

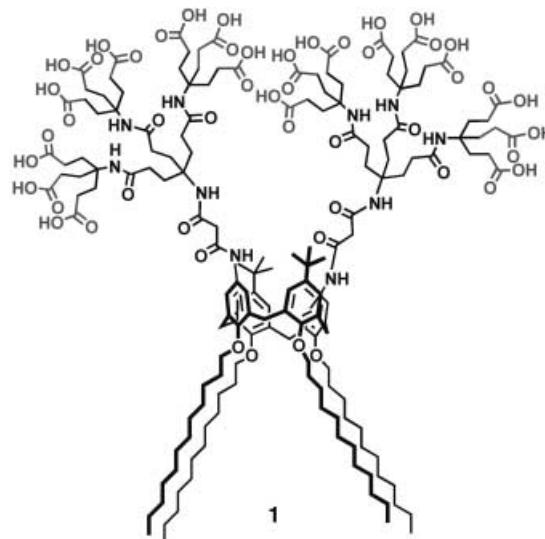
Micellen**Die erste Beschreibung einer strukturdefinierten Micelle****

Michael Kellermann, Walter Bauer, Andreas Hirsch,*
Boris Schade, Kai Ludwig und Christoph Böttcher*

Micellen sind ungebundene, meist sphärische Aggregate, die spontan von amphiphilen Molekülen beim Überschreiten der kritischen Micellbildungskonzentration (cmc) in Wasser oder organischen Lösungsmitteln gebildet werden.^[1] Die Micellbildung ist das Ergebnis des komplexen Zusammenwirkens schwacher ungerichteter abstoßender Kräfte und solvophober Effekte. Micellen sind meistens kurzlebige dynamische Aggregate, die sich schnell ab- und wieder aufbauen. In diesen Fällen können nur durchschnittliche Strukturen und Aggregationszahlen der Micellen bestimmt werden.

Die gezielte Selbstorganisation amphiphiler Moleküle zu präzise definierten stabilen Micellen ist nicht nur eine Herausforderung für die Grundlagenforschung, sondern bietet vielfältige technische Anwendungsmöglichkeiten, z.B. die Herstellung von Kapseln für den effizienten Wirkstofftransport.^[2] Entscheidend für die Bildung definierter Aggregate ist der Aufbau der amphiphilen Bausteine, denn die Information, die die spezifische supramolekulare Struktur bestimmt, muss bereits in der molekularen Architektur der Amphiphile verankert sein. Es wurde postuliert, dass für die Bildung sehr kleiner Aggregate mit starker Krümmung konusförmige Amphiphile mit sterisch anspruchsvollen, geladenen Kopfgruppen und deutlich kleineren hydrophoben Molekülteilen notwendig sind.^[3]

Diese strukturellen Voraussetzungen sind in dem amphiphilen Dendrocalixaren **1** erfüllt, das in einer mehrstufigen Synthese aus kommerziell erhältlichen Ausgangsmaterialien hergestellt werden konnte (siehe Hintergrundinformationen). Wir berichten hier über vollkommen einheitliche und struk-



turtreue Micellen, die spontan aus je sieben Molekülen des amphiphilen **1** in wässriger Lösung gebildet werden und sich bei der Trocknung nicht verformen. Die Struktur wurde mit einer Auflösung von 12 Å durch Kryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (Kryo-TEM) und Techniken zur dreidimensionalen Rekonstruktion bestimmt. Das System ist ein Prototyp für chemisch modifizierbare Nanobehälter, die einheitlich und stabil sind, aber auch reversibel verschlossen werden können, um einen hydrophoben Kern definierter Größe einzubetten.

1 wurde in guter Ausbeute als ockerfarbenes Pulver erhalten. Das Calixarendendrimer wurde NMR- und UV/Vis-spektroskopisch sowie FAB-massenspektrometrisch vollständig charakterisiert. Der ausgeprägte amphiphile Charakter von **1** ergibt sich aus vier C_{12} -Ketten am engen Rand des Calixarengeschwärzts und zwei konvergent synthetisierten, dendritischen Nonacarbonsäurebausteine am weiten Rand.^[4] Außer **1** wurde bisher nur ein amphiphiles Calix[4]arendendrimer, das peripherale Kohlenhydratreste aufweist, beschrieben.^[5] Bei neutralem pH-Wert sind fast alle Carboxygruppen deprotoniert, sodass **1** als oligoanionisches Amphiphil vorliegt. Es löst sich leicht bei Raumtemperatur in Wasser (23 mg mL⁻¹ bei pH 7.2); beim Absenken des pH-Werts auf 4 fällt es aus. Die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln wie Dichlormethan oder Tetrahydrofuran ist gering, doch löst es sich bei 40°C in DMSO.

