

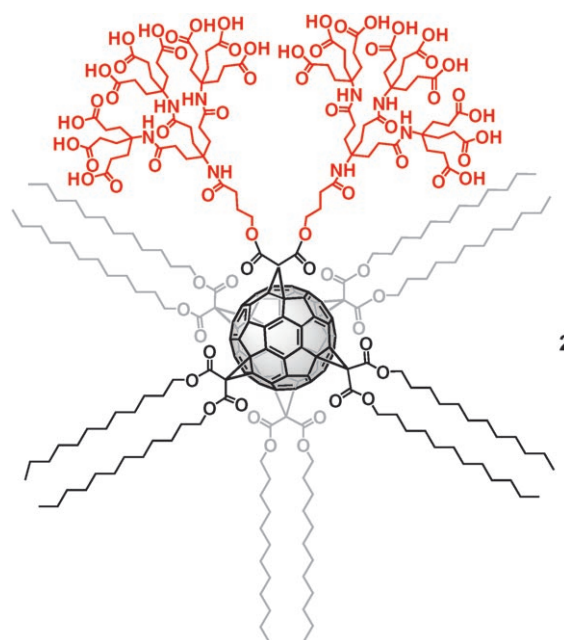
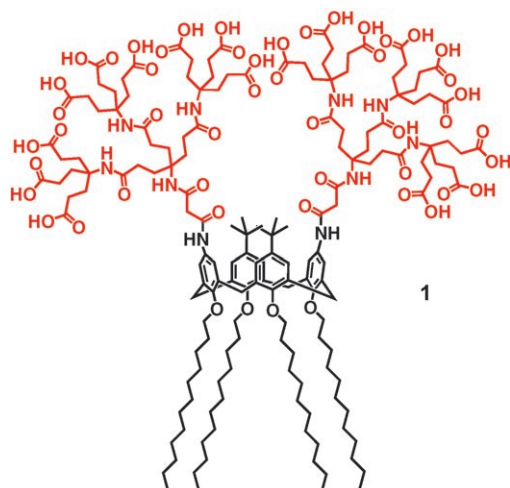
Die supramolekulare Struktur von 5 nm großen sphärischen Micellen mit D_3 -Symmetrie, selbstorganisiert aus einem amphiphilen [3:3]-Hexakisaddukt von C_{60} **

Boris Schade, Kai Ludwig, Christoph Böttcher,* Uwe Hartnagel und Andreas Hirsch*

Wir haben vor einiger Zeit über die Bildung der ersten strukturpersistenten Micellen und ihre dreidimensionale Charakterisierung mithilfe der Kryo-TEM-Technik berichtet.^[1,2] Beispielsweise bildet das amphiphile Calixarendervat **1** in wässriger Lösung stabile, aus exakt sieben Molekülen aufgebaute Aggregate. Dabei wurde deutlich, dass die polaren Kopfgruppen der Moleküle wegen ihrer spezifischen

Form und ihrer Rigidität keine dichte parallele Anordnung zulassen, wie sie für amphiphile Lipide typisch ist.

In dieser sphärischen Anordnung sind die hydrophoben Molekülteile effizient von der polaren wässrigen Umgebung abgeschirmt. Interessanterweise hat nicht nur der große sterische Anspruch der dendritischen Kopfgruppen signifikanten Einfluss auf die Ultrastruktur, sondern auch die Art ihrer chemischen Verknüpfung mit dem hydrophoben Molekülteil. Zum Beispiel sind im amphiphilen Hexakisaddukt **2** die



[*] Dr. B. Schade, Dr. K. Ludwig, Dr. C. Böttcher
Forschungszentrum für Elektronenmikroskopie
Institut für Chemie
Freie Universität Berlin
Fabeckstraße 36a, 14195 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-838-56589
E-Mail: christoph.boettcher@fzem.fu-berlin.de
Homepage: <http://www.fu-berlin.de/fzem/>
U. Hartnagel, Prof. Dr. A. Hirsch
Institut für Organische Chemie
Universität Erlangen-Nürnberg
Henkestraße 42, 91054 Erlangen (Deutschland)
Fax: (+49) 9131-852-6864
E-Mail: hirsch@chemie.uni-erlangen.de
Homepage: <http://www.chemie.uni-erlangen.de/hirsch>

