

Indikatorverdrängungsassays in lebenden Zellen**

Amir Norouzy, Zahra Azizi und Werner M. Nau*

Abstract: Der Makrocyclus *p*-Sulfonatocalix[4]aren (CX4) und der Fluoreszenzfarbstoff Lucigenin (LCG) bilden einen stabilen Wirt/Gast-Komplex, in dem die Fluoreszenz des Farbstoffs gelöscht wird. Die Inkubation von lebenden V79- und CHO-Zellen mit dem chemosensorischen Ensemble CX4/LCG führt zu dessen spontaner Aufnahme. Die nachfolgende Zugabe von Cholin, Acetylcholin oder Protamin, die alle eine hohe Affinität für CX4 haben und in der Lage sind, in die Zellen einzudringen, führte zu einer positiven Fluoreszenzantwort der Zellen. Dies kann auf die Verdrängung des LCG aus CX4 durch die Analyten zurückgeführt werden. Die Ergebnisse zeigen die grundsätzliche Funktionsfähigkeit von Indikatorverdrängungsassays mit synthetisch hergestellten Rezeptoren zur Detektion der Aufnahme bioorganischer Analyten in lebenden Zellen.

Indikatorverdrängungsassays (IDAs) mit synthetisch hergestellten Rezeptoren werden in der (bio)analytischen Chemie immer mehr beachtet,^[1] weil sie einen supramolekularen Ansatz zum empfindlichen Nachweis und zur Unterscheidung von Analyten bieten. IDAs umgehen sowohl die für übliche Immunoassays notwendige Herstellung hochspezifischer Antikörper als auch das Design nanotechnologischer Sensorsysteme, z. B. auf Basis von Graphenoxid^[2] oder verkap-selten mesoporenen Materialien.^[3]

Das Messprinzip basiert auf der Verwendung eines an einen Rezeptor gebundenen Indikatorfarbstoffs (das „Reporterpaar“); der Rezeptor, häufig ein makrocyclischer Wirt, wird mit der Maßgabe einer hohen Affinität zum Zielanalyten ausgewählt, damit dessen kompetitive Bindung zu einer Freisetzung des Farbstoffs und im gleichen Zug zu einer Änderung dessen photophysikalischer Eigenschaften, vorzugsweise der Fluoreszenz, führt. Die Eigenheit solcher Assays, nämlich die geringe Selektivität, mit der der Rezeptor

verschiedene Analyten bindet, ist einerseits ein Vorteil, weil eine große Bandbreite von Analyten nachgewiesen werden kann, und zwar ohne die Notwendigkeit spezifische Rezeptoren für jeden einzelnen herstellen zu müssen. Andererseits ist sie auch ein Nachteil, weil die Assays sehr empfindlich auf die kompetitive Bindung anderer Spezies mit komplementärer Ladung und Größe reagieren; diese sind in vielen flüssigen Matrices und fast immer in biologischen Proben allgegenwärtig.^[4] Gleichwohl wurden einige biologisch relevante Anwendungen von Makrocyclen vorgestellt, darunter auch im Bereich Wirkstofftransport,^[5] der verbesserten Membrangängigkeit von Fluoreszenzfarbstoffen^[6] und DNA,^[7] der Immobilisierung von Zellen,^[8] der Proteinerkennung^[9] und der Bildung von Zellen.^[10]

