



# Chemosensorische Ensembles zur Echtzeitdetektion von Transportprozessen durch Biomembranen\*\*

Garima Ghale, Adrienne G. Lanctôt, Hannah T. Kreissl, Maik H. Jacob, Helge Weingart, Mathias Winterhalter und Werner M. Nau\*

**Abstract:** Die Effektivität von Wirkstoffen und Biomolekülen basiert auf ihrer Fähigkeit, die Lipidmembran zu passieren. Die Entwicklung von Methoden, diese Transportprozesse direkt und mit hoher Empfindlichkeit zu verfolgen, bleibt eine Herausforderung. Der Einschluss eines chemosensorischen Ensembles, bestehend aus einem makrocyclischen Wirt (*p*-Sulfonatocalix[4]aren oder Cucurbit[7]uril) und einem Fluoreszenzfarbstoff (Lucigenin oder Berberin) in Liposomen ermöglicht es, den Membrandurchtritt von unmarkierten bioorganischen Molekülen direkt und in Echtzeit mittels Fluoreszenz zu verfolgen. Dieser In-vitro-Assay kann auf unterschiedliche Kanalproteine und Analyten angewendet werden, eignet sich zur schnellen Charakterisierung von Kanalmodulatoren und liefert zudem die absolute Kinetik der Translokation. Mit dieser neuen biophysikalischen Methode konnten wir erstmalig die direkte schnelle Translokation des antibiotisch wirksamen Peptids Protamin durch das bakterielle Transmembranprotein OmpF nachweisen.

Ionenkanäle und Transporterproteine sind nach Membranrezeptoren und Enzymen die dritthäufigsten Wirkstoffziele.<sup>[1]</sup> Robuste und zugleich empfindliche Detektionsmethoden der Permeation durch die Membran oder der Translokation durch Kanalproteine sind deshalb von höchstem Interesse. Der Mangel an solchen Assays, die außerdem einen schnellen Durchsatz bei der Wirkstoffsuche und -charakterisierung ermöglichen sollten, verzögert die Suche und Entwicklung sowohl neuer Antibiotika als auch anderer Wirkstoffe.<sup>[2]</sup> Aus dem gleichen Grund sind viele mechanistische Aspekte der Translokation von hydrophilen Molekülen, wozu die stark argininhaltigen Peptide zählen, ungeklärt, da empfindliche In-vitro-Methoden für die Translokationsdetektion schlichtweg fehlen.<sup>[2d]</sup> Ob diese polykationischen Peptide die Membran ohne Hilfe passieren können oder Kanalproteine benötigen, bleibt eine offene aber entscheidende Frage im Hinblick auf ihre antibiotische Aktivität und ihre weiteren – teils noch unbekannten – biologischen Funktionen.<sup>[3]</sup>

Es gibt nur sehr wenige Methoden, mit denen die Membrantranslokation verfolgt werden kann, ohne dabei chemisch modifizierte Membranlipide, Kanalproteine oder Analyten zu verwenden. Die bekannteste biophysikalische Methode der Translokationsdetektion basiert auf elektro-physiologischen Messungen. Hier ist das Problem, dass nicht unterschieden werden kann, ob der Analyt die Membran wirklich passiert oder nur an den Eingang des Kanalproteins bindet.<sup>[4]</sup> Andere Verfahren nutzen radioaktiv markierte Analyten, NMR-Spektroskopie oder isotherme Titrationskalorimetrie.<sup>[5]</sup> In der Regel werden jedoch fluoreszenzbasierte Methoden bevorzugt, um dem allgemeinen industriell-pharmazeutischen Anspruch eines schnellen Durchsatzes bei der Wirkstoffsuche gerecht zu werden. Das bestehende Repertoire dieser Methoden ist gegenwärtig begrenzt auf die Detektion von pH-Veränderungen, des Einstroms von Chloridionen<sup>[6]</sup> oder der Membranlyse (siehe die Hintergrundinformationen).

