Chemical Society.
- [53] V. Percec, D. Schlueter, G. Ungar, S. Z. D. Cheng, A. Zhang, *Macromolecules* **1998**, *31*, 1745-1762.
- [54] V. Percec, A. E. Dulcey, V. S. K. Balagurusamy, Y. Miura, J. Smidrkal, M. Peterca, S. Nummelin, U. Edlund, S. D. Hudson, P. A. Heiney, H. Duan, S. N. Magonov, S. A. Vinogradov, *Nature* **2004**, *430*, 764-768.
- [55] M. S. Kaucher, M. Peterca, A. s. E. Dulcey, A. J. Kim, S. A. Vinogradov, D. A. Hammer, P. A. Heiney, V. Percec, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11698-11699.
- [56] Reproduced with permission from V. Percec, A. E. Dulcey, V. S. K. Balagurusamy, Y. Miura, J. Smidrkal, M. Peterca, S. Nummelin, U. Edlund, S. D. Hudson, P. A. Heiney, H. Duan, S. N. Magonov, S. A. Vinogradov, *Nature* **2004**, *430*, 764-768., 117, 6599-6600. Copyright 2004 Nature Publishing Group.
- [57] P. H. Schlesinger, R. Ferdani, J. Liu, J. Pajewska, R. Pajewski, M. Saito, H. Shabany, G. W. Gokel, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1848-1849.
- [58] V. Sidorov, F. W. Kotch, G. Abdrakhmanova, R. Mizani, J. C. Fettinger, J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2267-2278.
- [59] J. L. Seganish, P. V. Santacroce, K. J. Salimian, J. C. Fettinger, P. Zavalij, J. T. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3334-3338.
- [60] J. L. Seganish, P. V. Santacroce, K. J. Salimian, J. C. Fettinger, P. Zavalij, J. T. Davis "Regulating supramolecular function in membranes: Calixarenes that enable or inhibit transmembrane Cl<sup>-</sup> transport" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3334-3338. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.
- [61] N. Sakai, N. Majumdar, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4294-4295.
- [62] P. Talukdar, G. Bollot, J. Mareda, N. Sakai, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6528-6529.

- [63] Reproduced with permission from P. Talukdar, G. Bollot, J. Mareda, N. Sakai, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6528-6529. Copyright 2005 American Chemical Society.
- [64] M. Newcomb, R. C. Helgeson, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 7367-7369.
- [65] Reproduced with permission from M. Newcomb, R. C. Helgeson, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 7367-7369. Copyright 1974 American Chemical Society.
- [66] M.-F. Paugam, L. S. Valencia, B. Boggess, B. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11203-11204.
- [67] M.-F. Paugam, J. T. Bien, B. D. Smith, L. A. J. Chrisstoffels, F. d. Jong, D. N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9820-9825.
- [68] Reproduced with permission from M.-F. Paugam, J. T. Bien, B. D. Smith, L. A. J. Chrisstoffels, F. d. Jong, D. N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9820-9825. Copyright 1996 American Chemical Society.
- [69] M.-F. Paugam, G. T. Morin, B. D. Smith, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7841-7844.
- [70] G. T. Morin, M.-F. Paugam, M. P. Hughes, B. D. Smith, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2724-2728.
- [71] G. T. Morin, M.-F. Paugam, M. P. Hughes, B. D. Smith, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2724-2728. – Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry. <http://dx.doi.org/10.1021/jo00089a014>.
- [72] V. Kral, S. L. Springs, J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8881-8882.
- [73] J. L. Sessler, A. Andrievsky, P. A. Gale, V. Lynch, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2954-2957.
- [74] J. L. Sessler, A. Andrievsky, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 159-167.
- [75] J. L. Sessler, A. Andrievsky "Efficient Transport of Aromatic Amino Acids by Sapphyrin-Lasalocid Conjugates," *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 159-167. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.
- [76] A. Galan, D. Andreu, A. M. Echavarren, P. Prados, J. d. Mendoza, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1511-1512.

