

# Was ist Kooperativität?

Christopher A. Hunter\* und Harry L. Anderson\*

Allosterische Kooperativität · Chelatbedingte Kooperativität · Kooperative Effekte · Selbstorganisation · Supramolekulare Chemie

Professor Jean-Marie Lehn  
zum 70. Geburtstag gewidmet

## 1. Einleitung: Es geht um alles oder nichts

Kooperativität ist ein zentrales Konzept zum Verständnis der molekularen Erkennung und supramolekularen Selbstorganisation.<sup>[1-3]</sup> Dennoch gibt es eine beträchtliche Konfusion um die Definition und Quantifizierung von Kooperativität, insbesondere im Zusammenhang mit selbstorganisierten Strukturen.<sup>[4-7]</sup> In diesem Essay beschreiben wir zwei Arten von Kooperativität in multivalenten Systemen: allosterische und chelatbedingte Kooperativität. Während das Konzept der allosterischen Kooperativität jederzeit eingängig ist, wird die Bedeutung der chelatbedingten Kooperativität weithin übersehen.

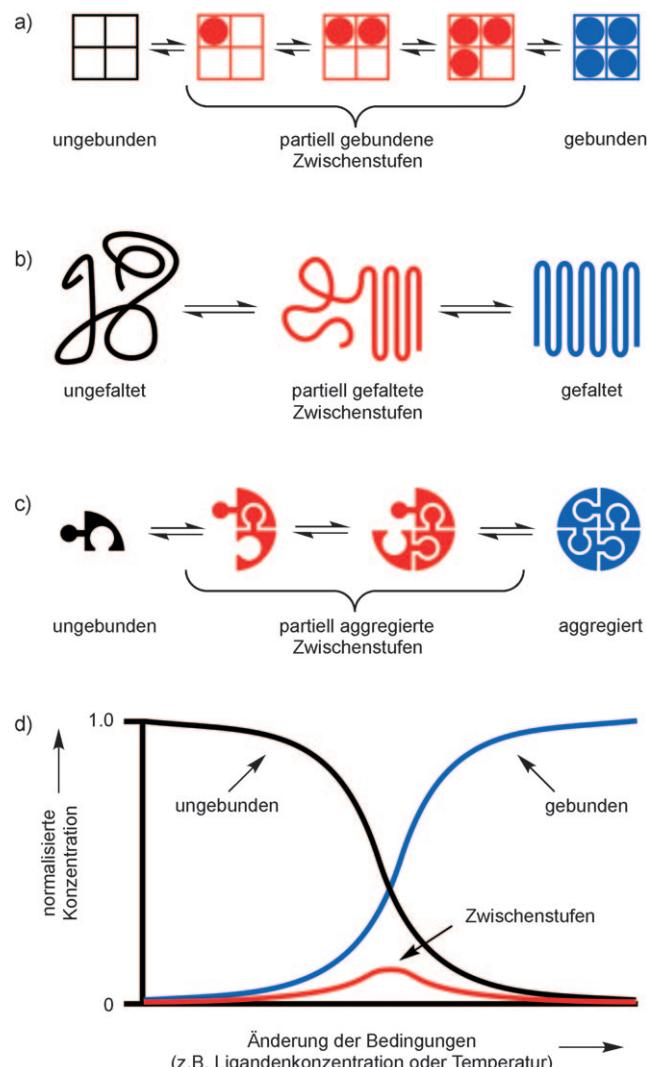
Kooperativität entsteht, wenn sich zwei oder mehr Wechselwirkungen in der Weise beeinflussen, dass sich das System als Ganzes anders verhält, als man aus den Eigenschaften der isolierten Wechselwirkungen erwarten würde. Die Kopplung von Wechselwirkungen kann zu positiver oder negativer Kooperativität führen, je nachdem, ob eine Wechselwirkung eine andere begünstigt oder beeinträchtigt. Kooperativität ist das Schlüsselmerkmal der Systemchemie; hier führt sie zu kollektiven Eigenschaften, die in den molekularen Komponenten nicht vorhanden sind. Sie ist auch eines der wichtigsten Merkmale biologischer molekularer Systeme.<sup>[8]</sup>

Lehrbücher führen oft zwei archetypische Beispiele für Kooperativität an: die Bindung von Sauerstoff an Hämoglobin,<sup>[1]</sup> wobei die Bindung an jede der vier Bindungsstellen die Sauerstoffaffinität der anderen Stellen erhöht (Abbildung 1a), und die Faltung von Biopolymeren (z. B. Proteinen, DNA oder RNA), die durch scharfe Schmelzübergänge gekennzeichnet ist (Abbildung 1b).<sup>[9]</sup> Supramolekulare Selbstorganisationsprozesse zeigen ein ähnliches Verhalten (Ab-

[\*] Prof. C. A. Hunter  
Department of Chemistry, University of Sheffield  
Sheffield S3 7HF (Großbritannien)  
Fax: (+44) 114-222-9346  
E-Mail: c.hunter@shaf.ac.uk  
Homepage: <http://www.chris-hunter.staff.shaf.ac.uk/>

Prof. H. L. Anderson  
Department of Chemistry, University of Oxford  
Oxford OX1 3TA (Großbritannien)  
Fax: (+44) 1865-285-002  
E-Mail: harry.anderson@chem.ox.ac.uk  
Homepage: <http://hla.chem.ox.ac.uk/>

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200902490> zu finden.



**Abbildung 1.** Positiv kooperative Prozesse: a) Bindung von Sauerstoff an Hämoglobin, b) Proteinfaltung und c) supramolekulare Selbstorganisation. d) Speziationsprofile. Bei positiver Kooperativität treten nur kleine Konzentrationen von Zwischenstufen auf, und man beobachtet einen scharfen Übergang vom ungebundenen zum gebundenen Zustand.

bildung 1c). Die Beziehung zwischen diesen unterschiedlichen Arten von Kooperativität ist nicht gut definiert und ist das Thema dieses Essays.

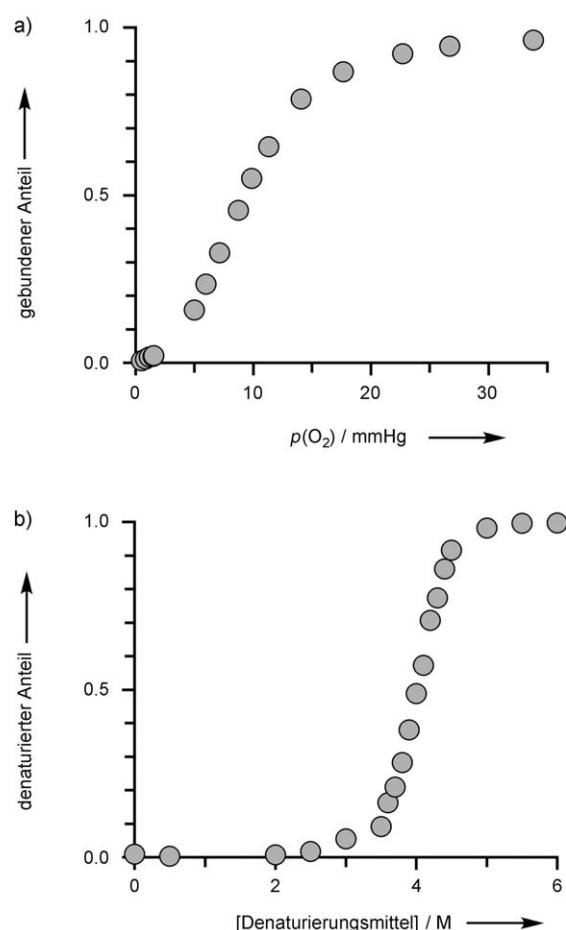
Die drei in Abbildung 1 a–c gezeigten Gleichgewichte verschieben sich, wenn bestimmte äußere Bedingungen verändert werden (Abbildung 1 d; horizontale Achse). Solche Bedingungen sind z. B. 1) die Sauerstoffkonzentration im Fall des Hämoglobins, 2) die Konzentration des denaturierenden Agens oder die Temperatur bei der Faltung von Biopolymen und 3) die Konzentration oder Temperatur bei der supramolekularen Aggregation. Positive Kooperativität ist stets mit einer niedrigen Konzentration von Zwischenstufen verbunden (partiell gebunden, gefaltet oder aggregiert; rot in Abbildung 1). Oder anders ausgedrückt: Wenn das System in den Bereich starker positiver Kooperativität gelangt, sind nur die Extremzustände signifikant bevölkert. Solche Systeme können auf zweierlei Weise ein „Alles-oder-nichts“-Verhalten zeigen:

- 1) **Auf molekularer Ebene:** Jedes Molekül ist wahrscheinlich vollständig gebunden oder vollständig ungebunden; es verbringt wenig Zeit in Zwischenzuständen.
- 2) **Auf makroskopischer Ebene:** Das Verhalten des Ensembles ist dadurch gekennzeichnet, dass die gesamte Population bei einer geringen Konzentrationsänderung von einem hauptsächlich ungebundenen in einen hauptsächlich gebundenen Zustand „umschaltet“. Unter den meisten Bedingungen dominiert ein einziger Zustand, und dieses Verhalten drückt sich in den sigmoidalen Bindungskurven und scharfen Schmelzübergängen aus, die als die klassischen experimentellen Indikatoren für Kooperativität gelten (siehe Abbildung 2 für die Bindung von Sauerstoff an Hämoglobin<sup>[1,10]</sup> und die Denaturierung von Lysozym).<sup>[11]</sup>

Ein solches Alles-oder-nichts-Verhalten ist das entscheidende Kennzeichen positiver Kooperativität. In der Biologie ist dieses Verhalten weit verbreitet: Kleine Änderungen der Bedingungen bewirken ein Umschalten zwischen An- und Aus-Zuständen. Intermediäre Strukturen, die unerwünschte Eigenschaften haben könnten, werden nicht gebildet.

## 2. Thermodynamische Modelle

Als allgemeines Beispiel betrachten wir Mehrkomponentenkomplexe zwischen mehrzähligen Liganden und Rezeptoren mit mehreren Bindungsstellen. Eine breite Vielfalt von supramolekularen Architekturen ist möglich, und die Kopplung zwischen den mannigfachen intermolekularen Wechselwirkungen, die in diesen Komplexen vorliegen, erzeugt unterschiedliche Arten von kooperativem Verhalten. Im Folgenden untersuchen wir die grundlegenden Prinzipien anhand der in Abbildung 3 a–e gezeigten Szenarien. Wir beginnen jeweils mit einfachen Gleichgewichten, an denen Moleküle mit nur einer oder zwei Bindungsstellen beteiligt sind, und extrapolierten dann zu Fällen mit vielen Wechselwirkungen. Eine detaillierte mathematische Analyse der thermodynamischen Modelle befindet sich in den Hintergrundinformationen.



