

Selbstorganisation von wasserstoffbrückengebundenen Hexameren zu sphärischen und röhrenförmigen Überstrukturen im mikroskopischen Maßstab**

*Michael W. Heaven, Gareth W. V. Cave,
Robert M. McKinlay, Jochen Antesberger,
Scott J. Dalgarno, Praveen K. Thallapally und
Jerry L. Atwood**

Die Fähigkeit zur Steuerung von supra- und supramolekularer Selbstorganisation ist eine Grundvoraussetzung in der supramolekularen Chemie und der Nanotechnologie. Diese Fähigkeit wurde zum Entwurf komplementärer Moleküle genutzt, die interessante sphärische und kapselförmige Architekturen bilden, die – wie auch in der Natur oft der Fall – eine hohe Symmetrie aufweisen.^[1–3] Diese supramolekularen Strukturen haben ein großes Potenzial für die Verabreichung von Wirkstoffen, in der selektiven Katalyse oder der Nachahmung von Zellen. Vergleichbare Beispiele im Bereich der Nanotechnologie und der supramolekularen Selbstorganisation sind komplexe, ineinander greifende Kapseln, die instabile Materialien umschließen,^[4] Reaktionsgeschwindigkeiten erhöhen^[5] oder die Beförderung durch inkompatible Umgebungen ermöglichen.^[6] Kovalente und nichtkovalente röhrenförmige Architekturen werden immer vielversprechender für Anwendungen,^[7,8] und komplexe Kombinationen von Phospholipidbehältern und Nanoröhren sind zum Aufbau mikroskopischer Netzwerke verwendet worden, die den Durchgang von Molekülen über verbindende Röhren ermöglichen.^[9] Biologische Beispiele der Wechselwirkung von Sphären und Röhren sind die Kommunikation zwischen Zellen mittels nanotubularer Zytosomen (untersucht mit Fluoreszenzmarkiertem Weizenkeim-Agglutinin)^[10] und die

[*] M. W. Heaven, Dr. G. W. V. Cave, R. M. McKinlay, J. Antesberger,

Dr. S. J. Dalgarno, Dr. P. K. Thallapally, Prof. J. L. Atwood

Department of Chemistry

University of Missouri-Columbia

601 South College Avenue, Columbia, MO 65211 (USA)

Fax: (+1) 573-882-2754

E-Mail: atwoodj@missouri.edu

Dr. G. W. V. Cave

School of Biomedical and Natural Sciences

Nottingham Trent University

Clifton Lane, Nottingham, NG11 8NS (Großbritannien)

[**] Wir danken der NSF für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, dem University of Missouri Structural Biology Core für technische Unterstützung und die Nutzung des Lichtstreuapparats sowie dem Electron Microscopy Core für die Nutzung der TEM- und SEM-Geräte.



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

Synergie zwischen Amphiphysin und Dynamin in der Clathrin-vermittelten Endozytose.^[11]

Wir beschreiben hier die supramolekulare Selbstorganisation von supramolekularen Nanoarchitekturen zu Sphären, Röhren oder Kombinationen der beiden im Sub-Mikrometermaßstab. Bei elektronen- oder kraftmikroskopischen Untersuchungen zeigt sich, dass diese Überstrukturen miteinander verbunden sind oder knospenförmig aufeinander wachsen. Das fragile Tekton (supramolekularer (diskreter) Baustein; **1₆** oder **3₆·Ga₁₂** in Abbildung 1), eine nahezu

jetzt ist jedoch nur wenig über die Aggregation und die supramolekulare Selbstorganisation dieser lösungsstabilen Ge bilde bekannt.

Mithilfe dynamischer Lichtstreuung (dynamic light scattering, DLS) beobachteten wir bei verschiedenen Pg-Hexameren in verdünnter Lösung (typische Konzentration ca. 10⁻³ M) große supramolekulare Aggregate mit Durchmessern von 80 bis 120 nm.^[18] Ultraschallbehandlung der Lösungen führte zur Bildung von 4 nm großen Gebilden, was darauf hindeutete, dass nun die individuellen Pg-Hexamere vorlagen (Abbildung 1 A). Innerhalb einiger Stunden bildeten sich schließlich wieder die größeren Aggregate, wie sich bei DLS-Untersuchungen zeigte. In wässriger Lösung wurde keine Aggregation beobachtet, DLS zeigt hier lediglich die diskreten Hexamere. Die Stabilität der Aggregate und die Reversibilität der Aggregatbildung in nichtwässrigem Milieu ermöglichen es uns, zur Untersuchung dieser Partikel Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Rasterkraftmikroskopie (AFM) einzusetzen, die zum Teil unerwartete Ergebnisse lieferten.