Das Aggregationsverhalten von **1** wurde mit gepulster Gradienten-Spin-Echo(PGSE)-NMR-Spektroskopie, Einschlussexperimenten und Kryo-TEM untersucht. Die PGSE-NMR-Spektren (Abbildung 1) enthalten nur Signale eines Aggregattyps mit einem Durchmesser von etwa 6 nm. Ähnliche Dimensionen fand man kürzlich bei amphiphilen Calix[4]resorcarens-Glycoclustern, die für den Aufbau artifizieller Viren verwendet wurden.^[6] Der Abbau der Aggregate wurde PGSE-NMR-spektroskopisch bei pH 11 bestimmt.

Die micellaren Eigenschaften von **1** in wässriger Lösung wurden durch seine Fähigkeit belegt, sehr unpolare hexanolösliche Moleküle wie das Porphyrin **2** oder das Fullerendendrimer **3** in die wässrige Phase zu überführen. In einem

[*] M. Kellermann, Prof. W. Bauer, Prof. A. Hirsch
Institut für Organische Chemie
Universität Erlangen-Nürnberg
Henkestraße 42
91054 Erlangen (Deutschland)
Fax: (+49) 9131-85-26864
E-mail: andreas.hirsch@organik.uni-erlangen.de
Dr. B. Schade, Dr. K. Ludwig, Dr. C. Böttcher
Forschungszentrum für Elektronenmikroskopie
Institut für Chemie
Fabeckstraße 36a
Freie Universität Berlin
14195 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-838-56589
E-mail: bottcher@chemie.fu-berlin.de

[**] Die Autoren danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung (DFG AH468/13-1 und Großgeräteinitiative für FU Berlin). Wir danken Dr. Marcus Speck für eine Probe von **2**.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

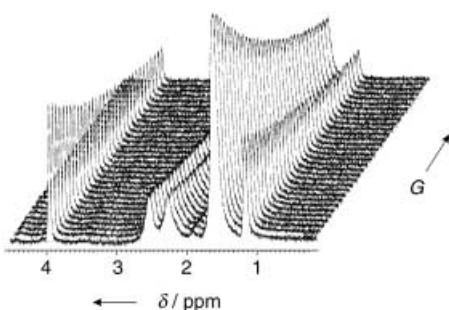


Abbildung 1. Gestapelte Darstellung der ^1H -PGSE-DOSY-NMR-Spektren von **1** bei pH 7.2, aufgenommen mit einem JEOL-Alpha-500-Spektrometer bei 303 K und einer Diffusionsverzögerung von 100 ms. Von vorn nach hinten nimmt die Stärke G des Gradienten in der DOSY-Pulssequenz zu und bedingt einen exponentiellen Abfall des Signals. Kleine Moleküle ergeben einen schnellen Abfall, große Moleküle einen langen Abfall der Signalintensität I . Aus der Auftragung von $\ln(I/I_0)$ gegen G^2 resultiert eine Gerade, aus deren Steigung sich die Diffusionskonstante D ergibt. Durch Einsetzen von D in die Stokes-Einstein-Gleichung wird der hydrodynamische Radius R des Moleküls erhalten. Die maximale Gradientenstärke im Experiment betrug 1.8 T m^{-1} .

Einschlussexperiment wurde **2** in Hexan gelöst und zu einer wässrigen Lösung von **1** gegeben. Nach zwölf Stunden im Ultraschallbad färbte sich die wässrige Phase rot, und die Hexanphase entfärbte sich, was auf den Einschluss von **2** hindeutet. Der Beweis wurde durch NMR- und UV/Visspektroskopische Untersuchungen der wässrigen Phase erbracht. Entsprechende Experimente mit **1** und **3** führten zu ähnlichen Ergebnissen.