Wir haben zuvor zeitaufgelöste Varianten von Verdrängungsassays entwickelt, die wir als supramolekulare Tandem-Assays bezeichnen, weil sie in der Lage sind, enzymatische Reaktionen in Echtzeit zu verfolgen.^[11] Interessanterweise konnten diese Assays nicht nur mit gereinigten Enzymen, sondern auch mit ungereinigten Extrakten^[11c] und sogar mit getrockneten Zellen, die ein bestimmtes Enzym exprimieren,^[11a] durchgeführt werden. Obwohl die Anwesenheit von Salzen, Metaboliten und Proteinen in biologischen Proben aufgrund der kompetitiven Bindung zu einer sofortigen Änderung des absolut messbaren Signals führt,^[11c,12] ist es die zeitabhängige Antwort des Assays, die als robuster Nachweis der enzymatischen Aktivität dient, und die ausgewertet wird.^[13] Diese Einsicht hat uns veranlasst, weitere Methoden zu entwickeln, in denen die orts- und zeitabhängige Antwort der Indikatorverdrängung ausgenutzt werden kann. Zum Beispiel haben wir kürzlich Tandem-Membranassays eingeführt, in denen das Reporterpaar räumlich isoliert im Innenraum von Liposomen vorliegt; auf diese Art kann nach Zugabe eines Zielanalyten zum umgebenden Hauptanteil der Lösung dessen durch ein Protein vermittelte Translokation durch eine Biomembran in Echtzeit verfolgt werden.^[14] Die Kombination dieser Ergebnisse, nämlich eine nennenswerte Toleranz gegenüber kompetitiven Bindern und eine räumlich lokalisierte Antwort, regten uns an, die zweitwichtigste biologische Herausforderung anzugehen: den Transfer von IDAs mit synthetischen Rezeptoren in lebende Zellen, um dort die Zellaufnahme biomolekularer Analyten zu verfolgen. Tatsächlich ist die Anwendung künstlicher Rezeptoren zur Verfolgung bioorganischer Analyten oder von Medikamenten in zellulärer Umgebung eine Herausforderung für sich;^[1b,4,10,15] sie geht über die gut etablierte Detektion bestimmter anorganischer Ionen in Zellen^[16] oder die Verwendung fluoreszenzerzeugender Sensoren für spezifische funktionelle Gruppen, wie solcher für Biothiole,^[17] hinaus.

Wir haben verschiedene Makrocyclus/Farbstoff-Kombinationen auf ihre Kompatibilität mit Biomembranen hin untersucht, und unter einigen Kombinationen fanden wir, dass

[*] Dr. A. Norouzy, Prof. Dr. W. M. Nau
Department of Life Sciences and Chemistry
Jacobs University Bremen
Campus Ring 1, 28759 Bremen (Deutschland)
E-Mail: w.nau@jacobs-university.de

Z. Azizi

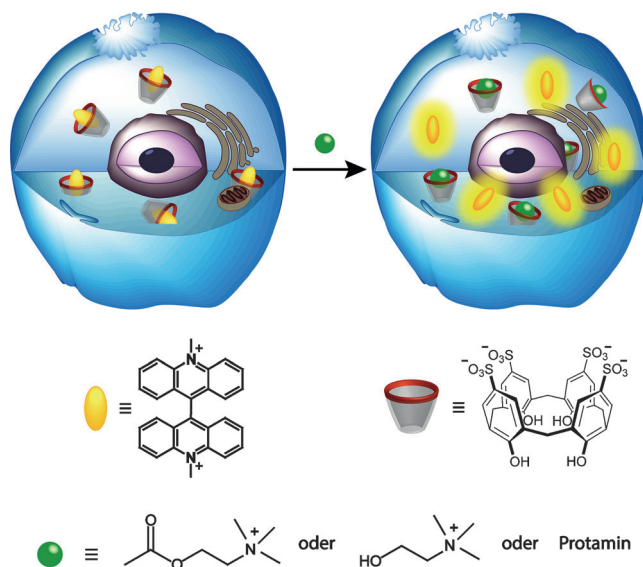
Centre for Biomolecular Interactions, University of Bremen
Leobener Straße NW2, 28359 Bremen (Deutschland)

[**] Wir danken D. Gabel (Jacobs University) für die Bereitstellung von V79-Zellen und der Zellkulturausstattung, K. Brix, M. Rehders, J. Fritz und M. Winterhalter (Jacobs University), K. Maedler (University of Bremen) sowie R. Amann, B. Fuchs und A. Ellrott (Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie) für den Zugang zu ihren Messeinrichtungen. Die Autoren danken der DFG (W.M.N.) und dem DAAD (Promotionsstipendium für A.N.) für die Unterstützung des Projekts.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201407808> zu finden.

das aus *p*-Sulfonatocalix[4]aren (CX4) und Lucigenin (*N,N'*-Dimethyl-9,9'-biacridiniumdinitrat, LCG) zusammengesetzte Reporterpaar von den beiden hier verwendeten Zelllinien, Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (CHO) und Fibroblasten (V79), spontan aufgenommen wurde. Die Aufnahme des Reporterpaares sollte uns die nachfolgende Durchführung zellulärer IDAs erlauben, wobei die hohe Biokompatibilität und die geringe Toxizität beider Komponenten, von LCG und Calixarenen im allgemeinen^[18] sowie von CX4 im besonderen,^[18e,f,19] förderlich für die Lebendzellmessungen sein sollte. Tatsächlich hatte die Inkubation mit LCG (250 μM , 24 h) keine nachteiligen Auswirkungen. Die zellulären IDAs, die wir nun durchführen konnten, sind in Schema 1 skizziert.



