

Modulare Chemosensoren auf Basis selbstorganisierter Vesikelmembranen mit künstlichen Rezeptoren und fluoreszierenden Reportergruppen

Benjamin Gruber, Stefan Stadlbauer, Andreas Späth, Stefan Weiss, Maria Kalinina und Burkhard König*

Übergangsmetallkomplexe mit freien Koordinationsstellen haben in der molekularen Erkennung breite Anwendung als Bindungsstellen gefunden und werden in molekularen Sonden und Chemosensoren genutzt.^[1] Derartige Sonden sind üblicherweise aus Gast-Bindungsstellen und lumineszierenden Reportergruppen aufgebaut, durch die Bindungsvorgänge angezeigt werden. Die Lumineszenzmarkierung kann dabei entweder ein Bestandteil des molekularen Chemosensors sein, üblicherweise in unmittelbarer Nähe zur Bindungsstelle,^[2] oder ein Indikatorfarbstoff, der erst reversibel gebunden und anschließend durch Analytmoleküle wieder verdrängt wird (Indikatorverdrängungssassay).^[3] Beide Strategien haben jedoch Nachteile, da sich das rationale Design von lumineszenzmarkierten Chemosensoren einerseits oft als schwierig erweist und langwierige Synthesearbeit nach sich zieht, während Verdrängungssassays andererseits nicht reversibel einsetzbar sind. Wir beschreiben hier einen neuen Ansatz, um Analyt-Rezeptor-Bindungen zu detektieren, indem wir amphiphile nichtfluoreszierende Bindungsstellen^[4] und fluoreszierende Reporterfarbstoffe gemeinsam in die Lipidmembranen unilamellarer Vesikel einlagern. Die Analytbindung an die entsprechenden Rezeptoren beeinflusst durch die Membran die eingelagerten Farbstoffe,^[5] die daraufhin ihre Emissionseigenschaften ändern. Wir zeigen damit einen einfachen und vielseitigen Weg auf, um eine Vielzahl von Bindungsstellen mit fluoreszierenden Reportergruppen in Lipiddoppelschichten nichtkovalent zu koppeln.^[6]

Drei verschiedene amphiphile Bindungsstellen, der Zn^{II}-1,4,7,10-Tetraazacyclododecan(Cyclen)-Komplex **1** für die Phosphationenerkennung,^[7] der Cu^{II}-Nitrilotriessigsäure-(NTA)-Komplex **2** für die Erkennung von Imidazol-Derivaten^[1a] und ein Benzoazakronenether-Derivat (BACE) **3** für Ammoniumionen^[8] sowie zwei amphiphile Fluorophore auf Basis von Carboxyfluorescein (**4**) und Cumarin (**5**) wurden für die Herstellung lumineszierender Rezeptorvesikel eingesetzt (Abbildung 1). Die Verbindungen **1** und **5** wurden be-

