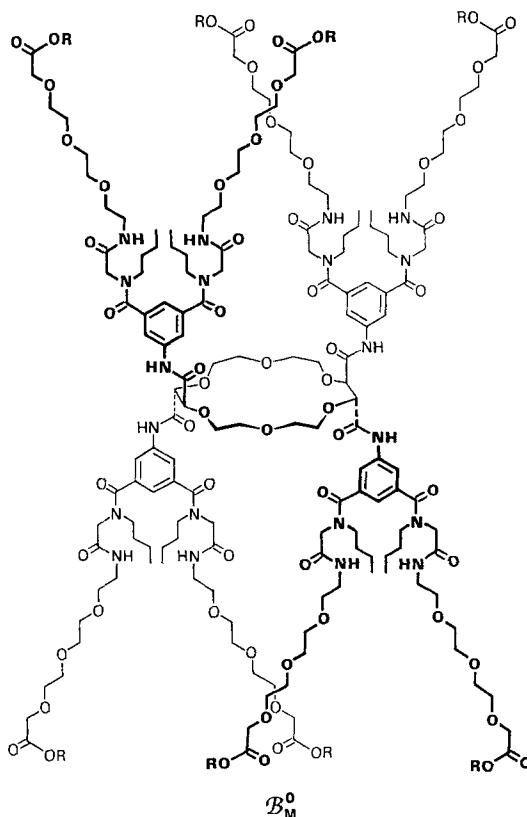


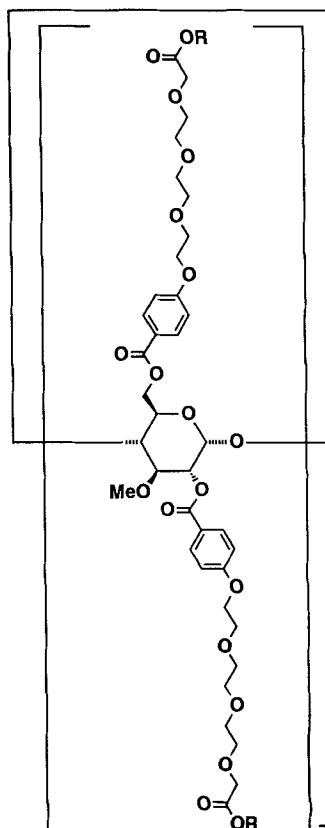
- [1] J. P. Collmann, L. S. Hegedus, J. R. Norton, R. G. Finke, *Principles and Applications of Organotransition Metal Chemistry*, University Science Book, Mill Valley, CA, USA, 1987, Kap. 4, zit. Lit.
- [2] a) R. D. W. Kemmitt, D. R. Russel in *Comprehensive Organometallic Chemistry*, Vol. 5 (Hrsg.: G. Wilkinson, F. G. A. Stone, E. W. Abels), Pergamon Press, Oxford, 1982; b) A. Davison, J. E. Ellis, *J. Organomet. Chem.* 1971, 31, 239; c) W. Hieber, K. Wollmann, *Chem. Ber.* 1962, 95, 1552; d) P. A. Bellus, T. L. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* 1980, 102, 6020.
- [3] a) F. Ungvary, A. Wojcicki, *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 6848; b) F. Ungvary, J. Gallucci, A. Wojcicki, *Organometallics* 1991, 10, 3053.
- [4] a) D. P. Schussler, W. R. Robinson, W. F. Edgell, *Inorg. Chem.* 1974, 13, 153; b) M. Y. Darenbourg, *Prog. Inorg. Chem.* 1985, 33, 221.
- [5] T. Graaf, R. M. J. Hofstra, P. G. M. Schilder, M. Rijkhoff, D. J. Stukens, J. G. M. Linden, *Organometallics* 1991, 10, 3668, zit. Lit.
- [6] M. J. Therien, W. C. Trogler, *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 4942.
- [7] G. Fachinetti, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1979, 396.
- [8] G. Fachinetti, T. Funaioli, M. Marcucci, *J. Organomet. Chem.* 1988, 353, 393.
- [9] H.-N. Adams, G. Fachinetti, J. Strähle, *Angew. Chem.* 1980, 92, 411; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1980, 19, 404.
- [10] M. Absi-Halabi, J. D. Atwood, N. P. Forbus, T. L. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* 1980, 102, 6248.
- [11] W. Hieber, C. Bartenstein, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 1954, 276, 1.