Nach Verdunstung einer ca. 10⁻⁴ M Acetonlösung des Pg-Hexamers (**1₆**, R = Isobutyl, Abbildung 1 A) unter Normalbedingungen wurden mittels TEM große Aggregate beobachtet (Abbildung 2 A). Es zeigte sich, dass die Partikel sphärisch und von einheitlicher Form waren und einen weiten Bereich von Durchmessern aufwiesen (92 ± 42 nm), wenn sie aus einer Acetonlösung hergestellt wurden. Des Weiteren waren manche sphärischen Aggregate durch röhrenförmige Strukturen verbunden (Abbildung 2 B). Bei der Aggregation spielte die Verdunstungsgeschwindigkeit eine Rolle, denn die Zahl der gefundenen Aggregate nahm ab, wenn ein Lösungsmittel mit höherem Siedepunkt eingesetzt wurde, und zudem ergab sich ein andersartiges Kristallwachstum, wie mittels TEM beobachtet wurde.^[19]

Bei ähnlichen Konzentrationen in Acetonitril (ca. 10⁻⁴ M) oder bei höheren Konzentrationen in Chloroform (ca. 10⁻² M) schichteten sich die sphärischen Aggregate aufeinander, anstatt ineinander zu wachsen (Abbildung 2 C,D). TEM-Untersuchungen wässriger Lösungen von **1₆** zeigten wiederholt amorphes Material anstelle der sphärischen Aggregate. Ethylacetat stellte sich als schlechtes Lösungsmittel für die Aggregatbildung heraus; Gründe sind wohl die Tatsache, dass eine Reihe von Pg-Hexameren leicht aus diesem Lösungsmittel kristallisieren,^[13] und sein vergleichsweise hoher Siedepunkt.^[20]

Für einen direkten Vergleich von Doppelschicht und Hexamer durch TEM wurde **1₆** in der Doppelschicht-Form aus Aceton umkristallisiert, einem Lösungsmittel, von dem bekannt ist, dass es die supramolekulare Ordnung aufrecht erhält, egal ob Hexamer oder Doppelschicht (aus Ethylacetat wird ausschließlich das Hexamer gebildet). Die TEM-Aufnahmen der Doppelschichtstruktur zeigten nur eine begrenzte Zahl sub-mikrometergroßer sphärischer Aggregate neben einer großen Menge amorphen Materials (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Die Tatsache, dass überhaupt sphärische Aggregate vorlagen, deutet darauf hin, dass sich die Doppelschichtstruktur mit der Zeit in eine hexamere Struktur umwandelt. Diese Erscheinung wurde pulvverröntgenographisch (Abbildung S2 in den Hinter-

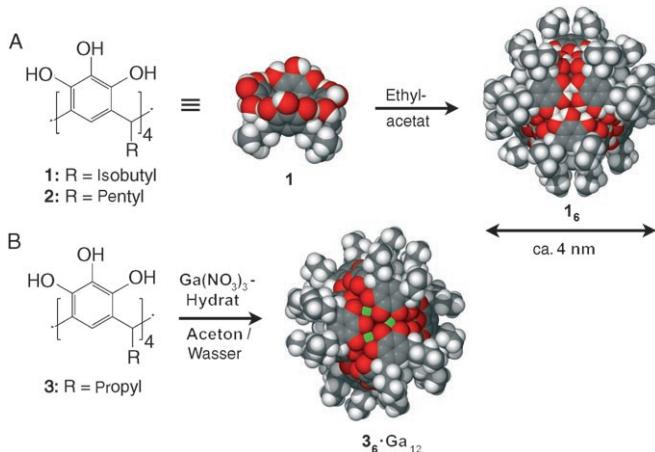


Abbildung 1. Bildung von hexameren Kapseln aus Pyrogallol[4]arenen über Wasserstoffbrücken oder Metallkoordination. A) Kristallisation aus einem geeigneten Lösungsmittel (z. B. Ethylacetat) führt zur Bildung von H-brückengebundenen Hexameren mit abstehenden Alkylketten. Der durchschnittliche Durchmesser eines einzelnen Hexamers im festen Zustand beträgt ca. 4 nm.^[13] B) Reaktion von Galliumnitrat-Hydrat mit **3** in einer Wasser/Aceton-Mischung ergibt metallkoordinierte Kapseln, in denen Wasserstoffatome der Hydroxygruppen der Pyrogallol[4]arene durch Metallzentren ersetzt werden. [grau C, weiß H, rot O, grün Ga; Ethylacetat und Wassermoleküle wurden der Übersichtlichkeit halber weggelassen.]^[23]

