

Viren als Bauelemente für Materialien und Strukturen

Martin Fischlechner* und Edwin Donath*

Stichwörter:

Gentechnologie · Hybridmaterialien · Nanopartikel ·

Oberflächen-Display · Viren

Aus dem Blickwinkel eines Materialwissenschaftlers können Viren als organische Nanopartikel betrachtet werden. Sie bestehen aus einer überschaubaren Anzahl unterschiedlicher Biopolymere: Proteine und Nukleinsäuren. Viele Viren sind zudem von einer Lipidmembran umhüllt. Viren weisen keinen eigenen Metabolismus auf; sie benötigen für ihre Vermehrung die metabolische Maschinerie einer Wirtszelle. Die Oberfläche von Viren ist mit funktionellen Elementen ausgestattet, die es dem Virus ermöglichen, in seine Wirtszelle einzudringen. Form und Größe von Viren, wie auch die Anzahl und Art funktioneller Gruppen an ihrer Oberfläche, sind exakt definiert. Deshalb werden Viren als Gerüststruktur für räumlich definierte kovalente Oberflächenmodifikationen verwendet. Die einzigartige Qualität von Viren als Nanopartikel besteht aber darin, dass ihre Oberfläche, aufgrund der Colokalisation von Geno- und Phänotyp, mithilfe kombinatorischer Methoden evolviert werden kann. Die dabei verwendeten molekularbiologischen Methoden, ursprünglich in den Lebenswissenschaften entwickelt, werden zur Basis neuer Techniken für die Bereitstellung von Nanomaterialien und eröffnen neue Anwendungsbereiche weit über Biologie und Medizin hinaus.

1. Einführung

Viren sind infektiöse Agentien, die sich nur innerhalb von lebenden Zellen vermehren. Nach dem Eindringen in ihre Wirtszelle kontrollieren sie die Transkriptions-/Translationsmaschinerie der Zelle zum Zweck der Produktion ihrer Komponenten. Diese assemblieren zu funktionalen Virionen – reifen viralen Partikeln – und sind somit bereit, neue Zellen zu infizieren. Virale Genome können aus unterschiedlichen Arten von Nukleinsäuren aufgebaut sein. Gemeinsamkeiten bestehen insofern, als Virengenie aus Sequenzen bestehen, die für die Strukturproteine des Virus codieren, und aus Sequenzen, deren Funktion in der Steuerung des zellulären Metabolismus zum Zweck der effizienten Replikation des viralen Genoms liegt. Dieser modulare Aufbau viraler Ge-

fremde Polypeptide präsentiert werden. Durch Einfügen der Sequenzen der Strukturproteine in Plasmide und ihrer Expression in Zellen können virenähnliche Partikel hergestellt werden, die kein oder nur ausgewähltes genetisches Material enthalten. Weiters können virale Chimären hergestellt werden, die aus den Proteinen unterschiedlicher Viren bestehen. Viren können für das Durchsuchen genetischer Sequenzbibliotheken verwendet werden. Diese sogenannten Oberflächen-Display-Systeme basieren auf der Colokalisation von Geno- und Phänotyp in jedem einzelnen Virus und ermöglichen die Isolierung eines funktionalen Peptids in direkter Verbindung mit der codierenden Nukleinsäuresequenz. Dieses Konzept wird in den Lebenswissenschaften extensiv verwendet, um aus genomischer Sequenzinformation spezifische Proteinfunktionalitäten zu extrahieren. In den Materialwissenschaften können Displaysysteme unter anderem dazu verwendet werden, neuartige Peptide, die an ausgewählte technische Materialien binden, zu generieren. Viren werden in ihren Wirtszellen vermehrt, selbst weisen sie keine eigene metabolische Aktivität auf. Diese Eigenschaft ermöglicht es, sie als

[*] Dipl.-Ing. M. Fischlechner, Prof. Dr. E. Donath
Institut für medizinische Physik und Biophysik
Universität Leipzig
Härtelstraße 16–18, 04107 Leipzig (Deutschland)
Fax: (+49) 341-971-5749
E-Mail: edwin.donath@medizin.uni-leipzig.de

beständige Bauteile für Kompositmaterialien zu nutzen. In Verbindung mit molekularbiologischen Methoden zur Modifikation dieser Nanopartikel ergeben sich vielfältige Möglichkeiten zur Produktion neuartiger hybrider Kompositmaterialien.