Auf dem Weg zu künstlichen Ionenkanälen: Transport von Alkalimetall-Ionen durch Liposomenmembranen über Bukettmoleküle**

Von Marko J. Pregel, Ludovic Jullien und Jean-Marie Lehn*

Der Transport von Ionen durch Membranen ist für lebende Systeme von essentieller Bedeutung und spielt z.B. beim Energiestoffwechsel und bei der Erregung von Nerven und Muskeln eine entscheidende Rolle^[1]. Dieser Transport kann entweder über diffundierende Trägermoleküle (Shuttlemechanismus) oder durch membran durchdringende Kanäle erfolgen (Kanalmechanismus)^[2]. In der supramolekularen Chemie werden Prozesse mit freien Trägermolekülen bereits seit einigen Jahren intensiv untersucht^[3]. In jüngerer Zeit richtete sich das Augenmerk verstärkt auf Design, Synthese und Wirkungsweise von molekularen Anordnungen, die Ionen über einen Kanalmechanismus durch Membranen hindurch transportieren können^[4]. Im wesentlichen wurden dabei bisher zwei Strategien verfolgt: 1) Bildung einer Pore durch Aggregation monomerer Transmembranspezies, d.h. Nachahmung der Wirkungsweise des natürlich vorkommenden Kanalproteins Alamethicin^[5]; 2) Verwendung von Molekülen mit kanalartiger Struktur wie beim natürlichen Gramicidin-Kanal. Der hier vorgestellte „Bukett-Weg“ zu künstlichen Ionenkanälen gehört zur zweiten Kategorie und geht von makrocyclischen Verbindungen aus, auf die Poly(oxyethylen)- oder Polymethylenketten mit geladenen Endgruppen aufgepfropft sind. In früheren Arbeiten haben wir bereits über Entwurf und Synthese zweier Klassen solcher Bukettmoleküle^[6] berichtet, wobei die eine sich von einem makrocyclischen Kern (\mathcal{B}_M^0), die andere von einem β -Cyclodextrin (\mathcal{B}_{CD}^0) ableitet (Schema 1). Wir berichten jetzt über vorläufige Untersuchungen, die zeigen, daß diese Bukettmo-



Schema 1. Strukturen von Bukettmolekülen mit einer zentralen makrocyclischen Polyether- (oben; \mathcal{B}_M^0 , R = Na) bzw. Cycloextrineinheit (unten; \mathcal{B}_{CD}^0 , R = H) und Poly(oxyethylen)seitenketten. Analogverbindungen mit Polymethylenseitenketten (\mathcal{B}_M^C und \mathcal{B}_{CD}^C) wurden ebenfalls synthetisiert und untersucht.

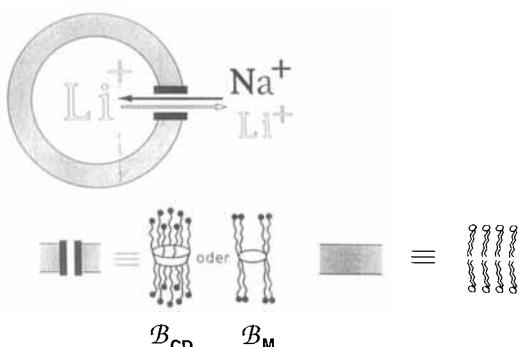
[*] Prof. Dr. J.-M. Lehn, Dr. M. J. Pregel, Dr. L. Jullien
 Laboratoire de Chimie des Interactions Moléculaires (UPR 285)
 Collège de France
 11, place Marcelin Berthelot, F-75005 Paris (Frankreich)

[**] Wir danken Dr. Josette Canceill für die Synthese einiger der hier verwendeten Verbindungen. M. J. P. dankt dem Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada für ein Nato-Science-Stipendium.

leküle in Doppelschichtmembranen als Ionentransportvermittler wirken.