**Abbildung 2.** Experimentelle Isothermen für a) die Bindung von Sauerstoff durch Hämoglobin als Funktion der Sauerstoffkonzentration<sup>[10]</sup> und b) die Denaturierung von Lysozym als Funktion der Guanidinhydrochlorid-Konzentration.<sup>[11]</sup>

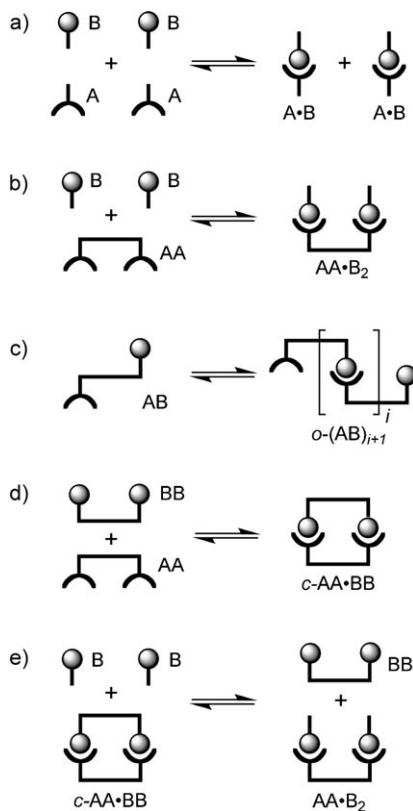
### 2.1. Das Bezugssystem

Wir beginnen unsere Betrachtung mit einem Bezugssystem, in dem keine Kooperativität auftreten kann, weil es nur eine Wechselwirkung gibt: der Komplex zwischen einem Rezeptor mit nur einer Bindungsstelle (A) und einem Liganden mit ebenfalls nur einer Bindungsstelle (B) (Abbildung 3a). Das einfache Zwei-Zustands-Gleichgewicht, dem der Komplex unterliegt, ist durch die Assoziationskonstante  $K$  charakterisiert [Gl. (1)].  $[A \cdot B]$  und  $[A]$  sind die Konzentrationen des gebundenen bzw. freien Rezeptors, und  $[B]$  ist die Konzentration des freien Liganden.

$$K = \frac{[A \cdot B]}{[A] [B]} \quad (1)$$

### 2.2. Allosterische Ligandenbindung

Dieses Szenario gilt für die Art von Kooperativität, wie sie beim Hämoglobin auftritt. Der einfachste Fall zweier Liganden mit jeweils einer Bindungsstelle, die mit einem Rezeptor



**Abbildung 3.** Komplexierungsgleichgewichte unter Beteiligung von Molekülen mit einem oder zwei Bindungsstellen. a) Das Referenzsystem, b) diskrete allosterische Systeme, c) polydisperse Oligomerisierung, d) selbstorganisierte Systeme, e) Denaturierung.

mit zwei kovalent verbundenen Bindungsstellen wechselwirken, ist in Abbildung 4a gezeigt. Der Rezeptor weist drei mögliche Zustände auf: freies AA, partiell gebundenes AA·B und vollständig gebundenes AA·B<sub>2</sub>. Die Gleichgewichte sind durch zwei mikroskopische Assoziationskonstanten  $K_1$  und  $K_2$  charakterisiert, die durch die Gleichungen (2) und (3) definiert sind. Der statistische Faktor 2 spiegelt die Entartung der partiell gebundenen Zwischenstufe wider.<sup>[12]</sup>

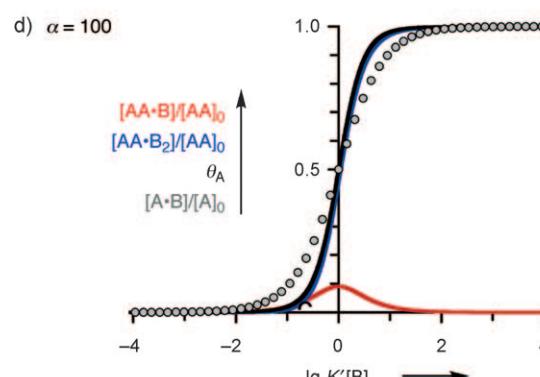
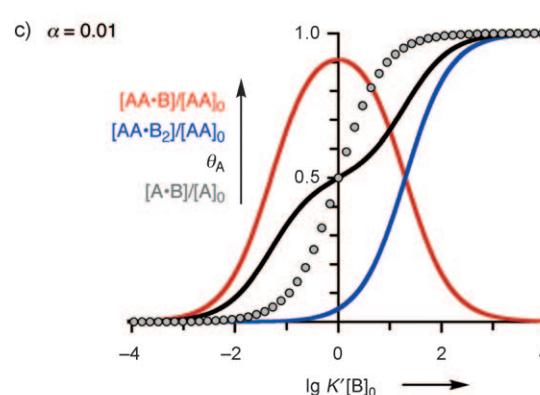
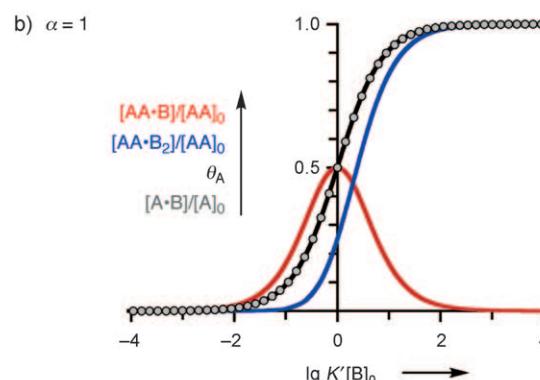
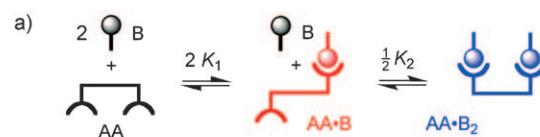
$$2 K_1 = \frac{[AA \cdot B]}{[AA] [B]} \quad (2)$$

$$\frac{1}{2} K_2 = \frac{[AA \cdot B_2]}{[AA \cdot B] [B]} \quad (3)$$

Auf molekularer Ebene wird die Kooperativität des Systems durch den Wechselwirkungsparameter  $\alpha$  beschrieben, der in Gleichung (4) definiert ist.<sup>[13]</sup> Falls keine Kooperativität

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} \quad (4)$$

auftritt, sind die mikroskopischen Assoziationskonstanten identisch mit dem Wert des entsprechenden Referenzrezeptors mit nur einer Bindungsstelle, d. h.  $K_1 = K_2 = K$  und  $\alpha = 1$ .



**Abbildung 4.** a) Wechselwirkung eines monovalenten Liganden B mit einem Zwei-Zentren-Rezeptor AA.<sup>[12]</sup> Spezialisationsprofile für b)  $\alpha = 1$ , c)  $\alpha = 0.01$  und d)  $\alpha = 100$  (blaue Kurve: vollständig gebundenes AA·B<sub>2</sub>; rote Kurve: partiell gebundenes AA·B; schwarze Kurve: Gesamtbesetzung der Bindungsstellen  $\theta_A$ ;  $[B]_0 = [B] + [AA \cdot B] + 2[AA \cdot B_2]$ ). Das Spezialisationsprofil für das Ein-Zentren-Referenzsystem ist ebenfalls gezeigt (graue Punkte). In (d) sind die Populationen von AA·B<sub>2</sub> und  $\theta_A$  praktisch gleich. Der Einfachheit halber wurden alle Kurven für die Bedingung  $[B]_0 \gg [AA]_0$  berechnet.<sup>[14]</sup>

Bei einem gegebenen Satz von Bedingungen ist der Gesamtanteil an Rezeptorzentren, an die Liganden gebunden sind, als die Bindungsstellenbesetzung des Rezeptors  $\theta_A$  de-

finiert [Gl. (5);  $[AA]_0$  ist die Gesamtkonzentration des Rezeptors („frei plus gebunden“):

$$\theta_A = \frac{\frac{1}{2}[AA \cdot B] + [AA \cdot B_2]}{[AA]_0} \quad (5)$$

Die Messung von  $\theta_A$  ist oftmals einfacher als die Konzentrationsbestimmung all der im Gleichgewicht vorliegenden Spezies, und die Beschreibung komplexer Gleichgewichte als Funktion von  $\theta_A$  führt zu einer drastischen Vereinfachung der mathematischen Behandlung.

In Abbildung 4b–d sind Speziationskurven für  $\alpha = 1, 0.01$  und  $100$  aufgetragen, die zeigen, wie  $[AA \cdot B]$ ,  $[AA \cdot B_2]$  und  $\theta_A$  mit  $[B]_0$  variieren ( $K'[B]_0$  ist eine normalisierte Konzentrationsskala).<sup>[14]</sup> Die Besetzungprofile ( $\theta_A$ ) der Zwei-Zentren-Rezeptoren (schwarze Kurven) sind denen des Ein-Zentren-Referenzrezeptors (graue Punkte) gegenübergestellt.

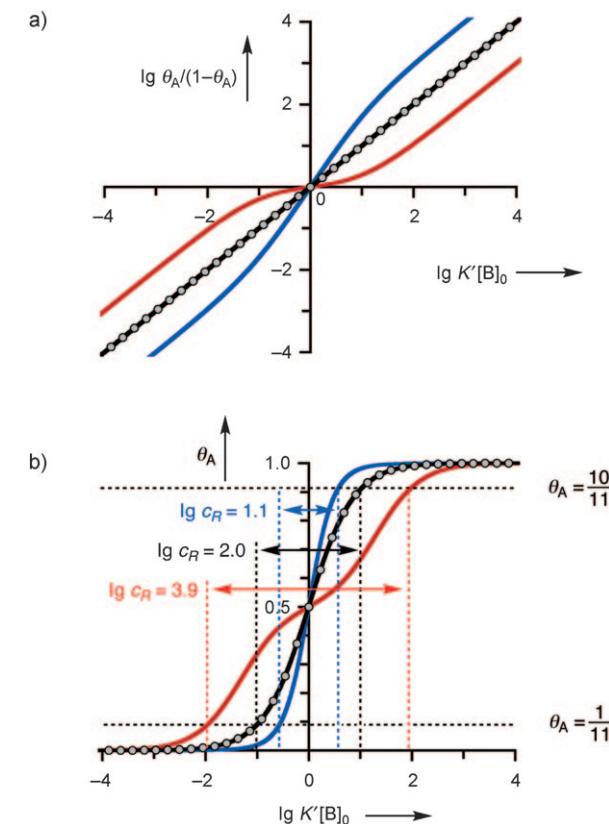
**Keine Kooperativität** ( $\alpha = 1$ , Abbildung 4a). In diesem Bereich gilt  $K_1 = K_2$ , und die  $\theta_A$ -Kurve ist identisch mit der des Ein-Zentren-Referenzsystems.

**Negative Kooperativität** ( $\alpha < 1$ , Abbildung 4c). Hier gilt  $K_1 > K_2$ , und die intermolekulare Wechselwirkung in der Zwischenstufe  $AA \cdot B$  ist stärker als im vollständig gebundenen Zustand  $AA \cdot B_2$ . Der vollständig gebundene Komplex liegt in einem breiteren Konzentrationsbereich vor als der Komplex des Ein-Zentren-Referenzrezeptors. Die Zwischenstufe  $AA \cdot B$  ist die vorherrschende Spezies bei mittleren Konzentrationen, und bei sehr kleinem  $\alpha$  ( $\ll 1$ ) wird der vollständig gebundene Zustand nie bevölkert.

**Positive Kooperativität** ( $\alpha > 1$ , Abbildung 4d). In diesem Fall gilt  $K_1 < K_2$ , und der vollständig gebundene Zustand enthält günstigere Wechselwirkungen als die Zwischenstufe. Bei sehr großen  $\alpha$  ( $\gg 1$ ) wird die Zwischenstufe nicht gebildet, und man beobachtet ein Zwei-Zustands-Verhalten („alles oder nichts“). Bildung und Dissoziation des Komplexes finden in einem schmaleren Konzentrationsbereich statt als beim Referenzsystem.