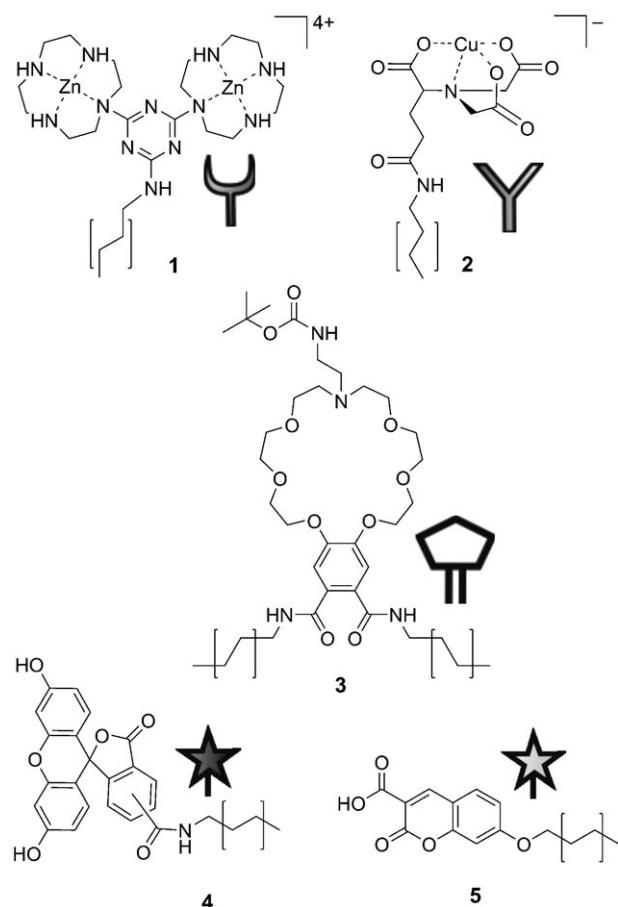


Abbildung 1. Künstliche amphiphile Rezeptoren auf Basis von Zn^{II}-Cyclen (**1**), Cu^{II}-NTA (**2**), BACE (**3**) und fluoreszierende Reporterfarbstoffe auf Basis von Carboxyfluorescein (**4**) und Cumarin (**5**).

reits von uns beschrieben,^[4c,9] die Synthesen von **2**, **3** und **4** sind in den Hintergrundinformationen zu finden. Der weitverbreitete Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein (CF) wurde aufgrund seiner Empfindlichkeit gegenüber Änderungen des elektrostatischen Potentials^[10] sowie seiner einfachen Derivatisierung mit Alkylaminen ausgewählt. Die Empfindlichkeit der Emission des Cumarin-Derivats **5** gegenüber Änderungen seiner lokalen Umgebung haben wir bereits in einer früheren Studie genutzt.^[11]

Lumineszierende Rezeptorvesikel (LVRs; Abbildung 2) mit membrangebundenen Rezeptoren und Farbstoffen

[*] B. Gruber, Dr. S. Stadlbauer, Dr. A. Späth, S. Weiss, Prof. B. König
Institut für Organische Chemie, Universität Regensburg
93040 Regensburg (Deutschland)
E-Mail: burkhard.koenig@chemie.uni-regensburg.de

Prof. M. Kalinina
Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, RAS,
119991 Moskau (Russland)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201001101> zu finden.

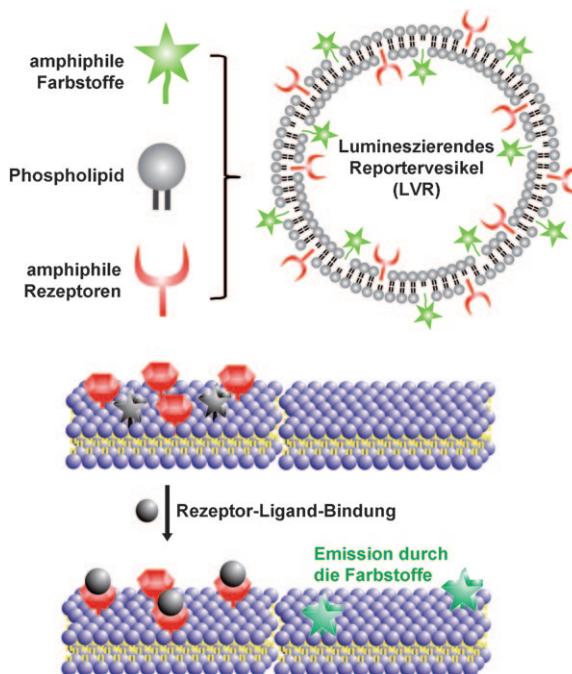


Abbildung 2. Lumineszierende Rezeptorvesikel und ihre Fluoreszenzantwort in Gegenwart von Analytmolekülen: Die Selbstorganisation von Phospholipiden und künstlichen amphiphilen Rezeptoren sowie amphiphilen Fluoreszenzfarbstoffen erzeugt oberflächenmodifizierte Vesikel, die auf Rezeptor-Analyt-Wechselwirkungen mit einer Änderung ihrer Emissionsintensität reagieren.