sphärische Nanokapsel auf der Basis von Pyrogallol[4]arenen (Pg oder **1–3**, allgemeine Struktur siehe Abbildung 1), wird von 72 Wasserstoffbrücken zusammengehalten. Es hat lipophile Alkylreste wechselnder Länge, die in verschiedenem Maße, abhängig von der Ausgangsverbindung, von der kugelförmigen Schale abstehen.^[12–14] Die durch Wasserstoffbrücken gebildeten „Nähte“ und „Flächen“ des Sphäroiden können je nach Länge der Kohlenstoffkette nach außen offen gelegt werden (zumindest im festen Zustand), und es wird vorgeschlagen, dass diese Einflüsse gemeinsam eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der sub-mikrometergroßen Überstruktur spielen.

Pyrogallol[4]arene kristallisieren je nach Lösungsmittel entweder in einer Doppelschicht oder in einer Anordnung von hexameren Nanokapseln.^[12–14] Die Stabilität dieser Hexamere in sowohl polaren als auch unpolaren Medien wurde in einer Reihe von Untersuchungen der Kapseln in Lösung demonstriert.^[15–17] Tatsächlich wurde diese Stabilität vor kurzem in einer Untersuchung mit fluoreszierenden Molekülen genutzt, die im Innern einer Kapsel gebunden waren, um so Aufschluss über das Kapselinnere zu erhalten.^[14] Bis