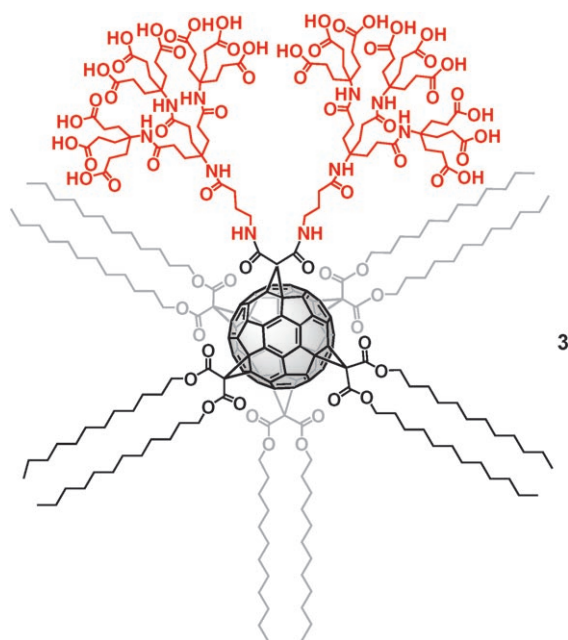
[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für großzügige finanzielle Unterstützung von A.H. (DFG AH468/13-1) und C.B. (DFG BO1000/6-1).



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

dendritischen Kopfgruppen über Esterfunktionen an den Fullerenkäfig geknüpft,^[3] woraus eine ganze Reihe von Aggregatstrukturen resultiert, besonders solche mit ausgedehnten liposomalen Doppelschichtmembranen.

Werden die hydrophilen Dendronen hingegen über Amidbindungen verbunden, wie beim Amphiphil **3**,^[2] werden ausschließlich kleine, sphärische Micellen gebildet. Dieses Verhalten kann auf die ausgeprägte Rigidität der Amidbindungen zurückgeführt werden, die insbesondere eine planare Anordnung wie in liposomalen Membranen unterdrückt. Dieser Effekt kann auch über den pH-Wert gesteuert werden: Während in neutraler Lösung sowohl zylindrische als auch sphärische Aggregate entstehen, werden bei Erhöhung des pH-Wertes auf 9.2 ausschließlich sphärische Micellen mit definierter Struktur und einem Durchmesser von 8.5 nm ge-

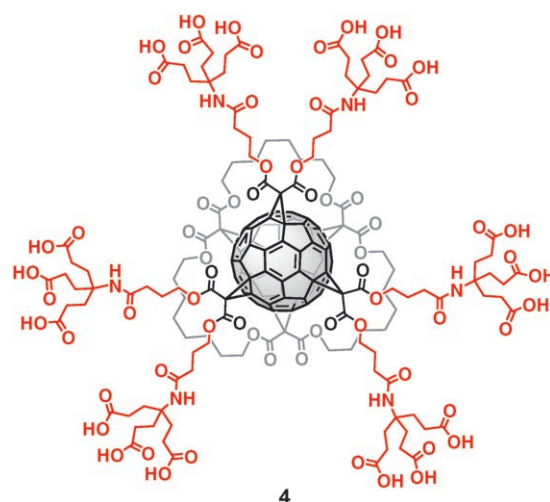


bildet. Diese Micellen sind aus genau acht Einzelmolekülen in einer annähernd kubischen Anordnung aufgebaut. Der Protonierungsgrad der Kopfgruppen bestimmt dabei offensichtlich das Ausmaß ihrer Abstoßung und damit die Größe des Hydrathülle, was Aggregate mit unterschiedlich starker Krümmung bedingt.

Die Tatsache, dass die Bildung solcher Ultrastrukturen in drei Dimensionen verfolgt werden kann, eröffnet die Möglichkeit, die grundlegenden Prinzipien und Abhängigkeiten zwischen Moleküldesign und supramolekularer Struktur zu untersuchen. Da die Variation der Substituenten sich auch in unterschiedlichen Molekülanordnungen niederschlägt (die sich dann in drei Dimensionen charakterisieren lassen), sind alle Voraussetzungen zur Bestimmung der Faktoren erfüllt, die für eine Strukturpersistenz wesentlich sind. Dabei soll untersucht werden, wie die Balance zwischen hydrophobem und hydrophilem Molekülteil je nach Raumerfüllung der beiden Molekülteile das Aggregationsverhalten beeinflusst. Darüber hinaus sind sowohl die Art der chemischen Verknüpfung als auch die Ladungsverteilung mit Bezug auf das Ausmaß der konformativen Freiheit zu berücksichtigen.