Auf der makroskopischen Ebene wird Kooperativität in allosterischen Systemen gewöhnlich durch Auftragen von  $\lg \{\theta_A/(1-\theta_A)\}$  gegen  $\lg [B]_0$  in Form einer Hill-Kurve charakterisiert.<sup>[15]</sup> Der *Hill-Koeffizient*  $n_H$  ist die bei 50% Sättigung, d.h. bei  $\lg \{\theta_A/(1-\theta_A)\} = 0$ , gemessene Steigung. Ein einfacher Referenzrezeptor mit nur einer Bindungsstelle ergibt  $n_H = 1$ ; jede Abweichung von diesem Wert zeigt kooperatives Verhalten an (siehe die Hill-Kurven in Abbildung 5a, konstruiert für die drei Bereiche aus Abbildung 4b–d). Negative Kooperativität (rote Kurve) führt zu einer geringeren Steigung ( $n_H < 1$ ), während positive Kooperativität (blaue Kurve) eine größere Steigung bedeutet ( $n_H > 1$ ). Bei höheren und niedrigeren Konzentrationen betragen die Steigungen wieder 1, weil Änderungen in  $\theta_A$  nur durch das erste Bindungsereignis (bei niedrigen Ligandenkonzentrationen) bzw. nur durch das zweite Bindungsereignis (bei hohen Ligandenkonzentrationen) verursacht werden.

Das makroskopische Verhalten von Systemen dieser Art kann auch durch das *Umschaltfenster* („switching window“)  $c_R$  charakterisiert werden [Gl. (6)].

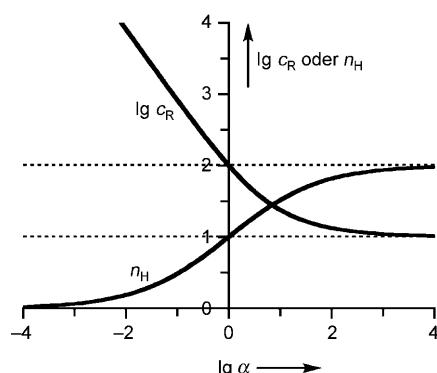


**Abbildung 5.** Auftragungen zur Bestimmung a) des Hill-Koeffizienten  $n_H$  und b) des Umschaltfensters  $c_R$  für den Fall zweier monovalenter Liganden (B), die mit einem Zwei-Zentren-Rezeptor (AA) wechselwirken. Drei Bereiche sind veranschaulicht: keine Kooperativität ( $\alpha=1$ ; schwarze Kurve), negative Kooperativität ( $\alpha=0.01$ ; rote Kurve) und positive Kooperativität ( $\alpha=100$ , blaue Kurve). Die Daten für den Ein-Zentren-Referenzrezeptor sind zum Vergleich gezeigt (graue Punkte).<sup>[14]</sup>

$$c_R = \frac{[B]_0 \text{ bei } \theta_A = 10/11}{[B]_0 \text{ bei } \theta_A = 1/11} \quad (6)$$

$c_R$  ist der faktorielle Anstieg der Ligandenkonzentration, der benötigt wird, um das Verhältnis zwischen gebundenem und freiem Rezeptor von 1:10 nach 10:1 „umzuschalten“ (Abbildung 5b).<sup>[16]</sup> Anders ausgedrückt ist  $c_R$  ein Maß für die Schärfe des Übergangs vom gebundenen in den freien Zustand. Für den einfachen Ein-Zentren-Referenzrezeptor gilt  $\lg c_R = 2$ , und jede Abweichung von diesem Wert zeigt kooperatives Verhalten an (siehe die Beispiele aus Abbildung 4b–d konstruierten Kurven in Abbildung 5b). Positive Kooperativität (blaue Kurve) verringert den Wert von  $c_R$ , d.h., der Wechsel vom gebundenen in den freien Zustand findet in einem schmaleren Konzentrationsbereich statt. Das Gegenteil ist der Fall bei negativer Kooperativität (rote Kurve), und man findet nun ein getrenntes Auftreten der beiden Bindungsereignisse auf der Konzentrationsskala.

Die Beziehung zwischen dem molekularen Parameter  $\alpha$  und den makroskopischen Parametern  $n_H$  und  $c_R$  ist in Abbildung 6 veranschaulicht. Am „nichtkooperativen“ Referenzpunkt gilt  $\alpha = 1$ ,  $n_H = 1$  und  $\lg c_R = 2$ . Bei leicht kooperativen Systemen ist  $n_H > 1$  und  $\lg c_R < 2$ .

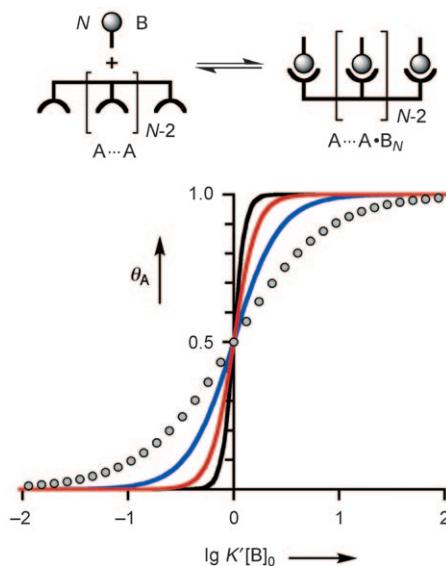


**Abbildung 6.** Beziehung zwischen dem molekularen Parameter  $\alpha$  und den makroskopischen Parametern  $n_H$  und  $c_R$  für die Bindung eines monovalenten Liganden an einen Zwei-Zentren-Rezeptor.

rativen Systemen hängt der Wert von  $n_H$  stark von  $\alpha$  ab. Bei starker negativer Kooperativität ( $\alpha \ll 1$ ) geht  $n_H$  gegen 0 und bei starker positiver Kooperativität ( $\alpha \gg 1$ ) gegen 2. Demgegenüber sinkt  $\lg c_R$  mit steigendem  $\alpha$  und geht bei starker positiver Kooperativität gegen 1. Bei negativer Kooperativität ist  $c_R$  umgekehrt proportional zu  $\alpha$ , da das erste und zweite Bindungseignis auf der Konzentrationsachse einfach weiter auseinanderdriften.

Die Eigenschaften des Zwei-Zentren-Systems können auf Rezeptoren mit großer Zahl  $N$  an Bindungszentren verallgemeinert werden (Abbildung 7). Die Zahl an möglichen Zwischenstufen steigt mit  $N$ , ebenso wie die Zahl an unabhängigen Assoziationskonstanten. Wir betrachten wieder drei Fälle:

**Keine Kooperativität** ( $\alpha=1$ ). In diesem Bereich ist das makroskopische Verhalten des Systems praktisch unabhängig



**Abbildung 7.** Bindung von  $N$  monovalenten Liganden (B) an einen Rezeptor mit  $N$  Bindungsstellen (A...A). Es gibt eine Vielzahl möglicher Zwischenstufen, diese werden aber kaum bevölkert, wenn das System starke positive allosterische Kooperativität zeigt. Bindungsisothermen für obiges Gleichgewicht bei starker positiver allosterischer Kooperativität ( $\alpha \gg 1$ ).  $N=1$  graue Punkte,  $N=2$  blau,  $N=4$  rot,  $N=8$  schwarz.<sup>[14]</sup>

von  $N$ . Obwohl die Speziationsprofile durch die vielen Zwischenstufen kompliziert werden, ist die Konzentrationsabhängigkeit der Besetzung  $\theta_A$  identisch mit der des Ein-Zentren-Referenzsystems;  $n_H = 1$  und  $\lg c_R = 2$ .

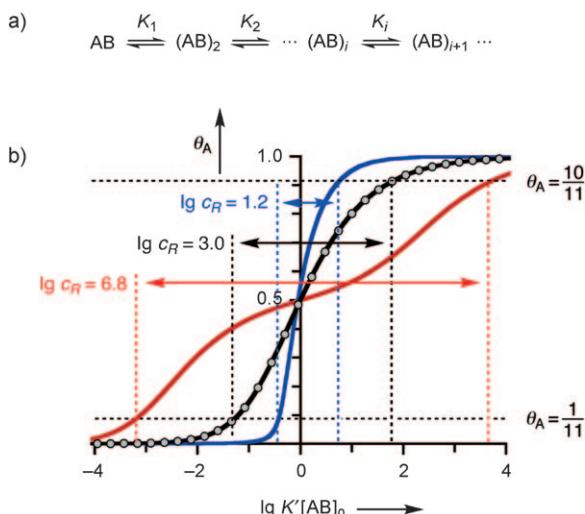
**Negative Kooperativität** ( $\alpha < 1$ ). Auch hier ist das einzige, was sich mit steigendem  $N$  ändert, die Zunahme der Zahl an Zwischenzuständen. Das Konzentrationsfenster, in dem diese Zustände bevölkert werden, wird breiter.

**Positive Kooperativität** ( $\alpha > 1$ ). In diesem Bereich sind die Eigenschaften des Systems stark abhängig von  $N$ . Abbildung 7 veranschaulicht den Einfluss von  $N$  auf die Bindungsisotherme für  $N=2$ , 4 und 8. Mit zunehmendem  $N$  findet der Übergang zwischen freien und gebundenen Zuständen in einem immer schmäler werdenden Konzentrationsfenster statt. Bei hohem  $\alpha$  konvergiert  $\lg c_R$  zu  $2/N$  und  $n_H$  zu  $N$ .<sup>[17]</sup> Infolgedessen werden all die möglichen Zwischenstufen, deren Zahl mit steigendem  $N$  stark ansteigt, niemals bevölkert, und auf molekularer Ebene beobachtet man ein Zwei-Zustands-Verhalten. Im Grenzfall großer  $N$ - und großer  $\alpha$ -Werte genügt schon eine kleine Konzentrationsänderung des Liganden, um zwischen den freien und gebundenen Zuständen des Rezeptors umzuschalten, sodass das System auf makroskopischer Ebene ein Alles-oder-nichts-Verhalten zeigt.

In biologischen Systemen ist allosterische Kooperativität ausführlich untersucht worden; Beispiele sind die Bindung von Sauerstoff an Hämoglobin<sup>[1]</sup> und die Bindung von Peptiden an das Vancomycin-Dimer.<sup>[18]</sup> Es gibt eine Vielzahl von Mechanismen, die zu positiver oder negativer allosterischer Kooperativität führen können, z.B. Konformationswechsel,<sup>[2,19]</sup> elektronische Polarisation des Rezeptors<sup>[20]</sup> oder langreichweite elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Liganden.<sup>[18]</sup> Die trivialste Ursache für negative Kooperativität ist eine sterische Abstoßung zwischen zwei gebundenen Liganden. Die Einzelheiten übersteigen den Rahmen dieses Essays; ganz allgemein gilt aber, dass positive Kooperativität erreicht werden kann, indem man entweder das erste Bindungseignis ungünstiger oder aber nachfolgende Bindungseignisse günstiger macht.

### 2.3. Nukleation und Wachstum polydisperser offenkettiger Oligomere

Die kooperative Oligomerisierung ist ein wichtiger Vorgang bei der Aggregation von Amyloiden,<sup>[21]</sup> Actinsträngen<sup>[22]</sup> und supramolekularen Polymeren.<sup>[23]</sup> Wir betrachten die einfachen Modelle in Abbildung 3c und 8a, um diese Prozesse zu verstehen. Das Monomer AB bildet durch Selbstorganisation eine Verteilung von Oligomeren  $(AB)_i$  mit  $i = 1 \dots \infty$ . Wenn alle Assoziationskonstanten identisch sind ( $K_i = K$ ), resultiert eine isodesmische Verteilung, d.h. ein konzentrationsunabhängiges statistisches Gemisch von Oligomeren. Die Bindungsisotherme, die man bei dieser Art von nicht-kooperativem Prozess beobachtet, ist identisch zu der Isothermen, die bei der Verdünnung einer 1:1-Mischung von A und B erhalten wird (Abbildung 8, schwarze Kurve und graue Punkte).



