

Einzelmolekül-Untersuchungen

Supramolekulare Chemie mit einzelnen Molekülen**

Rainer Eckel, Robert Ros, Björn Decker, Jochen Mattay* und Dario Anselmetti*

Die supramolekulare Chemie^[1] beschäftigt sich mit der Synthese und den Eigenschaften von Verbindungen mit gerichteten und spezifischen nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen maßgeschneiderten organischen Bausteinen. Große Bedeutung kommt hierbei synthetischen Wirt-Gast-Systemen zu, die supramolekulare Strukturen von hoher Komplexität bilden können. Supramolekulare Systeme sind hinsichtlich Spezifität und Funktionalität („molekulare Schalter“) plan- und optimierbar, woraus sich Konzepte für die Entwicklung von neuen Materialien für molekulare Erkennung, molekulare Überstrukturen und Selbstorganisation ableiten. Mithilfe mechanischer Einzelmolekül-Kraftspektroskopie untersuchten wir die Bindung von einzelnen Wirt-Gast-Komplexen aus Resorc[4]arenen als Rezeptoren und Ammoniumderivaten als Liganden. Durch die Verwendung von verdünnten Proben des Wirtmoleküls und von Gastmolekülen, die durch einen langen Polymerlinker an einer AFM-Spitze immobilisiert waren, ließ sich Mehrfachbindung vermeiden, sodass erstmalig einzelne Wirt-Gast-Dissoziationsereignisse in einem supramolekularen System beobachtet werden konnten. Die molekularen Bindungskräfte, ihre Abhängigkeit von der äußeren Beladung, die Dissoziationsgeschwindigkeit und die molekulare Reaktionslänge hängen direkt mit den molekularen Eigenschaften des supramolekularen Systems zusammen und sind in Einklang mit einem aktivierten Zerfall eines metastabilen gebundenen Zustands; ähnliche Ergebnisse wurden auch für biologische Rezeptor-Ligand-Systeme erhalten. Die Resultate geben Aufschluss über Mechanismen, Kinetik und Thermodynamik der intermolekularen Assoziation in Chemie und Biologie und zeigen neue Konzepte für die Entwicklung synthetischer Rezeptorsysteme auf.

Calixarene sind gut untersuchte Modellsysteme für Rezeptoren, die synthetische Hohlräume für den Einschluss kleiner kationischer Gäste wie Alkalimetall- oder Ammoniumionen bereitstellen.^[2–5] Organische Kationen wie Ammoniumionen spielen eine wichtige Rolle bei molekularen Erkennungsprozessen in der Natur (z. B. in Proteinseitenketten). Calix[*n*]arene sind eine Klasse makrocyclischer Verbindungen, die durch basenkatalysierte Kondensation von *n* Phenolderivaten und Formaldehyd gebildet werden.^[2,3] Die hier verwendeten Resorc[4]arene^[6,7] bestehen aus vier Resorcin-Bausteinen, die über Methingruppen verbrückt sind. Dieses Strukturprinzip lässt Freiheitsgrade für Rotationen um die Methin-C-C-Bindungen zu, sodass sich fünf mögliche Konformationen ergeben: Krone (C_{4v}), Boot (C_{2v}), Sessel (C_{2h}), Diamant (C_s) und Sattel (D_{2d}). Um die konformative Flexibilität in Resorc[4]arenen einzuschränken, können z. B. die Hydroxygruppen am oberen Rand des Moleküls durch Kondensation verknüpft werden, wodurch das Molekül in der Kronen-Konformation fixiert wird. Die neue Verbindung wird als Cavitand^[8] bezeichnet, und der starre Hohlraum des Wirtes dient nun als Templat für den Einschluss kleiner Gastionen. Die Bindung kleiner Kationen an den Resorc[4]aren-Cavitanden wird durch Ion-Dipol-Wechselwirkungen ermöglicht, wobei Wasserstoffbrücken und Kation- π -Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen Ion und dem aromatischen Ringsystem des Cavitanden von großer Bedeutung sind.^[9] Die Spezifität der Bindung ist durch die sterische Komplementarität von Wirt und Gast gegeben: Nur Kationen, die klein genug sind, um in den Hohlraum zu passen, werden durch den Resorc[4]aren-Rezeptor erkannt. In unserem Experiment wurde ein 2,8,14,20-Tetra[10-(decylthio)decyl]-Cavitand mit einer berechneten Hohlraumweite von 0.7 nm auf die spezifische Erkennung von Ammoniumionen und Ammoniumderivaten untersucht (Abbildung 1).^[9]