Wir berichten hier über die Aggregation des [3:3]-Hexakisadduktes **4**,^[4] das im Unterschied zu **2** und **3** über drei Paare dendritischer Verzweigungen anstelle von nur einem Paar verfügt. Darüber hinaus wurden anders als bei **2** und **3** lediglich Dendronen der ersten Generation verwendet, was einer Reduzierung der Zahl an Carboxygruppen von neun auf drei pro Verzweigung entspricht. Dabei bleibt allerdings die Gesamtzahl an Ladungen in **4** gleich jener in **2** und **3**.

Der hydrophobe Molekülteil von **4** wurde durch die Einführung von trifunktionellen *cyclo*-[3]-Octylmalonat-Addenden^[5] an den drei Positionen, die den Kopfgruppen äquatorial gegenüberliegen, signifikant verkleinert. Der hydrophobe Makrocyclus bedeckt dabei annähernd eine Hemisphäre des Fullerenes, die dem Bereich der drei Paare von Newcome-Dendronen gegenüberliegt. Die negative Ladung



der Carboxylate sollte dabei eine starke Abstoßung und damit räumliche Trennung der Dendronen erzwingen.

Anders als die einfachen Amphiphile nimmt der Tris(malonat-Makrocyclus^[6,7] nur wenig Raum ein: Der maximale Durchmesser eines einzigen Amphiphils beträgt 2.5–3 nm. Die mithilfe von Moleküldynamiksimulationen bestimmte Topologie des Octadecaanions **4** (ohne Gegenionen) ist in Abbildung 1 gezeigt. Zunächst wurde mithilfe eines MM+-Kraftfeldes und anschließender semiempirischer PM3-Rechnung eine energieminierte Struktur erreicht. Diese Startstruktur wurde für eine MD-Simulationsrechnung in eine Wasserbox (40 × 40 × 40 Å³), die 4100 Wassermoleküle

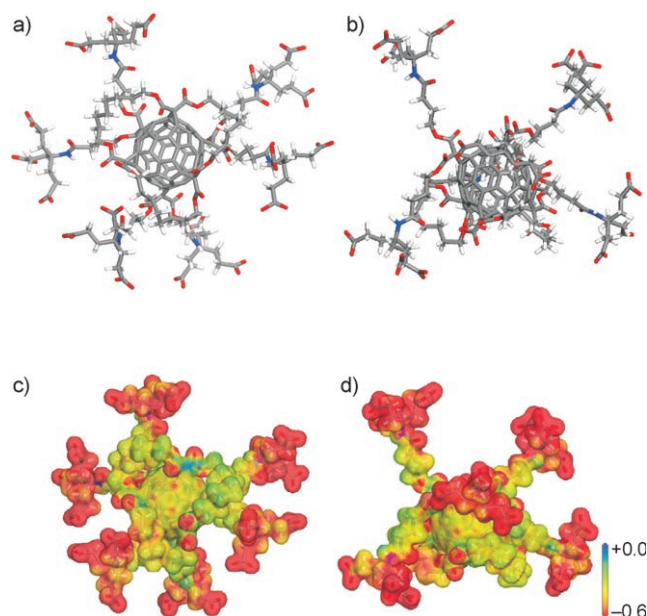


Abbildung 1. a), b) Struktur des Octadecaanions **4** aus Moleküldynamiksimulationen in Wasser; a) Draufsicht, b) Seitenansicht. c), d) Ladungsdichteverteilung $\rho(r)$ der oben gezeigten, berechneten Struktur von **4**. Die beiden Ansichten entsprechen denen in der oberen Reihe. Die MM+- und PM3-Rechnungen erfolgten mit HyperChem.^[9] MD-Simulationsparameter: Heizperiode: 15 ps, Abkühlungszeit: 15 ps, Intervallgröße: 1 fs, Starttemperatur: 0 K, Simulationstemperatur: 370 K, Endtemperatur: 370 K, Temperaturintervall: 0.2 K.

enthält, eingebettet (siehe Hintergrundinformationen). Es wurde eine annähernd C_3 -symmetrische Konformation erhalten.

