ETH zürich

ETH Library

Zur Chemie von Glykolaldehydphosphat in Liposomen

Doctoral Thesis

Author(s):
Devaquet, Edmée Lydie Marie Jeanne

Publication date:
1998

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-001979392

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Diss. ETH ex. B

Diss. ETH Nr. 12703

Zur Chemie von Glykolaldehydphosphat in Liposomen

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

BIBLIOTHEK ETH ZÜRICH CatE

Vorgelegt von
Edmée Lydie Marie Jeanne Devaquet
geboren am 30. Dezember 1969
von Schifflange (Luxemburg)

Angenommen auf Antrag von:
Prof. Dr. P. L. Luisi, Referent
Prof. Dr. A. Eschenmoser, Korreferent

Zürich 1998

A) Zusammenfassung und Abstract

Zusammenfassung

Die Aufgabe dieser Promotionsarbeit besteht darin, die Effekte der Mikrokompartimentalisierung auf den Verlauf der Synthese von Zuckerphosphaten zu untersuchen. Zuckerphosphate sind die Aldolisierungsprodukte von Glykolaldehydphosphat; letzteres wird ausgehend von *rac*-Oxirancarbonitril, anorganischem Phosphat und Formaldehyd gebildet.

Zu diesem Zweck wurden zunächst Liposomen, bestehend aus 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-3-phosphatidylcholin (POPC, 100 mM) mit eingeschlossenem anorganischen Phosphat hergestellt. Mit der Extrusionsmethode wurden unilamellare Vesikel erhalten, die einen Durchmesser von ca. 125 nm (durch Lichtstreumessungen und Elektronenmikroskopieaufnahmen bestätigt) aufwiesen. Die lokale Konzentration an anorganischem Phosphat betrug 0.5 M im inneren wässrigen Volumen. Der osmotischen Druck wurde durch 0.5 M K_2SO_4 im äusseren Volumen ausgeglichen. Der Phosphatgradient zwischen dem Inneren und dem Äusseren der Liposomen blieb erhalten, da die Lipiddoppelschicht eine Barriere für geladene Moleküle darstellt.

Es konnte gezeigt werden, dass von aussen zugegebenes, neutrales *rac*-Oxirancarbonitril dagegen schnell durch die Lipiddoppelschicht in die Liposomen hineindiffundieren konnte. Dort wurde unter schwach alkalischen Bedingungen (pH ca. 9), durch substitutive Öffnung des Epoxidringes von *rac*-Oxirancarbonitril mittels anorganischem Phosphat effizient endo-liposomales *rac*-Glykolaldehydphosphat-cyanhydrin erhalten. Ausgehend von diesem fand vollständige Übertragung von HCN auf die Carbonylgruppe des von aussen zugesetzten, membran-

durchlässigen (da neutralen) Formaldehyds - unter Ausbildung von Formaldehyd-cyanhydrin und Glykolaldehydphosphat - statt.
Glykolaldehydphosphat, geladen und somit membran-undurchlässig, wurde in den Liposomen zurückbehalten, während Formaldehyd-cyanhydrin, als kleines und neutrales Molekül, mittels Dialyse dem Reaktionssystem entzogen werden konnte.
Bei der Durchführung dieser Reaktionen in wässriger Lösung wurde der irreversible Unterbruch der Aldomerisierungsschritte von Glykol-aldehydphosphat zu höheren Zuckerphosphaten auf die latente Präsenz von CN^--Ionen im Reaktionsgemisch zurückgeführt [80]. Hier zeigt sich ein wesentlicher Vorteil der Kompartimentalisierung der Reaktionen in Liposomen, da CN^--Ionen als membrandurchlässiges Formaldehyd-cyanhydrin während dem Reaktionsgeschehen entfernt werden konnten und eine Weiterreaktion von Glykolaldehydphosphat im selben Umfeld möglich wurde.
Für die folgende endo-liposomale Aldolisierung von Glykolaldehydphosphat in Gegenwart von Formaldehyd war es nötig den pH-Wert im Inneren der Liposomen zu erhöhen. Nach 24 Stunden bei pH 11 konnte im liposomalen Inhalt *rac*-Glycerinaldehyd-2-phosphat und in bescheidener Ausbeute auch *rac*-Ribose-2,4-diphosphat nachgewiesen werden. Da wiederum alle Produkte eine Ladung trugen und die Lipidmembran eine Barriere für geladene Moleküle darstellt, war die Kompartimentalisierung dieser Reaktionen garantiert.

Interessant wäre es die Aldolisierungsreaktionen über einen längeren Zeitraum zu beobachten. POPC-Liposomen wiesen unter den dafür nötigen basischen Bedingungen keine ausreichende Stabilität auf. Mit der Idee Liposomen, bestehend aus hydroylsebeständigeren "Ether-Phospholipiden", als Mikroreaktoren einzusetzen, wurde ein neuer Ansatz für die Weiterführung des Projekts vorgeschlagen.

Abstract

The aim of this work is the investigation of the effect of micro-compartmentalization on the synthesis of sugar phosphates. Sugar phosphates are the products of the aldol reaction of glycolaldehyde phosphate; latter is formed from *rac*-oxirane carbonitrile, inorganic phosphate and formaldehyde.

For this purpose, liposomes composed of 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC, 100 mM) were prepared with inorganic phosphate in the inner water core. With the extrusion-method unilamellar vesicles with a mean diameter of ca. 125 nm (confirmed by dynamic light scattering measurements and electon microscopy pictures) were obtained. The local concentration of inorganic phosphate in the inner water core was 0.5 M. The osmotic pressure was compensated with 0.5 M K_2SO_4 in the outer water core. The phosphate gradient between the inner and the outer water phase of the liposomes was maintained, as the lipid bilayer functions a barrier for charged molecules.

On the other hand, it was possible to show, that the uncharged *rac*-oxirane carbonitrile diffuses fast into the liposomes, when added from the outside. There, under weak alkaline conditions (pH ca. 9), by substitutive ring opening of *rac*-oxirane carbonitrile, efficient endo-liposomal *rac*-glycolaldehyde phosphate cyanohydrin was obtained. Upon external addition of membrane permeable (as neutral) formaldehyde, complete transfer of HCN to the carbonyl group of formaldehyde took place and led to the quantitative formation of formaldehyde cyanohydrin and glycolaldehyde phosphate.

Glycolaldehyde phosphate, charged and consequently membrane impermeable, was retained in the liposomes, while formaldehyde cyanohydrin, small and uncharged, could be withdrawn from the reaction system by dialyses.

The irreversible interruption of the aldomerization steps of glycolaldehyde phosphate to higher sugar phosphates, when carried out in water solution, was attributed to the latent presence of CN^--ions in the reaction mixture [80]. Here appears the fundamental advantage of the compartmentalization, as CN^--ions could be removed as membrane permeable formaldehyde cyanohydrin during the reaction event, and glycolaldehyde phosphate was able to aldomerize in the same environment.

For the following endo-liposomal aldol reaction of glycolaldehyde phosphate in the presence of formaldehyde, it was necessary to raise the pH inside the liposomes. After 24 hours at pH 11 *rac*-glyceraldehyde 2-phosphate and with a modest yield *rac*-ribose 2,4-diphosphate could be traced in the liposomal volume. Again, as all the products were charged, no leakage took place and the compartmentalization was guaranteed.

It would be of big interest to follow the aldol reaction over a longer period of time. However, POPC-liposomes showed a lack of stability under the required basic conditions. The use of liposomes composed of more hydrolysis resistant "ether-phospholipids" as microreactors was proposed to continue this research project.