Sphärische Micellen aus konventionellen ionischen Detergentien wurden erstmals 1988 durch Kryo-TEM direkt sichtbar gemacht.^[7] Radius und Gestalt ließen sich dadurch ungefähr bestimmen, Strukturdetails konnten jedoch nicht aufgelöst werden. Kryo-TEM Aufnahmen von **1** (Abbildung 2a) enthielten dagegen sehr definierte interne Strukturmuster der Micellen, geeignet zur Auswertung mit Bildverarbeitungstechniken (Ausrichtung, Klassifizierung) und zur dreidimensionalen Rekonstruktion. Diese Techniken werden heute routinemäßig zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur, z.B. von Proteinen, eingesetzt.^[8] Einzelbilder individueller Aggregate mit identischer Raumorientie-

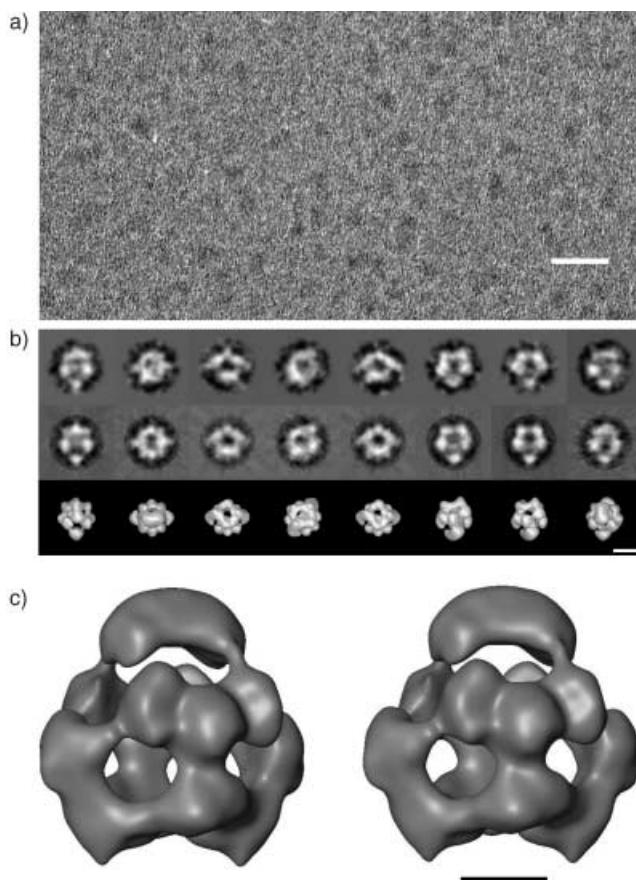
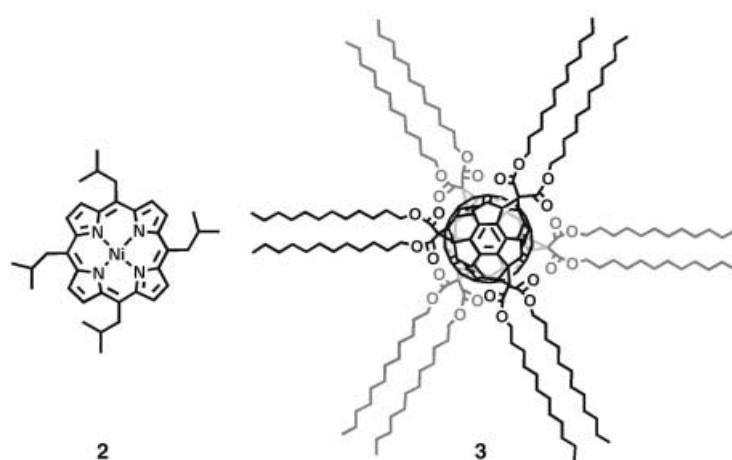