wurden nach unserem etablierten Protokoll hergestellt.^[4c] Die Vesikel **LVR-1,5**, mit dem Zn^{II}-Komplex **1** und dem Cumarin-Derivat **5**, zeigen eine starke Fluoreszenzemission mit einem Maximum bei 408 nm. In Gegenwart zunehmender Konzentrationen an Phosphationen, wie Pyrophosphat (PP_i) oder Phosphoserin (pSer), sinkt die Emissionsintensität deutlich (Abbildung 3, oben). Die eingelagerten Zn^{II}-Cyclen-Komplexe behalten ihre bekannte Selektivität für Phosphationen – die Zugabe anderer Anionen erzeugte keine Emissionsänderung (siehe die Hintergrundinformationen). Wir erklären die Intensitätsänderungen durch eine Umordnung der Membranstruktur, die durch die Koordination der Phosphationen an die eingebetteten Rezeptoren ausgelöst wird: Werden der Farbstoff **5** und der künstliche Rezeptor **1** zusammen in die Lipiddoppelschicht eingelagert, so nehmen wir an, dass sich beide nicht gleichmäßig in der Membran verteilen, sondern dass sich relativ dicht gepackte, gemischte Aggregate in der Membran bilden, da ihre Struktur durch die relativ sperrigen eingelagerten Moleküle gestört wird. Durch diese Ungleichverteilung haben die Farbstoffmoleküle in der Membran verschiedene Umgebungen. Während ein Teil der Moleküle frei emittieren kann, befindet sich ein anderer Teil in der Nähe der Rezeptoren und wird durch die Rezeptor-Farbstoff-Wechselwirkung gelöscht. Diese Wechselwirkungen werden durch die dicht gepackte Membranstruktur hervorgerufen und sind in homogener wässriger Lösung nicht zu beobachten.^[12] Die Bindung der großen Phosphationen an die Rezeptoren verändert die Solvatisierung und Ladung der Bindungsstellen und damit auch die Mischbarkeit der Re-

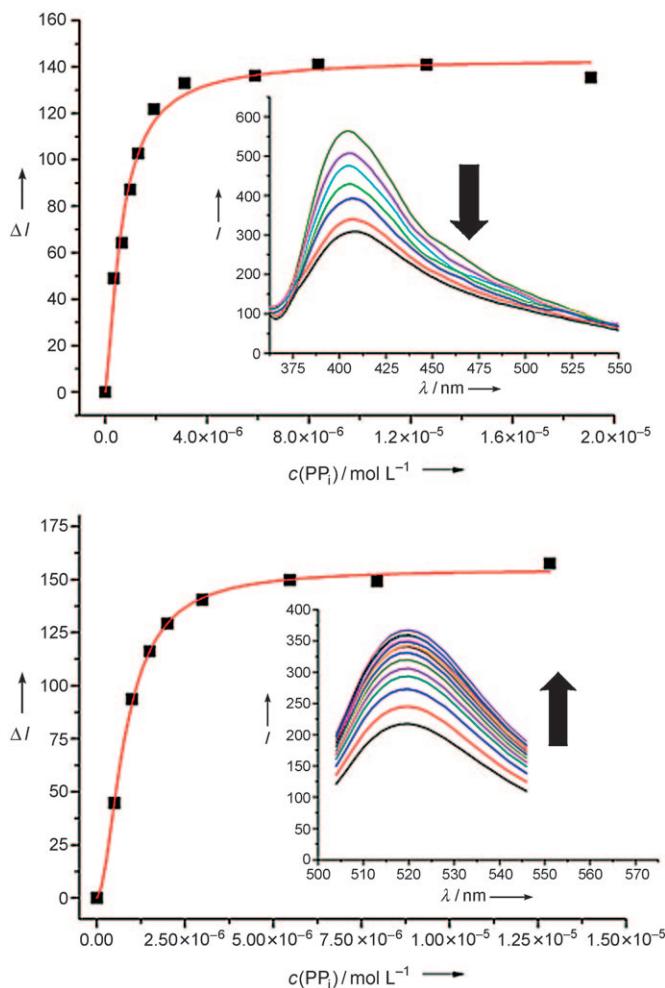


Abbildung 3. Oben: Bindungsisothermen aus Fluoreszenztitrationen von **LVR-1,5** gegen PP_i ($\lambda_{\text{ex}} = 349 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 405 \text{ nm}$). Unten: Bindungsisothermen aus Fluoreszenztitrationen von **LVR-1,4** gegen PP_i ($\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$).