Natürlicher und künstlicher Ionentransport sind bei Liposomen bereits mit unterschiedlichsten Methoden untersucht worden: Atomabsorptionsanalyse^[4b], Leitfähigkeitsmessungen an planaren Doppelschichten^[4d, f], Fluoreszenz- und UV/VIS-Spektroskopie^[4a, c, e, h] und pH-stat-Techniken^[4e]. Die Alkalimetall-Ionen-NMR-Spektroskopie wurde ebenfalls schon benutzt, um den Ionentransport durch die Phospholipiddoppelschichten von Liposomen zu verfolgen^[4g, 7, 8]. Alkalimetall-Ionen in der wäßrigen Lösung außerhalb der Liposomen können bei Zugabe eines Shiftreagens von den Ionen innerhalb der Liposomen unterscheiden werden^[9]. Man erhält dementsprechend zwei Signale, von denen eines zu den inneren (Signal nicht verschoben), das andere zu den äußeren Ionen (Signal verschoben) gehört. Wir untersuchten nun den Zusammenbruch entgegengerichteter Gradienten von Na^+ - und Li^+ -Ionen durch eine Membran mit ^{23}Na - und ^7Li -NMR-Spektroskopie^[7].

Zunächst wurden in wäßriger LiCl -Lösung Liposomen hergestellt. Nach Zugabe einer Shiftreagenslösung (basierend auf DyCl_3 , siehe Experimentelles), wurden entgegengesetzte Gradienten von Na^+ - und Li^+ -Ionen durch Zugabe einer isoosmolaren NaCl -Lösung erzeugt. Anfänglich fanden sich Na^+ -Ionen nur im äußeren Volumen. Der Eintritt von Na^+ -Ionen in die Liposomen wurde dann durch Integration des Signals für „innere“ Ionen als Funktion der Zeit aufgenommen (siehe Schema 2). Dieses Vorgehen hat eine



Schema 2. Schematische Darstellung des Transportexperiments, bei dem wäßrige NaCl -Lösung zu Liposomen gegeben wird, die in wäßriger LiCl -Lösung hergestellt wurden und Bukettmoleküle in der Membran enthalten. Dabei werden entgegengesetzte Gradienten von Na^+ - und Li^+ -Ionen aufgebaut. Der resultierende Einstrom von Na^+ -Ionen in die Liposomen wird ^{23}Na -NMR-spektroskopisch verfolgt (zu Beginn des Versuchs finden sich Na^+ -Ionen nur in der Lösung außerhalb der Liposomen); der entsprechende Ausstrom von Li^+ -Ionen wird ^7Li -NMR-spektroskopisch gemessen.

Reihe von Vorteilen: Erstens können beide Sorten von transportablen Alkalimetall-Ionen direkt und nahezu gleichzeitig beobachtet werden; zweitens kann das Platzen von Liposomen während des Experiments, das die Freisetzung von Na^+ - und Li^+ -Ionen zur Folge hätte, nicht mit Transmembrantransport verwechselt werden, da man den *Eintritt* von Na^+ -Ionen mißt; drittens ermöglicht das Gradientenexperiment die Bestimmung von Transportgeschwindigkeiten über einen weiten Bereich: Die Zeitskala des Experiments reicht von 10^2 bis 10^4 min.

Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse für den Transport von Na^+ -Ionen durch Liposomenmembranen, die Bukettmoleküle enthalten. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen eines Kontrollexperiments ohne Bukettmoleküle, so erkennt man, daß die Gegenwart letzterer sowohl die Geschwindigkeit als auch der Umfang des Transports erheblich größer sind als beim Kontrollexperiment, d. h. diese Moleküle erhöhen die Permeabilität von Phospholipidmembranen gegenüber Alkalimetall-Ionen. Ebenso überraschend wie inter-

essant ist die Tatsache, daß Bukettmoleküle mit Poly-methylenketten fast so gut wirksam sind wie solche mit Poly(oxyethylen)ketten und zwar in beiden Serien (\mathcal{B}_M^0 und \mathcal{B}_{CD}^0). Darüber hinaus transportieren korrespondierende Verbindungen der beiden Klassen mit nur geringfügig verschiedenen Geschwindigkeiten. Schließlich sollte erwähnt werden, daß unter den gewählten Bedingungen die Transportgeschwindigkeiten klein sind (scheinbar 1. Ordnung, Geschwindigkeitskonstanten in der Größenordnung 10^{-3} min^{-1}) im Vergleich zu denen bei anderen künstlichen Ionenkanälen. Unmittelbare Zahlenvergleiche sind jedoch angesichts unterschiedlicher experimenteller Bedingungen nicht sinnvoll.