Erste Wahl wäre deshalb eine Fluoreszenzmethode, mit der die Translokation organischer Wirkstoffe in mikromolaren Konzentrationen beobachtet werden kann. Die In-vitro-Methode, die wir hier vorstellen, und die wir als supramolekulare Tandem-Membranassays bezeichnen, liefert Echtzeitkinetiken, benötigt keine modifizierten Analyten und ist jeweils auf eine ganze Serie strukturell verwandter Biomoleküle anwendbar. Sie basiert auf dem gemeinsamen Einschluss eines Fluoreszenzfarbstoffs und eines makrocyclischen Wirtmoleküls, die innerhalb des Liposoms ein Reporterpaar ergeben. Die Makrocyclen in unseren Assays agieren als Rezeptoren für die transportierten Analyten, womit ein einzigartiges biomolekulares Erkennungsmerkmal gegeben ist, das zu einer Empfindlichkeit des Assays im mikromolaren Bereich führt. Hier sei angemerkt, dass Makrocyclen bereits in der Membranforschung eingesetzt wurden, allerdings mit anderen Zielsetzungen, nämlich um diese direkt in die Membran einzubetten oder als Modulatoren an Membranproteine anzubinden.<sup>[7]</sup>

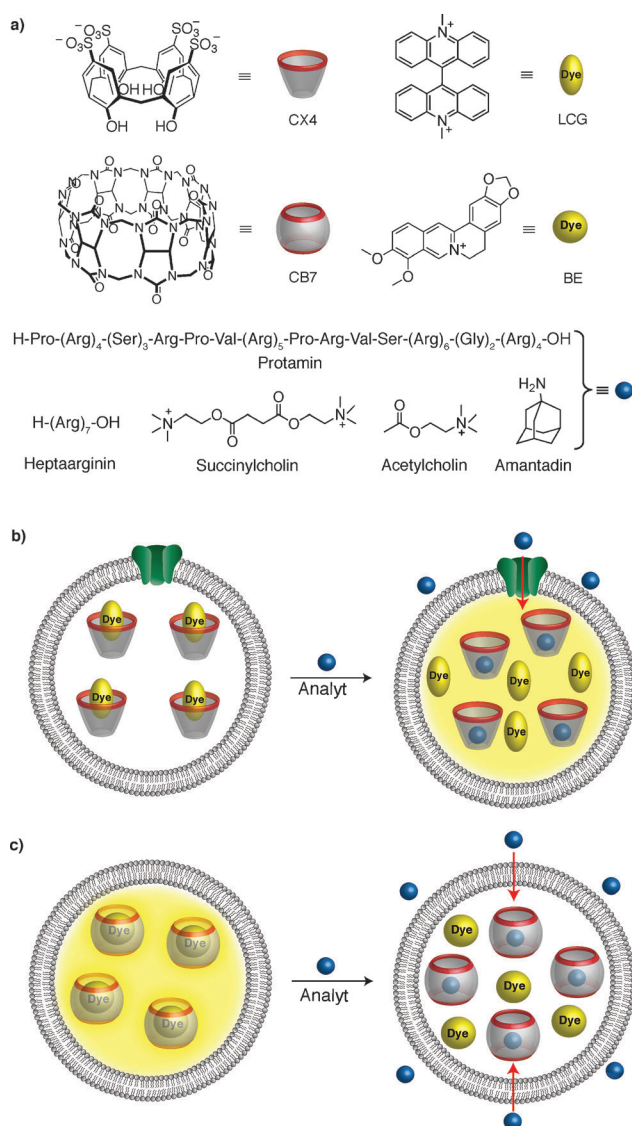
Das Wirkprinzip unserer supramolekularen Methode ist in Abbildung 1 veranschaulicht. Liposomen, die das Reporterpaar aus Wirt und Farbstoff enthalten, werden nach ihrer Herstellung so gereinigt, dass der nachfolgend zugesetzte Analyt die Fluoreszenz des Farbstoffs nur dann beeinflussen kann, wenn er in der Lage ist, erstens ins Liposom zu gelangen und zweitens den Farbstoff aus dem Wirt zu verdrängen. (Abbildung 1 b,c). Das Reporterpaar wird nach folgenden Gesichtspunkten ausgewählt: a) Weder Wirt noch Farbstoff dürfen in der Membran löslich sein, und beide dürfen diese auch nicht passieren; dies sind Einschränkungen, welche die physikochemische Komplexität im Vergleich zu unseren

[\*] G. Ghale, A. G. Lanctôt, H. T. Kreissl, Dr. M. H. Jacob, Dr. H. Weingart, Prof. Dr. M. Winterhalter, Prof. Dr. W. M. Nau School of Engineering and Science, Jacobs University Bremen Campus Ring 1, 28759 Bremen (Deutschland)  
E-Mail: w.nau@jacobs-university.de

[\*\*] G.G. und W.M.N. bedanken sich für finanzielle Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG-Fördermittel NA-686/5) und die COST Action CM1005 „Supramolecular Chemistry in Water“. Wir danken R. Benz und K. R. Mahendran für hilfreiche Diskussionen.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201309583> zu finden.