1.1. Viren als Bauteile für Materialien – Konzepte

1.1.1. Viren als Gerüststruktur für chemische Synthesen

Derzeit werden Viren in den Materialwissenschaften vorrangig als Gerüststrukturen für nachfolgende chemische Synthesen verwendet. Die meisten Arbeiten verwenden Viren ohne umhüllende Membran. Durch Biokonjugation kann die Virenoberfläche mit diversen kovalent gebundenen Molekülspezies ausgestattet werden. So können virale Nanopartikel konstruiert werden, die auf ihren Oberflächen eine definierte Zahl und Anordnung funktioneller Moleküle tragen. Viren werden auch als Gerüststrukturen für Mineralisierungen oder Metallisierungen verwendet. Einige Viren können durch Variieren äußerer Bedingungen, wie etwa des pH-Werts, reversibel in ihre Komponenten zerlegt und wieder zusammengefügt werden. Diese Eigenschaft bietet eine gute Möglichkeit, Viren als Nanocontainer zu nutzen (siehe Abschnitt 2; Abbildung 1).

1.1.2. Design des viralen Gerüsts

Viren sind flexibel in Bezug auf gentechnische Modifikationen ihrer Strukturproteine, wie etwa das Einfügen funktionaler Peptidsequenzen in ihre Oberflächenproteine (siehe Abschnitt 3; Abbildung 1). Diese Modifikationen werden auf der Ebene des genetischen Codes durchgeführt. Auf diesem Wege können zusätzliche Funktionen, von der Insertion weiterer funktionaler Gruppen durch Insertionsmutagenese bis zum Einfügen ganzer Proteine reichend, in die virale Oberfläche integriert werden. Die eingefügten Polypeptide können zusätzlich posttranslational modifiziert werden. Ob und in welcher Art diese posttranslationalen Modifikationen, wie etwa Glykosylierungen, stattfinden, ist von der Wirtszelle des Virus abhängig (siehe Abschnitt 4.1.2). Wenn das virale Genom einmal erfolgreich modifiziert wurde, können die mit neuen Funktionen versehenen viralen Nanopartikel nach Belieben in Zellkultur vermehrt werden.



Martin Fischlechner, geboren in Innsbruck, Österreich, studierte Lebensmittel- und Biotechnologie an der Universität für Bodenkultur in Wien. Seine Doktorarbeit befasst sich mit der Herstellung kolloidalen Partikel mit virenähnlichen Oberflächen. Aktuelle Forschungen gelten der Entwicklung viraler Bausteine für die Präsentierung funktionaler Polypeptide an Grenzflächen.

Das Design viraler Oberflächen auf der Ebene des genetischen Codes geschieht in Analogie zu modernen Fabrikationsmethoden, bei denen ein Programm den Fertigungsprozess steuert (computerized numerical control (CNC) principle). Die Wirtszelle, die die Nanopartikel erzeugt, entspricht der ausführenden Maschine, während das virale Genom die Funktion des steuernden Programms übernimmt.

1.1.3. Evolution spezifischer Oberflächenreaktivität

Oberflächenmodifizierte Viren können als Nanopartikel betrachtet werden, deren insertierte Polypeptide mit der codierenden Nukleinsäuresequenz im Inneren des Partikels räumlich verbunden sind. Durch Einfügen von Fragmenten einer Nukleinsäuresequenzbibliothek in virale Genome kann eine ungeheure Vielfalt oberflächenmodifizierter Viren erzeugt werden. Durch Screening nach einer gesuchten Oberflächenfunktionalität können Viren mit der gewünschten Eigenschaft selektiert und nachfolgend vermehrt werden. Nach Durchführung einiger Selektions-/Vermehrungszyklen können ein oder einige wenige virale Klone erhalten werden, die die gewünschte Funktionalität tragen. Die Technik des Oberflächen-Displays ermöglicht die Isolierung von funktionalen Polypeptiden in Verbindung mit der zugehörigen Gensequenz, ohne vorangehende Kenntnis der Sequenz-Funktions-Beziehung. Dadurch können auch Sequenzen isoliert werden, die für Peptide codieren, die in der belebten Natur nicht vorkommen oder noch nicht bekannt sind. Ein Beispiel dafür sind Peptide, die spezifisch an Edelmetalle oder Halbleitermaterialien binden können (siehe Abschnitt 4; Abbildung 2).