- [77] P. Breccia, M. V. Gool, R. Perez-Fernandez, S. Martin-Santamara, F. Gago, P. Prados, J. d. Mendoza, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8270-8284.
- [78] Reproduced with permission from P. Breccia, M. V. Gool, R. Perez-Fernandez, S. Martin-Santamara, F. Gago, P. Prados, J. d. Mendoza, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8270-8284. Copyright 2003 American Chemical Society.
- [79] H. Boerrigter, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7148-7155.
- [80] H. Boerrigter, L. Grave, J. W. M. Nissink, L. A. J. Christoffels, J. H. v. d. Maas, W. Verboom, F. d. Jong, D. N. Reinhoudt, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4174-4180.
- [81] Reproduced with permission from H. Boerrigter, L. Grave, J. W. M. Nissink, L. A. J. Christoffels, J. H. v. d. Maas, W. Verboom, F. d. Jong, D. N. Reinhoudt, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4174-4180. Copyright 1998 American Chemical Society.
- [82] J. L. Sessler, L. R. Eller, W.-S. Cho, S. Nicolaou, A. Aguilar, J. T. Lee, V. M. Lynch, D. J. Magda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5989-5992.
- [83] J. L. Sessler, L. R. Eller, W.-S. Cho, S. Nicolaou, A. Aguilar, J. T. Lee, V. M. Lynch, D. J. Magda "Synthesis, Anion-Binding Properties, and In Vitro Anticancer Activity of Prodigiosin Analogues," *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5989-5992. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.
- [84] P. V. Santacroce, J. T. Davis, M. E. Light, P. A. Gale, J. C. Iglesias-Sanchez, P. Prados, R. Quesada, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1886-1887.
- [85] Reproduced with permission from P. V. Santacroce, J. T. Davis, M. E. Light, P. A. Gale, J. C. Iglesias-Sanchez, P. Prados, R. Quesada, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1886-1887. Copyright 2007 American Chemical Society.
- [86] J.-P. Behr, J.-M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *18*, 6108-6110.
- [87] Reproduced with permission from J.-P. Behr, J.-M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *18*, 6108-6110. Copyright 1973 American Chemical Society.
- [88] T. L. F. Diederich, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3449-3454.
- [89] T. Li, S. J. Krasne, B. Persson, H. R. Kaback, F. Diederich, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 380-384.

- [90] Reproduced with permission from T. Li, S. J. Krasne, B. Persson, H. R. Kaback, F. Diederich, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 380-384. Copyright 1993 American Chemical Society.
- [91] V. Janout, L.-h. Zhang, I. V. Staina, C. D. Giorgio, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5401-5406.
- [92] V. Janout, I. V. Staina, P. Bandyopadhyay, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9926-9927.
- [93] V. Janout, B. Jing, S. L. Regen, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 351-356.
- [94] V. Janout, B. Jing, I. V. Staina, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4436-4437.
- [95] Reproduced with permission from V. Janout, B. Jing, I. V. Staina, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4436-4437. Copyright 2003 American Chemical Society.
- [96] L. J. Lawless, A. G. Blackburn, A. J. Ayling, M. N. Pérez-Payána, A. P. Davis, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 1329-1341.
- [97] A. P. Davis, L. J. Lawless, *Chem. Comm.* **1999**, *1*, 9-10.
- [98] B. Baragan, A. G. Blackburn, P. Breccia, A. P. Davis, J. d. Mendoza, J. M. P. Carrillo, P. Prados, J. Riedner, J. G. d. Vries, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 2931-2936.
- [99] B. Baragan, A. G. Blackburn, P. Breccia, A. P. Davis, J. d. Mendoza, J. M. P. Carrillo, P. Prados, J. Riedner, J. G. d. Vries "Enantioselective Transport by a Steroidal Guanidinium Receptor," *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 2931-2936. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.
- [100] C. Reichardt, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, 3 ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [101] C. Schmuck, D. Rupprecht, C. Urban, N. Walden, *Synthesis* **2006**, *1*, 89-96.
- [102] C. Schmuck, V. Bickert, M. Merschky, L. Geiger, D. Rupprecht, J. Dudaczek, P. Wich, T. Rehm, U. Machon, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2*, 324-239.
- [103] I. Bury, B. Heinrich, C. Bourgogne, D. Guillon, B. Donnio, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 8396-8413.
- [104] D. Rupprecht, Dissertation, Julius-Maximilians Universität Würzburg, **2006**.