**Abbildung 8.** a) Allgemeines Schema für die Oligomerisierung eines selbstkomplementären Moleküls AB mit Bindungsisothermen für  $\alpha=1$  (schwarz),  $\alpha=0.01$  (rot) und  $\alpha=100$  (blau) mit den entsprechenden Umschaltfenstern  $c_R$  ( $K_i=K_2$  für alle  $i>1$  und  $\alpha=K_2/K_1$ ). Die Bindungsisotherme für die Verdünnung einer 1:1-Mischung von A und B ist zum Vergleich gezeigt (graue Punkte).<sup>[14]</sup>

Im Prinzip ist jede beliebige Verteilung von Assoziationskonstanten möglich. Wir werden ein einfaches Szenario betrachten, das zu makroskopischer Kooperativität bei der Bildung von polydispernen offenkettigen Aggregaten führt:<sup>[22,24]</sup> Alle Assoziationskonstanten für die Addition einer Monomereinheit an oligomere Ketten sind identisch ( $K_2$ ), mit Ausnahme der Bindungskonstanten für das Dimer ( $AB_2$ ) ( $K_1$ ). Auch hier ist der allosterische Wechselwirkungsparameter als  $\alpha=K_2/K_1$  definiert. Wir unterscheiden erneut drei Fälle (Abbildung 8b):

**Keine Kooperativität** ( $\alpha=1$ ). Isodesmisches Kettenwachstum mit einer statistischen Verteilung von Oligomeren.

**Negative Kooperativität** ( $\alpha<1$ ). Das Dimer ist die stabilste Spezies, sodass die Oligomerisierung erst stattfindet, wenn sehr hohe Konzentrationen von AB erreicht werden.

**Positive Kooperativität** ( $\alpha>1$ ). Das Dimer ist die am wenigsten stabile Spezies und wird praktisch nicht gebildet. Die Bildung des Dimers ist ein Keimbildungsschritt; die nachfolgende Oligomerisierung findet in einem schmalen Konzentrationsfenster statt, und das System zeigt makroskopische Kooperativität. Die hauptsächlich gebildeten Spezies sind das Monomer und langkettige Oligomere.

Die Bindungsisothermen in Abbildung 8b ähneln zwar denen der allosterischen Rezeptor-Ligand-Systeme (Abbildung 5b), sie sind aber nicht symmetrisch zum Ursprung der Konzentrationsskala. Der Grund ist, dass Selbstorganisationsprozesse durch Verdünnungsexperimente, nicht durch Titrationen untersucht werden: Wenn der Ligand im Überschuss eingesetzt wird, wie es in einem Titrationsexperiment der Fall ist, liegen praktisch alle Ligandenmoleküle in ungebundener Form vor ( $[B] \approx [B]_0$ ), wogegen bei hohen Konzentrationen von AB, wie sie in Verdünnungsexperimenten auftreten, der größte Teil gebunden ist ( $[AB] \ll [AB]_0$ ). Hill-Kurven sind bei Verdünnungsexperimenten problematisch:

Die Steigung für das nichtkooperative isodesmische System ist nicht konstant und erreicht kein Maximum bei 50 % Sättigung (siehe Hintergrundinformationen). Allerdings kann das Umschaltfenster  $c_R$  als ein makroskopisches Maß für Kooperativität benutzt werden. Der einzige Unterschied zu einem Titrationsexperiment ist, dass  $\lg c_R = 3$  gilt (für das nichtkooperative isodesmische System). Jede Abweichung von diesem Wert zeigt kooperatives Verhalten an. Bei starker positiver Kooperativität ( $\alpha \gg 1$ ) geht  $\lg c_R$  gegen 1: Ein scharfer Nukleationspunkt wird beobachtet, dem sich das Oligomerwachstum anschließt, und ein 10-facher Anstieg der Konzentration ist erforderlich, um 90 % Sättigung zu erreichen.

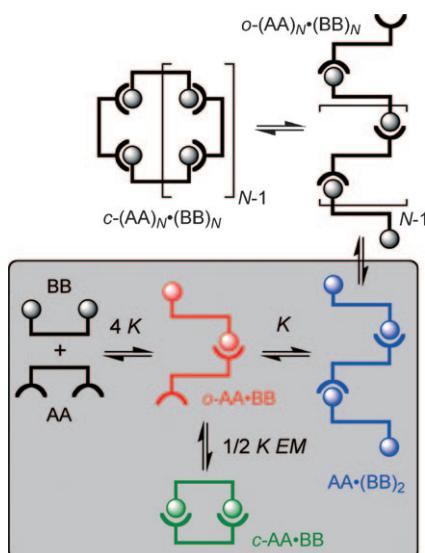
Es gibt viele molekulare Mechanismen, die zu dieser Art von kooperativer Oligomerisierung führen. Zum Beispiel kann bei helicalen Aggregaten die  $i$ -te Monomereinheit eine günstige Kontaktwechselwirkung mit der  $(i-2)$ -ten Monomereinheit eingehen.<sup>[22]</sup> In wasserstoffverbrückten Harnstoffaggregaten geht die  $i$ -te Monomereinheit eine günstige polarisationsvermittelte, kontaktfreie Wechselwirkung mit der  $(i-2)$ -ten Monomereinheit ein.<sup>[25]</sup> Das Nukleations- und Wachstumsverhalten in Abbildung 8 wurde von Meijer und Mitarbeitern im Zusammenhang mit sehr großen wasserstoffverbrückten Aggregaten untersucht.<sup>[23]</sup> Ähnlich wie bei diskreten allosterischen Systemen lässt sich eine *positive allosterische Kooperativität erreichen, indem man erste Bindungereignisse ungünstiger und spätere Bindungereignisse günstiger macht*.

#### 2.4. Selbstorganisation zu geschlossenen Systemen

Wenden wir uns nun der Art von Kooperativität zu, wie sie bei der Proteinfaltung oder der Bildung von DNA-Doppelsträngen beobachtet wird, wobei wir nun auch intramolekulare Wechselwirkungen zulassen wollen. Der einfachste Fall von zwei Molekülen, die jeweils zwei Bindungsstellen aufweisen, ist in Abbildung 9 dargestellt. Das System ist komplexer als die allosterischen Systeme in Abbildung 4, da sehr viel mehr gebundene Zustände möglich sind. Liegt allerdings der Ligand im großen Überschuss gegenüber dem Rezeptor vor, können wir Komplexe, die mehr als ein Rezeptormolekül enthalten, ignorieren. Unter diesen Bedingungen gibt es nur vier Zustände des Rezeptors (in Abbildung 9 im Kasten hervorgehoben): freies AA, zwei 1:1-Komplexe (die partiell gebundene offene Zwischenstufe  $o\text{-AA}\cdot\text{BB}$  und der vollständig gebundene cyclische Komplex  $c\text{-AA}\cdot\text{BB}$ ) und der 2:1-Komplex  $\text{AA}\cdot(\text{BB})_2$ . Wir beschränken uns hier auf das Szenario  $\alpha=1$ , also den Bereich ohne allosterische Kooperativität.

Das entscheidende Merkmal, das die Eigenschaften dieses Systems bestimmt, ist die intramolekulare bindende Wechselwirkung, die zu dem cyclischen 1:1-Komplex  $c\text{-AA}\cdot\text{BB}$  führt. Diese Wechselwirkung kann mithilfe der effektiven Molarität ( $EM$ ) beschrieben werden [Gl. (7)].<sup>[26]</sup>

$$\frac{1}{2} K EM = \frac{[c\text{-AA}\cdot\text{BB}]}{[o\text{-AA}\cdot\text{BB}]} \quad (7)$$



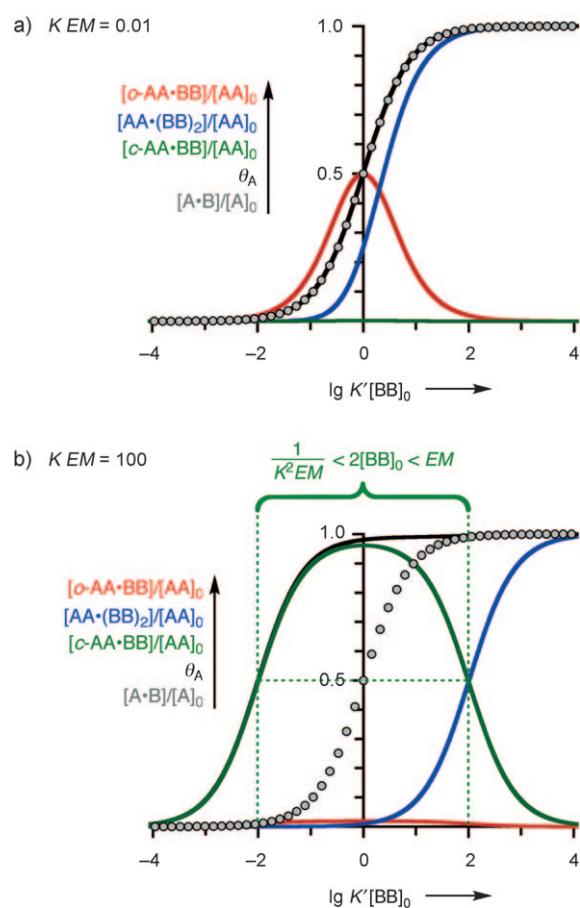
**Abbildung 9.** Ein Zwei-Zentren-Rezeptor (AA), der mit einem divalenten Liganden (BB) wechselwirkt ( $\alpha = 1$  in diesem Beispiel).<sup>[12]</sup> Für den Fall  $[BB]_0 \gg [AA]_0$  werden von der Vielzahl möglicher Strukturen nur die im Kasten gezeigten Zustände bevölkert.

Die Gleichung besagt, dass das Verhältnis zwischen dem offenen und geschlossenen 1:1-Komplex unabhängig von der Ligandenkonzentration ist. Das Produkt  $KEM$  bestimmt das Ausmaß, zu dem der cyclische Komplex gebildet wird. Es ist der Schlüsselparameter für die Kooperativität selbstorganisierter Systeme. Wir betrachten zwei Bereiche, dargestellt in Abbildung 10:

**$KEM \ll 1$**  (Abbildung 10a). Unter diesen Bedingungen ist die partiell gebundene Zwischenstufe stabiler als der cyclische Komplex. Das System wird von der Gegenwart des cyclischen Komplexes nicht beeinflusst und verhält sich wie ein System mit monovalentem Liganden (vgl. die Abbildungen 4 und 10).