Zur Untersuchung dieser Wechselwirkungen verwendeten wir die Einzelmolekül-Kraftspektroskopie. Bei dieser Methode wird die Verbiegung des Kraftsensors („cantilever“) eines Rasterkraftmikroskops (AFM) detektiert. Die Technik ermöglicht die Messung sehr kleiner Kräfte (Pikonewton) unter physiologischen Bedingungen. Zusammen mit ihrer räumlichen Auflösung bis in den Subnanometerbereich bietet die Einzelmolekül-Kraftspektroskopie einzigartige Möglichkeiten zur Untersuchung und Manipulation einzelner Mole-

[*] Dipl.-Chem. R. Eckel, Priv.-Doz. Dr. R. Ros, Prof. Dr. D. Anselmetti
Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften
Universität Bielefeld
Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)
Fax: (+49) 521-106-2959
E-mail: dario.anselmetti@physik.uni-bielefeld.de

Dipl.-Chem. B. Decker, Prof. Dr. J. Mattay
Organische Chemie
Universität Bielefeld
Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)
Fax: (+49) 521-106-6417
E-mail: mattay@uni-bielefeld.de

[**] Die Autoren danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 613) für finanzielle Unterstützung.

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

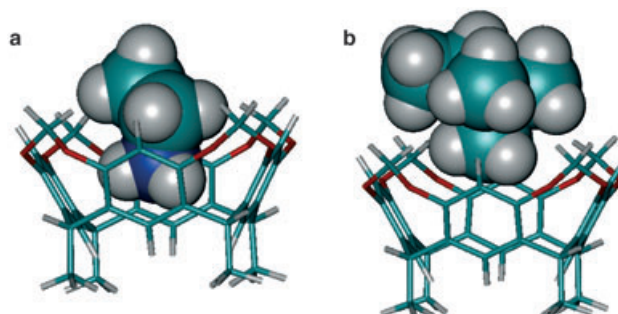


Abbildung 1. Gasphasenstruktur des Wirt-Gast-Komplexes aus dem Cavitanden und einem Ethylammoniumion (a) oder einem Trimethyl-ethylammoniumion (b). Die Struktur wurde auf dem B3LYP/3-21G*-Niveau optimiert.