Abbildung 2. a) Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahme von Calixarenmicellen, eingebettet in vitrifiziertem Eis (Maßstab = 100 Å). b) Die erste Reihe zeigt Klassensummenbilder^[9b] von Micellen unterschiedlicher räumlicher Orientierung. Basierend auf den zugehörigen Euler-Winkeln^[9a] wurden aus den Daten dreidimensionale Strukturinformationen mit einer Auflösung von 12 Å gewonnen. Rückprojektionen (zweite Reihe) aus dem errechneten Volumen (dritte Reihe) mit gleichen Euler-Winkeln geben Hinweise auf den Grad der Übereinstimmung mit den experimentellen Daten (Maßstab = 50 Å). c) Stereobild der dreidimensionalen Rekonstruktion (Maßstab = 25 Å).

zung (identischen Euler-Winkeln) können so identifiziert, extrahiert, ausgerichtet und zu einem Klassensummenbild mit verbessertem Signal-Rausch-Verhältnis addiert werden. Abbildung 2b zeigt ausgewählte Klassensummenbilder, von denen insgesamt 180 für eine A-posteriori-Bestimmung der Euler-Winkel und die abschließende Rekonstruktion der dreidimensionalen Struktur verwendet wurden.^[9] Die Methode setzt voraus, dass alle verwendeten Aggregate strukturidentisch sind und sich nur in ihrer räumlichen Orientierung unterscheiden. Die erfolgreiche dreidimensionale Rekonstruktion mit einer Auflösung von 12 Å bestätigt dabei die Strukturtreue der Aggregate. Kleinere oder größere Micellen als die in Abbildung 2c dargestellten wurden nicht gefunden.

Die Rekonstruktion zeigt einen hohlen sphärischen Käfig mit einem Durchmesser von ca. 75 Å und charakteristischen Öffnungen auf der Oberfläche (Abbildung 2c). Eine einfache Volumenrech-



nung ergibt eine Aggregationszahl von etwa 12. Etablierte Micellenmodelle^[10] weisen darauf hin, dass eine sphärische hydrophile Korona aus den vollständig hydratisierten Kopfgruppen die unpolaren Kohlenwasserstoffketten vom polaren Lösungsmittel abschirmt. Die Kopfgruppen sind durch nicht-lineare Abstoßungs Kräfte homogen über die Micellenoberfläche verteilt. Es ist erwiesen, dass die hydrophoben Ketten von Amphiphilen in supramolekularen Aggregaten zu ungeordneten Orientierungen neigen.^[11] Dies könnte erklären, weshalb die Dichteinformation über den inneren hydrophoben Kern bei der Bildverarbeitung herausgemittelt wird. Die Strukturinformation der flexiblen nichtisomorphen unpolaren Kohlenwasserstoffketten fehlt in der Rekonstruktion. Die rekonstruierte Strukturinformation wird daher den räumlich definierten, verhältnismäßig starren Kopfgruppen der Calixarene zugeordnet. Darüber hinaus erlauben die bemerkenswerte Monodispersität sowie die Strukturidentität die Zuordnung von Details in molekularer Größenordnung.

Visuell können exakt sieben Calixarenkopfgruppen in der energieärmsten Konformation (Abbildung 3) sehr genau in

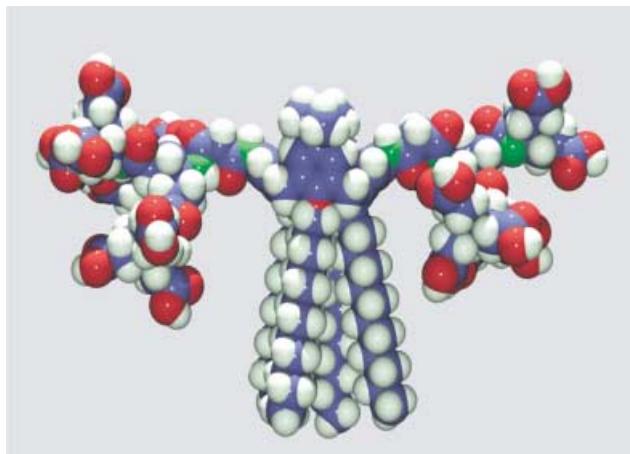


Abbildung 3. Kalottenmodell der energieärmsten Konformation von 1.