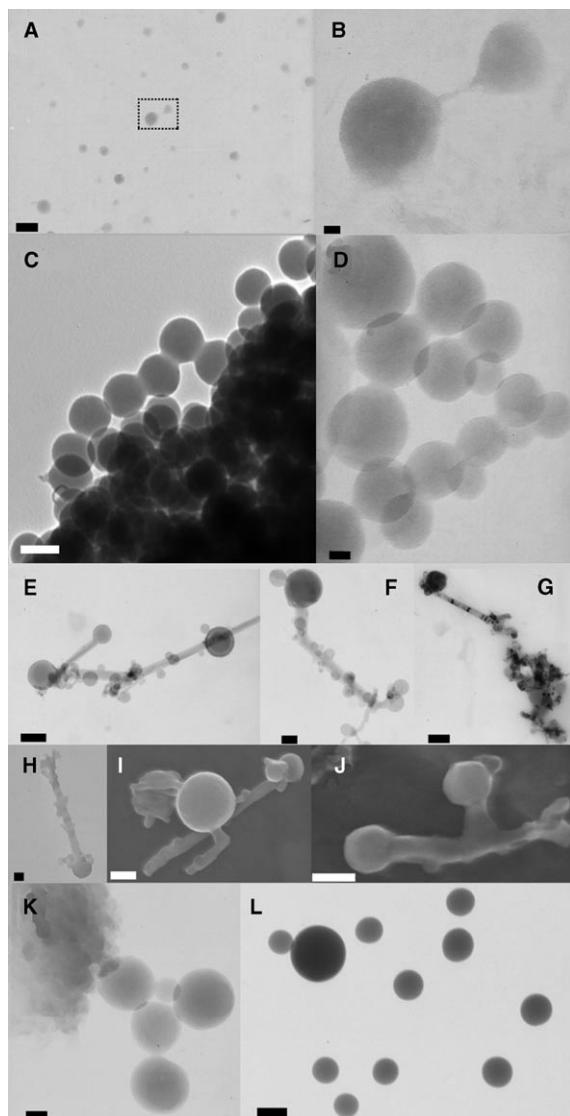


Abbildung 2. TEM- und SEM-Aufnahmen von Aggregaten aus Pyrogallol[4]arenen. A) TEM-Aufnahme von sphärischen Aggregaten aus einer Acetonlösung von $\mathbf{1}_6$. B) Vergrößerung eines Bereichs von (A), der eine röhrenförmige Verbindung zwischen zwei Sphären zeigt. C) TEM-Aufnahme einer Chloroformlösung von $\mathbf{1}_6$, in der die Schichtung der Aggregate sichtbar ist. D) TEM-Aufnahme von sphärischen Aggregaten aus einer Acetonitrillösung von $\mathbf{1}_6$. E, F) TEM-Aufnahmen von Sphären und Röhren aus einer Chloroformlösung von $\mathbf{1}_6$. G) TEM-Aufnahme eines Netzwerks von Sphären und Röhren, das sich aus einer Dichlormethanolösung von $\mathbf{1}_6$ gebildet hat. H)–J) REM-Aufnahmen von Sphären und Röhren aus einer Chloroformlösung. K, L) TEM-Aufnahmen von metallkoordinierten Kapseln $\mathbf{3}_6\text{-Ga}_{12}$, wie sie sich aus einer Acetonlösung bilden. (Maßstäbe: A, G: 200 nm; B, D: 20 nm; C, E, H–J: 100 nm; F, K, L: 50 nm.)

grundinformationen) sowie durch weitere TEM-Untersuchungen aufgeklärt.^[20]

Röhrenartige Verbindungsstücke zwischen einzelnen Sphären ließen sich am einfachsten beobachten, wenn die Proben aus Chloroform- oder Dichlormethanolösungen hergestellt wurden (gelegentlich entstanden solche Ensembles allerdings auch aus Acetonitril und Aceton, Abbildung 2B). Im Allgemeinen hatten diese Röhren kleinere Durchmesser

als die sphärischen Aggregate (die oft an ihren Enden gefunden wurden) und wurden sowohl in einer glatten als auch in einer rauen Morphologie gefunden (Abbildung 2E–J). Die glatteren Röhren, meist mit einer Länge von knapp einem Mikrometer, herrschten dabei vor (Abbildung 2E–I). Die raueren Röhren wurden zumeist aus Chloroformlösungen gebildet, hatten einen größeren Durchmesser und waren kürzer als die glatten Röhren (Längen bis annähernd 400 nm, Abbildung 2J). Die Untersuchung beider Varianten durch TEM und REM zeigte halbkugelartige Gebilde, die den Anschein von sphärischen Aggregaten hatten, die knospenartig auf den Röhren wuchsen (Abbildung 2E,F,H–J). Diese Aggregate verteilten sich statistisch über die ganze Länge der Röhren und hatten vergleichbare Durchmesser.

AFM-Aufnahmen stützen die Befunde der Elektronenmikroskopie hinsichtlich Struktur und räumlicher Höhe der sphärischen Überstrukturen. Eine Untersuchung der Aggregate durch AFM im Kontaktmodus zeigte sphärische Regionen mit Höhen im Bereich von 60 bis 80 nm (aus $\mathbf{2}_6$ gebildete Aggregate, Abbildungen 1A, 3 und S3–S5). Diese Befunde stimmen gut mit jenen aus den DLS- und TEM-Untersuchungen überein.

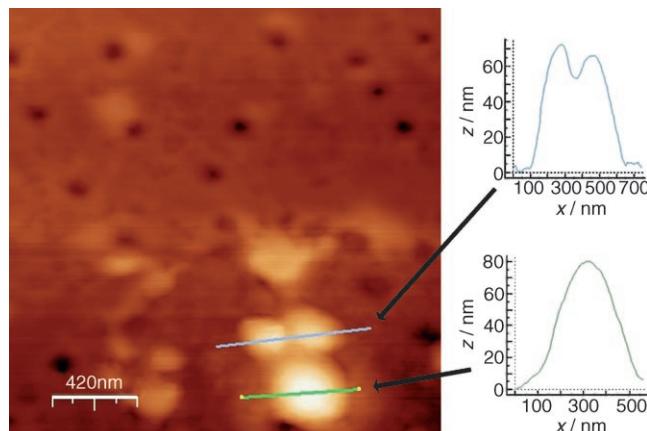


Abbildung 3. AFM-Aufnahme des Hexamers $\mathbf{2}_6$ ($\text{R} = \text{Pentyl}$, Abbildung 1); Messung der Höhe der sphärischen Aggregate.