1.1.4. Integration viraler Partikel in Materialien

Anstatt direkt ein Material mithilfe chemischer Methoden zu modifizieren, kann es vorteilhaft sein, Nanopartikel mit der gewünschten Funktion als Baustein in das Material zu integrieren. Falls eine passende, allgemeingültige Strategie für die Einbindung in das Material zu Verfügung steht, wird die Herstellung einer Vielzahl funktionaler Oberflächen möglich. Viren sind dafür in besonderer Weise geeignet, denn einerseits können durch kombinatorisches Herangehen auf vergleichsweise einfache Art und Weise funktionale Peptide auf ihrer Oberfläche präsentiert werden, und andererseits



Edwin Donath, geboren in Schorbus, Deutschland, studierte Physik an der Moskauer Staatsuniversität und promovierte in Biophysik an der Humboldt-Universität zu Berlin. Er war Dozent in biophysikalischer Chemie an der Humboldt-Universität und kam später an das Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenwissenschaften in Golm/Potsdam, wo er mit Prof. Helmuth Möhwald die Forschung an LbL-Kolloiden und -Kapseln leitete. 2001 wurde er als Professor an die Universität Leipzig berufen. Sein Forschungsinteresse gilt Polyelektrolytmultischichten, biomimetischen Materialien und Grenzflächen.

stehen Techniken für die Kupplung von Viren an Oberflächen zur Verfügung (siehe Abschnitt 5; Abbildung 3).

Wenngleich es bereits einige Beispiele für die Verwendung von Viren als Bausteine für Kompositmaterialien gibt, ist das Potenzial der vielen viralen Systeme, die in der Biotechnologie Verwendung finden, in den Materialwissenschaften bei Weitem noch nicht ausgelotet. Vor allem Viren eukaryotischer Zellen, obwohl schwieriger als beispielsweise Bakteriophagen zu handhaben, bieten großartige Möglichkeiten für das Design von viralen Partikeln mit sehr spezifischer Oberflächenchemie. Der besondere Vorteil bei der Verwendung dieser Viren als Bauteile besteht z. B. darin, dass Polypeptide mit gewünschten posttranslationalen Modifikationen herstellbar sind, die das Zusammenspiel mit wesentlichen Targets in eukaryotischen Organismen verfeinern können.

2. Viren als Nanopartikel/Nanohüllen

Viren können als monodisperse Kern-Schale-Nanopartikel betrachtet werden. Die Hülle besteht entweder nur aus Protein, oder die Oberflächenproteine des Virus sind in einer Lipidmembran eingebettet. Die zugänglichen funktionellen Gruppen an der Virenoberfläche sind räumlich präzise angeordnet. Dank zahlreicher Techniken, die für das kovalente Binden von Molekülen an Proteine verfügbar sind, können Viren als Plattform für räumlich definierte chemische Oberflächenmodifikationen verwendet werden. Der Vorteil des Einsatzes von Viren anstelle anorganischer Nanopartikel besteht in der definierten Zahl und der präzisen Anordnung der zugänglichen funktionellen Gruppen. Unterschiedliche chemische Funktionalitäten können so mit nanometrischer Präzision zueinander angeordnet werden. Die Verwendung von Viren als Plattform für chemische Synthesen kann man somit als ein auf Nanopartikeln basierendes 3D-Äquivalent anderer Techniken sehen, mithilfe derer Moleküle in zwei Dimensionen angeordnet werden können (beispielsweise zur Konstruktion kristallisierter bakterieller Oberflächenproteine (S-Layer-Proteine)).^[1] Im Hinblick auf kovalente Modifikationen viraler Oberflächen werden meist Lysin-, Cystein- oder Tyrosinreste als chemisch reaktive Gruppen für Kupplungsreaktionen verwendet.^[2] Die Kombination viraler Gerüststrukturen mit Biokonjugationsmethoden^[3] bietet somit vielfältige Möglichkeiten zur Herstellung funktionaler Moleküle in definierten räumlichen Anordnungen (Abbildung 1).^[4]