**$KEM \gg 1$**  (Abbildung 10b). In diesem Fall ist der cyclische Komplex stabiler als die partiell gebundene Zwischenstufe, und  $c\text{-AA}\cdot\text{BB}$  ist in einem breiten Konzentrationsbereich die Hauptspezies. Die offene partiell gebundene Zwischenstufe  $o\text{-AA}\cdot\text{BB}$  wird kaum gebildet. Auch die Bildung des 2:1-Komplexes  $\text{AA}\cdot(\text{BB})_2$  ist deutlich unterdrückt, verglichen mit einem entsprechenden Komplex monovalenter Liganden. Der cyclische 1:1-Komplex  $c\text{-AA}\cdot\text{BB}$  öffnet sich nur dann zur Bildung des 2:1-Komplexes  $\text{AA}\cdot(\text{BB})_2$ , wenn die Bedingung  $2[BB]_0 > EM$  erfüllt ist. Anders ausgedrückt: Die effektive Molarität  $EM$  markiert die Konzentration, bei der einfache monovalente intermolekulare Wechselwirkungen mit kooperativen intramolekularen Wechselwirkungen konkurrieren. Ein Vergleich des Speziationsprofils mit dem des Ein-Zentren-Referenzsystems (graue Punkte in Abbildung 10) macht deutlich, dass die intramolekulare Wechselwirkung die Gesamtstabilität des Komplexes bei niedrigen Konzentrationen merklich erhöht. Das Konzentrationsfenster, in dem der cyclische Komplex die vorherrschende Spezies ( $> 50\%$ ) ist, lässt sich angeben [Gl. (8)]:

$$(K^2 EM)^{-1} < 2[BB]_0 < EM \quad (8)$$



**Abbildung 10.** Speziationsprofile der in Abbildung 9 gezeigten Gleichgewichte (grün: cyclischer Komplex  $c\text{-AA}\cdot\text{BB}$ , rot: offene Zwischenstufe  $o\text{-AA}\cdot\text{BB}$ , blau: 2:1-Komplex  $\text{AA}\cdot(\text{BB})_2$ , schwarz: Gesamtbesetzung der Bindungsstellen  $\theta_A$ ). a)  $KEM = 0.01$  und b)  $KEM = 100$ . In beiden Fällen ist  $\alpha = 1$ . Das Speziationsprofil des Referenzsystems mit nur einer intermolekularen Wechselwirkung ist zum Vergleich gezeigt (graue Punkte).<sup>[14,27]</sup>

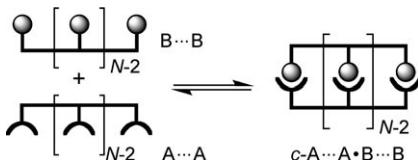
In diesem Beispiel haben wir  $\alpha = 1$  gesetzt, bei anderen Werten verändert sich das Verhalten des selbstorganisierten Systems. Änderungen in  $\alpha$  betreffen nicht das Ligandenkonkentrationsfenster, in dem der cyclische Komplex  $c\text{-AA}\cdot\text{BB}$  gebildet wird, sie beeinflussen aber das Gleichgewicht zwischen den offenen und cyclischen 1:1-Komplexen.

Das hier besprochene System zeigt eine andere Art von Kooperativität als die oben diskutierten allosterischen Systeme. Die Triebkraft der kooperativen Aggregation ist die Differenz zwischen der Stärke der intermolekularen und intramolekularen Wechselwirkungen, und die Kooperativität resultiert aus der Molekülarchitektur. Dieses Phänomen liegt auch dem Chelateffekt zugrunde,<sup>[28]</sup> und wir sprechen deshalb von einer chelatbedingten Kooperativität. Es ist die Art von Kooperativität, wie sie uns bei der Faltung von Proteinen und der supramolekularen Selbstorganisation begegnet (Abbildung 1b,c).

Kooperativität drückt sich bei diesen Systemen auf der molekularen Ebene aus: Im Bereich starker chelatbedingter Kooperativität folgt die Bildung des cyclischen Komplexes

dem Alles-oder-nichts-Prinzip. Allerdings bieten die makroskopischen Parameter  $n_H$  und  $c_R$ , die zur Charakterisierung von allosterischer Kooperativität verwendet werden, keinen Einblick in die Kooperativität des  $c\text{-AA}\cdot\text{BB}$ -Komplexes: Für alle in Abbildung 10 gezeigten Beispiele gilt  $n_H=1$  und  $\lg c_R=2$ . Es kann daher schwierig sein, das kooperative Verhalten selbstorganisierter Komplexe einzuordnen.

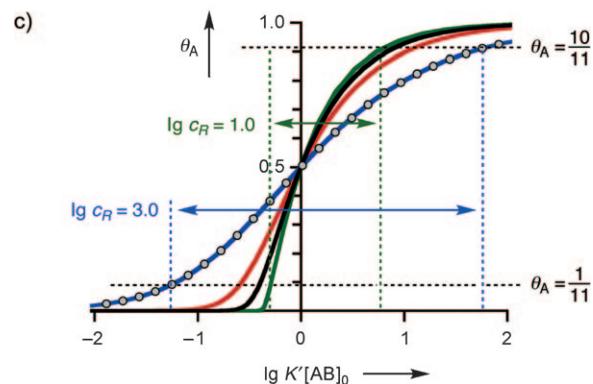
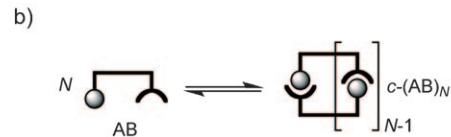
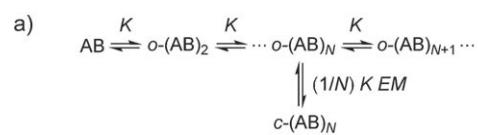
Das Verhalten des in Abbildung 9 gezeigten Zwei-Zentren-Systems kann auf verschiedene Weise auf eine große Zahl  $N$  von Wechselwirkungszentren extrapoliert werden. Wir betrachten hier zwei Architekturen: Im ersten Fall bleiben wir bei einer Zusammensetzung des Komplexes von 1:1 und erhöhen die Zahl der Bindungsstellen in beiden Komponenten (Abbildung 11); im zweiten Fall erhöhen wir die



**Abbildung 11.** Selbstorganisation eines 1:1-Komplexes zwischen einem polytopen Rezeptor ( $\text{A}\cdots\text{A}$ ) und einem komplementären polyvalenten Liganden ( $\text{B}\cdots\text{B}$ ). Es gibt noch viele andere Zustände, jedoch werden diese im Bereich starker chelatbedingter Kooperativität ( $KEM \gg 1$ ) nicht nennenswert bevölkert.

Zahl der Moleküle im Komplex und bleiben bei zwei Bindungsstellen pro Molekül (Abbildung 12). Die erste Architektur entspricht der Art von Kooperativität, wie sie bei der Bildung eines DNA-Doppelstrangs auftritt. Der zweite Fall begegnet uns bei der Selbstorganisation eines Mehrkomponentenkomplexes, z.B. einer Viruskapsel.

- 1) Wechselwirkung eines oligomeren Liganden mit einem oligomeren Rezeptor.** Die Zahl der möglichen partiell gebundenen Zwischenstufen steigt mit der Zahl der Bindungsstellen. Die Konzentration einer bestimmten Zwischenstufe hängt vom Produkt  $KEM$  für die betreffende intramolekulare Wechselwirkung ab. Bei sehr hohen Werten von  $KEM$  ( $\gg 1$ ) werden keine Zwischenstufen gebildet, und man findet Alles-oder-nichts-Verhalten (Abbildung 11). Die Gesamtstabilität des Komplexes steigt mit zunehmendem  $N$ ; die Form der Bindungskurve ist unabhängig von  $N$ , da es sich um eine einfache 1:1-Komplexierung handelt ( $n_H=1$  und  $\lg c_R=2$ ). Das Alles-oder-nichts-Verhalten findet hier auf der molekularen Ebene statt, ist also kein makroskopisches Phänomen, und das Konzentrationsfenster für den Übergang zwischen freiem und gebundenem Zustand ist nicht schmäler als bei einer isolierten Ein-Zentren-Wechselwirkung. Bei thermischer oder chemischer Denaturierung des  $c\text{-A}\cdots\text{A}\cdot\text{B}\cdots\text{B}$ -Doppelstrangs kann allerdings auch hier eine makroskopische Kooperativität beobachtet werden (siehe unten).
- 2) Geschlossene oligomere Aggregate aus einem selbst-komplementären Molekül.** Diese Systeme sind ein Spezialfall der in Abbildung 8a gezeigten Oligomerisierung von AB. In Abschnitt 2.3 wurden polydisperse offenket-



**Abbildung 12.** a) Selbstorganisation von AB-Oligomeren, wobei eines der offenen Oligomere cyclisieren kann ( $\alpha=1$ ).<sup>[12]</sup> b) Bei Vorliegen starker chelatbedingter Kooperativität ist  $c\text{-}(\text{AB})_N$  der vorherrschende gebundene Zustand. c) Bindungskurven für  $N=2$  (blau),  $N=4$  (rot),  $N=8$  (schwarz) und  $N=30$  (grün) ( $KEM \gg 1$ ).<sup>[14]</sup>

tige Aggregate von AB beschrieben; wenn aber ein Oligomer bestimmter Größe in signifikantem Maße zur Cyclisierung neigt, kann dieses cyclische Isomer eine thermodynamische Senke bilden (Abbildung 12a). Bei sehr hohen Werten von  $KEM$  (wobei  $EM$  die effektive Molarität der Cyclisierung eines spezifischen linearen Oligomers  $o\text{-}(\text{AB})_N$  ist) reduziert sich das System auf ein Zwei-Zustands-Gleichgewicht (Abbildung 12b).

Abbildung 12c zeigt für den Fall  $\alpha=1$  – d.h. ohne allosterische Kooperativität –, wie die Bindungskurve in diesem  $KEM$ -Bereich von  $N$  abhängt. Bei hohen Werten von  $N$  und  $KEM$  zeigt das System sowohl molekulares als auch makroskopisches Alles-oder-nichts-Verhalten. Bei sehr starker chelatbedingter Kooperativität ( $KEM \gg 1$ ) geht  $\lg c_R$  gegen  $1+2/(N-1)$ . Bei sehr hohen Werten von  $N$  wird ein scharfer Nukleationspunkt beobachtet und  $\lg c_R$  nimmt den Wert 1 an (Abbildung 12c, grüne Kurve). Obwohl sich die Verteilung der  $K$ -Werte für die Bildung von diskreten geschlossenen Oligomeren von der Situation bei polydispernen offenen Aggregaten unterscheidet, sind die makroskopischen Kooperativitäten, die man bei offenen und geschlossenen Systemen beobachtet, praktisch identisch. Zum Beispiel sind die Bindungskurven für  $N=8$  in Abbildung 12c (schwarze Kurve) und für  $\alpha=100$  in Abbildung 8b (blaue Kurve) nahezu gleich. Das bedeutet, dass für  $N>2$  die chelatbedingte Kooperativität, die bei der Selbstorganisation eines geschlossenen cyclischen Komplexes auftritt, auf makro-

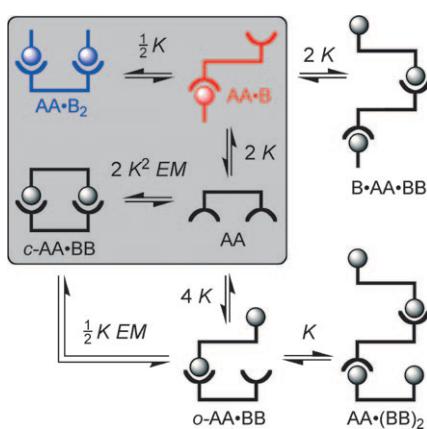
skopischer Ebene ununterscheidbar ist von der positiven allosterischen Kooperativität bei der Bildung polydisperser offener Oligomere.