Die Untersuchungen des Aggregationsverhaltens mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) sollten in erster Linie Aufschluss darüber geben, ob a) durch Verringerung des hydrophoben Molekülteils eine dichtere Packung erreicht wird und ob b) die Verwendung weniger voluminöser Kopfgruppen einen Einfluss auf die Gesamtstruktur der Aggregate hat. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten in der Tat einheitliche und sehr kleine Partikel mit einem Durchmesser von nur 5 nm, die damit deutlich kleiner waren als die des Fullerenderivates **3** (Durchmesser ca. 8.5 nm).

Wegen der geringen Aggregatgröße und dem damit verbundenen niedrigen Kontrast musste ein Kontrastierungsverfahren unter Verwendung von Schwermetallen („Negativkontrastierung“) eingesetzt werden. Dieses Verfahren hatten wir bereits bei unseren Untersuchungen an **1** zusätzlich zur klassischen Kryo-TEM-Technik geprüft, um zu ermitteln, welchen Einfluss die Verwendung eines Kontrastmittels (Phosphorwolframsäure) auf die supramolekulare Struktur hat (siehe Hintergrundinformationen zu Lit. [1]). Die Rekonstruktion einer kontrastierten Probe von **1** zeigte hierbei keine signifikanten Unterschiede zu der aus einer vitrifizierten Probe (=klassische Kryo-TEM) ermittelten Struktur, auch bei völliger Eintrocknung der Probe im Hochvakuum des Mikroskops (=keine Kryo-Fixierung). Der Einsatz der notwendigen kontrastverstärkenden Agentien schien uns daher unbedenklich.

Dem Ansatz der „Einzelpartikelmethode“ entsprechend wurden die mikroskopischen Rohdaten der Einzelaggregate von **4** mithilfe der multivariaten Statistik^[8] untersucht, die die Unterschiede in einem Datensatz von statistisch orientierten Einzelpartikeln ermittelt und Hinweise darauf gibt, ob in den Daten eine Ultrastruktur enthalten ist. Die nachfolgende Datenanalyse ermöglichte eine dreidimensionale Rekonstruktion der Aggregatstruktur nach dem von uns bereits früher vorgestellten Ansatz.^[1,2] Eine einfache Volumenberechnung auf der Basis der oben erwähnten Simulationen weist darauf hin, dass die sehr kleinen Aggregate aus etwa fünf bis sechs Molekülen aufgebaut sind.

Nach einigen iterativen Bildverarbeitungsschritten konnte eine dreizählige Drehachse in den Mikroskopiedaten identifiziert werden. Für den De-novo-Aufbau der Struktur und die nachfolgenden Schritte ihrer Verfeinerung wurde diese C_3 -Symmetrie berücksichtigt. Die Abbildungen 2 und 3 zeigen verschiedene Ansichten der aus 3973 Einzelbildern ermittelten Struktur, in der sogar eine höhere D_3 -Symmetrie zu erkennen ist (siehe Hintergrundinformationen).

Aus diesen Daten konnte die Struktur einer sphärischen Micelle ermittelt werden, die entsprechend der inhärenten Symmetrie in drei identische, S-förmige Motive gegliedert ist. Das Kernvolumen der Micelle, in dem der hydrophobe Molekülteil (Fullerenkäfig + Malonataddukt) lokalisiert sein dürfte, scheint hingegen unstrukturiert zu sein, wie es bereits in früheren Fällen beobachtet wurde.^[1,2] Dieser Befund wird auf die strukturelle Unbestimmtheit des hydrophoben Molekülteils zurückgeführt. Die Mittelung über Tausende ein-