Übersichtsartikel über die Verwendung viraler Partikel, sowohl als Plattform für chemische Synthesen^[5] als auch mit Schwerpunkt auf biomedizinischen Anwendungen,^[6] sind kürzlich erschienen. Die meisten der bisher verwendeten Viren, mit Ausnahme von Bakteriophagen, sind Pflanzenviren wie TMV (tobacco mosaic virus), CPMV (cowpea mosaic virus) oder CCMV (cowpea chlorotic mottle virus). Der Grund für ihre Beliebtheit ist ihre fehlende Pathogenität gegenüber dem Menschen, und dass sie mit geringem Aufwand in großen Mengen aus infizierten Pflanzen isoliert werden können. Auf Biokonjugation beruhende Anwendungen reichen von der Kupplung redoxaktiver metallorganischer

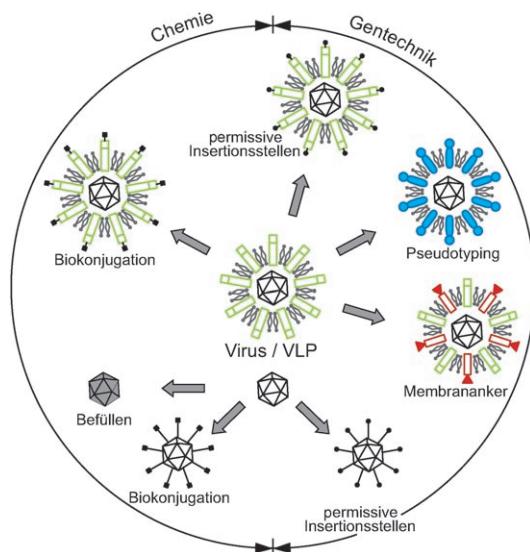


Abbildung 1. Chemische und molekularbiologische Methoden für das Design viraler Oberflächen. Die dargestellten Techniken können miteinander kombiniert werden.

Komplexe,^[7] metallischer Nanopartikel^[8] oder dreidimensionaler leitfähiger molekularer Netzwerke^[9] bis zur Präsentation von Kohlenhydraten.^[10] Im biomedizinischen Bereich kann das Wirtszellspektrum viraler Vektoren z. B. durch Anbindung von Polyethylenglycol^[11] oder Polylysin verändert werden.^[12] Mit Gold-Nanopartikeln versehene Viren konnten in Hinblick auf photothermale Krebstherapien spezifisch in Zellen eingebracht werden.^[13]

Viren wurden als Gerüststruktur für Metallisierungen oder Mineralisierungen genutzt.^[14] Ebenso können Viren als Nanokäfige für das Einschließen von Substanzen Verwendung finden.

Viele virenähnliche Partikel (virus-like particles; VLPs) können *in vitro* aus ihren Strukturproteinen assembliert und gleichzeitig auch gefüllt werden.^[15] Zusätzlich kann bei manchen Viren die Porengröße des Kapsids durch pH-Änderungen oder durch osmotischen Schock gesteuert werden. Dies ermöglicht beispielsweise die Mineralisierung des Kapselinneren^[16,18] oder das nachfolgende Befüllen des leeren Kapsids mit Nukleinsäuren.^[17] Der inhärenten Affinität viralen Kapsids für Nukleinsäuren folgend konnten ebenso andere negativ geladene Polyelektrolyte in Kapside eingebracht werden.^[18] Ein ähnliches Konzept steht hinter der Assemblierung viraler Hüllen auf oberflächenfunktionalisierten Gold-Nanopartikeln.^[19] Transmembranproteine lipidumhüllter Viren können in Liposomen rekonstituiert werden. Die Zellspezifität der viralen Membranproteine ermöglicht es, diese Viren als Wirkstoffträger mit Zielfunktion^[20] und für Immunisierungen zu verwenden.^[21]

3. Präsentation von Proteinen auf viralen Oberflächen

Die einzigartige Eigenschaft viraler Nanokomposite besteht darin, dass sie die Information zur Herstellung ihrer

Komponenten in sich tragen. Dadurch kann die Virenoberfläche direkt durch Veränderungen am viralen Genom gestaltet werden. Diese Eigenschaft ermöglicht es, in das Genom des Virus insertierte Sequenzen, die als Peptide an der Oberfläche präsentiert werden, durch Selektion auf eine gewünschte Eigenschaft hin zu evolvieren. Wenn das virale Partikel der Wahl sich jedoch von einem Pathogen ableiten sollte, ist die Verwendung von virenähnlichen Partikeln vorteilhaft. Um diese herzustellen, wird lediglich der Code der Strukturproteine des Virus in Plasmide eingefügt und diese in Zellen exprimiert. Die einzelnen viralen Proteine assemblieren zu Virenpartikeln ohne inkorporierte genetische Information, d.h. ohne die Fähigkeit sich zu replizieren.^[22] Da sie somit nicht mehr infektiös sein können, ist die Verwendung derartiger Partikel unbedenklich.