**Abbildung 1.** a) In dieser Studie als Reporterpaare verwendete Makrocyclen und Fluoreszenzfarbstoffe und die untersuchten Analyten. b,c) Messprinzip von supramolekularen Tandem-Membranassays. Die schematische Darstellung zeigt im Liposom eingeschlossene makrocyclische Wirt-Farbstoff-Komplexe vor (links) und nach (rechts) der Translokation des Analyten (in blau) durch b) ein Kanalprotein (grün) oder c) direkt durch die Biomembran; der Analyt bindet an den Makrocyclen und verdrängt dabei den Farbstoff, der daraufhin in seiner nicht-komplexierten Form entweder b) stärker (positives Signal) oder c) schwächer fluoresziert (negatives Signal).

kürzlich eingeführten Enzymassays<sup>[8]</sup> (einer zeitauflösenden Variante von Indikator-Verdrängungsassays) beträchtlich erhöhen.<sup>[9]</sup> b) Der makrocyclische Wirt muss eine starke Affinität für den Analyt oder, allgemeiner, für eine Analytklasse aufweisen, zum Beispiel für polykationische Peptide oder für kationische Neurotransmitter. c) Die Fluoreszenz des Farbstoffs muss sich deutlich ändern, wenn er aus dem Wirt verdrängt wird. Trotz dieser Randbedingungen können Tandem-Membranassays mit einer ganzen Reihe von Reporterpaaren für eine Vielzahl biologischer Analyten entwickelt werden. Eine umfassende Bibliothek von Reporterpaaren mit variie-

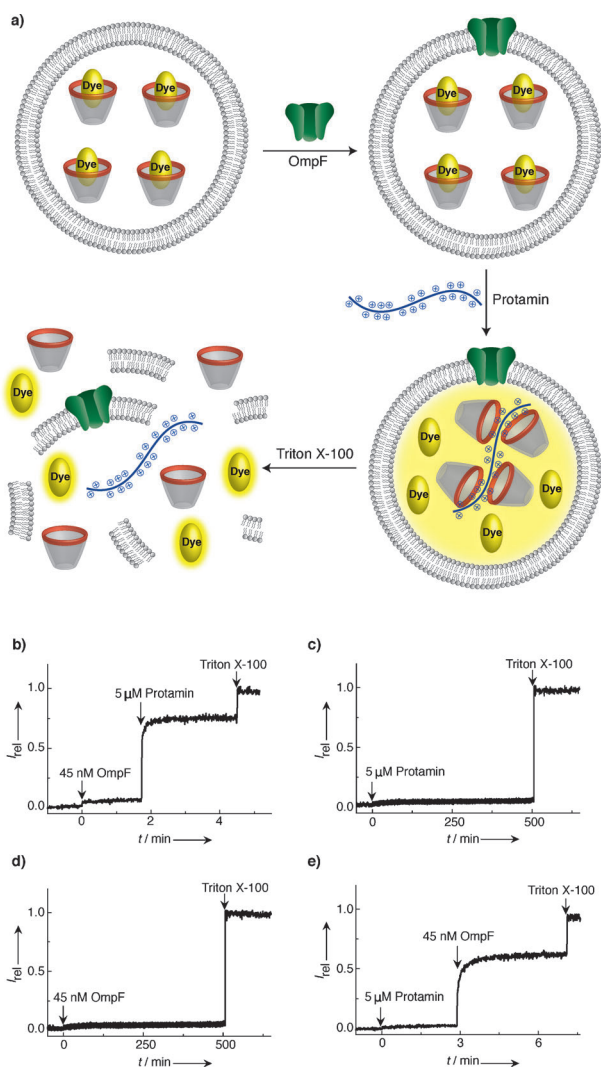
renden Rezeptoreigenschaften steht bereits zur Verfügung, und viele darunter sind kommerziell erhältlich.<sup>[10]</sup> In dieser Arbeit haben wir zunächst *p*-Sulfonatocalix[4]arene (CX4) und Lucigenin (LCG)<sup>[8b,11]</sup> verwendet, welche gemeinsam die Komplexierung unterschiedlicher kationischer Analyten signalisieren können (Abbildung 1a).