zeptoren und Farbstoffe. Diese Phasenzustandsänderung hat wiederum eine Auftrennung der Aggregate und letztlich eine Verdrängung der Farbstoffmoleküle aus der gemischten Phase in die umgebende Zone zur Folge. Ähnliche, wenn auch weitaus komplexere Phänomene, liegen der Reaktion von biologischen Zellmembranen, die im Wesentlichen aus Lipiden und eingebetteten aktiven Zentren bestehen, auf äußere Reize und Substrate zugrunde.^[13] Umgebungsempfindliche Farbstoffe wie Cumarine sind bekannt dafür, auf veränderte Bedingungen, wie sie durch die Analytbindung entstehen, anzusprechen^[14] – in diesem Fall durch ihre verminderte Fluoreszenzemission.

Aus den Bindungsisothermen von Emissionstitrationen wurden Bindungskonstanten ermittelt (Tabelle 1). Die erhaltenen Affinitäten für PP_i und pSer liegen im mikromolaren Bereich und sind in guter Übereinstimmung mit den Affinitäten, die bereits mit anderen Methoden bestimmt wurden.^[4c] Um die spezifische Anion-Metallkomplex-Wechselwirkung als Ursache der Emissionsänderung zu bestätigen und unspezifische Adsorptionseffekte auszuschließen, wurden die Messungen mit Vesikeln wiederholt, die keine Zn^{II}-Cyclen-

Tabelle 1: Bindungsaffinitäten der lumineszierenden Rezeptorvesikel (LVRs) gegenüber verschiedenen Analyten (erhalten aus Fluoreszenztitrationen).

	Rezeptor(en)	Reporter	Analyt	$\log K$ (± 0.1)
LVR-1,4	1	4	PP _i	6.2
LVR-1,4	1	4	pSer	5.9
LVR-1,5	1	5	PP _i	6.0
LVR-1,5	1	5	pSer	5.9
LVR-2,4	2	4	4-Me-Im	7.1
LVR-2,4	2	4	His-OMe	7.1
LVR-1,2,4	1 + 2	4	PP _i	6.0
LVR-1,2,4	1 + 2	4	pSer	5.8
LVR-1,2,4	1 + 2	4	4-Me-Im	6.2
LVR-1,2,4	1 + 2	4	His-OMe	6.1
LVR-1,2,3,4	1 + 2 + 3	4	PP _i	6.1
LVR-1,2,3,4	1 + 2 + 3	4	4-Me-Im	6.0
LVR-1,2,3,4	1 + 2 + 3	4	Gly-OMe	5.8

Bindungsstellen enthalten. Solche Partikel zeigten ebenfalls blaue Fluoreszenz, erzeugten jedoch keine Fluoreszenzantwort auf die Zugabe eines Überschusses (50–100 Äquiv.) an PP_i oder pSer.