Um in ein virales Hüllprotein ein zusätzliches Proteinfragment einzufügen, muss zuerst eine geeignete Insertionsstelle gefunden werden. Diese soll das eingefügte Fragment an der Proteinoberfläche zugänglich präsentieren und darf die natürliche Funktion des Hüllproteins (und somit die Replikationsfähigkeit des produzierten Virus) nicht beeinträchtigen. Durch Nutzung einer permissiven Insertionsstelle, obwohl meist mit einem Größenlimit der Polypeptide verbunden, kann eine Vielzahl funktionaler Proteinfragmente mit molekularbiologischen Techniken an der Oberfläche des Virus präsentiert werden.

Die direkte Verwendung von Viren als Trägerstrukturen für das Display funktionaler Proteine oder Peptide bietet gewisse Vorteile gegenüber der Produktion eines Proteins und dessen nachfolgende Immobilisierung auf einer Oberfläche. Viren oder virenähnliche Partikel werden kontinuierlich von den produzierenden Zellen in den Kulturüberstand abgegeben und können relativ einfach, z.B. durch Ultrazentrifugation auf einem Saccharose-Kissen, isoliert werden. Die Isolierung und Aufreinigung von Proteinen umfasst eine Reihe von Zwischenschritten, dauert länger und verursacht dadurch in der Regel höhere Kosten.

Systeme für die Detektion von Biomarkern beruhen meist auf der Immobilisierung von Proteinen mit spezifischer Bindungsfähigkeit gegenüber dem zu detektierenden Agens an eine Oberfläche.^[23]

Um mehrere Biomarker parallel auf einem Chip detektieren zu können, ist es mitunter vonnöten, die Immobilisierungsprotokolle der einzelnen Proteine zu optimieren, um ihre Funktionalität auf der Oberfläche garantieren zu können. Durch die Verwendung viraler Partikel als Träger der gewünschten Funktion werden die insertierten Proteinfragmente in definierter räumlicher Orientierung präsentiert. Sie können nach Bedarf entworfen und trotz verschiedenster Modifikationen mit einem einzigen Protokoll hergestellt, gereinigt und wie funktionalisierte Nanopartikel verwendet werden. Ein einmal hergestelltes oberflächenmodifiziertes Virus kann über die Infektion von Zellen einfach produziert werden, mit geringem Aufwand im Vergleich zur Synthese chemisch modifizierter Partikel.

3.1. Viren ohne Lipidhülle

Um Viren chemisch an ihrer Oberfläche zu modifizieren, werden meist Viren ohne zusätzliche Membranumhüllung verwendet. Häufig werden zusätzliche funktionale Gruppen über ortsspezifische Mutagenese in die Virenoberfläche eingefügt. Dadurch können gezielt Anzahl und Art räumlich definierter adressierbarer funktionaler Gruppen für nachfolgende chemische Konjugationen beeinflusst werden.^[24] Molekularbiologische Techniken für die Insertion funktionaler Polypeptide in die Oberflächenproteine von z.B. Bakteriophagen sind bereits gut entwickelt. Abgesehen von Limitierungen hinsichtlich der Größe der insertierbaren Proteinfragmente^[25] und Schwierigkeiten beim Display komplexerer Proteine sind diese Viren für viele Zwecke wahrscheinlich die geeigneten.

Gentechnische Modifikationen viraler Oberflächenproteine tierischer Viren werden vor allem eingesetzt, um die Wirtszellspezifität davon abgeleiteter viraler Vektoren im Hinblick auf Anwendungen in der Gentherapie^[26] zu verändern.