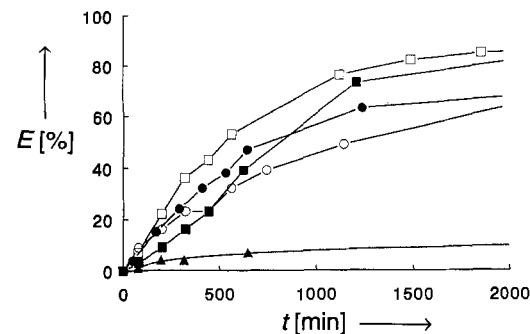


Abb. 1. Relative Menge der in die Liposomen eingeschleusten Na^+ -Ionen (E) als Funktion der Zeit in Gegenwart der Bukettmoleküle \mathcal{B}_M^0 (●), \mathcal{B}_M^C (○), \mathcal{B}_{CD}^0 (■) und \mathcal{B}_{CD}^C (□) sowie in Abwesenheit von Bukettmolekülen (▲). Die relative Menge der eingeschleusten Ionen ist ein normalisierter Parameter, d. h. in jedem Experiment wird der maximal erreichte Wert gleich 100 % gesetzt. Die Konzentrationen der Bukettmoleküle waren $62 \mu\text{M}$ (\mathcal{B}_M^0), $27 \mu\text{M}$ (\mathcal{B}_M^C), $56 \mu\text{M}$ (\mathcal{B}_{CD}^0) und $51 \mu\text{M}$ (\mathcal{B}_{CD}^C); die Lipidkonzentration lag in Bereich zwischen 8.4 und 11.2 mg mL^{-1} .

Der Transport der Alkalimetall-Ionen kann nach unterschiedlichen Mechanismen ablaufen: entgegengesetztem Kation-Kation-Transport, entgegengesetztem Kation-Proton-Transport oder gleichgerichtetem Kation-Anion-Transport^[10]. Im vorliegenden System wurde der Einstrom von Na^+ -Ionen in die Liposomen mit ^{23}Na -NMR-Spektroskopie verfolgt. In einigen Experimenten wurde parallel dazu mit ^7Li -NMR-Spektroskopie der Ausstrom von Li^+ -Ionen gemessen. Es war daher möglich, zu verschiedenen Zeitpunkten die Menge der bereits inkorporierten Na^+ -Ionen mit der Menge der ausgetretenen Li^+ -Ionen zu vergleichen (Abb. 2). Innerhalb der experimentellen Fehlergrenzen waren beide Werte zu jedem gegebenen Zeitpunkt gleich, was den Schluß nahelegt, daß Na^+ - und Li^+ -Transport durch Bukettmoleküle über einen 1:1-Austausch von Natrium gegen Lithium erfolgt (entgegengesetzter Kation-Kation-

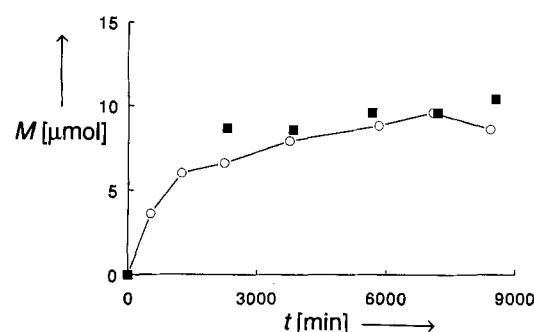


Abb. 2. Menge M der eingeschleusten Na^+ -Ionen (○) sowie der ausgeschleusten Li^+ -Ionen (■) als Funktion der Zeit für Liposomen, die \mathcal{B}_M^0 enthalten. Andere Bukettmoleküle liefern ähnliche Ergebnisse.

Transport). Der langsamere Transport (vermutlich der von Li^+) wird damit geschwindigkeitsbestimmend für den Gesamttransport.