Schema 1. Die Aufnahme von Analyten in mit dem Makrocyclen/Farbstoff-Komplex beladene Zellen resultiert in der Verdrängung des Farbstoffes aus dem Makrocyclen und einem damit einhergehenden Fluoreszenzanstieg.

Die Ergebnisse zur erfolgreichen Aufnahme der Analyten, erkennbar am Fluoreszenzanstieg, sind in Abbildung 1 gezeigt.

Die Farbstoffaufnahme wurde bestätigt und quantifiziert durch Inkubation mit dem Farbstoff (in An- und Abwesenheit des Makrocyclen), nachfolgender Lyse der Zellen und Messung der Fluoreszenz nach Verdünnung und Zugabe eines Kompetitors (um die vollständige Auflösung des Wirt/Farbstoff-Komplexes sicherzustellen). Dabei ist zu beachten, dass die Fluoreszenz des Farbstoffs im supramolekularen Komplex gelöscht ist, was zu einer Fluoreszenzverminderung nach Zugabe von CX4 und zu einem Fluoreszenzanstieg nach Zugabe des Kompetitors führt.^[20] Die Aufnahme des Makrocyclen (in Gegenwart des Farbstoffs) wurde indirekt durch nicht weniger als vier unabhängige Beobachtungen erhärtet: a) Mit LCG (800 μM , 30 min) inkubierte Zellen ergaben in Gegenwart von CX4 (bis zu fünffacher Überschuss) eine bis zu zweimal effizientere Aufnahme von LCG (Tabelle 1),^[21] was nahelegt, dass der Wirt zusätzlich als Carrier wirkt (ähnlich der DNA-Transfektion mit kationischen Calixare-

Tabelle 1: Effizienz der Aufnahme und absolute zelluläre Konzentrationen von LCG in An- und Abwesenheit von CX4.^[a]

Zelllinie	[CX4] [mM]	[LCG in Zellen] [μM] ^[b]	Aufnahme [%] ^[b]
V79-Zellen	0	75	9.4
	4.5	150	19
CHO-Zellen	0	10	1.3
	4.5	20	2.5

[a] Quantifizierung durch Lyse, siehe Hintergrundinformationen. [b] Inkubationsbedingungen: 800 μM LCG und 30 min.

nen).^[7] b) Die Fluoreszenzbilder von mit LCG inkubierten Zellen zeigten in Gegenwart von CX4 eine viel schwächere Fluoreszenz (Abbildung S7 in den Hintergrundinformationen). c) Die Fluoreszenz des Zellslysats von mit LCG in Gegenwart von CX4 inkubierten Zellen erhöhte sich substantiell durch Zugabe von Kompetitoren, was die Dissoziation des Wirt/Farbstoff-Komplexes und somit die Gegenwart von CX4 bestätigt (Abbildung S4). d) Der bei Zugabe von Analyt zu den lebenden Zellen beobachtete Fluoreszenzanstieg (Abbildung 1) erfordert, im Gegensatz zu einer einfachen Fluoreszenzlösung, ebenso die Freisetzung des Farbstoffs aus dem gelöschten Zustand, also dem Makrocyclen/Farbstoff-Komplex.^[22]

Das überraschende Ergebnis, dass IDAs in lebenden Zellen funktionsfähig bleiben (Abbildung 1), kann durch die günstigen Eigenschaften dieses Wirt/Farbstoff-Systems erklärt werden. Erstens bindet LCG an CX4 in Experimenten in reinem Wasser mit einer für synthetisch hergestellte Makrocyclen sehr hohen Affinität ($K_a = 2.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$),^[20,23] was die Detektion von Kompetitoren mit ebenfalls hohen effektiven Bindungskonstanten erleichtert, wie z.B. von Acetylcholin (ACh, $K_a = 1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), Cholin (Ch, $1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)^[20] und dem polykationischen Peptid Protamin ($1.24 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$),^[14] um die hier untersuchten Analyten zu nennen. Zweitens löscht CX4 die Fluoreszenz von LCG sehr effektiv (bis um einen Faktor 140),^[20] was eine einfach zu detektierende Antwort auf die kompetitive Bindung sicherstellt.