Verschiedene Reporterfarbstoffe können verwendet werden, um die optischen Eigenschaften der Rezeptorvesikel zu modifizieren: **LVR-1,4** mit dem Zn^{II}-Cyclen-Komplex **1** und dem amphiphilen Carboxyfluorescein **4** zeigt grüne Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei 520 nm (bei einer Anregung bei 495 nm). Da die Änderung des Emissionsverhaltens der umgebungsempfindlichen Farbstoffe von ihrer Struktur, von ihren Eigenschaften sowie von ihrer Mischbarkeit mit den freien/besetzten Rezeptoren abhängt, kann sie entsprechend variieren. **LVR-1,4** reagiert entsprechend auf die Zugabe eines Überschusses an Phosphationen mit einer starken Steigerung der Emission bei 520 nm (Abbildung 3, unten). Die Assoziationskonstanten aus den erhaltenen Bindungsisothermen von **LVR-1,4** und **LVR-1,5** sind jedoch identisch für pSer und PP_i (innerhalb der Fehlergrenze, siehe Tabelle 1). Dies stützt unsere Hypothese und gibt Grund zu der Annahme, dass eine Vielzahl von Farbstoffen eingesetzt werden kann, sofern deren optische Eigenschaften von ihrer lokalen Umgebung abhängig sind. Da Vesikel mit dem eingelagerten Farbstoff **4** durch Analytbindung eine Intensitätssteigerung zeigen („einschaltbare“ Fluoreszenz), die für die meisten analytischen Anwendungen einer Intensitätsabnahme („ausschaltbare“ Fluoreszenz) überlegen ist, wurde Verbindung **4** für alle folgenden Studien verwendet.^[15]

Um unsere mechanistische Hypothese mit mehr experimentellen Daten zu stützen, wurde **LVR-1,4** mit verschiedenen Konzentrationen von Rezeptoren und Farbstoffen hergestellt. Damit konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzantwort für eine definierte Analytzugabe mit abnehmender oder zunehmender Menge an Rezeptor-Farbstoff-Paaren ebenfalls ab- bzw. zunimmt (siehe die Hintergrundinformationen), was eindeutig für ein Modell mit gemischten Rezeptor-Farbstoff-Phasen spricht.

Als weitere Bindungsstelle wurde der amphiphile Cu^{II}-Nitrolotriessigsäure-Komplex **2** untersucht. Cu^{II}-NTA-Komplexe koordinieren Imidazol-Derivate und werden immobilisiert weithin in der Affinitätschromatographie verwendet

(IMAC),^[16] z. B. für die Aufreinigung von Biomolekülen mit Histidin(His)-Markierung.^[17] **LVR-2,4** mit dem Cu^{II}-Komplex **2** und dem Farbstoff **4** emittiert nach der Herstellung mit einem Fluoreszenzmaximum bei 520 nm analog zu **LVR-1,4**. Bindungsstudien zeigten, dass sich diese Emissionsintensität nun in Gegenwart von Imidazolen beträchtlich verringerte, wohingegen andere Additive – egal ob kationisch, anionisch oder ungeladen – keinen Effekt erzielten (siehe die Hintergrundinformationen). Die Analytselektivität der funktionalisierten Vesikel ist hier also rein durch den eingelagerten Cu^{II}-NTA-Komplex bedingt.

Um den Einsatzbereich der Vesikel auszudehnen, wurden weiterhin zwei verschiedene Bindungsstellen in einer Vesikelmembran kombiniert: **LVR-1,2,4** enthält sowohl den kationischen^[18] Zn^{II}-Cyclen-Komplex **1** als auch den anionischen^[14] Cu^{II}-NTA-Komplex **2** als Bindungsstellen sowie Carboxyfluorescein **4** als Reportergruppe. Die erhaltenen Partikel zeigen wiederum grüne Fluoreszenz bei 520 nm, die nun in Gegenwart von sowohl Phosphat- als auch von Imidazol-Derivaten deutlich ansteigt (Abbildung S5 der Hintergrundinformationen). Die Affinitäten für PP_i und pSer sind dabei ähnlich derer für **LVR-1,4**, wohingegen die $\log K$ -Werte für 4-Methylimidazol (4-Me-Im) und His bis zu einer Größenordnung niedriger waren als bei **LVR-2,4**. Ungeachtet dessen liegen die Werte jedoch immer noch im mikromolaren Bereich und sind damit höher als für Cu^{II}-NTA-Komplexe in homogener wässriger Lösung.^[19] Die Selektivitäten der einzelnen Bindungsstellen bleiben weiterhin auch nach der Einlagerung in die Vesikelmembran erhalten. Partikel mit beiden Metallkomplexen zeigten keine Fluoreszenzänderung in Gegenwart von anderen Analyten wie Ammonium- oder Sulfationen (Abbildung S5 in den Hintergrundinformationen). Wir gehen daher davon aus, dass unser vorgeschlagenes Modell für ein binäres System (mit einem Rezeptor und einem Farbstoff) ebenfalls für ternäre (zwei Rezeptoren und ein Farbstoff) oder sogar noch komplexere Systeme gilt.^[20] Weiterhin erzeugen bei einer aufeinanderfolgenden Zugabe von Phosphaten und Imidazolen beide Analyte einen inkrementellen Fluoreszenzanstieg, was ebenfalls unsere Hypothese von gemischten (Multi-)Rezeptor- und Farbstoff-Domänen in der Membran, die sich durch die Analyt-Rezeptor-Bindungen zu einem gewissen Grad neu anordnen, stützt.