Um die Schlüsselschritte in der Entwicklung eines Tandem-Membranassays für die Translokation biologisch wichtiger Analyten zu dokumentieren, und um die Eignung des Assays für Kinetikmessungen und für die Identifizierung von Ionenkanalmodulatoren zu demonstrieren, haben wir unser Augenmerk auf Protamin als Analyten und auf das Membranprotein OmpF als ein repräsentatives Kanalprotein gerichtet. Kationische antimikrobielle Peptide wie Protamin (MW ca. 5000 Da) wirken zwar bakterizid,<sup>[3b,12]</sup> allerdings verursachen sie keine Lyse der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Eine aus mechanistischer Sicht äußerst wichtige Frage ist daher, ob die postulierte Aufnahme von kationischen antimikrobiellen Peptiden über Kanalproteine verläuft. OmpF als Beispiel eines kationenselektiven Kanals ermöglicht bekanntermaßen den direkten Durchtritt kleiner Moleküle (MW < 600 Da), einschließlich vieler Antibiotika.<sup>[1b]</sup> Aufgrund dieses empirischen Schwellenwertes ist die Translokation von Protamin durch OmpF a priori nicht zu erwarten. Kürzlich ist jedoch die Translokation eines Bacteriocins, Colicin E9, beobachtet worden, für die allerdings Rezeptoren an der Membranoberfläche erforderlich sind.<sup>[13]</sup>

Fluoreszenztitrations in Gegenwart des CX4-LCG-Reporterpaars in homogener Lösung (siehe die Hintergrundinformationen) zeigten, dass die Zugabe mikromolarer Konzentrationen von Protamin zu einer effizienten Regenerierung der Fluoreszenz führt. Dies beruht auf einer kompetitiven Bindung des Analyten, denn Protamin hat eine höhere Affinität ( $K_{\text{CX4-Protamin}} = (1.24 \pm 0.04) \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , Abbildung S3b) für CX4 als der Farbstoff ( $K_{\text{CX4-LCG}} = (1.03 \pm 0.04) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ , Abbildung S3a). Da sich das Reporterpaar nur im Inneren der Liposomen befindet, kommt es zu einer lokalen Separation des chemosensorischen Ensembles, sodass Veränderungen der Protaminkonzentration räumlich und zeitlich aufgelöst direkt verfolgt werden können.

Für die eigentlichen Assays wurde CX4-LCG zunächst in Liposomen eingeschlossen. Eine innere Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  LCG garantierte eine ausreichende Empfindlichkeit, während eine etwas geringere Konzentration von CX4 (450  $\mu\text{M}$ ) benötigt wurde, um eine Linearität zwischen Fluoreszenzintensität und Analytkonzentration zu gewährleisten (siehe die Hintergrundinformationen). Danach wurde OmpF zugegeben, was die spontane Bildung von Proteoliposomen einleitet (Abbildung 2a). Die Zugabe von Protamin im dritten Schritt führte zu einer beträchtlichen Intensivierung der Fluoreszenz (Abbildung 2b). Diese Beobachtung ist interessant, weil sie eindrücklich zeigt, dass das untersuchte Porin (mit einem angenommenem Schwellenwert von 600 Da) auch die Aufnahme eines viel größeren polykationischen Peptids (MW 5000 Da) ins Innere des Liposoms ermöglicht, und zwar ohne jegliche Rezeptoren an der äußeren Membranoberfläche.<sup>[13]</sup>

Zahlreiche Kontrollexperimente wurden durchgeführt. Insbesondere konnten wir zeigen, dass die direkte Zugabe