Vorexperimente in Tyrode-Lösung und CHO-Medium (Abbildung S6) zeigten, dass sich beide Eigenschaften des Reporterpaares aufgrund der Anwesenheit großer Mengen von kompetitiven Salzen, Nährstoffen und anderen Biomolekülen erwartungsgemäß verschlechtern,^[12b] aber genügend hoch bleiben ($K_a = 3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, Fluoreszenzanstieg um einen Faktor 90 in Tyrode-Lösung und 25 in CHO-Medium), um die Zielanalyten zu detektieren. Dies ermutigte uns in der Anwendung des CX4/LCG-Reporterpaares zur Verfolgung der Aufnahme von Analyten in lebende Zellen.

Es bestand die Möglichkeit, dass das CX4/LCG-Reporterpaar nur physikalisch an der Oberfläche der Zellmembran adsorbiert wäre oder lediglich in der äußeren Schicht der Zellmembran eingebaut und somit leicht zugänglich bliebe. In diesen Fällen sollte die Inkubation der Zellen mit Kompetitoren wie Cholin und Acetylcholin (50 mM)^[20] sowie Protamin (200 μM)^[14] zu einer sofortigen Abgabe von LCG in das umgebende Medium führen, weil der eigentliche Verdrängungsprozess innerhalb von Millisekunden abläuft.^[14] Allerdings zeigten die Analytlösungen, die nach 10–20 min