Um den modularen Charakter unserer Chemosensoren zu demonstrieren, wurde die Membran des Rezeptorvesikels **LVR-1,2,4** schließlich noch mit einer dritten Bindungsstelle dotiert. Für diesen Zweck wurde das amphiphile Benzoazakronenether-Derivat **3**^[8] mit den Verbindungen **1**, **2** und **4** zu **LVR-1,2,3,4** kombiniert, das nun drei grundlegend verschiedene Bindungsstellen auf der Oberfläche trägt. Benzoazakronenether sind etablierte Bindungsstellen für Ammoniumionen mit niedriger Affinität. In den lumineszierenden Vesikeln lässt sich die Bindungsselektivität des Kronenethers mit den optischen Eigenschaften der membrangebundenen Farbstoffe kombinieren. Die Emissionseigenschaften von **LVR-1,2,3,4** sowie die Bindungsaffinitäten gegenüber Phosphationen und Imidazol stimmen erneut gut mit den Werten für **LVR-1,2,4** überein (Tabelle 1). Allerdings zeigt **LVR-1,2,3,4**, anders als **LVR-1,2,4**, auch eine deutliche Zunahme der Emissionsintensität in Gegenwart von Ammoniumionen,

wie in Form der C-terminal geschützten Aminosäure Glycin, Gly-OMe. Die Affinität für Gly-OMe wurde mit $\log K = 5.8$ bestimmt, was die typischen Ammoniumionen-Affinitäten für Benzoazakronenether in wässriger Lösung um drei bis vier Größenordnungen übertrifft. Wie bereits für ähnliche Fälle beschrieben wurde,^[9,21] kann diese Affinitätssteigerung durch die speziellen Einflüsse auf intermolekulare Wechselwirkungen an der Grenzfläche zwischen der hydrophoben Membran und der wässrigen Phase erklärt werden. Der Detektionsmechanismus über den membrangebundenen Farbstoff ermöglicht hier außerdem einen empfindlicheren Nachweis.

Um schließlich auch die Reversibilität der Rezeptor-Analyt-Bindung auf der Vesikeloberfläche zu demonstrieren, wurden die Vesikel mit Analytmolekülen gesättigt und anschließend von diesen durch Größenausschlusschromatographie abgetrennt. Bindungsstudien mit den zurückgewonnenen lumineszierenden Rezeptorvesikeln lieferten nahezu identische Ergebnisse (siehe Abbildung S7 in den Hintergrundinformationen).