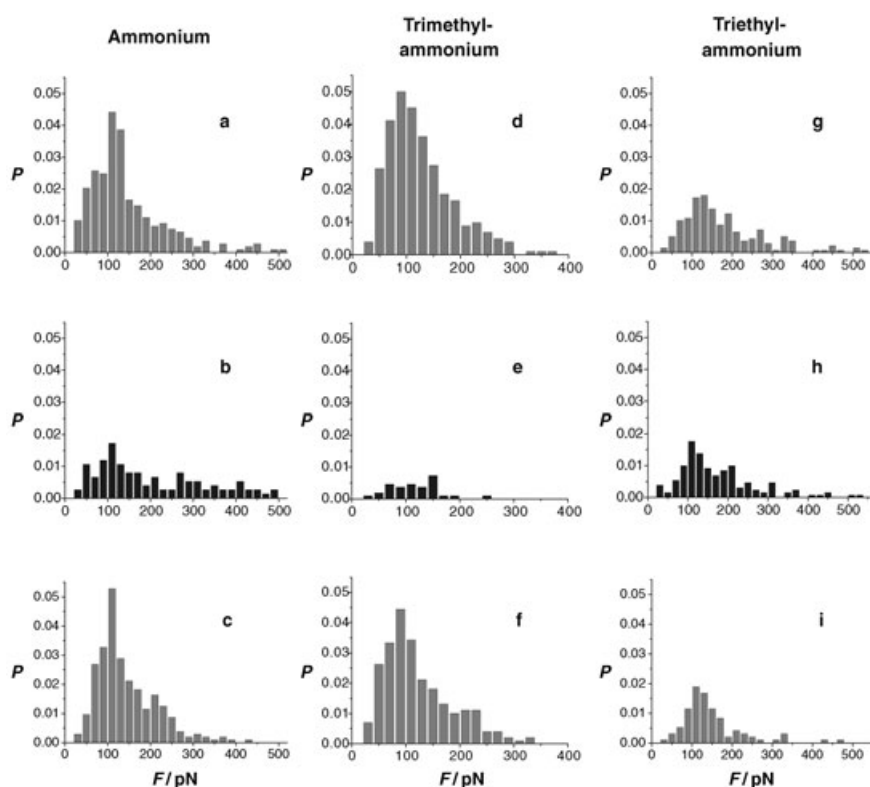


Abbildung 3. Ergebnisse der AFM-Experimente in Ethanol (a, d, g) und der Konkurrenzexperimente in gesättigten ethanolschen Lösungen der freien Ionen (b, e, h). Durch Waschen mit Ethanol wurden die ursprünglichen Dissoziationswahrscheinlichkeiten (P) wiederhergestellt (c, f, i).

Kraftentwicklung auf den molekularen Komplex ab, die man als Beladungsrate („loading rate“) bezeichnet. Die Beladungsrate errechnet sich aus dem Produkt der experimentellen Geschwindigkeit und der molekularen Elastizität. Die Elastizität des molekularen Systems wurde aus der Steigung der Kraft-Distanz-Kurve (korrigiert auf die molekulare Ausdehnung) auf den letzten 20 Datenpunkten vor dem Abriss erhalten und die Beladungsrate dann als Produkt aus Elastizität und Rückziehggeschwindigkeit berechnet.

Mithilfe der dynamischen Kraftspektroskopie wurden Details der Bindungskinetik und Informationen über die Längenskala der Wechselwirkung erhalten. Die Ergebnisse für die Geschwindigkeiten der natürlichen thermischen Dissoziation sind in Abbildung 4 gezeigt; man erhält $k_{\text{off}} = (0,99 \pm 0,81) \text{ s}^{-1}$ für den Ammoniumrest und $k_{\text{off}} = (1,87 \pm 0,75) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ für den Trimethylammoniumrest, was Lebensdauern der Bindungen von $\tau = 1,01 \text{ s}$ bzw. $\tau = 53,5 \text{ s}$ entspricht. Dieses Ergebnis deutet ebenso wie die Resultate der Konkurrenzexperimente darauf hin, dass sich der Trimethylammoniumrest besser, d. h. mit höherer Bindungsaffinität in den Rezeptorhohlraum einfügt als der Ammoniumrest. Bei Rezeptor-Ligand-Bindungen wird die Affinität der Wechselwirkung (Gleichgewichtskonstante der Dissoziation $K_{\text{diss}} = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$) durch die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{off} dominiert (und variiert), während die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{on} weniger stark variieren.^[13] Unter der Annahme diffusionskontrollierter Assoziation mit einer typischen Assoziationsgeschwindigkeit von $k_{\text{on}} =$

$10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^[13,28] für die Bindung eines Liganden in die Bindungstasche des Rezeptors lassen sich Gleichgewichtskonstanten von $K_{\text{diss}} = 0,99 \text{ s}^{-1}/10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \approx 10^{-5} \text{ M}$ für Ammonium und $K_{\text{diss}} = 2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}/10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} = 2 \times 10^{-7} \text{ M}$ für Trimethylammonium angeben. Aus den Gleichgewichtskonstanten leiten sich die Differenzen der freien Reaktionsenthalpien (Gibbs-Energien) gemäß $\Delta G = RT \ln K_{\text{diss}}$ ab. Es ergeben sich ungefähre Werte von $\Delta G \approx -28 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Ammonium) und $\Delta G \approx -38 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Trimethylammonium). Diese ΔG -Werte stimmen gut mit kalorimetrisch und NMR-spektroskopisch ermittelten Werten für ähnliche supramolekulare Systeme wie Cyclodextrine^[23,29] und wasserlösliche Cavitanen^[30] überein. Dieser Befund ist aus zwei Gründen von Bedeutung: 1) Es wurde belegt, dass die Rasterkraftspektroskopie für die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Einzelmolekülen mit einer zehn Größenordnungen umfassenden Bandbreite der Affinität anwendbar ist (10^{-15} M (Biotin-Streptavidin) bis 10^{-5} M (diese Arbeit)). 2) Durch Anwendung dieser Technik ist es nun möglich, Gleichgewichtskonstanten

und Bindungsenergien einzelner (supra)molekularer Komplexe abzuschätzen. Dies ist von allgemeinem Interesse, da z. B. in NMR-Experimenten die Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten und den zugehörigen Bindungsenergien für ionische Bindungspartner mit stark unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften sehr schwierig ist (so sind uns für das hier betrachtete System keine Werte bekannt).