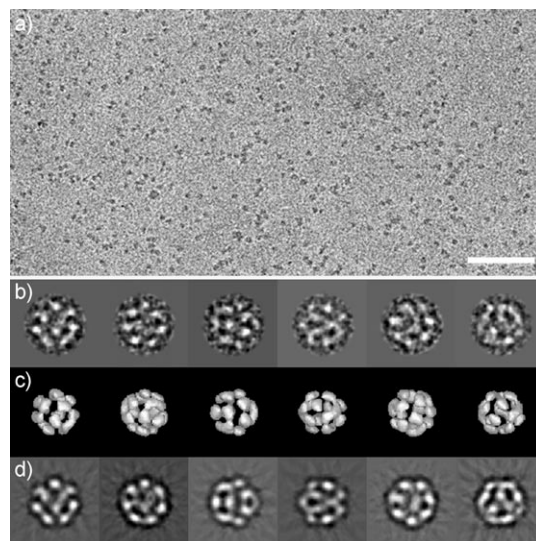


Abbildung 2. Bestimmung der dreidimensionalen Struktur. a) Negativkontrastierte Präparation von **4**, die eine Population einiger zehn individueller Aggregate zeigen (Maßstab = 50 nm). Der Kontrast des aufgenommenen Negativs wurde der besseren Sichtbarkeit halber nicht invertiert. b) Typische räumliche Ansichten (repräsentative Klassensummen) der Micellen (Durchmesser: 5 nm) nach Filterung, Datenkompression mit multivariater statistischer Analyse und automatischer Klassifizierung (Details in den Hintergrundinformationen). c) Die Oberflächenpräsentationen zeigen die zur Reihe von Klassensummen in (b) gehörenden räumlichen Orientierungen der Rekonstruktion. d) Rückprojektionen, die durch Einprojizieren in das Volumen in exakt den Winkeln erhalten wurden, die den Orientierungen in (c) entsprechen. Die Übereinstimmung („3D-Error“) mit der ursprünglichen Projektion (Klassensumme) ist ein Maß für die Verlässlichkeit der Strukturbestimmung.

zelner Objekte ergibt offensichtlich keine definierte Struktur für diesen Teil des Aggregates. Im Bereich der dendritischen Kopfgruppen ist die Struktur hingegen für den gesamten Datensatz präzise bestimmt (eine unbedingte Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung der Einzelpartikelmethode) und kann deshalb für die Berechnung der dreidimensionalen Struktur verwendet werden.

Die Interpretation der Struktur erwies sich wegen der geringen Größe der Aggregate und ihrer ausgeprägten Strukturmerkmale als relativ eindeutig. Unter Berücksichtigung dieser aus der Rekonstruktion erhaltenen Strukturmerkmale lassen sich genau zwei Moleküle in jedes der drei identischen S-förmigen Motive einpassen. Interessanterweise wechselwirkt dabei jeder einzelne dendritische Ast mit nur je einem nächsten benachbarten Ast.

Dieses Phänomen wird durch die wechselseitige Verkipfung der drei identischen Motive ermöglicht. Auf diese Weise wird eine Gesamtstruktur erzeugt, deren molekulares Arrangement eine effiziente Abschirmung des hydrophoben Kerns gegen die wässrige Umgebung ermöglicht. Dabei zeigt sich, dass die Molekülkonformation in den Aggregaten von derjenigen abweicht, die sich aus der Simulation eines Einzelmoleküls in einer Wasserbox ergibt (Abbildung 1). Die spezifische Wechselwirkung der Moleküle ermöglicht offensichtlich eine dichtere Packung der hydrophilen Dendronen,