Zusammenfassend wurden neuartige Lumineszenz-Chemosensoren für die Erkennung biologisch relevanter Ionen und Moleküle entwickelt. Ihr Bauprinzip beruht auf der Selbstorganisation von Phospholipiden, amphiphilen Rezeptoren und umgebungsempfindlichen Reporterfarbstoffen. Um das Konzept zu illustrieren, wurden in die Membran unilamellarer Vesikel drei verschiedene amphiphile Bindungsstellen, auf Basis Zn^{II}-Cyclen (**1**), Cu^{II}-NTA (**2**) und Benzoazakronenethern (**3**), sowie zwei Fluoreszenzfarbstoffe, auf Basis von Cumarin und Carboxyfluorescein, eingelagert. Obwohl die Fluoreszenzfarbstoffe weder kovalent noch koordinativ an die Rezeptoren gebunden sind, wie in klassischen Lumineszenz-Chemosensoren oder Indikatorverdrängungssassays, reagieren die Farbstoffe auf Rezeptor-Analyt-Wechselwirkungen mit Änderungen ihrer optischen Eigenschaften. Wir erklären diese Fluoreszenzantwort mit einer Analyt-induzierten Umstrukturierung der dotierten Lipidmembran. Die Einlagerung sperriger Bindungsstellen und Farbstoffe führt zu einer Phasentrennung und zur Bildung von Aggregaten aus Rezeptoren und Farbstoffen. Die Analytbindung an die freien Rezeptoren ändert die Oberflächenbedingungen, wie Solvatation und Ladung in der näheren Rezeptorumgebung, was letztlich zu einer Freisetzung der umgebungsempfindlichen Farbstoffmoleküle und deren Emissionsänderung führt. Der auf dem Wechselspiel von Bindungsvorgängen und Phasenverhalten in der näheren Rezeptorumgebung beruhende Detektionsmechanismus bietet die Möglichkeit zur Feinabstimmung der Fluoreszenzantwort durch einfache Variation des Rezeptor-Farbstoff-Verhältnisses oder der Vesikelzusammensetzung. Die funktionalisierten Vesikel zeigen additive Antworten bezüglich aller eingelagerten Bindungsstellen, Analyte wie pSer, His-OMe und Gly-OMe werden reversibel und in mikromolaren Konzentrationen gebunden. Ein wesentlicher Vorteil unserer selbstorganisierten Nanopartikel ist die nichtkovalente Anordnung einer Vielzahl (unterschiedlicher) Bindungsstellen und fluoreszierender Reportergruppen und damit die drastische Reduktion des Syntheseaufwands bei der Herstellung von Lumineszenz-Chemosensoren. Es ist davon auszugehen,

dass eine Vielzahl weiterer Bindungsstellen und Fluoreszenzfarbstoffe in der demonstrierten Weise eingesetzt werden kann, womit der Weg zu analytischen Nanopartikeln geebnet ist, deren optische und Bindungseigenschaften nach Belieben und auf einfachste Weise modifiziert werden können.

Eingegangen am 23. Februar 2010,
veränderte Fassung am 19. Mai 2010
Online veröffentlicht am 16. August 2010

Stichwörter: Fluoreszenzspektroskopie · Künstliche Rezeptoren · Molekulare Erkennung · Umgebungsempfindliche Farbstoffe · Vesikel