TEM von metallkoordinierten Kapseln (Hexameren, die in den verwendeten Lösungsmitteln nicht zerfallen können; siehe Ga-koordiniertes Hexamer $\mathbf{3}_6\text{-Ga}_{12}$ in Abbildung 1B) sollte Aufschluss darüber geben, ob diese sub-mikrometergroßen Aggregate aus Doppelschichten von Pyrogallol[4]aren oder aus dessen Hexameren gebildet werden.^[21] Es wurden sphärische Aggregate von ähnlicher Größe wie bei den wasserstoffbrückengebundenen Hexameren beobachtet, wobei die Aufnahmen erheblich dunkler waren, was höchstwahrscheinlich auf den hohen Gehalt an Gallium in den resultierenden Überstrukturen zurückzuführen ist (Abbildung 2K,L). Diese Befunde deuten darauf hin, dass die sphärischen Aggregate tatsächlich aus diskreten hexameren Bausteinen bestehen und nicht auf Doppelschichten beruhen. Dies wird auch durch Untersuchungen von Coleman et al. gestützt, in denen aus *p*-Acylcalix[4]aren feste Lipidnanopartikelchen (solid lipid nanoparticles, SLNs) erzeugt werden

konnten.^[22] Es wurden große Objekte mit Durchmessern von 250 nm beobachtet, die allerdings beim Trocknungsprozess etwas flacher wurden. Aus ihren Untersuchungen leiteten die Autoren ab, dass ihre Objekte solide sind. Liposomale Systeme könnten unter diesen Bedingungen nicht bestehen (sie würden zusammenfallen), und daher folgern wir, dass die Objekte in unseren Untersuchungen ebenfalls solide sind – sie setzen sich aus vielen benachbarten Hexameren zusammen und basieren nicht auf einem Doppelschicht-Motiv (Abbildung 4).

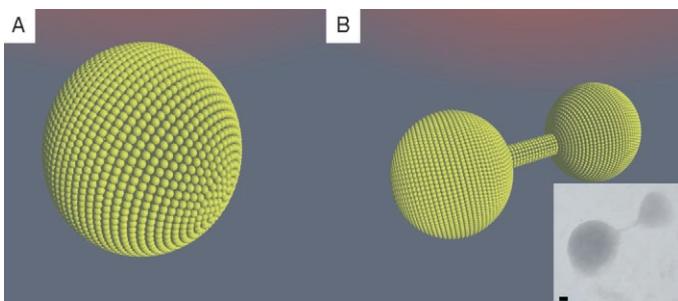


Abbildung 4. Theoretische Darstellung von Hexameren, die sich A) zu sphärischen und B) zu röhrenförmigen Überstrukturen ordnen. Einschub: Negativ von Abbildung 2B, das in (B) modelliert wurde (Maßstab: 20 nm).

Anders als bei nahezu allen Beispielen künstlicher Vesikel-Systeme auf Molekül-Basis findet bei den hier vorgestellten supramolekularen Systemen die Selbstorganisation der Hexamere vor der Bildung der größeren Aggregate statt. Die Eigenschaften des Lösungsmittels sind sehr wichtig bei der Bildung dieser großen Strukturen; so behindert Wasser anscheinend die Bildung der Aggregate, was darauf schließen lässt, dass es die Wechselwirkungen zwischen den Hexameren stört. Die genauen Wechselwirkungen der Hexamere untereinander sind bisher nicht bekannt, diese Aggregation ist jedoch ein allgemeines Phänomen bei einer Reihe von Pyrogallol[4]arenen.^[23]

Die hier gezeigten, großen Aggregate könnten entweder durch eine große Zahl von Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den benachbarten Alkylketten oder durch direkte Wechselwirkungen zwischen den hydrophilen Flächen der einzelnen supramolekularen Gebilde stabilisiert werden, so wie es auch im festen Zustand beobachtet wird.^[13] Nicht zuletzt können die Alkylketten der Nanosphäroide auch mit chemischen Funktionalitäten versehen werden; dies dürfte sich – in Verbindung mit der Möglichkeit, Gastmoleküle in das Innere der Hexamere aufzunehmen – bei zukünftigen Untersuchungen und Anwendungen der hier vorgestellten Aggregate als nützlich erweisen.