Die Ergebnisse erlauben keine genaue Aussage über den Mechanismus, nach dem die Bukettmoleküle den transmembranen Kationenstrom ermöglichen. Es wurde jedoch beobachtet, daß in Anwesenheit der Bukettmoleküle \mathcal{B}_M^C und \mathcal{B}_{CD}^O der Kationendurchtritt durch Membranen aus Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) im *Gelzustand* mit annähernd gleicher Geschwindigkeit erfolgt wie durch Ei-Phosphatidylcholinmembranen (EPC), die im *flüssigen Zustand* vorliegen. Im Gegensatz dazu ist die Transportgeschwindigkeit von Monensin A, einem ionophoren Antibiotikum, das nach dem Shuttlemechanismus arbeitet, bei DPPC-Membranen im Gelzustand drastisch gegenüber der von Monensin A in flüssigen EPC-Membranen verringert. Damit kann zumindest für die Bukettmoleküle \mathcal{B}_M^C und \mathcal{B}_{CD}^O ein Shuttlemechanismus ausgeschlossen werden. Wenn auch eine Störung der Membranstruktur durch die Bukettmoleküle und damit eine generelle Änderung der Membranpermeabilität nicht völlig auszuschließen ist, so stehen unsere Ergebnisse dennoch in gutem Einklang mit einem Kanalmechanismus für den Ionentransport.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß Bukettmoleküle in die Phospholipidmembran von Liposomen inkorporierbar sind und die Permeabilität der Membran gegenüber Na^+ - und Li^+ -Ionen erhöhen; dabei ist ein entgegengesetzter Kation-Kation-Transport wirksam. Variationen am Bukettmolekül wie der Wechsel von Poly(oxyethylen)- zu Poly-methylenseitenketten oder von einer zentralen Kronenether- zu einer Cyclodextrineinheit hatten keinen entscheidenden Einfluß auf die Transportaktivität. Für zwei der getesteten Verbindungen kann ein Shuttlemechanismus ausgeschlossen werden, da sich ihre Transportaktivität in Membranen im Gelzustand nicht verringert. Weitere Arbeiten zur Untersuchung des Transportmechanismus und zum Einfluß von Parametern wie der Membranzusammensetzung, der Natur des Alkalimetall-Ions sowie der Bukettkonzentration auf die Transportgeschwindigkeit sollten ein noch besseres Verständnis der Wirkungsweise dieser Substanzklasse ermöglichen.

Experimentelles

Große unilamellare Vesikel (Liposomen) wurden aus Ei-Phosphatidylcholin mit der dialytischen Detergentsermentationstechnik erhalten [11]. Die Inkorporation der Bukettmoleküle in die Membran erfolgte während der Liposomenbildung. Dazu wurden Vorratslösungen des Buketts, des Lipids und des Detergents gemischt, zur Trockne eingedampft, mit wäßriger 100 mM LiCl-Lösung hydratisiert und gegen wäßrige 100 mM LiCl-Lösung dialysiert. Der Lipidgehalt der Liposomenpräparatur wurde durch Analyse des Phosphatgehalts nach Verdauung bestimmt [12]; der Gehalt an Bukettmolekülen wurde über deren Absorption bei 250 oder 255 nm gemessen. In einem typischen Transportexperiment wurde das Liposomenpräparat (1.0 mL) mit einer isoosmolaren Lösung des Shiftreagens (30 mM $(\text{Me}_2\text{N})_3\text{P}_2\text{O}_{10}$, 10 mM DyCl_3 ; 0.3 mL) und 100 mM NaCl-Lösung (0.8 mL) versetzt und damit transmembrane Gradienten von Na^+ - und Li^+ -Konzentrationen erzeugt. Der Einstrom von Na^+ -Ionen in die Liposomen wurde ^{23}Na -NMR-spektroskopisch durch Integration des Signals für „innere“ Na^+ -Ionen verfolgt. Der Ausstrom von Li^+ -Ionen wurde ^7Li -NMR-spektroskopisch in analoger Weise gemessen. Die Temperatur wurde während des Experiments bei $25 \pm 1^\circ\text{C}$ gehalten.