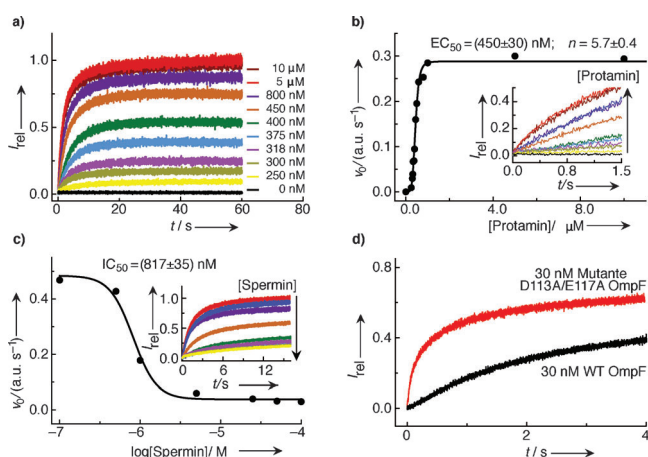


**Abbildung 2.** Supramolekulare Tandem-Membranassays zur Detektion der Translokation von Protamin mittels Fluoreszenz. a) Spontane Insertion von OmpF (in grün) in die Membran von CX4-LCG-haltigen Liposomen (450 µm, 500 µm). Protamin (blau) tritt durch OmpF ins Liposom ein und verdrängt LCG aus CX4, was zu einer positiven Fluoreszenzantwort führt. Die Zugabe von Triton X-100 führt zur Lyse der Membranen und Freisetzung sowohl des Reporterpaares als auch des Analyten in die umgebende Lösung, was eine starke Verdünnung (um einen Faktor von ca. 5000, Abbildung S9) und eine supramolekulare Dekomplexierung zur Folge hat. Der supramolekulare Tandem-Membranassay ermöglicht die Verfolgung der Translokation über die Fluoreszenz von LCG. b–e) Fluoreszenzintensität von CX4-LCG enthaltenen Liposomen nach Zugabe von b) 45 nM OmpF gefolgt von 5 µM Protamin, c) nur 5 µM Protamin, d) nur 45 nM OmpF und e) 5 µM Protamin gefolgt von 45 nM OmpF.

von Protamin zu einer Lösung von Liposomen mit eingeschlossenem Reporterpaar zu keiner Fluoreszenzänderung führte (Abbildung 2c), womit eindeutig belegt war, dass Protamin nicht direkt durch die Biomembran diffundieren kann – zumindest nicht unter den vorgegebenen experimentellen Bedingungen und innerhalb von zehn Stunden Messzeit. Da keine Fluoreszenzänderung beobachtbar war, konnte auch sofort ausgeschlossen werden, dass Protamin eine Porenbildung in der Membran einleitet oder eine Fusion der

Liposomen (Abbildungen S5 und S6). Auf ähnliche Weise konnten wir verifizieren, dass weder Wirt noch Farbstoff durch den Kanal nach außen gelangen können (Abbildung 2d), und dass die Fluoreszenzzunahme nur in Gegenwart beider Komponenten erfolgt, OmpF und Protamin; eine Zugabe in umgekehrter Reihenfolge ist allerdings möglich (Abbildung 2e). Der Fluoreszenzanstieg in Gegenwart von OmpF zeigt, dass eine direkte Translokation eines stark argininhaltigen Peptids durch ein Kanalprotein vonstattengehen kann. Dies ist ein entscheidender Befund, denn gegenwärtig werden antimikrobielle Peptide als potenzielle Antibiotika der nächsten Generation gegen Gram-negative Bakterien diskutiert.<sup>[3b, 14]</sup>

Als Alleinstellungsmerkmal gestattet unsere Methode die Echtzeitdetektion der Translokationskinetik. Die Translokation von Protamin durch OmpF verlief in der Tat überraschend schnell und erforderte „Stopped-Flow“-Experimente; so konnte der Analyt rasch mit den Proteoliposomen vermischt werden, die das CX4-LCG-Reporterpaar enthielten (Abbildung 3a). Eine schrittweise Steigerung der Analyt-