Das Verhalten dieser Systeme ist unabhängig von der Zahl der Wechselwirkungsstellen pro Molekül, und dieses Modell beschreibt eine breite Vielfalt von selbstorganisierten Architekturen. Chelatbedingte Kooperativität ist in supramolekularen Systemen wie Helicaten<sup>[7,29]</sup> und Leitern<sup>[30]</sup> untersucht worden. Die von Fujita et al. beschriebenen Käfige veranschaulichen diese Art von Prozess, wie er in Abbildung 12b beschrieben ist.<sup>[31]</sup>

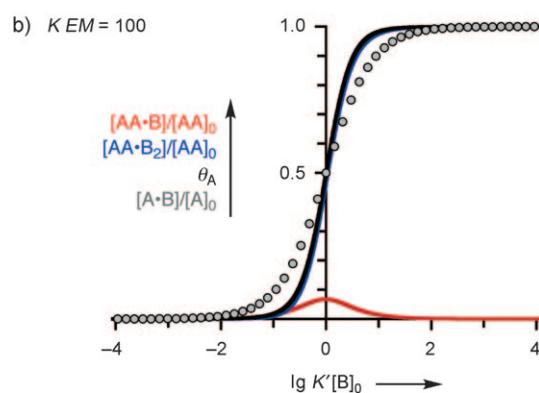
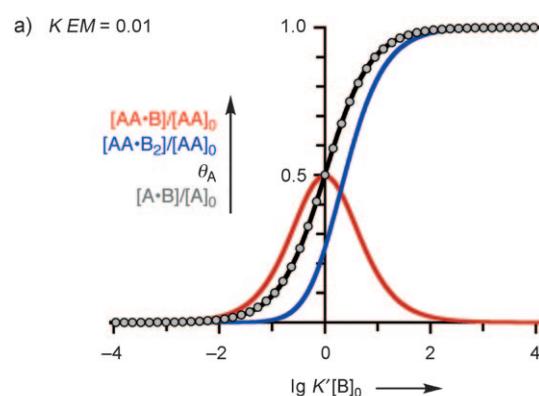
## 2.5. Denaturierung

Als letztes betrachten wir Prozesse, in denen ein monovalenter Ligand ein supramolekulares Aggregat spaltet (wie bei der Entfaltung eines Proteins durch Zugabe von Guanidinhydrochlorid; Abbildung 2). Auch diesmal beginnen wir mit dem einfachsten Szenario: Der Konkurrenz zwischen einem monovalenten Liganden (B) und einem divalenten Liganden (BB) um die Bindung an einen Zwei-Zentren-Rezeptor (AA) (Abbildung 13). Diese Konkurrenz ermöglicht es uns, einen direkten Vergleich zwischen den beiden Arten von Kooperativität, wie sie in den Abschnitten 2.2–2.4 diskutiert wurden, anzustellen. Im Denaturierungsexperiment wird B dem AA·BB-Komplex zugefügt, um BB vom Rezeptor zu verdrängen. Eine große Zahl von Strukturen ist möglich, wir wollen aber nur den Fall betrachten, dass die Liganden im großen Überschuss zum Rezeptor vorhanden sind, d.h.  $[BB]_0 \gg [AA]_0$ . Unter diesen Bedingungen werden nur vier Strukturen in signifikantem Ausmaß gebildet (grauer Kasten in Abbildung 13).

Das Verhalten des Systems hängt von den molekularen Parametern  $\alpha$  und  $KEM$  ab; wir beschränken uns auf den Fall  $\alpha = 1$ , d.h. der nichtkooperativen Bindung von B an AA in Abwesenheit von BB. Zwei Grenzfälle sind in Abbildung 14 gezeigt.



**Abbildung 13.** Konkurrenz zwischen Liganden mit einer und zwei Bindungsstellen (B bzw. BB) um einen Zwei-Zentren-Rezeptor (AA).<sup>[12]</sup> Viele Spezies sind möglich, unter der Bedingung  $[BB]_0 \gg [AA]_0$  und  $KEM \gg 1$  werden aber nur die Rezeptorstrukturen AA, c-AA·BB, AA·B und AA·B<sub>2</sub> signifikant gebildet.



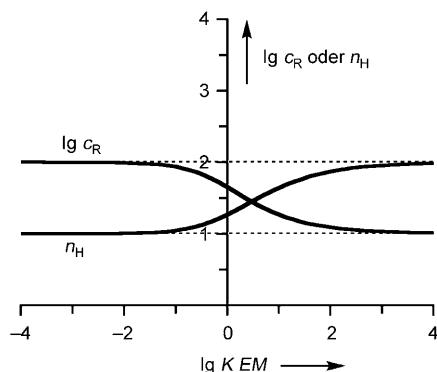
**Abbildung 14.** Speziesprofile für die Denaturierung von B (Gleichgewichte in Abbildung 13; rot: AA·B, blau: AA·B<sub>2</sub>, schwarz: Gesamtbesetzung  $\theta_A$  für die von B in AA besetzten Bindungsstellen). Das Speziesprofil des Systems mit nur einer intermolekularen Wechselwirkung ist zum Vergleich gezeigt (graue Punkte). a)  $KEM = 0.01$ ; b)  $KEM = 100$  (in diesem Fall sind die schwarzen und blauen Kurven praktisch identisch).  $\alpha = 1$ ;  $K = 1 \text{ M}^{-1}$ ,  $[BB]_0 = 1 \text{ M}$  und  $[AA]_0 = 0.1 \text{ M}$ .<sup>[14]</sup>

**$KEM \ll 1$**  (Abbildung 14a). Unter diesen Bedingungen ist BB nur schwach an AA gebunden, sodass die Bildung von AA·B<sub>2</sub> durch die Gegenwart von BB nicht beeinflusst wird. Das Speziesprofil ist identisch mit dem des nichtkooperativen Systems (vgl. die Abbildungen 4b und 14a). Für die Wechselwirkung von B mit dem AA·BB-Komplex kann eine Hill-Kurve konstruiert werden. Die Komplexbildung ist nicht kooperativ ( $n_H = 1$  und  $\lg c_R = 2$ ).

**$KEM \gg 1$**  (Abbildung 14b). In diesem Fall gibt es nur zwei Rezeptorstrukturen, die in signifikanten Mengen gebildet werden: den cyclischen Komplex c-AA·BB und den 1:2-Komplex AA·B<sub>2</sub>. Die Bindung des ersten Moleküls von B konkurriert mit der kooperativen intramolekularen Wechselwirkung zwischen AA und BB im zweifach koordinierten c-AA·BB-Komplex, während die Bindung des zweiten Moleküls von B mit der nichtkooperativen intermolekularen Wechselwirkung zwischen AA und BB im einfach koordinierten B·AA·BB konkurriert. Das Speziesprofil für dieses System ist identisch mit dem Profil, das für ein allosterisches System mit positiver Kooperativität erhalten wird (vgl. die Abbildungen 4d und 14b). Unter diesen Bedingungen zeigt das Denaturierungssystem die typischen Kennzeichen einer positiven Kooperativität ( $n_H > 1$  und  $\log c_R < 2$ ). Der Hinweis ist wichtig, dass in diesem Beispiel  $\alpha = 1$  gesetzt

wurde und deshalb die makroskopische Kooperativität, die für die Bindung von B beobachtet wird, allein aus der chelatbedingten Kooperativität resultiert, die mit der Selbstorganisation des  $c\text{-AA}\cdot\text{BB}$ -Komplexes einhergeht.

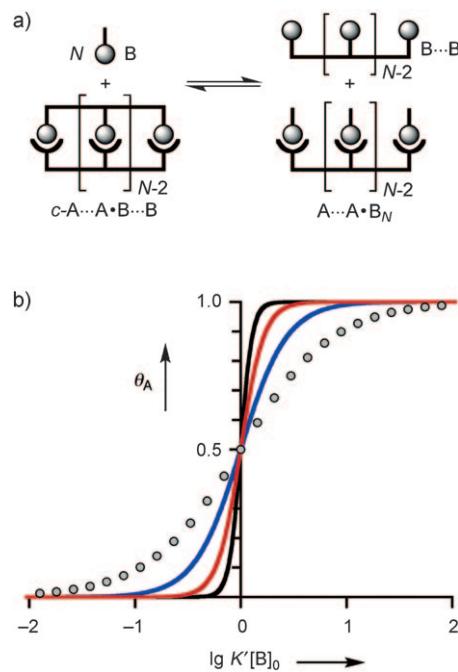
Die Beziehungen zwischen den makroskopischen Parametern  $n_H$  und  $c_R$  (für die Bindung von B an den  $c\text{-AA}\cdot\text{BB}$ -Komplex) und  $KEM$  (dem molekularen Parameter, der die chelatbedingte Kooperativität für die Bindung von BB an AA quantifiziert) sind in Abbildung 15 dargestellt. Im Bereich  $KEM \ll 1$  wird die einfache nichtkooperative Bindung von B



**Abbildung 15.** Beziehung zwischen dem molekularen Parameter  $KEM$  und den makroskopischen Parametern  $n_H$  und  $c_R$  für die Denaturierung des selbstorganisierten Komplexes  $c\text{-AA}\cdot\text{BB}$  durch einen monovalenten Liganden B.<sup>[14]</sup>

beobachtet;  $n_H = 1$  und  $\lg c_R = 2$ . Der Hill-Koeffizient  $n_H$  steigt mit zunehmendem  $KEM$  und geht gegen den Grenzwert 2;  $\lg c_R$  sinkt mit zunehmendem  $KEM$  auf einen unteren Grenzwert von 1. Im Bereich starker chelatbedingter Kooperativität ähneln die Abhängigkeiten von  $n_H$  und  $c_R$  von  $KEM$  in Abbildung 15 den Abhängigkeiten von  $n_H$  und  $c_R$  von  $\alpha$  in Abbildung 6.  $KEM$  und  $\alpha$  sind analoge Maße für zwei unterschiedliche Arten von Kooperativität, und das Denaturierungsexperiment deckt auf, wie beide zusammenhängen. Ein Vergleich der Abbildungen 6 und 15 zeigt, dass allosterische Kooperativität positiv oder negativ sein kann (je nachdem, ob  $\alpha$  größer 1 ist), während die chelatbedingte Kooperativität bei allen Werten von  $KEM$  positiv ist.

Das Verhalten dieses Systems kann auf beliebige  $N$  verallgemeinert werden. Betrachten wir als Beispiel die Denaturierung des 1:1-Komplexes eines polytopen Rezeptors ( $A\cdots A$ ) mit einem polyvalenten Liganden  $B\cdots B$  (Abbildung 16a). Im Bereich  $KEM \ll 1$  findet keine kooperative Selbstorganisation statt, und die Bindung des denaturierenden Agens ist nicht kooperativ ( $n_H = 1$  und  $\lg c_R = 2$ ). Bei  $KEM \gg 1$  konkurriert dagegen die Bindung des denaturierenden Agens mit der kooperativen Selbstorganisation, und die Denaturierungskurve zeigt den charakteristischen Verlauf für positive allosterische Kooperativität. Bindungskurven für unterschiedliche Werte von  $N$  sind in Abbildung 16b gezeigt. Im Bereich starker chelatbedingter Kooperativität geht  $n_H$  gegen  $N$  und  $\lg c_R$  gegen  $2/N$ . Die Bindung des  $N$ -ten denaturierenden Moleküls konkurriert mit einer intermolekularen Wechselwirkung, während die Bindung des ersten ( $N-1$ ) denaturierenden Moleküls mit intramolekularen



**Abbildung 16.** a) Denaturierung eines 1:1-Komplexes eines polytopen Rezeptors  $A\cdots A$  mit einem komplementären polyvalenten Liganden  $B\cdots B$  (beide mit  $N$  Bindungsstellen) bei starker chelatbedingter Kooperativität. b) Besetzung  $\theta_A$  des Rezeptors durch das denaturierende Agens für  $N=1$  (graue Punkte),  $N=2$  (blau),  $N=4$  (rot) und  $N=8$  (schwarz).<sup>[14]</sup>

ren Wechselwirkungen konkurriert. Die positive makroskopische Kooperativität resultiert somit aus der starken bindenden Wechselwirkung mit dem letzten Liganden.