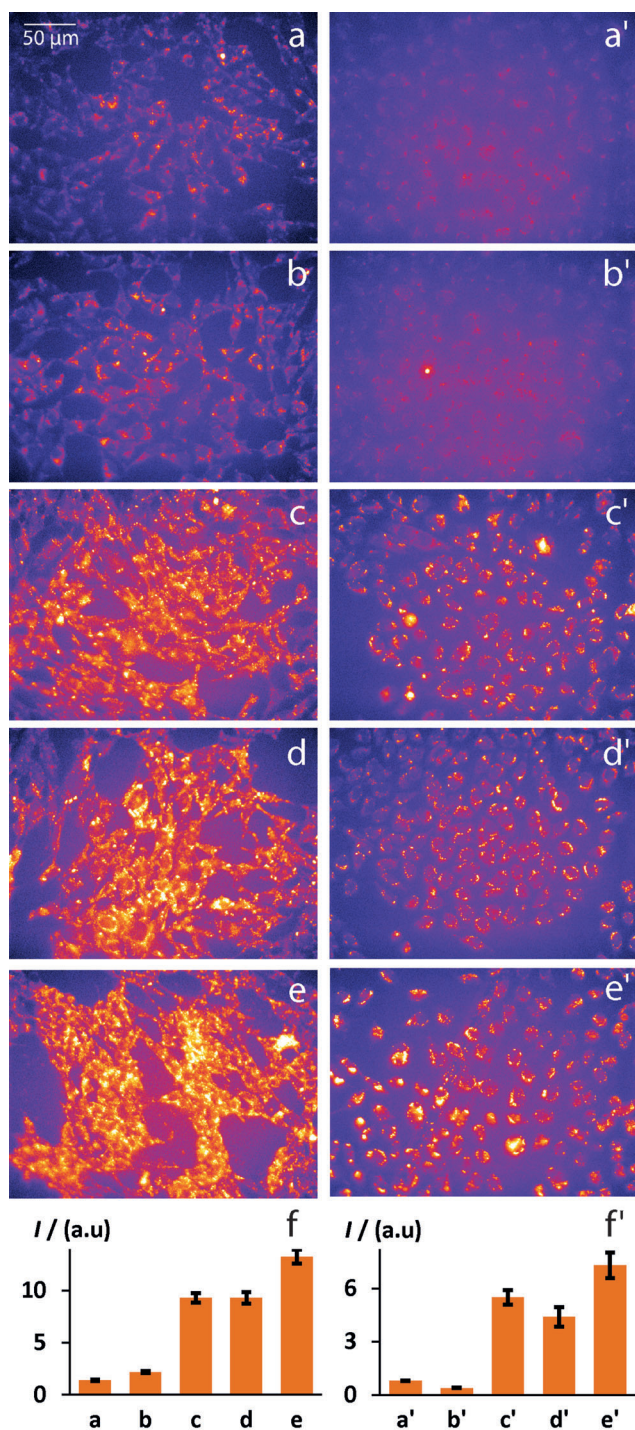


Abbildung 1. Fluoreszenzbilder von V79-Zellen (linke Spalte) und CHO-Zellen (rechts) nach Inkubation mit 50 µM LCG und 250–300 µM CX4 bei 37 °C für 15 min, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation mit Medium (a und a', als Blindkontrollen), 50 mM Betain (b, b', als Negativkontrollen), 50 mM Cholin (c, c'), 50 mM Acetylcholin (d, d') und 15 min Inkubation mit 200 µM Protamin (e, e'). Die Balkendiagramme (f, f') zeigen die relativen gemittelten Fluoreszenzintensitäten pro Zelle.

Inkubation abgenommen wurden, keine LCG-Fluoreszenz, was nahelegt, dass das Reporterpaar sich innerhalb der Zellen befindet. Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen, die den

Analytlösungen ausgesetzt waren, eine signifikant erhöhte Fluoreszenz, die in Abhängigkeit von Zelllinie und Analyt variierte (Abbildung 1). Dieser Fluoreszenzanstieg zeigte, dass die Analyten innerhalb von 10–15 min in die Zellen aufgenommen wurden, wo sie LCG aus dem makrocyclischen Komplex verdrängen, was zu einer erhöhten zellulären Fluoreszenz führt. Längere Inkubationszeiten als 20 min ergaben relativ geringere Fluoreszenzänderungen, und nach 5 h war kein signifikanter Anstieg mehr zu beobachten, was nahelegt, dass das Reporterpaar aus dem Zytoplasma in andere zelluläre Kompartimente übergeht.^[18b] Das Anfärbemuster des freigesetzten LCG ist punktuell, in Übereinstimmung mit früheren Studien zur zellulären Bildgebung mit dem Farbstoff alleine.^[18d] Obwohl LCG einer Photobleichung in der konfokalen Laserrastermikroskopie unterliegt, bestätigten die entsprechenden z-gestapelten Bilderergebnisse (Abbildung S2) die Verteilung des freigesetzten Farbstoffs (kurz nach Analytzugabe) im gesamten Zellvolumen. Die Tatsache, dass die Verdrängung des Farbstoffs auch durch zytoplasmatische Mikroinjektion des Analyten erreicht werden konnte (siehe Testexperiment in Abbildung S8), unterstützt die anfängliche Lokalisation des CX4/LCG-Reporterpaares im Zytoplasma.^[18a–d]

In der Tat wurden die Analyten nicht nur mit der Maßgabe einer hohen Affinität ausgewählt, sondern auch einer effizienten Aufnahme in die Zellen. Ch wird z.B. in nicht-neuronale Zellen hauptsächlich durch spezifische und unspezifische Cholintransporter aufgenommen,^[24] und ACh durchquert die Membran in beide Richtungen mithilfe organischer Kationentransporter (OCTs),^[25] wie sie in fast allen Zellen exprimiert werden.^[26] Die Aufnahme von Protamin in Zellen ist ebenfalls gut bekannt, allerdings mechanistisch vielfältiger; sie erfolgt hauptsächlich durch schnelle Endozytose innerhalb von 15–30 min,^[27] derselben Zeit, die zu einem Fluoreszenzanstieg in unseren Lebendzell-IDAs führte. Nach dem endosomalen Escape^[27b,28] kann Protamin mit dem Reporterpaar im Zytoplasma wechselwirken. Es sollte angemerkt werden, dass Betain als Negativkontrolle eingesetzt wurde, weil es ebenso dafür bekannt ist, in Zellen durch einen Na⁺-abhängigen Transportmechanismus einzudringen,^[29] aber es bindet nicht signifikant an CX4.^[20] Tatsächlich lieferte dieser Analyt (50 mM) keinen signifikanten Fluoreszenzanstieg in den Zellen (Abbildung 1 b,b'), was zeigt, dass die Methode selektiv für bestimmte Analyten ist. Die semi-quantitativen Auswertungen der relativen Fluoreszenzzunahmen für beide Zelllinien (Abbildung 1 f,f') zeigten, dass Betain keinen signifikanten Effekt hatte, ACh und Ch in etwa den gleichen Fluoreszenzanstieg und Protamin selbst bei viel geringeren Konzentrationen die stärkste Fluoreszenzzunahme bewirkte. Obwohl die absolute Fluoreszenzzunahme von mehreren Faktoren abhängt, unter anderem der Konzentration des Analyten und dessen Bindungskonstante (siehe oben), bieten zellbasierte IDAs im Prinzip auch die Möglichkeit, die Aufnahme eines Analyten zu unterschiedlichen Inkubationszeiten in Echtzeit zu verfolgen.