- [1] a) M. Kruppa, B. König, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3520–3560; b) A. Ojida, Y. Mito-oka, M. Inoue, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6256–6258.
- [2] a) S. K. Kim, D. H. Lee, J. I. Hong, J. Yoon, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 23–31; b) R. Martínez-Máñez, F. Sancenon, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4419–4476.
- [3] B. T. Nguyen, E. V. Anslyn, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3118–3127.
- [4] a) D. A. Jose, S. Stadlbauer, B. König, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7404–7412; b) D. A. Jose, B. König, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 655–662; c) B. Gruber, S. Stadlbauer, K. Woinaroschy, B. König, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3704–3714.
- [5] T. Parasassi, E. K. Krasnowska, L. Bagatolli, E. Gratton, *J. Fluoresc.* **1998**, *8*, 365–373.
- [6] a) T. Takeuchi, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18048–18049; b) S. Matile, H. Tanaka, S. Litvinchuk, *Top. Curr. Chem.* **2007**, *277*, 219–250; c) M. M. Tedesco, B. Ghebremariam, N. Sakai, S. Matile, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 523–526; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 540–543.
- [7] a) S. Mizukami, T. Nagano, Y. Urano, A. Odani, K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3920–3925; b) S. Aoki, M. Zulkefeli, M. Shiro, M. Kohsako, K. Takeda, E. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9129–9139; c) E. Kimura, T. Shiota, T. Koike, M. Shiro, M. Kodama, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5805–5811; d) T. Koike, S. Kajitani, I. Nakamura, E. Kimura, M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1210–1219; e) E. Kimura, S. Aoki, T. Koike, M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3068–3076.
- [8] a) C. P. Mandl, B. König, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 670–674; b) A. Späth, B. König, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 690–695.
- [9] D. S. Turygin, M. Subat, O. A. Raitman, V. V. Arslanov, B. König, M. A. Kalinina, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5466–5470; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5340–5344.
- [10] a) M. Przybylo, A. Olszynska, S. Han, A. Ozyhar, M. Langner, *Biophys. Chem.* **2007**, *129*, 120–125; b) M. Langner, H. Pruchnik, K. Kubica, *Z. Naturforsch. C* **2000**, *55*, 418–424.
- [11] A. Riechers, F. Schmidt, S. Stadlbauer, B. König, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 804–807.
- [12] Eine Wechselwirkung zwischen Rezeptoren und Farbstoffen in Bezug auf Analytmoleküle konnte zu einem gewissen Grad auch in unpolaren organischen Lösungsmitteln, als Modell für die Umgebung in der Lipidmembran, gezeigt werden (siehe die Hintergrundinformationen).
- [13] a) I. D. Alves, Z. Salamon, V. J. Hruby, G. Tollin, *Biochemistry* **2005**, *44*, 9168–9178; b) E. L. Elson, E. Fried, J. E. Dolbow, G. M. Genin, *Annu. Rev. Biophys.* **2010**, *39*, 207–226; c) K. Simons, W. L. C. Vaz, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2004**, *33*, 269–295.
- [14] a) M. Langner, J. Gabrielska, S. A. Przestalski, *Appl. Organomet. Chem.* **2000**, *14*, 25–33; b) M. Langner, H. Kleszczynska, *Cell. Mol. Biol. Lett.* **1997**, *2*, 15–24.

- [15] Die unterschiedlichen Fluoreszenzantworten können auf der Grundlage unserer Hypothese erklärt werden. Das Carboxy-fluorescein-Derivat trägt relativ sperrige Kopfgruppen und hat ein vergleichsweise großes freies Volumen, was gegen eine dichte Packung in homogener Phase spricht. Entfernt es sich während der Phasentrennung aus der Rezeptor-Analyt-Umgebung, so legt die Struktur des Farbstoffs eine eher lose Verteilung in der umgebenden Lipidphase nahe. Dies führt zu einer gesteigerten Fluoreszenzemission aufgrund der erhöhten Bewegungsfreiheit. Das Cumarin-Derivat verfügt dagegen über eine eher kompakte Kopfgruppe, die Stapelwechselwirkungen eingehen und somit während der Analyt-induzierten Phasentrennung dicht gepackte Aggregate rund um die Rezeptorphase bilden kann, was letztlich die beobachtete Fluoreszenzlösung zur Folge hat.
- [16] I. Paunovic, R. Schulin, B. Nowack, *J. Chromatogr. A* **2005**, *1100*, 176–184.
- [17] a) A. N. Kapanidis, Y. W. Ebright, R. H. Ebright, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12123–12125; b) C. R. Goldsmith, J. Jaworski, M. Sheng, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 418–419.
- [18] Bezogen auf die Ladung des koordinierten Metallions in dem amphiphilen Liganden unter Vernachlässigung des Gegenions.
- [19] D. Hopgood, R. J. Angelici, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2508–2513.
- [20] Zurzeit liegen noch nicht alle Daten für ein detailliertes Phasendiagramm vor, dies wird jedoch nachdrücklich verfolgt.
- [21] a) K. Ariga, T. Kunitake, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 371–378; b) R. Zadmar, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 904–915; c) S. Kolusheva, O. Molt, M. Herm, T. Schrader, R. Jelinek, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10000–10001; d) K. Ariga, A. Kamino, X. Cha, T. Kunitake, *Langmuir* **1999**, *15*, 3875–3885; e) N. Sakai, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14348–14356.