**Abbildung 3.** „Stopped-Flow“-Kinetiken der OmpF-vermittelten Translokation von Protamin in Liposomen. a) Fluoreszenzkinetiken nach Mischung von Protamin (0–10 µM) mit einer Lösung von CX4-LCG-haltigen Proteoliposomen (450 µm/500 µm und 30 nM OmpF). b) Auswertung der Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeiten der Translokation von der Protaminkonzentration über die Hill-Gleichung.<sup>[15]</sup> Einschub: Anstieg der Geschwindigkeit mit der Protaminkonzentration. c). Dosis-Wirkungs-Profil für die Inhibition der Protamintranslokation durch Spermin. Die Messungen wurden ausgelöst durch Zugabe von 5 µM Protamin zu einer Lösung von CX4-LCG-haltigen Liposomen, 45 nM OmpF und 0–100 µM Spermin. Einschub: Fluoreszenzkinetiken bei verschiedenen Sperminkonzentrationen (rote Spur: 0 µM, gelbe Spur: 100 µM). d) Fluoreszenzkinetiken der Protamintranslokation durch Wildtyp-OmpF (30 nM, schwarze Spur) und durch die Doppelmutante D113A/E117A-OmpF (30 nM, rote Spur). Die Reaktion wurde ausgelöst durch Zugabe von 5 µM Protamin zu den CX4-LCG-haltigen Proteoliposomen.

konzentration resultierte in zweierlei, einer schnelleren Kinetik und einer höheren Endintensität der Fluoreszenz, die bei hohen Protaminkonzentrationen ein Plateau erreichte (Abbildung 3b). Dies zeigt, dass die Translokationsgeschwindigkeit einen Grenzwert erreicht und dass bei hohen Analytkonzentrationen eine vollständige Verdrängung des

Farbstoffs erfolgte (siehe die Hintergrundinformationen und Abbildung S11). Eine Hill-Analyse der Anfangsgeschwindigkeiten ergab eine Halbsättigungskonstante ( $EC_{50}$ ) von 450 nM mit einer Hill-Steigung von ca. 6.<sup>[15]</sup> Die Tandem-Membranassays ergänzen also elektrophysiologische Messungen, bei denen die Unterscheidung zwischen Analytbindung zum Kanal und Translokation durch den Kanal schwierig sein kann, insbesondere für Analyten mit hohem Molekulargewicht und langsamen Translokationsraten (siehe die Hintergrundinformationen).<sup>[3c,4,16]</sup>

Verschiedenste Transmembrankanäle werden von Polyaminen mitreguliert; beispielsweise ist Spermin der stärkste Modulator von OmpF.<sup>[1b,17]</sup> Wenn die Tandem-Assays bei verschiedenen Sperminkonzentrationen durchgeführt wurden, sank die mittels Fluoreszenz detektierte Translokationsgeschwindigkeit (Abbildung 3c), und die Dosis-Wirkungs-Kurve ergab einen  $IC_{50}$ -Wert von  $(820 \pm 40)$  nM. Mit  $K_i = IC_{50}/(1 + [Protamin]/EC_{50})$  erhält man einen  $K_i$ -Wert von ca. 70 nM, in Übereinstimmung mit einer Literaturschätzung (niedriger nanomolarer Bereich).<sup>[17]</sup> Somit wird ersichtlich, dass nun eine markierungsfreie supramolekulare Methode zur Verfügung steht, um die Funktion von Kanalproteinen zu untersuchen und um neue Modulatoren zu finden und diese zu charakterisieren – alles mit Fluoreszenz. Dazu kommt, dass Spermin bekanntermaßen in der Konstriktionsregion des OmpF-Kanals bindet, sodass die effiziente Inhibierung der Translokation auch beweist, dass dieser Analyt wirklich durch das Innere des Kanals ins Liposom gelangt, und nicht etwa – um einen unwahrscheinlichen Weg auszuschließen – entlang der äußeren Wände des Proteinkanals, also entlang der Lipid-Protein-Grenzfläche.<sup>[18]</sup>