Zusammenfassend haben wir ein leicht messbares Signal von Rezeptor/Farbstoff-basierten IDAs auf bioorganische Analyten im Innern lebender Zellen beobachtet. Zellbasierte IDAs könnten als einfaches, ökonomisches Screening-Werk-

zeug verwendet werden, um die Aufnahmeeffizienz von nahe verwandten Verbindungen mit ähnlichen Affinitäten zu untersuchen, z.B. von Trimethylammoniumionen oder einer Bibliothek von polykationischen Peptiden, deren Bioaktivität momentan intensiv diskutiert wird.

Eingegangen am 31. Juli 2014,

veränderte Fassung am 14. Oktober 2014

Online veröffentlicht am 27. November 2014

Stichwörter: Bioanalytische Chemie · Fluoreszenz · Makrocyclen · Supramolekulare Chemie · Wirt-Gast-Komplexe

- [1] a) B. T. Nguyen, E. V. Anslyn, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3118–3127; b) E. V. Anslyn, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 687–699; c) S. K. Sun, K. X. Tu, X. P. Yan, *Analyst* **2012**, *137*, 2124–2128; d) X. J. Liu, H. T. Ngo, Z. J. Ge, S. J. Butler, K. A. Jolliffe, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1680–1686; e) D. Leung, J. F. Folmer-Andersen, V. M. Lynch, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12318–12327; f) R. G. Hanshaw, E. J. O'Neil, M. Foley, R. T. Carpenter, B. D. Smith, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 2707–2713.
- [2] a) Y. Wang, Z. H. Li, D. H. Hu, C. T. Lin, J. H. Li, Y. H. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9274–9276; b) X. Sun, Z. Liu, K. Welsher, J. T. Robinson, A. Goodwin, S. Zaric, H. Dai, *Nano Res.* **2008**, *1*, 203–212; c) X. W. Mao, D. M. Tian, H. B. Li, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 4851–4853; d) X. W. Mao, H. B. Li, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 4267–4272.
- [3] a) S. Angelos, Y. W. Yang, K. Patel, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2222–2226; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2254–2258; b) A. Agostini, L. Mondragón, A. Bernardos, R. Martínez-Máñez, M. D. Marcos, F. Sancenón, J. Soto, A. Costero, C. Manguan-García, R. Perona, M. Moreno-Torres, R. Aparicio-Sanchis, J. R. Murguía, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10556–10560; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10708–10712; c) Y. Zhou, L. L. Tan, Q. L. Li, X. L. Qiu, A. D. Qi, Y. C. Tao, Y. W. Yang, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 2998–3004; d) D. G. He, X. X. He, K. M. Wang, Z. Zou, X. Yang, X. C. Li, *Langmuir* **2014**, *30*, 7182–7189.
- [4] a) B. J. Shorthill, C. T. Avetta, T. E. Glass, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12732–12733; b) S. H. Zhang, T. E. Glass, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 112–114.
- [5] a) Q. P. Duan, Y. Cao, Y. Li, X. Y. Hu, T. X. Xiao, C. Lin, Y. Pan, L. Y. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10542–10549; b) J. Zhang, Z. F. Yuan, Y. Wang, W. H. Chen, G. F. Luo, S. X. Cheng, R. X. Zhuo, X. Z. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5068–5073; c) J. J. Yin, S. Sharma, S. P. Shumyak, Z. X. Wang, Z. W. Zhou, Y. D. Zhang, P. X. Guo, C. Z. Li, J. R. Kanwar, T. X. Yang, S. S. Mohapatra, W. Q. Liu, W. Duan, J. C. Wang, Q. Li, X. J. Zhang, J. Tan, L. Jia, J. Liang, M. Q. Wei, X. T. Li, S. F. Zhou, *PLoS One* **2013**, *8*, e62289.
- [6] Z. Y. Li, S. G. Sun, Z. G. Yang, S. Zhang, H. Zhang, M. M. Hu, J. F. Cao, J. Y. Wang, F. Y. Liu, F. L. Song, J. L. Fan, X. J. Peng, *Biomaterials* **2013**, *34*, 6473–6481.
- [7] a) V. Bagnacani, V. Franceschi, M. Bassi, M. Lomazzi, G. Donofrio, F. Sansone, A. Casnati, R. Ungaro, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1721; b) L. Nault, A. Cumbo, R. F. Pretôt, M. A. Sciotti, P. Shahgaldian, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5581–5583.
- [8] a) P. Neirynck, J. Brinkmann, Q. An, D. W. J. van der Schaft, L. G. Milroy, P. Jonkheijm, L. Brunsveld, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 3679–3681; b) Q. An, J. Brinkmann, J. Huskens, S. Krabbenborg, J. de Boer, P. Jonkheijm, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12233–12237; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 12399–12403.
- [9] a) D. Bier, R. Rose, K. Bravo-Rodriguez, M. Bartel, J. M. Ramirez-Anguita, S. Dutt, C. Wilch, F. G. Klarner, E. Sanchez-Garcia, T. Schrader, C. Ottmann, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 234–239; b) D. W. Lee, K. M. Park, M. Banerjee, S. H. Ha, T. Lee, K. Suh, S. Paul, H. Jung, J. Kim, N. Selvapalam, S. H. Ryu, K. Kim, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 154–159; c) S. A. Minaker, K. D. Daze, M. C. F. Ma, F. Hof, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11674–11680.