Dafür werden vorwiegend Adenoviren^[27] oder Adeno-assoziierte Viren^[28] verwendet. Durch das Display zusätzlicher Bindungsstellen oder Antikörper-Fragmente auf ihrer Oberfläche können auch Zellen angesprochen werden, denen die natürlichen Rezeptoren für das Andocken des Virus fehlen.

3.2. Lipidumhüllte Viren

Das Kapsid vieler tierischer Viren ist zusätzlich von einer Lipidmembran umhüllt, die meist im Zuge der Knospung des viralen Partikels aus der zytoplasmatischen Membran der Wirtszelle aufgebracht wird.^[29] Diese vom viralen Kapsid gestützte Membran dient als Matrix für die in die Membran insertierten viralen Transmembranproteine, die die spezifische Bindung des Virus an Rezeptoren der Wirtszellen vermitteln und die Fusion der viralen mit der zellulären Membran induzieren – ein essenzieller Schritt für die Infektion der Zelle durch das Virus.^[30] Während die gentechnische Modifikation des Kapsidproteins eines nichtumhüllten Virus ein Hindernis für die Selbstassemblierung des viralen Partikels sein kann, wird die Funktion viraler Transmembranproteine meist weniger stark durch eingefügte Modifikationen beeinträchtigt.

3.2.1. Permissive Insertionsstellen

Techniken zur genetischen Modifikation viraler Transmembranproteine sind für mehrere virale Systeme bereits gut etabliert. Einige virale Membranfusionsproteine weisen permissive Insertionsstellen für das Einfügen zusätzlicher Peptidsequenzen auf. Beispiele dafür sind Membranfusionsproteine von Baculoviren,^[31] Vogel-Leukoseviren,^[32] vesikulären Stomatitisviren,^[33] murinen Leukämieviren,^[34] von Influenza A^[35] und anderen. Obwohl die an ihrer Oberfläche modifizierten Viren ihre Infektiosität behalten, können insertierte Polypeptide die Dynamik des Fusionsprozesses sterisch be-

hindern und somit die Infektivität der Viren reduzieren. Dies impliziert oftmals ein Größenlimit für eingefügte Modifikationen.

3.2.2. Pseudotypisierung – Membranproteine als Anker

Virale Chimären können gebildet werden, wenn zwei unterschiedliche lipidumhüllte Viren gleichzeitig eine Zelle infizieren. Dieses Phänomen, Pseudotypisierung, ist mit dem Mechanismus der Anreicherung der viralen Transmembranproteine in Lipid-Rafts der zytoplasmatischen Membran der Wirtszelle während der Knospung der Viren assoziiert.^[36] Dieses Verhalten einiger Membranfusionsproteine lipidumhüllter Viren kann für die Produktion oberflächenmodifizierter Viren oder virenähnlicher Partikel genutzt werden. Dieses Konzept spielt in der aktuellen Gentherapieforschung eine wichtige Rolle. Vektorsysteme, die eine stabile Integration von DNA-Sequenzen in ein Wirtsgenom ermöglichen, sind zumeist von Retroviren abgeleitet und weisen oft nicht das gewünschte Wirtszellspektrum auf. Der Tropismus dieser Vektoren kann durch Insertion fremder viraler Transmembranproteine verändert werden, wie z. B. nativer oder gentechnisch veränderter Membranfusionsproteine des vesikulären Stomatitisvirus, des Sindbis-Virus und vieler anderer.^[37]

Verkürzte Formen viraler Membranfusionsproteine, aus zytoplasmatischer Domäne und Transmembrandomäne des Proteins bestehend, können als Ankerstruktur für das Display von Peptiden und Proteinen dienen. Diese Technik weist oftmals keine Limitierung bezüglich der Größe des insertierten Proteins auf. Die erzeugten Viren sind infektiös, wenn ein funktionales virales Membranfusionsprotein, zusätzlich zu dem für das Display verwendeten Anker, in die Membran des Virus insertiert wird.^[38]