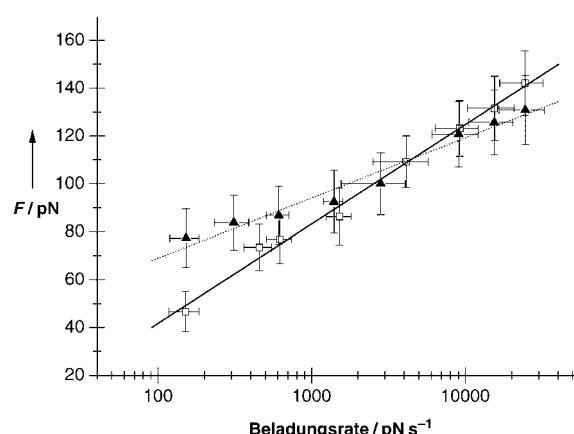


Abbildung 4. Halblogarithmische Auftragung der Dissoziationskraft gegen die Beladungsrate für die Bindung des Ammonium- und des Trimethylammoniumrestes an den Resor[4]aren-Cavitanen. □: Ammoniumrest ($k_{\text{off}} = 0,99 \text{ s}^{-1}$, $x_{\beta} = 0,22 \text{ nm}$), ▲: Trimethylammoniumrest ($k_{\text{off}} = 0,0187 \text{ s}^{-1}$, $x_{\beta} = 0,38 \text{ nm}$).

Aus der inversen Steigung der Auftragung der Kraft gegen die Beladungsrate erhält man molekulare Reaktionslängen von $x_{\beta} = (0.22 \pm 0.04)$ nm für den Ammoniumrest und $x_{\beta} = (0.38 \pm 0.06)$ nm für den Trimethylammoniumrest. Diese Werte sind vergleichbar mit den berechneten Van-der-Waals-Durchmessern von 0.3 nm für den Ammonium- und 0.6 nm für den Trimethylammoniumrest.^[9] Es lässt sich also schließen, dass der Passgenauigkeit (sterischen Komplementarität), mit der sich das Gastmolekül in den Rezeptorhohlraum einfügt, eine große Bedeutung bei der Wechselwirkung zukommt, wobei Kation- π -Wechselwirkungen beträchtlich zum molekularen Bindungsmechanismus beitragen. Dieser Sachverhalt trifft auch für den Trimethylammoniumrest zu, da gezeigt werden konnte, dass an den Wasserstoffatomen der Methylgruppen eine positive Partialladung vorliegt.^[31,32]

Wir haben gezeigt, dass die spezifische Wechselwirkung einzelner Gastmoleküle mit ihren Rezeptoren wie auch ihre Dissoziation mit dem Mechanismus des aktivierten Zerfalls eines metastabilen Zustandes in Einklang sind. Die Dissoziation ist thermisch aktiviert, wie es bereits theoretisch vorhergesagt und an biologischen Ligand-Rezeptor-Systemen experimentell verifiziert worden ist. Die gemessenen Reaktionslängen entsprechen den berechneten Van-der-Waals-Durchmessern der Gastliganden und ermöglichen eine Abschätzung, wie tief ein Ligand in den Rezeptorhohlraum des Calixaren-Cavitanden eindringt. Die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten stimmen mit den für eine niederaffine Wirt-Gast-Wechselwirkung erwarteten Werten überein. Mithilfe der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie konnten schließlich erstmals die untersuchten Liganden bezüglich ihrer Affinität zum Rezeptor klassifiziert und abgestuft werden.