Ein solches Verhalten wird bei der Denaturierung jeglicher Art von selbstorganisierter Struktur beobachtet, die durch kooperative intramolekulare Wechselwirkungen zusammengehalten wird – ganz gleich welcher Architektur.

Denaturierungsexperimente werden häufig eingesetzt, um die Stabilität von Biopolymeren wie Proteinen<sup>[32]</sup> und Oligonucleotiden<sup>[33]</sup> zu messen. Oft handelt es sich um Zwei-Zustands-Gleichgewichte, und man kann die Hill-Koeffizienten zur Quantifizierung ihrer Kooperativität nutzen. Zum Beispiel ergeben die in Abbildung 2b aufgetragenen Daten für die Denaturierung von Lysozym durch Guanidinhydrochlorid eine lineare Hill-Kurve im Bereich  $0.1 < \theta_A < 0.9$  mit  $n_H = 17$ . Dieses Ergebnis besagt, dass jedes Lysozymmolekül bei seiner Denaturierung mindestens 17 Moleküle Guanidinhydrochlorid bindet. Allerdings ist die Interpretation der Proteindenaturierung mithilfe von Bindungsmodellen nicht unproblematisch, weil das Protein keine diskreten Bindungsstellen für das denaturierende Agens aufweist und die Aktivität des Agens möglicherweise nicht proportional zu seiner Konzentration ist.<sup>[34]</sup> In der Praxis wird die Kooperativität der Proteindenaturierung mithilfe der empirischen Beziehung (9) analysiert.<sup>[32,35]</sup>

$$-RT \ln \{\theta_A / (1 - \theta_A)\} = \Delta G - m[B]_0 \quad (9)$$

$-RT \ln \{\theta_A / (1 - \theta_A)\}$  ist die freie Energie der Proteinfallung bei einer Konzentration des denaturierenden Agens von

$[B]_0$ ,  $\Delta G$  ist die freie Energie der Faltung in Abwesenheit des denaturierenden Agens, und  $m$  ist ein Parameter für die makroskopische Kooperativität, der proportional zur Änderung der solvenszugänglichen Oberfläche bei der Entfaltung ist. <sup>[35]</sup>

Über Denaturierungsexperimente an supramolekularen Systemen wurde überraschend wenig berichtet. Whitesides und Mitarbeiter untersuchten die Kooperativität in selbstorganisierten wasserstoffverbrückten Komplexen mit DMSO als denaturierendem Agens. <sup>[36]</sup> Die kooperative Bildung von supramolekularen Leiterstrukturen wurde in Denaturierungsexperimenten gemessen, <sup>[30]</sup> und Bindungskurven für die Verdrängung von multivalenten Liganden aus cyclischen Porphyrinoligomeren durch Pyridin sind mit den simulierten Kurven in Abbildung 16 im Einklang. <sup>[37]</sup>

### 3. Überlegungen zum Standardzustand

Die Beziehung zwischen allosterischer und chelatbedingter Kooperativität lässt sich anhand der freien Energie veranschaulichen; wir vergleichen hierzu die freie Bildungsenergie der Komplexe AA·B<sub>2</sub> und c-AA·BB (Abbildungen 4a und 9). Die freie Energie für die Bildung von AA·B<sub>2</sub> ist durch die Gleichungen (10) und (11) gegeben:

$$\Delta G_{AA \cdot B_2} = -RT \ln(\alpha K^2) \quad (10)$$

$$= 2\Delta G_{A \cdot B} - RT \ln(\alpha) \quad (11)$$

Positive Kooperativität ( $\alpha > 1$ ) entsteht, wenn die freie Energie für die Bildung des Aggregats größer ist als die Summe der freien Energien der isolierten Wechselwirkungen. Die Gleichungen (12)–(14) beschreiben den entsprechenden Fall für die Bildung von c-AA·BB für  $\alpha = 1$ :

$$\Delta G_{c-AA \cdot BB} = -RT \ln(2EM K^2) \quad (12)$$

$$= 2\Delta G_{A \cdot B} - RT \ln(2EM) \quad (13)$$

$$= \Delta G_{A \cdot B} - RT \ln(2K EM) \quad (14)$$

Das ähnliche Aussehen der Gleichungen (11) und (13) täuscht. Während  $\alpha$  das dimensionslose Verhältnis zweier bimolekulärer Assoziationskonstanten ist, hat  $EM$  die Einheit der Konzentration, sodass das Vorzeichen von  $\ln(2EM)$  von der Wahl des Standardzustands abhängt. Der Punkt  $2EM = 1M$  hat keine besondere Bedeutung. Der dimensionslose Parameter, der die Kooperativität in selbstorganisierten Systemen kennzeichnet, ist das Produkt  $KEM$ , und Gleichung (13) sollte deshalb in Gleichung (14) umgeschrieben werden. Der Punkt  $(2KEM) = 1$  ist insofern bedeutsam, als er die Schwelle angibt, unterhalb der die Selbstorganisation die Eigenschaften des Systems nicht beeinflusst. Die thermodynamische Analyse von Komplexen mit unterschiedlich vielen Komponenten und Wechselwirkungen gibt nicht selten Anlass zur Verwirrung: *Kooperativität in selbstorganisierten Systemen sollte eher durch das dimensionslose Produkt KEM anstatt durch EM quantifiziert werden.*

### 4. Schlussbemerkungen

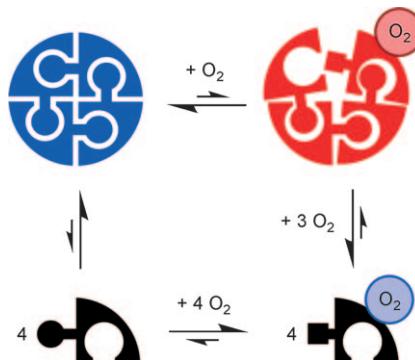
In diesem Essay haben wir zwei unterschiedliche Arten von Kooperativität untersucht, die die Ausprägung supramolekularer und biologischer Systeme bestimmen: *allostatische* und *chelatbedingte* Kooperativität. Chelatbedingte Kooperativität ist ein Merkmal geschlossener selbstorganisierter Strukturen und kommt selbst dann zum Tragen, wenn die mikroskopischen Affinitäten der Bindungsstellen für monovalente Liganden alle identisch sind. Wir haben gezeigt, dass chelatbedingte Kooperativität zu einem makroskopischen Verhalten führen kann, das von einer positiven allosterischen Kooperativität nicht zu unterscheiden ist. Ersichtlich ist dies aus der Konzentrationsabhängigkeit der Selbstorganisation geschlossener Oligomere  $c(AB)_N$  (Abbildung 12) und der Denaturierung selbstorganisierter Komplexe c-AA·BB durch ein denaturierendes Agens (Abbildungen 14 und 16). Würde man lediglich den Anteil an gebundenen Rezeptorstellen  $\theta_A$  als Funktion der Ligandenkonzentration beobachten können, wäre man nicht in der Lage, chelatbedingte und allosterische Kooperativität zu unterscheiden (vgl. die Abbildungen 8b mit 12c, 4d mit 14b und 7 mit 16b). Im Bereich starker positiver Kooperativität gibt es drei Fälle, in denen ein charakteristisches Zwei-Zustands-Profil mit stöchiometrieabhängiger Form beobachtet wird: allosterische Ligandenbindung an einen polytypen Rezeptor, Selbstorganisation eines oligomeren Komplexes und Denaturierung einer durch multiple intermolekulare Wechselwirkungen aufgebauten Struktur.

Experimentell können beide Arten von Kooperativität anhand des Hill-Koeffizienten  $n_H$  und des Umschaltfensters  $c_R$  erkannt werden. Auf molekularer Ebene sind die allosterische Kooperativität durch den Wechselwirkungsparameter  $\alpha$  und die chelatbedingte Kooperativität durch das Produkt  $KEM$  charakterisiert. In allosterischen Systemen kann Kooperativität entweder positiv oder negativ sein, abhängig vom Wert von  $\alpha$ , während chelatbedingte Kooperativität ausschließlich positiv ist. Ein Vergleich der allosterischen Bindung mit der Denaturierung selbstorganisierter Komplexe offenbart, dass die makroskopischen Parameter  $n_H$  und  $c_R$  von  $\alpha$  auf sehr ähnliche Weise abhängen wie von  $KEM$ . Im Bereich starker positiver Kooperativität ( $\alpha \gg 1$  oder  $KEM \gg 1$ ) kann die Zusammensetzung des Komplexes durch Titrations- oder Verdünnungsexperimente bestimmt werden; bei der Titration geht  $n_H$  gegen  $(N-1)$  und  $\lg c_R$  gegen  $2/(N-1)$ , bei einer Verdünnung geht  $\lg c_R$  gegen  $1+2/(N-1)$ .

Es gibt zwei Fälle, in denen die makroskopischen Parameter  $n_H$  und  $c_R$  keinen Einblick in die Kooperativität auf molekularer Ebene bieten: unimolekulare Faltung und bimolekulare Selbstorganisation. Die unimolekulare Faltung ist unabhängig von der Konzentration, und weil die Stöchiometrie der bimolekularen Selbstorganisation 2 beträgt, haben die Bindungsisothermen die gleiche Form wie bei einer nichtkooperativen Bindung, an der nur eine intermolekulare Wechselwirkung beteiligt ist. Allerdings kann das Vorliegen von chelatbedingter Kooperativität in beiden Fällen durch Denaturierung aufgedeckt werden.

Der Zusammenhang zwischen allosterischer und chelatbedingter Kooperativität kann am Beispiel von Hämoglobin erklärt werden.<sup>[1]</sup> Die chelatbedingte Kooperativität im Häm-

moglobin führt zur Bildung eines selbstorganisierten tetrameren Proteins (Abbildung 1c). Im Säugetier-Hämoglobin bindet jeder Teil des Tetramers auf allosterische Weise Sauerstoff (siehe Abbildungen 1a und 2a). Im Hämoglobin des Neunauges verursacht die Bindung von Sauerstoff die Dissoziation der vier Untereinheiten, sodass das Auftreten von Kooperativität bei der Ligandenbindung mit der Denaturierung des Tetramers einhergeht (Abbildung 17). In diesem Fall



**Abbildung 17.** Das Hämoglobin des Neunauges bildet ein selbstorganisiertes Tetramer (oben), und die Bindung von Sauerstoff (rechts) konkurriert mit den Wechselwirkungen der Untereinheiten. Das Monomer hat eine höhere Affinität für Sauerstoff als das Tetramer, sodass freies Tetramer und gebundenes Monomer die vorherrschenden Spezies sind. Die chelatbedingte Kooperativität, die das Tetramer stabilisiert, führt zu einer positiven allosterischen Kooperativität bei der Bindung des Sauerstoffs.

hängt es vom Bezugssystem ab, ob die Kooperativität als positiv oder negativ zu beschreiben ist: Was den Liganden betrifft, erhöht die Bindung eines einzelnen Sauerstoffmoleküls die Affinität des Rezeptors für andere Sauerstoffmoleküle (*positive homotope Kooperativität*); was den Rezeptor betrifft, verringert die Bindung eines einzelnen Sauerstoffmoleküls die Affinität eines Hämoglobinmonomers für ein anderes Hämoglobinmonomer (*negative heterotope Kooperativität*).<sup>[6]</sup> In einer interessanten Studie machten sich Tabushi und Mitarbeiter den Zusammenhang von allosterischer und chelatbedingter Kooperativität zu Nutze, um eine Hämoglobin-artige Kooperativität zu erzielen. Hierbei wurde Sauerstoff als monovalenter Ligand verwendet, um einen chelatisierenden divalenten Liganden aus einem Metallporphyrin-Dimer zu verdrängen (Abbildung 13).<sup>[38]</sup>