4. Kombinatorische Methoden/gerichtete Evolution

Die beschriebenen molekularbiologischen Techniken für das Display funktionaler Peptide oder Proteine an der Oberfläche viralen Partikel können auf infektiöse Viren sowie virenähnliche Partikel angewendet werden. Methoden gerichteter Evolution hingegen benötigen infektiöse Viren, weil der Selektion auf eine an der Oberfläche präsentierten Proteinfunktionalität die Amplifikation der selektierten Viren folgt (siehe Abbildung 2). Oberflächen-Display-Techniken sind nicht allein auf Viren als Träger der Nukleinsäure-Bibliothek beschränkt. Displaysysteme auf Basis prokaryotischer^[39] wie auch eukaryotischer Zellen^[40] wurden bereits etabliert. Ebenso wurden In-vitro-Systeme, die auf mRNA basieren, entwickelt.^[41] Der Bedarf an mehreren Displaysystemen erwächst aus Limitierungen bezüglich der Proteinsynthese und posttranslationaler Modifikationen in den verwendeten Organismen. Komplexe eukaryote Proteine beispielsweise, die die richtige Faltung sowie die richtigen Disulfidbrücken und Glykosylierungsmuster aufweisen, können oft nur in Zellen höherer Organismen hergestellt werden. Andererseits sind diese Zellen in Bezug auf die Anzahl herstellbarer Transfomanten und somit screenbarer Fragmente limitiert.

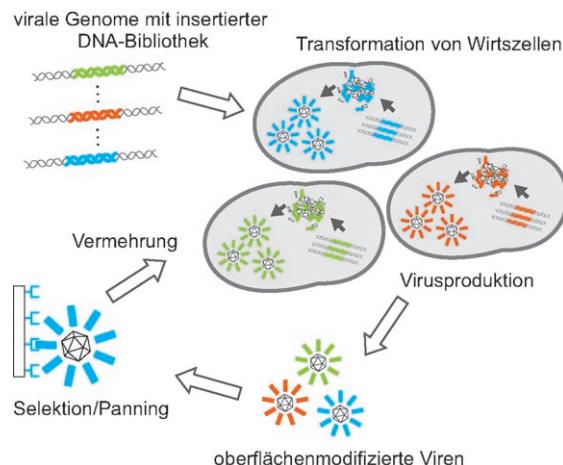


Abbildung 2. Virales Oberflächen-Display: Virale Genome, die Fragmente einer Nukleinsäure-Bibliothek in sich tragen, werden in Wirtszellen eingeschleust. Die daraufhin produzierten Viren bieten die Fragmente als Peptide auf ihren Oberflächenproteinen dar. Durch Selektion bezüglich einer gewünschte Oberflächenfunktionalität der erzeugten Virenpartikel und anschließende Vermehrung der selektierten Viren in Zellen können nach einigen Zyklen ein oder einige wenige virale Klone gewonnen werden, die die gesuchte Eigenschaft aufweisen.

4.1. Screening von Nukleinsäure-Bibliotheken

4.1.1. Phagen-Display-Systeme in den Lebens- und Materialwissenschaften

Die bislang am weitesten verbreiteten Oberflächen-Display-Systeme basieren auf Bakteriophagen.^[42] M13, MS2, Lambda-Phagen und einige Phagen der T-Serie wurden bisher verwendet.^[43] Antikörper-Produktion, Enzymtechnologie, Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie Vakzin-Entwicklung sind einige der Bereiche, in denen Phagen-Display-Systeme breite Anwendung finden. Einige aktuelle Übersichtsartikel finden sich zu diesem Thema.^[44]

Der Trend in den Materialwissenschaften zur Entwicklung hybrider organisch-anorganischer Kompositmaterialien hat einen Bedarf an Peptiden mit neuartigen Funktionen geschaffen. Diese Peptide sollen spezifische Bindungen mit anorganischen Materialien wie Edelmetallen, Halbleitern, Polymeren und anderen technisch wichtigen Komponenten ermöglichen. Durch die Anwendung von Displaysystemen, insbesondere Phagen-Display, konnte bereits eine Vielzahl derartiger Peptide isoliert werden.^[45]

Oberflächen-Display-Systeme können auch zur Gewinnung von auf D-Aminosäuren basierenden funktionalen Peptidsequenzen verwendet werden. In einem als Spiegelbild-Phagen-Display benannten Schema werden Viren bezüglich einer chemisch synthetisierten Zielsequenz gescreent, die aus D-Aminosäuren besteht. Das Produkt des Screenings, das mithilfe von D-Enantiomeren chemisch synthetisiert wurde, kann dann mit der verwendeten Zielsequenz, diesmal aus L-Aminosäuren bestehend, spezifisch interagieren.^[46] Solche Spiegelmer-Techniken ermöglichen die Herstellung funktionaler Peptide, die erhöhte Stabilität gegen Abbau durch Enzyme aufweisen und sich in ihren immunogenen Eigenschaften von den natürlich vorkommenden Peptiden unterscheiden.