Eingegangen am 20. Februar 2006,
veränderte Fassung am 16. Mai 2006
Online veröffentlicht am 25. Juli 2006

Stichwörter: Calixarene · Elektronenmikroskopie · Materialwissenschaften · Selbstorganisation · Supramolekulare Chemie

- [1] J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. MacNicol, F. Vögtle, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 1–II, Elsevier Science, Oxford, 1996.
- [2] C. Li, X. Zhang, Z. Cao, *Science* **2005**, 309, 909–911.
- [3] R. Zandi, D. Reguera, R. F. Bruinsma, W. M. Gelbart, J. Rudnick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 15556–15560.
- [4] J. L. Dye, *Science* **1990**, 247, 663–668.
- [5] A. Koçer, M. Walko, W. Meijberg, B. L. Feringa, *Science* **2005**, 309, 755–758.
- [6] M. Antonietti, S. Förster, *Adv. Mater.* **2003**, 15, 1323–1333.
- [7] R. H. Baughman, A. A. Zakhidov, W. A. de Heer, *Science* **2002**, 297, 787–792.
- [8] S. Fernandez-Lopez, H.-S. Kim, E. C. Choi, M. Delgado, J. R. Granja, A. Khasanov, K. Kraehenbuehl, G. Long, D. A. Weinberger, K. M. Wilcoxen, M. R. Ghadiri, *Nature* **2001**, 412, 452–456.
- [9] A. Karlsson, R. Karlsson, M. Karlsson, A.-S. Cans, A. Strömborg, F. Ryttén, O. Orwar, *Nature* **2001**, 409, 150–152.
- [10] A. Rustom, R. Saffrich, I. Markovic, P. Walther, H.-H. Gerdes, *Science* **2004**, 303, 1007–1010.
- [11] K. Takei, V. I. Slepnev, V. Haucke, P. D. Camilli, *Nat. Cell Biol.* **1999**, 1, 33–39.
- [12] T. Gerkensmeier, W. Iwanek, C. Agena, R. Fröhlich, S. Kotila, C. Nähther, J. Mattay, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 1999, 2257–2262.
- [13] G. W. V. Cave, J. Antesberger, L. J. Barbour, R. M. McKinlay, J. L. Atwood, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 5375–5378; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5263–5266.
- [14] S. J. Dalgarno, S. A. Tucker, D. B. Bassil, J. L. Atwood, *Science* **2005**, 309, 2037–2039.
- [15] L. C. Palmer, J. Rebek, Jr., *Org. Lett.* **2005**, 7, 787–792.
- [16] J. Rebek, Jr., *Angew. Chem.* **2005**, 44, 2068–2078; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2068–2078.
- [17] Y. Cohen, L. Avram, L. Frish, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 524–560; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 520–554.
- [18] Die Pg-Hexamere wurden über eine Zeitspanne von 12 Stunden bis zwei Tagen aus Ethylacetat kristallisiert, mit Ausnahme von $\text{3}_6\text{Ga}_{12}$ (wurde aus Aceton/Wasser kristallisiert). Die Kristalle wurden gewogen, und es wurde die geeignete Menge Lösungsmittel zugegeben, um Stammlösungen der gewünschten Molarität zu erhalten. Alle Proben wurden in Glasampullen aufbewahrt und innerhalb von 12 Stunden nach Auflösen untersucht (außer bei Langzeituntersuchungen). Für analytische Methoden siehe Hintergrundinformationen.
- [19] Dies wurde typischerweise gefunden, wenn Lösungsmittel mit hohem Siedepunkt bei der Probenherstellung eingesetzt wurden. Mit TEM wurde ein Einkristallwachstum beobachtet, wenn Ethylacetat oder eine Wasser/Aceton-Mischung verwendet wurden; geringe Mengen mikrokristallinen Materials wurden gelegentlich auch bei anderen Lösungsmitteln gefunden.
- [20] Eine Acetonlösung wieder aufgelöster Doppelschichtkristalle des Pg-Hexamers I_6 wurde beim Stehen über Nacht wieder in das entsprechende Hexamer umgewandelt, wie durch eine pulvverrörtsenographische und TEM-Untersuchung festgestellt wurde. Die TEM-Untersuchung der Lösung ergab eine Bildung von sphärischen Aggregaten von ca. 80 nm Durchmesser. Die übrige Lösung wurde bei Raumtemperatur verdunstet und der feste Rückstand pulvverrörtsenographisch untersucht. Die Hexamerbildung zeigte sich anhand charakteristischer Reflexe.
- [21] R. M. McKinlay, P. K. Thallapally, G. W. V. Cave, J. L. Atwood, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 5879–5882; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5733–5736.
- [22] P. Shahgaldian, E. Da Silva, A. W. Coleman, B. Rather, M. J. Zawarotko, *Int. J. Pharm.* **2003**, 253, 23–28, zit. Lit.
- [23] Details zur Bildung und Untersuchung von Aggregaten, die auf anderen Pyrogallol[4]aren-Hexameren basieren, finden sich in den Hintergrundinformationen.