Die Konstriktionsregion von OmpF beschränkt die Geschwindigkeit der Translokation von Molekülen, einschließlich hydrophiler Antibiotika wie Ampicillin und Penicillin.<sup>[1b]</sup> Elektrophysiologische Studien ergaben eine beschleunigte Aufnahme dieser  $\beta$ -Lactam-Antibiotika durch die OmpF-Mutanten D113A und R132A.<sup>[19]</sup> Das hat uns bewogen, die Wirkung von Mutationen, welche die Ladung und den Durchmesser des OmpF-Kanals verändern, auf den Protamineinstrom zu untersuchen. Wir haben daher die beiden negativ geladenen Reste Aspartat113 und Glutamat117 mithilfe von ortsspezifischer Mutagenese durch Alanin ersetzt. In der Tat stieg die Geschwindigkeit der Protamintranslokation durch D113A/E117A-OmpF um das Dreifache an (Abbildung 3d). Im Unterschied zu etablierten Methoden ermöglichen unsere Assays wiederum die kontinuierliche Messung der Translokationskinetik, die für ein antimikrobielles Peptid nun zum ersten Mal zugänglich ist.<sup>[3c]</sup> Es ist offensichtlich, dass die Charakterisierung einer großen Bibliothek von mutierten Kanalproteinen nun ohne weiteres durchführbar ist. Zudem ist die Methode auch auf andere Kanalproteine übertragbar.

Da die Methode auf einer unselektiven molekularen Erkennung basiert, ist sie auch nicht auf Protamin beschränkt, sondern auf andere organische Analyten übertragbar (Abbildung 1a). So konnten wir auch die erfolgreiche Translokation durch OmpF für das Membrantransduktionspeptid Heptaarginin und für Acetylcholin, einen Neurotransmitter mit niedrigem Molekulargewicht, zweifelsfrei belegen (Ab-

bildung S12). Die direkte Permeation (ohne Kanal) von Analyten kann ebenfalls bequem verfolgt werden, beispielsweise von Amantadin, einem Wirkstoff gegen Alzheimer (Abbildung S13). Der entsprechende Assay wurde außerdem mit Liposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung durchgeführt und unter Verwendung eines alternativen chemosensorischen Ensembles, das aus Cucurbit[7]uril (CB7) als makrocyclischem Rezeptor und Berberin (BE) als Fluoreszenzfarbstoff bestand (Abbildung 1a).

Zusammengefasst kann die hier vorgestellte supramolekulare Methode dazu verwendet werden, um (nach Anpassung der jeweils benötigten Reporterpaare) diverse Analytklassen, verschiedene Kanalproteine und Kanalmodulatoren einfach zu charakterisieren. Der Transport kann hierbei von einem Konzentrationsgradienten getrieben werden, potentiell auch von einem elektrochemischen Gradienten, wie er zum Beispiel mittels Rekonstitution hochselektiver Ionophore wie Valinomycin in die Liposomenmembran erzeugt werden kann. Aufgrund der mikromolaren Empfindlichkeit und großen Flexibilität sollte die Methode vielseitige Anwendungen in der grundlegenden und angewandten Membranforschung finden, angefangen mit der einfachen Detektion der Permeation bis hin zur Echtzeitmessung der Transportkinetik natürlicher Metaboliten, Toxine oder Arzneistoffe. Der Einsatz der Methode für zelluläre Studien wird gegenwärtig untersucht.

Eingegangen am 4. November 2013

Online veröffentlicht am 27. Januar 2014

**Stichwörter:** Antimikrobielle Peptide · Calixarene · Fluoreszenz · Makrocyclen · Membranproteine

- [1] a) M. Rask-Andersen, M. S. Almen, H. B. Schioth, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, 10, 579–590; b) J. M. Pagès, C. E. James, M. Winterhalter, *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, 6, 893–903.
- [2] a) K. M. O'Connell, J. T. Hodgkinson, H. F. Sore, M. Welch, G. P. Salmond, D. R. Spring, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 10904–10932; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 10706–10733; b) D. J. Payne, M. N. Gwynn, D. J. Holmes, D. L. Pompliano, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, 6, 29–40; c) K. L. Brouwer, D. Keppler, K. A. Hoffmaster, D. A. Bow, Y. Cheng, Y. Lai, J. E. Palm, B. Stieger, R. Evers, *Clin. Pharmacol. Ther.* **2013**, 94, 95–112; d) S. T. Henriques, M. N. Melo, M. A. R. B. Castanho, *Mol. Membr. Biol.* **2007**, 24, 173–184.
- [3] a) A. T. Jones, E. J. Sayers, *J. Controlled Release* **2012**, 161, 582–591; b) K. A. Brogden, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3, 238–250; c) A. Apetrei, A. Asandei, Y. Park, K. S. Hahm, M. Winterhalter, T. Luchian, *J. Bioenerg. Biomembr.* **2010**, 42, 173–180.
- [4] K. R. Mahendran, E. Hajjar, T. Mach, M. Lovelle, A. Kumar, I. Sousa, E. Spiga, H. Weingart, P. Gameiro, M. Winterhalter, M. Ceccarelli, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 5170–5179.
- [5] a) C. M. Nimigeon, *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 1207–1212; b) A. Watts, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, 4, 555–568; c) A. D. Tsamaloukas, S. Keller, H. Heerklotz, *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 695–704; d) A. N. Tkachenko, P. K. Mykhailiuk, S. Afonin, D. S. Radchenko, V. S. Kubyshev, A. S. Ulrich, I. V. Komarov, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 1526–1529; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 1486–1489.
- [6] a) S. M. Butterfield, A. Hennig, S. Matile, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 1784–1792; b) S. Matile, N. Sakai, A. Hennig in *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*, Vol. 8