die berechnete Dichtekarte eingepasst werden (Abbildung 4).^[12] Eine ungewöhnliche Packung von sieben Molekülen mit C_2 -symmetrischer Anordnung stimmt am besten mit der Rekonstruktion überein: 2 × 2 Moleküle (hellgrün/dunkelgrün und türkis/blauviolett in Abbildung 4c,d) ordnen sich so an, dass einer der polaren Flügel des T-förmigen Moleküls zwischen den beiden polaren Flügeln eines zweiten Moleküls eingebettet ist. Zwei solcher „Dimere“ liegen sich im Aggregat fast genau gegenüber. Ihr Abstand entspricht einer typischen Doppelschichtanordnung (6.7 nm). Drei weitere Moleküle (orange, rot, rotviolett) bilden zusätzliche klammerähnliche Verbindungen, sodass die hydrophoben Kanten der Dimere abgeschirmt werden.

Alternative Anordnungen von sieben Molekülen sind denkbar: In Abbildung 4b ist eine Variante mit C_{2v} -Symmetrie dargestellt, die aus chemischer Sicht sogar wesentlich plausibler erscheint, da hier alle Moleküle chemisch äquivalent sind. Diese Anordnung lässt sich jedoch wesentlich schlechter in die Dichtekarte einpassen. Andere Möglich-

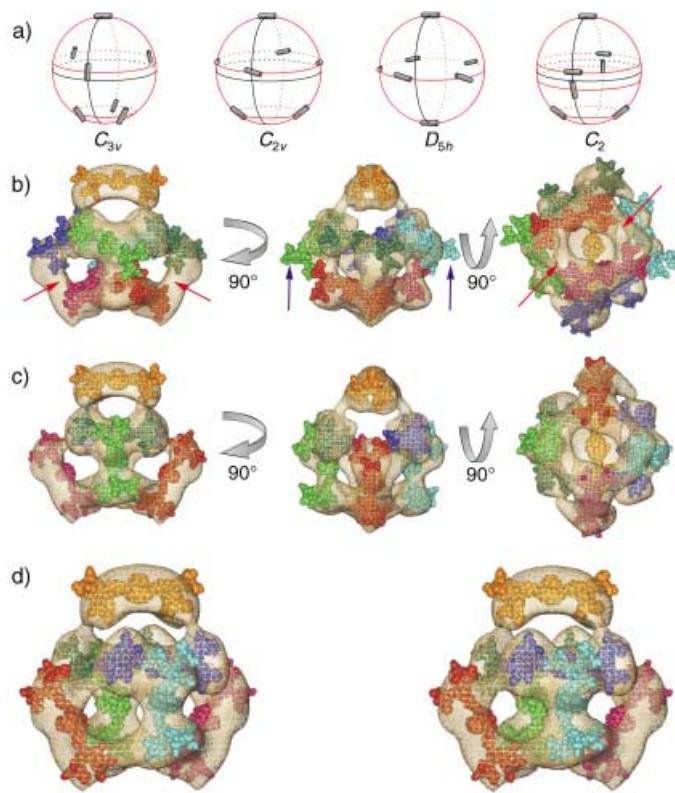


Abbildung 4. a) Einige mögliche Anordnungen von sieben Molekülen auf einer Kugeloberfläche. b) Eine chemisch plausible Anordnung von sieben Calixarenkopfgruppen wurde in die rekonstruierte Dichtekarte eingepasst. Die Pfeile markieren Stellen, an denen die Kopfgruppen und die rekonstruierte Struktur sich nicht decken. c) Beste Übereinstimmung mit der rekonstruierten Struktur bei C_2 -symmetrischer Anordnung der sieben Calixarenkopfgruppen. d) Stereoansicht der C_2 -symmetrischen Anordnung. Hellgrün/dunkelgrün und türkis/blauviolett gekennzeichnete Calixarenmoleküle bilden „Dimere“. Drei weitere Moleküle (orange, rot, rotviolett) schirmen die hydrophoben Kanten der Dimere ab.

keiten, z.B. eine C_{3v} - oder eine D_{5h} -Symmetrie (Abbildung 4a), stimmen nicht mit der Dichtekarte überein und können daher ausgeschlossen werden. Die Struktur ist so stabil, dass sie sogar nach vollständigem Entfernen des Lösungsmittels vor einer elektronenmikroskopischen Untersuchung mit dem gleichen Ergebnis rekonstruiert werden kann (siehe Hintergrundinformationen).