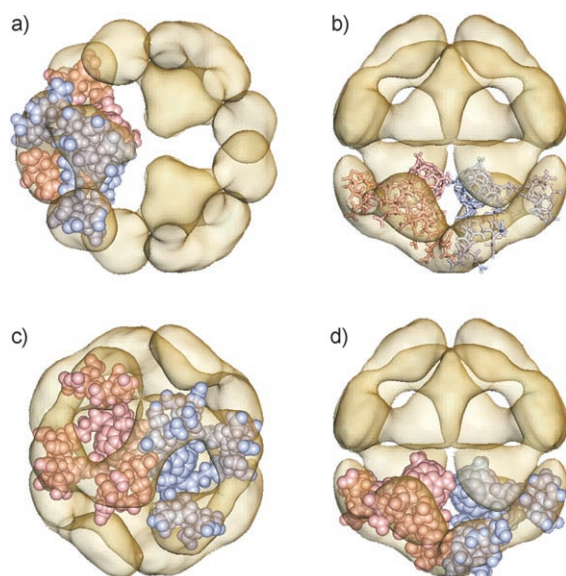


Abbildung 3. Dreidimensionale Rekonstruktion einer Micelle zusammen mit eingepassten Molekülmodellen: Aus Gründen der Übersichtlichkeit und wegen der inhärenten D_3 -Symmetrie genügt die Berücksichtigung von nur zwei von insgesamt sechs Molekülen von **4** für eine repräsentative Darstellung. Die rekonstruierte Struktur ist in einer Oberflächenrepräsentation zusammen mit den visuell eingepassten Moleküldarstellungen abgebildet. a) Kalotten- und b) Stab-Modell von zwei Molekülen (von sechs), wie sie im Aggregat zueinander orientiert sind (= orthogonal zur C_3 -Achse). Die Orientierung der Fullerenkäfige in Richtung des Micellenkerns ist deutlich sichtbar. c) wie (b), jedoch Ansicht der Moleküle entlang der C_3 -Achse; d) wie (c), jedoch 90° um die C_3 -Achse gedreht.

die durch eine stärkere Verlagerung in Richtung der wässrigen Phase erreicht wird.

Die Organisation des Kernvolumens wird durch Einpassen von entsprechenden Molekülmodellen nachvollziehbar (Abbildung 3). Die sechs Fullerenkäfige haben eine recht kompakte Anordnung, die nicht sehr verschieden von einer dichten Kugelpackung ist, dabei aber noch zusätzlich die Malonsäureaddukte einschließt.

Der Aggregationsprozess dieser Art von Amphiphilen scheint im Wesentlichen vom Verhältnis der Volumina des hydrophilen und des hydrophoben Molekülteils angetrieben zu werden. Erstaunlicherweise verhindert die drastische Reduzierung des hydrophoben Molekülteils nicht die Micellbildung, sondern fördert nur die äußerst dichte Packung der Amphiphile. So können die Aggregate der Dendrimere erster

Generation (**4**) wegen ihres geringeren Platzbedarfs (verglichen mit dem der Dendrimere der zweiten Generation, **1–3**) auch kleinere Micellen bilden – sie sind sogar die kleinsten bisher gefundenen strukturpersistenten Micellen. Obgleich also neben der Größe der hydrophilen Molekülteile auch die Dendronengröße reduziert wurde (von der zweiten zur ersten Generation), ist die Aggregatbildung auch bei **4** nicht gehindert.

Derzeit führen wir systematische Untersuchungen durch, die die Frage beantworten sollen, welche Strukturvoraussetzungen die Amphiphile mindestens erfüllen müssen, damit sich strukturpersistente Aggregate bilden. Die so gewonnenen Erkenntnisse sollten die Synthese von maßgeschneidereten supramolekularen Behältern ermöglichen, was von großer Bedeutung für die Nanotechnologie sein könnte.

Eingegangen am 24. November 2006,
veränderte Fassung am 23. Januar 2007
Online veröffentlicht am 30. April 2007

Stichwörter: Amphiphile · Dendrimere · Fullerene · Micellen · Selbstorganisation

- [1] M. Kellermann, W. Bauer, A. Hirsch, B. Schade, K. Ludwig, C. Böttcher, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3019; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2959.
- [2] C. Burghardt, A. Hirsch, B. Schade, K. Ludwig, C. Böttcher, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3036; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2976.
- [3] M. Brettreich, S. Burghardt, C. Böttcher, T. Bayerl, S. Bayerl, A. Hirsch, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1915; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1845.
- [4] U. Hartnagel, B. Balbinot, N. Jux, A. Hirsch, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1785. Die Formeln der Verbindungen **1–4** geben die Neutralverbindungen wieder, da jedoch bei den verwendeten pH-Werten die Carboxygruppen weitgehend deprotoniert sind, wird im Text beispielsweise vom Octadecaanion **4** gesprochen.
- [5] U. Reuther, T. Brandmüller, W. Donaubaue, F. Hampel, A. Hirsch, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 2261. Dort findet sich auch die Definition der verwendeten Nomenklatur.
- [6] J.-H. Fuhrhop, J. Köning, *Membranes and Molecular Assemblies, The Synkinetic Approach. Monographs in Supramolecular Chemistry*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1994**.
- [7] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, New York, **1985**.
- [8] M. van Heel, G. Harauz, E. V. Orlova, R. Schmidt, M. Schatz, *J. Struct. Biol.* **1996**, *116*, 17.
- [9] Hyperchem 7.5, Copyright 2004, Hypercube Inc., <http://www.hyper.com/>.