- (Hrsg.: P. A. Gale, J. W. Steed), Wiley, Chichester, **2012**, S. 473–500.
- [7] a) J. T. Davis, O. Okunola, R. Quesada, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3843–3862; b) Y. J. Jeon, H. Kim, S. Jon, N. Selvapalam, D. H. Oh, I. Seo, C. S. Park, S. R. Jung, D. S. Koh, K. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15944–15945; c) R. Zadnark, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 904–915; d) L. Q. Gu, S. Cheley, H. Bayley, *Science* **2001**, 291, 636–640; e) Y. L. Ying, J. J. Zhang, F. N. Meng, C. Cao, X. Y. Yao, I. Willner, H. Tian, Y. T. Long, *Sci. Rep.* **2013**, 50, 1–8.
- [8] a) A. Hennig, H. Bakirci, W. M. Nau, *Nat. Methods* **2007**, 4, 629–632; b) D.-S. Guo, V. D. Uzunova, X. Su, Y. Liu, W. M. Nau, *Chem. Sci.* **2011**, 2, 1722–1734; c) R. N. Dsouza, A. Hennig, W. M. Nau, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 3444–3459.
- [9] a) L. You, E. V. Anslyn in *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials, Vol. 1* (Hrsg.: P. A. Gale, J. W. Steed), Wiley, Chichester, **2012**, S. 135–160; b) B. T. Nguyen, E. V. Anslyn, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, 250, 3118–3127.
- [10] R. N. Dsouza, U. Pischel, W. M. Nau, *Chem. Rev.* **2011**, 111, 7941–7980.
- [11] S. A. Minaker, K. D. Daze, M. C. F. Ma, F. Hof, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 11674–11680.
- [12] A. Aspedon, E. A. Groisman, *Microbiology* **1996**, 142, 3389–3397.
- [13] N. G. Housden, J. T. S. Hopper, N. Lukyanova, D. Rodriguez-Larrea, J. A. Wojdyla, A. Klein, R. Kaminska, H. Bayley, H. R. Saibil, C. V. Robinson, C. Kleanthous, *Science* **2013**, 340, 1570–1574.
- [14] C. D. Fjell, J. A. Hiss, R. E. Hancock, G. Schneider, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2012**, 11, 37–51.
- [15] L. J. Van Winkle, O. Bussolati, G. Gazzola, J. McGiven, B. Mackenzie, M. H. Saier, Jr., P. M. Taylor, M. J. Rennie, S. Y. Low in *Biomembrane Transport*, Academic Press, San Diego, **1999**, S. 65–131.
- [16] U. Lamichhane, T. Islam, S. Prasad, H. Weingart, K. Mahendran, M. Winterhalter, *Eur. Biophys. J.* **2013**, 42, 363–369.
- [17] A. Baslé, A. H. Delcour in *Bacterial and Eukaryotic Porins*, 1. Aufl. (Hrsg.: R. Benz), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, S. 79–98.
- [18] T. G. Baboolal, M. J. Conroy, K. Gill, H. Ridley, V. Visudtiphole, P. A. Bullough, J. H. Lakey, *Structure* **2008**, 16, 371–379.
- [19] S. Vidal, J. Bredin, J. M. Pagès, J. Barbe, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 1395–1400.