- [10] S. S. Agasti, M. Liong, C. Tassa, H. J. Chung, S. Y. Shaw, H. Lee, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 450–454; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 465–469.
- [11] a) A. Hennig, H. Bakirci, W. M. Nau, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 629–632; b) D. M. Bailey, A. Hennig, V. D. Uzunova, W. M. Nau, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6069–6077; c) W. M. Nau, G. Ghale, A. Hennig, H. Bakirci, D. M. Bailey, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11558–11570.
- [12] a) V. Francisco, A. Pineiro, W. M. Nau, L. Garcia-Rio, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 17809–17820; b) K. D. Daze, C. E. Jones, B. J. Lilgert, C. S. Beshara, F. Hof, *Can. J. Chem.* **2013**, *91*, 1072–1076.
- [13] a) R. N. Dsouza, A. Hennig, W. M. Nau, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 3444–3459; b) D. A. Jose, M. Elstner, A. Schiller, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 14451–14457; c) B. Villozny, A. Schiller, R. A. Wessling, B. Singaram, *Anal. Chim. Acta* **2009**, *649*, 246–251; d) T. Desmet, W. Soetaert, P. Bojarova, V. Kren, L. Dijkhuizen, V. Eastwick-Field, A. Schiller, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 10786–10801.
- [14] G. Ghale, A. G. Lancot, H. T. Kreissl, M. H. Jacob, H. Weingart, M. Winterhalter, W. M. Nau, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2762–2765; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 2801–2805.
- [15] K. S. Hettie, X. Liu, K. D. Gillis, T. E. Glass, *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 918–923.
- [16] a) D. Kim, S. Singha, T. Wang, E. Seo, J. H. Lee, S. J. Lee, K. H. Kim, K. H. Ahn, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 10243–10245; b) E. L. Que, D. W. Domaille, C. J. Chang, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4328–4328; c) D. W. Domaille, E. L. Que, C. J. Chang, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 507–507; d) A. K. Mahapatra, J. Roy, P. Sahoo, S. K. Mukhopadhyay, A. Chattopadhyay, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 2231–2236; e) G. Sivaraman, T. Anand, D. Chellappa, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 17029–17033; f) J. L. Wang, L. P. Long, D. Xie, Y. W. Zhan, *J. Lumin.* **2013**, *139*, 40–46; g) M. X. Yu, M. Shi, Z. G. Chen, F. Y. Li, X. X. Li, Y. H. Gao, J. Xu, H. Yang, Z. G. Zhou, T. Yi, C. H. Huang, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6892–6900.
- [17] a) K. Cui, Z. L. Chen, Z. Wang, G. X. Zhang, D. Q. Zhang, *Analyst* **2011**, *136*, 191–195; b) H. Kwon, K. Lee, H. J. Kim, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 1773–1775; c) C. Huang, T. Jia, M. Tang, Q. Yin, W. Zhu, C. Zhang, Y. Yang, N. Jia, Y. Xu, X. Qian, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14237–14244.
- [18] a) R. Lalor, H. Baillie-Johnson, C. Redshaw, S. E. Matthews, A. Mueller, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2892–2893; b) A. Mueller, R. Lalor, C. M. Cardaba, S. E. Matthews, *Cytometry Part A* **2011**, *79A*, 126–136; c) C. Redshaw, M. R. J. Elsegood, J. A. Wright, H. Baillie-Johnson, T. Yamato, S. De Giovanni, A. Mueller, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 1129–1131; d) S. J. Rembish, M. A. Trush, *Free Radical Biol. Med.* **1994**, *17*, 117–126; e) A. W. Coleman, S. Jebors, S. Cecillon, P. Perret, D. Garin, D. Marti-Battle, M. Moulin, *New J. Chem.* **2008**, *32*, 780–782; f) D. S. Guo, Y. Liu, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1925–1934.
- [19] a) F. Perret, A. W. Coleman, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 7303–7319; b) M. H. Paclet, C. F. Rousseau, C. Yannick, F. Morel, A. W. Coleman, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2006**, *55*, 353–357; c) K. Wang, D. S. Guo, X. Wang, Y. Liu, *ACS Nano* **2011**, *5*, 2880–2894.
- [20] D. S. Guo, V. D. Uzunova, X. Su, Y. Liu, W. M. Nau, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1722–1734.
- [21] V79-Zellen zeigten eine effizientere Aufnahme des Farbstoffs als CHO-Zellen (Tabelle 1), was unter anderem an einem unterschiedlichen Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis ($0.65\ \mu\text{m}^{-1}$ für V79- und $0.37\ \mu\text{m}^{-1}$ für CHO-Zellen, siehe Hintergrundinformationen für die Größenberechnung) liegen kann.