Wir haben erstmals ein Amphiphil synthetisiert, das zu vollkommen einheitlichen und strukturpersistenten Micellen aggregiert. Dies ermöglichte die erste dreidimensionale Strukturcharakterisierung einer Micelle in molekularer Größenordnung. Die T-Form von **1** induziert dabei eine spezifische Faltung, die zur Bildung von Aggregaten mit sehr starker Krümmung führt. Außerdem verringert die spezifische Anordnung geladener Kopfgruppen die Flexibilitäten innerhalb des Aggregats, z.B. durch Wasserstoffbrücken, die durch das Lösungsmittel vermittelt werden. Durch die gerichteten Wechselwirkungen der Kopfgruppen wird ein definiertes Strukturmuster mit charakteristischer Gestalt stabilisiert. Demgegenüber führen ungerichtete Wechselwirkungen bei klassischen Detergensmicellen zu einer eher

flüssigkeitsähnlichen Organisation. Der Einsatz als Transporter für unpolare Wirkstoffe, aber auch eine Reihe anderer Anwendungen sind für diese Micellen denkbar.

Eingegangen am 11. Dezember 2003 [Z53510]
Online veröffentlicht am 2. April 2004

Stichwörter: Amphiphile · Calixarene · Micellen ·
Rastersondenverfahren · Selbstorganisation

-
- [1] J.-H. Fuhrhop, J. König, *Membranes and Molecular Assemblies: The Synkinetic Approach. Monographs in Supramolecular Chemistry*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1994**.
 - [2] J. M. C. A. Kerckhoffs, F. W. B. van Leeuwen, A. L. Spek, H. Kooijman, M. Crego-Calama, D. N. Reinhoudt, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5895–5900; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5717–5722.
 - [3] J. N. Israelachvilli, *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, New York, **1985**.
 - [4] M. Brettreich, A. Hirsch, *Synlett* **1998**, *12*, 1396–1398.
 - [5] R. Roy, J. M. Kim, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 380–384; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 369–372.
 - [6] N. Nakai, T. Kanamori, S. Sando, Y. Ayoama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8465–8475.
 - [7] J. R. Bellare, T. Kaneko, D. F. Evans, *Langmuir* **1988**, *4*, 1066–1067.
 - [8] Elektronenmikroskopische Präparation: a) K. Ludwig, B. Baljinnyam, A. Herrmann, C. Böttcher, *EMBO J.* **2003**, *22*, 3761–3771; Beispiele für dreidimensionale Rekonstruktionen von Proteinen: b) M. M. Golas, B. Sander, C. L. Will, R. Lührmann, H. Stark, *Science* **2003**, *300*, 980–984; c) A. Sali, R. Glaeser, T. Earnest, W. Baumeister, *Nature* **2003**, *422*, 216–225.
 - [9] a) M. van Heel, *Ultramicroscopy* **1987**, *21*, 111–123; b) M. van Heel, G. Harauz, E. V. Orlova, R. Schmidt, M. Schatz, *J. Struct. Biol.* **1996**, *116*, 17–24; c) Details zur Bestimmung der Auflösung: E. V. Orlova, P. Dube, J. R. Harris, E. Beckman, F. Zemlin, J. Markl, M. van Heel, *J. Mol. Biol.* **1997**, *271*, 417–437.
 - [10] a) E. Williams, B. Sears, A. Allerhand, E. H. Cordes, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 4871–4873; b) K. A. Dill, P. J. Flory, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 676–680.
 - [11] D. W. R. Gruen, *J. Colloid Interface Sci.* **1981**, *84*, 281–283.
 - [12] Die energieärmste Konformation von **1** wurde durch MM+ Kraftfeld-Rechnungen (HyperChem 6.01, Hypercube, Inc., Gainesville, USA) erhalten. Pdb-Daten wurden in AMIRA (Indeed-Visual Concepts GmbH, Berlin, Deutschland) importiert. Die visuelle Einpassung in die EM-Dichtekarte wurde mithilfe einer Stereobrille (CrystalEyes, StereoGraphics Corporation, San Rafael, USA) durchgeführt.