Eingegangen am 21. Juli 2004

Stichwörter: Calixarene · Einzelmolekül-Untersuchungen · Kraftspektroskopie · Supramolekulare Chemie · Wirt-Gast-Systeme

- [1] a) J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry*, VCH, Weinheim, **1995**; b) F. Vögtle, *Supramolecular Chemistry*, Wiley, Chichester, **1991**; c) J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. Macnicol, F. Vögtle, J.-M. Lehn, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Pergamon, New York, **1996**; d) J. W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, Wiley, Chichester, **2000**; e) E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985–2993; f) P. Ehrlich, *Klin. Jahrb.* **1897**, 6, 299–326; g) A. Werner, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1907**, 40, 15–69.
- [2] C. D. Gutsche, *Calixarenes*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1989**.
- [3] C. D. Gutsche, *Calixarenes Revisited*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1998**.
- [4] J. Vicens, V. Böhmer, *Calixarenes. A Versatile Class of Macrocyclic Compounds*, Kluwer, Dordrecht, **1991**.
- [5] L. Mandolini, R. Ungaro, *Calixarenes in Action*, Imperial College Press, London, **2000**.
- [6] V. Böhmer, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 785–818; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 713–745.
- [7] P. Timmerman, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, *Tetrahedron* **1996**, 52, 2663–2704.
- [8] D. J. Cram, S. Karbach, H. E. Kim, C. B. Knobler, E. F. Maverick, J. L. Ericson, R. C. Helgeson, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 2229–2237.
- [9] A. B. Rozhenko, W. W. Schoeller, M. C. Letzel, B. Decker, C. Agena, J. Mattay, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [10] G. U. Lee, D. A. Kidwell, R. J. Colton, *Langmuir* **1994**, 10, 354–357.
- [11] E.-L. Florin, V. T. Moy, H. E. Gaub, *Science* **1994**, 264, 415–417.
- [12] P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H. Gruber, K. Schilcher, H. Schindler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 3477–3481.
- [13] F. Schwesinger, R. Ros, T. Strunz, D. Anselmetti, H.-J. Güntherodt, A. Honegger, L. Jermutus, L. Tiefenauer, A. Plückthun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 9972–9977.
- [14] U. Dammer, M. Hegner, D. Anselmetti, P. Wagner, M. Dreier, W. Huber, H.-J. Güntherodt, *Biophys. J.* **1996**, 70, 2437–2441.
- [15] R. Ros, F. Schwesinger, D. Anselmetti, M. Kubon, R. Schäfer, A. Plückthun, L. Tiefenauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 7402–7405.
- [16] J. Fritz, A. G. Katopodis, F. Kolbinger, D. Anselmetti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12283–12288.
- [17] F. W. Bartels, B. Baumgarth, D. Anselmetti, R. Ros, A. Becker, *J. Struct. Biol.* **2003**, 143, 145–152.
- [18] G. U. Lee, L. A. Chrisey, R. J. Colton, *Science* **1994**, 266, 771–773.
- [19] T. Strunz, K. Oroszlan, R. Schäfer, H.-J. Güntherodt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 11277–11282.
- [20] U. Dammer, O. Popescu, P. Wagner, D. Anselmetti, H.-J. Güntherodt, G. N. Misevic, *Science* **1995**, 267, 1173–1175.
- [21] H. Schönherr, M. W. J. Beulen, J. Bügler, J. Huskens, F. C. J. M. van Veggel, D. N. Reinhoudt, G. J. Vancso, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 4963–4967.
- [22] S. Zapotoczny, T. Auletta, M. R. de Jong, H. Schönherr, J. Huskens, F. C. J. M. van Veggel, D. N. Reinhoudt, G. J. Vancso, *Langmuir* **2002**, 18, 6988–6994.
- [23] T. Auletta, M. R. de Jong, A. Mulder, F. C. J. M. van Veggel, J. Huskens, D. N. Reinhoudt, S. Zou, S. Zapotoczny, H. Schönherr, G. J. Vancso, L. Kuipers, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1577–1584.
- [24] S. Kado, K. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4560–4564.
- [25] S. Kado, K. Yamada, K. Kimura, *Langmuir* **2004**, 20, 3259–3263.
- [26] G. I. Bell, *Science* **1978**, 200, 618–627.
- [27] E. Evans, K. Ritchie, *Biophys. J.* **1997**, 72, 1541–1555.
- [28] M. Schlosshauer, D. Baker, *Protein Sci.* **2004**, 13, 1660–1669.
- [29] L. A. Godínez, L. Schwartz, C. M. Criss, A. E. Kaifer, *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 3376–3380.
- [30] T. Haino, D. M. Rudkevich, A. Shivanyuk, K. Rissanen, J. Rebek, Jr., *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 3797–3805.
- [31] C. A. Deakyne, M. Meot-Ner (Mautner), *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 474–479.
- [32] H. J. Schneider, T. Schiestel, P. Zimmermann, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7698–7703.