Allosterische Kooperativität ist ein weithin anerkanntes Phänomen, und ihre Definition ist eindeutig.<sup>[5]</sup> Jedoch gab es häufig die Tendenz, Kooperativität auf eine Weise zu definieren, die jegliche Chelateffekte ausschließt. Auf molekularer Ebene sind chelatbedingte und allosterische Effekte vollkommen verschieden, können aber zu einem identischen makroskopischen kooperativen Verhalten führen. Darüber hinaus handelt es sich bei den meisten natürlichen und synthetischen Beispielen für starke positive Kooperativität um Fälle von chelatbedingter Kooperativität. Typische mikroskopische Assoziationskonstanten in supramolekularen Systemen bewegen sich im Bereich von  $10^2$  bis  $10^4 \text{ M}^{-1}$  mit typischen effektiven Molaritäten zwischen  $10^{-3}$  und  $10^1 \text{ M}$ ,<sup>[39]</sup> die

zu  $KEM$ -Werten von  $10^{-1}$  bis  $10^5$  führen; der Wert von  $\alpha$  beträgt typischerweise  $10^{-3}$  bis  $10^2$ .<sup>[10,21]</sup> Bei vielen scheinbaren Fällen starker positiver allosterischer Kooperativität spielt in Wirklichkeit eine Chelatbildung mit hinein. Zum Beispiel gehen die hoch kooperative Nukleation und das Wachstum von offenen linearen Aggregaten gewöhnlich mit der Bildung von helicalen oder mehrsträngigen Oligomeren mit geschlossenen Schleifen einher, die intramolekulare Chelatwechselwirkungen enthalten.<sup>[22,23,40]</sup>

In der Realität treten chelatbedingte und allosterische Effekte oft gemeinsam im selben System auf. Wenn die kooperierenden Wechselwirkungszentren weit auseinander liegen, ist Kooperativität leicht zu quantifizieren, wie oben diskutiert. Befinden sich die Zentren dagegen in unmittelbarer Nähe zueinander, wird die Analyse schwierig, weil womöglich kein geeignetes Ein-Zentren-Referenzsystem verfügbar ist. Betrachten wir als Beispiel ein Guanin-Cytosin-Basenpaar: Es gibt zum einen allosterische Kooperativität, die aus den sekundären elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen benachbarten Wasserstoffbrückenzentren entsteht;<sup>[41]</sup> daneben gibt es auch chelatbedingte Kooperativität, die den dreifach H-verbrückten Zustand gegenüber partiell gebundenen Zwischenstufen stabilisiert. Die Zergliederung der Beiträge von  $KEM$  und  $\alpha$  ist jedoch problematisch, denn die Wahl von Referenzsystemen zur Bestimmung der  $K$ -Werte der einzelnen Wasserstoffbrückenzentren erweist sich als schwierig.<sup>[42]</sup>

Die Möglichkeit, chelatbedingte und allosterische Kooperativität unterscheiden zu können, hat in der Praxis wichtige Auswirkungen. So wäre man etwa in der Lage, multivalente Aggregate in der Weise zu entwerfen, dass ein scharfer Übergang zwischen gebundenen und freien Zuständen auftritt, was bei der Entwicklung von responsiven Materialien, Sensoren oder Wirkstofftransportsystemen nützlich sein dürfte. Kooperativität ist auch fundamental für das Verständnis der Wirkungsweise biologischer Systeme, deren Komplexität durch das koordinierte Umschalten molekularer Spezies zwischen diskreten Zuständen reguliert wird.

## Abkürzungen

$\alpha$	allosterischer Wechselwirkungsparameter
$[A]$	Konzentration der Spezies A (frei)
$[A]_0$	Gesamtkonzentration an A, einschließlich freiem und an andere Spezies gebundenem A
$c_R$	Konzentrationsfenster, in dem das System zwischen zwei Zuständen umschaltet (Umschaltfenster)
$EM$	effektive Molarität
$K$	Assoziationskonstante
$K'$	normalisierte Assoziationskonstante <sup>[14]</sup>
$lg$	dekadischer Logarithmus
$ln$	natürlicher Logarithmus
$n_H$	Hill-Koeffizient
$N$	Zahl an Bindungsstellen
$R$	Gaskonstante
$T$	Temperatur

$\Delta G$	Änderung der freien Energie
$\theta_A$	Besetzungsgrad der Bindungsstellen von Rezeptor A

Eingegangen am 11. Mai 2009  
 Online veröffentlicht am 10. September 2009  
 Übersetzt von Dr. Frank Maaß, Weinheim

- [1] M. F. Perutz, *Q. Rev. Biophys.* **1989**, *22*, 139–236.
- [2] S. Shinkai, M. Ikeda, A. Sugasaki, M. Takeuchi, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 494–503.
- [3] J. D. Badjic, A. Nelson, S. J. Cantrill, W. B. Turnbull, J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 723–732; A. Mulder, J. Huskens, D. N. Reinhoudt, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3409–3424.
- [4] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908–2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794.
- [5] G. Ercolani, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16097–16103.
- [6] D. H. Williams, E. Stephens, D. P. O'Brien, M. Zhou, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6760–6782; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6596–6616.
- [7] J. Hamacek, M. Borkovec, C. Piguet, *Dalton Trans.* **2006**, 1473–1490.
- [8] A. Whitty, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 435–439.
- [9] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, 6. Aufl., Freeman, New York, **2007**.
- [10] F. J. W. Roughton, R. L. J. Lyster, *Hvalradets Skr.* **1965**, *48*, 185–198.
- [11] M. Ikeguchi, K. Kumajima, S. Sugai, *J. Biochem.* **1986**, *99*, 1191–1201.
- [12] Statistische Faktoren, wie sie in den Abbildungen 4a, 7, 9, 11, 12, 13 und 16a verwendet werden, können leicht aus Symmetriezahlen berechnet werden (siehe Hintergrundinformationen): S. W. Benson, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 5151–5154; W. F. Bailey, A. S. Monahan, *J. Chem. Educ.* **1978**, *55*, 489–493; G. Ercolani, C. Piguet, M. Borkovec, J. Hamacek, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 12195–12203.
- [13] K. A. Connors, A. Paulson, D. Toledo-Velasquez, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2023–2026.
- [14] Die in den Diagrammen verwendeten Konzentrationsskalen sind gegen die effektive Assoziationskonstante pro Bindungsstelle ( $K'$ ) normalisiert, wobei  $1/K'$  die Konzentration am Punkt  $\theta_A = 50\%$  ist.
- [15] A. V. Hill, *Biochem. J.* **1913**, *7*, 471–480; L. D. Byers, *J. Chem. Educ.* **1977**, *54*, 352–354.
- [16] Wir weichen damit von der ursprünglichen Definition ab, in der ein Wechsel von 1:9 zu 9:1 angegeben wurde (K. Taketa, B. M. Pogell, *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 651–662).
- [17] Die Abnahme von  $c_R$  mit steigendem  $N$  bei Komplexen des Typs  $A \cdots A \cdot B_N$  ist analog zur Verkleinerung der Potentiallücke zwischen den Oxidations- und Reduktionswellen in der Cyclovoltammetrie bei steigender Zahl von Elektronen, gemäß der Gleichung  $\Delta E = 57/N$  mV.
- [18] D. H. Williams, A. J. Maguire, W. Tsuzuki, M. S. Westwell, *Science* **1998**, *280*, 711–714.
- [19] J. Rebek, T. Costello, L. Marshall, R. Wattley, R. C. Gadwood, K. Onan, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7481–7487.
- [20] A. P. Bisson, C. A. Hunter, J. C. Morales, K. Young, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 845–851.
- [21] E. Terzi, G. Hölzemann, J. Seelig, *J. Mol. Biol.* **1995**, *252*, 633–642.
- [22] D. Zhao, J. S. Moore, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3471–3491.
- [23] P. Jonkheijm, P. van der Schoot, A. P. H. J. Schenning, E. W. Meijer, *Science* **2006**, *313*, 80–83; M. M. J. Smulders, A. P. H. J. Schenning, E. W. Meijer, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 606–611.
- [24] Z. Chen, A. Lohr, C. R. Saha-Möller, F. Würthner, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 564–584.
- [25] V. Simic, L. Bouteiller, M. Jalabert, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13148–13154; M. de Loos, J. van Esch, R. M. Kellogg, B. L. Feringa, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 633–636; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 613–616.
- [26] Die effektive Molarität ( $EM$ ) wird gewöhnlich aus den Gleichungen (15) oder (16) bestimmt:
- $$EM = K_o K(c\text{-AA}\cdot\text{BB})/K(\text{AA}\cdot\text{B}_2) \quad (15)$$
- $$EM = K_o K(c\text{-AA}\cdot\text{BB})/K(\text{A}\cdot\text{B})^2 \quad (16)$$
- Bei Komplexen mit identischen Bindungsstellen tritt ein statistischer Faktor auf ( $K_o = 2$ ), der den Unterschied in der Konzentration der Bindungsstellen zwischen einem monovalenten Liganden (B) und einem divalenten Liganden (BB) berücksichtigt.<sup>[12]</sup> Manche Autoren ziehen den statistischen Faktor in den Wert von  $EM$  hinein.
- [27] In Abbildung 10 ist  $\theta_A$  durch die Gleichung (17) definiert:
- $$\theta_A = \frac{1/2 [o\text{-AA}\cdot\text{BB}] + [c\text{-AA}\cdot\text{BB}] + [\text{AA}\cdot(\text{BB})_2]}{[\text{AA}]_0} \quad (17)$$
- [28] B. Zhang, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9353–9354.
- [29] A. Pfeil, J.-M. Lehn, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 838–840; N. Fatin-Rouge, S. Blanc, A. Pfeil, A. Rigault, A.-M. Albrecht-Gary, J.-M. Lehn, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1694–1711.
- [30] P. N. Taylor, H. L. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11538–11545; T. E. O. Screen, J. R. G. Thorne, R. G. Denning, D. G. Bucknall, H. L. Anderson, *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 2796–2808; A. Camara-Campos, C. A. Hunter, S. Tomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 3034–3038.
- [31] M. Fujita, M. Tominaga, A. Hori, B. Therrien, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 369–378.
- [32] D. Barrick, *Phys. Biol.* **2009**, *6*, 015001.
- [33] V. M. Shelton, T. R. Sosnick, T. Pan, *Biochemistry* **1999**, *38*, 16831–16839.
- [34] J. A. Schellman, *Biopolymers* **1978**, *17*, 1305–1322.
- [35] J. K. Myers, C. N. Pace, J. M. Scholtz, *Protein Sci.* **1995**, *4*, 2138–2148.
- [36] M. Mammen, E. E. Simanek, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12614–12623.
- [37] M. Hoffmann, J. Kärnbratt, M.-H. Chang, L. M. Herz, B. Albinsson, H. L. Anderson, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5071–5074; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4993–4996; M. Hoffmann, C. J. Wilson, B. Odell, H. L. Anderson, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3183–3186; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3122–3125.
- [38] I. Tabushi, T. Sasaki, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2901–2902; I. Tabushi, *Pure Appl. Chem.* **1988**, *60*, 581–586.
- [39] K. N. Houk, A. G. Leach, S. P. Kim, X. Zhang, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5020–5046; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4872–4897.
- [40] T. E. Kaiser, V. Stepanenko, F. Würthner, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6719–6732.
- [41] W. L. Jorgensen, J. Pranata, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2008–2010.
- [42] J. R. Quinn, S. C. Zimmerman, J. E. Del Bene, I. Shavitt, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 934–941.