- [105] G. Angelini, C. Giancaspro, G. Illuminati, G. Sleiter, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1786-1790.
- [106] G. Angelini, G. Illuminati, A. Monaci, G. Sleiter, M. Speranza, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *4*, 1377-1382.
- [107] M. Scarsella, G. Sleiter, *Gazz. Chim. Ital.* **1988**, *118*, 757-762.
- [108] S. R. Hartshorn, *Chem. Soc. Rev.* **1974**, *2*, 167-191.
- [109] E. Baciocch, E. Muraglia, G. Sleiter, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2486-2490.
- [110] H. Tamiaki, T. Obata, Y. Azefu, K. Toma, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2001**, *74*, 733-738.
- [111] F. Mohamad, N. G. J. Richards, W. C. Guida, R. Liskamp, M. Lipton, C. Caufield, G. Chang, T. Hendrickson, W. C. Stillh, *J. Comp. Chem.* **1990**, *11*, 440-467.
- [112] V. Bickert, Doktorarbeit, Julius-Maximilians Universität Würzburg, **2008**.
- [113] M. G. Cacace, E. M. Landau, J. J. Ramsden, *Quart. Rev. Biophys.* **1997**, *30*, 241-277.
- [114] W. B. Person, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 167-170.
- [115] D. A. Deranleau, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 4044-4049.
- [116] C. A. Schalley, *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [117] T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, L.-N. Lint, *Anal. Biochem.* **1989**, *179*, 131-137. Reproduced with permission. Copyright 1989 Elsevier Science.
- [118] B. R. Linton, M. S. Goodman, E. Fan, S. A. v. Arman, A. D. Hamilton, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7313-7319.
- [119] M. G. Evans, M. Polanyi, *Trans. Faraday Soc.* **1938**, *34*, 11-24.
- [120] W. P. Jencks, *Chem. Rev.* **1985**, *85*, 511-527.
- [121] M. Bomkamp, C. Siering, K. Landrock, H. Stephan, R. Fröhlich, S. R. Waldvogel, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 3724-3732. "Extraction of Radio-Labelled Xanthine Derivatives by Artificial Receptors: Deep Insight into the Association Behaviour" Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

- 
- [122] C. Schmuck, U. Machon, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1109-1118.
- [123] C. Schmuck, U. Machon, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4385-4392.
- [124] A. G. Ogston, *Nature* **1948**, *162*, 963.
- [125] C. Schmuck, P. Wich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4277-4281.
- [126] H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie, Vol. 2. Auflage*, Wiley-VCH, Weinheim, **1992**.
- [127] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1997**.
- [128] H. G. O. Becker, R. Beckert, G. Domschke, E. Fanghänel, W. D. Habicher, P. Metz, D. Pavel, K. Schwetlick, *Organikum*, 21 ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.

## 10.2 Abkürzungsverzeichnis

Å Angström	g Gramm
AA Amino Acid	ges. gesättigt
Abb. Abbildung	GluT Glucose Transporter
abs. absolutiert	HCTU 5-Chloro-1-[bis(dimethylamino)
Ala Alanin	methylene]-1 <i>H</i> -benzotriazolium-
Asp Asparaginsäure	3-oxid-hexafluorophosphat
BIS-TRIS Bis-(2-hydroxyethyl)aminotris-	Hz Hertz
(hydroxymethyl)methan	IR Infrarotspektroskopie
Boc <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	ITC Isothermale Titrationskalorimetrie
Bn Benzyl	J Joule
°C Grad Celsius	K Kelvin
CBS Carboxylat-Bindungsstelle	K <sub>ass</sub> Assoziationskonstante
Cbz Benzyloxycarbonyl	L Liter
DC Dünnschichtchromatographie	M molar
DCM Dichlormethan	mbar Millibar
DMAP 4-(Dimethylamino)-pyridin	Met Methyl
DMF <i>N, N'</i> -Dimethylformamid	mol Mol
DMSO Dimethylsulfoxid	MS Massenspektrometrie
eq Äquivalent(e)	m/z Masse pro Ladung
Et Ethyl	m Meter
FT-IR Fourier-Transformation-	NMM <i>N</i> -Methylmorpholin
Infrarotspektroskopie	NMR Kernresonanzspektroskopie

---

pa pro analysi	s Sekunde
PE Polyethylen	Sdp. Siedepunkt
Ph Phenyl	SLC Solute Carrier
Phe Phenylalanin	Smp. Schmelzpunkt
pKs Säurekonstante	Tab. Tabelle
ppm parts per million	<i>t</i> -Bu <i>tert</i> -Butyl
PyBOP Benzotriazol-(1-yloxy)-tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat	TFA Trifluoressigsäure
quant. quantitativ	THF Tetrahydrofuran
R Rest	Trp Tryptophan
rac. racemisch	Tyr Tyrosin
R <sub>f</sub> Retentionsfaktor	UV Ultraviolett-Spektroskopie
resp. respectively	Val Valin
rpm rounds per minute	verd. verdünnt
	Zers. Zersetzung