Eingegangen am 10. August 1992 [Z 5506]

- [1] L. Stryer, *Biochemistry*, 3. Aufl. Freeman, 1988, S. 949; deutsche Ausgabe: *Biochemie*, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 1990, S. 985.
- [2] P. Läuger, *Angew. Chem.* 1985, 97, 939; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1985, 24, 905.
- [3] J.-M. Lehn in *Physical Chemistry of Transmembrane Ion Motions*, (Hrsg.: G. Spach), Elsevier, Amsterdam, 1983, S. 181–207; J.-M. Lehn, *Angew. Chem.* 1988, 100, 91; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1988, 27, 89.
- [4] a) I. Tabushi, Y. Kuroda, K. Yokota, *Tetrahedron Lett.* 1982, 23, 4601; b) J. H. Fuhrhop, U. Liman, V. Koesling, *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 6840, zit. Lit. c) U. F. Kragten, F. M. Roks, R. J. M. Nolte, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1985, 1275; d) J. D. Lear, Z. R. Wasserman, W. F. De Grado, *Science* 1988, 247, 1177; e) T. M. Fyles, T. D. James, K. C. Kaye, *Can. J. Chem.* 1989, 67, 976, zit. Lit.; f) T. M. Fyles, K. C. Kaye, T. D. James, D. W. M. Smiley, *Tetrahedron Lett.* 1990, 31, 1233; g) C. J. Stankovic, S. H. Heinemann, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 3702, zit. Lit.; h) A. Nakano, Q. Xie, J. V. Mallen, L. Echegoyen, G. W. Gokel, *ibid.* 1990, 112, 1287; h) F. M. Menger, D. S. Davis, R. A. Persichetti, J. J. Lee, *ibid.* 1990, 112, 2451.
- [5] R. O. Fox Jr., F. M. Richards, *Nature* 1982, 300, 325.
- [6] L. Jullien, J. M. Lehn, *Tetrahedron Lett.* 1988, 29, 3803; *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* 1992, 12, 55; J. Cancell, L. Jullien, L. Lacombe, J.-M. Lehn, *Helv. Chim. Acta* 1992, 75, 791.
- [7] M. M. Pike, S. R. Simon, J. A. Balschi, C. Springer, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982, 79, 810.
- [8] a) F. G. Riddell, S. Arumugam, B. G. Cox, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1987, 1890; F. G. Riddell, S. Arumugam, P. J. Brophy, B. G. Cox, M. C. H. Payne, T. E. Southon, *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 734, zit. Lit.; b) D. C. Shungu, R. W. Briggs, *J. Magn. Reson.* 1988, 77, 491, zit. Lit.
- [9] R. K. Gupta, P. Gupta, *J. Magn. Reson.* 1982, 47, 344; S. C. Chu, M. M. Pike, E. T. Fossel, T. W. Smith, J. A. Balschi, C. S. Springer, Jr., *ibid.* 1984, 56, 33; M. M. Pike, D. M. Yarmush, J. A. Balschi, R. E. Lenkinski, C. Springer, Jr., *Inorg. Chem.* 1983, 22, 2388, zit. Lit.; R. Ramasamy, M. C. Espanol, K. M. Long, D. Mota de Freitas, C. F. G. C. Gerald, *Inorg. Chim. Acta* 1989, 163, 41.
- [10] W. N. Konings, K. J. Hellingwerf, G. T. Robillard in *Membrane Transport* (Hrsg.: S. L. Bonting, J. J. H. H. M. de Pont), Elsevier, Amsterdam, 1981, S. 267.
- [11] L. T. Mimms, G. Zampighi, Y. Nozaki, C. Tanford, J. A. Reynolds, *Biochemistry* 1981, 20, 833.
- [12] P. S. Chen, Jr., T. Y. Toribara, Hubert Warner, *Anal. Chem.* 1956, 28, 1756; W. R. Morrisson, *Anal. Biochem.* 1964, 7, 218.

Berichtigungen

In der Correspondenz von T. Braun über „Die epidemische Ausbreitung der Fulleren-Forschung“ (*Angew. Chem.* 1992, 104, 602) fehlt – durch ein Versehen des Autors – in Tabelle 3 ein Eintrag. Nach der University of California, Los Angeles, muß die University of Pennsylvania mit 21 Veröffentlichungen eingefügt werden.

In dem Aufsatz „Flexible Moleküle mit definierter Gestalt – Konformationsdesign“ von R. W. Hoffmann (*Angew. Chem.* 1992, 104, 1147) und in der Berichtigung in Heft 11 ist die Strukturformel von Lardolure **9** falsch wiedergegeben. Sie muß durch folgende ersetzt werden.



Der Autor dankt Dr. M. Morr, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, für den Hinweis auf diese Fehler.