- [22] Während gezeigt werden konnte, dass LCG durch adsorptive Endozytose in Zellen aufgenommen wird (I. Braakman, T. Pijning, O. Verest, B. Weert, D. K. F. Meijer, G. M. M. Groothuis, *Mol. Pharmacol.* **1989**, *36*, 537–542), gibt es mehrere potentielle Aufnahmewege für den CX4/LCG-Komplex (siehe Hintergrundinformationen).
- [23] R. N. Dsouza, U. Pischel, W. M. Nau, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 7941–7980.
- [24] a) S. A. Müller, K. Holzapfel, C. Seidl, U. Treiber, B. J. Krause, R. Senekowitsch-Schmidtke, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2009**, *36*, 1434–1442; b) P. R. Lockman, D. D. Allen, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2002**, *28*, 749–771; c) P. Schloss, W. Mayser, A. Niehuis, H. Betz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *199*, 1320–1325.
- [25] K. S. Lips, C. Volk, B. M. Schmitt, U. Pfeil, P. Arndt, D. Miska, L. Ermert, W. Kummer, H. Koepsell, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2005**, *33*, 79–88.
- [26] I. Wessler, C. J. Kirkpatrick, *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *154*, 1558–1571.
- [27] a) H. Amos, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1961**, *5*, 1–4; b) H. Amos, K. E. Kearns, *Exp. Cell Res.* **1963**, *32*, 14–32; c) J. Nagai, T. Komeda, Y. Katagiri, R. Yumoto, M. Takano, *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, *36*, 1942–1949.
- [28] a) J. Guy, D. Drabek, M. Antoniou, *Mol. Biotechnol.* **1995**, *3*, 237–248; b) Y. W. Cho, J. D. Kim, K. Park, *J. Pharm. Pharmacol.* **2003**, *55*, 721–734.
- [29] P. G. Petronini, E. Deangelis, A. F. Borghetti, K. P. Wheeler, *Biochem. J.* **1994**, *300*, 45–50.