Viren gebrauchen für ihre Replikation die Transkriptions-/Translationsmaschinerie ihrer Wirtszelle. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass zusätzliche, nicht in Organismen verwendete Aminosäuren durch Modifikationen des genetischen Codes in den Metabolismus von Zellen eingebracht werden können.^[47] Die Verwendung derart modifizierter Zellen als Wirtszellen für virale Oberflächen-Display-Systeme ermöglicht es, Polypeptide, die artifizielle Aminosäuren enthalten, auf erwünschte Funktionalitäten zu screenen.^[48]

4.1.2. Trend in Richtung eukaryoter Systeme

Phagen-Display bietet reichhaltige Möglichkeiten für die Arbeit an Sequenz-Funktions-Beziehungen, hat aber auch Nachteile. Da Phagen in Bakterien vermehrt werden, sind Proteine oder Peptide, die an der Phagenoberfläche präsentiert werden, Beschränkungen unterworfen, die in den Mechanismen der Proteinexpression in prokaryotischen Organismen begründet sind. Wegen der chemisch reduzierenden Umgebung des bakteriellen Zytosplasmas ist es oftmals nicht möglich, Proteine mit korrekt ausgebildeten Disulfidbrücken zu erhalten. Eukaryotische Glykosylierungsmuster, oftmals für die spezifische Funktionalität von Proteinen von großer Bedeutung,^[49] sind nicht präsentierbar.^[50]

Diese Beschränkungen können durch Verwendung von Displaysystemen, die eukaryotische Zellen verwenden (virale Oberflächen-Display-Systeme auf Basis eukaryotischer Viren oder direktes Zelloberflächen-Display) umgangen werden. Obwohl Rhinoviren^[51] und Adeno-assoziierte Viren^[52] als Oberflächen-Display-Systeme etabliert wurden, werden meist lipidumhüllte eukaryotische Viren wie Baculoviren,^[53] murine Leukämieviren^[54] und Vogel-Leukoseviren^[55] als Displaysysteme verwendet. Zusätzlich zum Screening der viralen Partikel ist es bei lipidumhüllten Viren auch möglich, auf der Ebene der infizierten Zellen zu screenen, da diese die viralen Membranproteine an ihrer Oberfläche präsentieren. Obwohl sich Displaysysteme auf Basis eukaryotischer Viren im Vergleich zu Phagen-Display-Systemen erst in einem frühen Stadium der Entwicklung befinden und in Bezug auf die Größe der zu screenenden Nukleinsäure-Bibliothek limitiert sind, werden sie aller Voraussicht nach dank ihrer Fähigkeit, eukaryotische Proteine authentisch darzubieten, breite Verwendung finden.

Die Limitierung eukaryotischer Systeme bezüglich der Größe der zu screenenden Nukleinsäure-Bibliothek kann bis zu einem gewissen Grad umgangen werden, indem man die Qualität der zugrundeliegenden Bibliothek verbessert.^[56] DNA-Shuffling und ähnliche Methoden, die auf In-vitro-Rekombination verwandter Nukleinsäuresequenzen basieren, ermöglichen den Aufbau von Bibliotheken, die im Vergleich zu randomisierten Sequenzbibliotheken ein Vielfaches an sinnvollen Sequenzvariationen beinhalten.^[57] Diese Methode, hauptsächlich zur Optimierung von Enzymen für industrielle Anwendungen im Einsatz, wurde zur Verbesserung viraler Gentherapie-Vektoren zum Zweck der Veränderung ihres Wirtszellspektrums,^[58] der verringerten Neutralisation durch Antikörper^[59] und der Erhöhung ihrer mechanischen Stabilität^[60] verwendet.

5. Funktionalisierte Viren als Bauteile für Kompositmaterialien

In Form unspezifischer Adsorbate mit verschiedenen Substraten (wie ELISA-Platten oder Latex-Partikeln für immunologische Tests) werden Viren als Bestandteile kommerziell erhältlicher Produkte seit geraumer Zeit verwendet. Eine selektive Immobilisierung an Oberflächen wird möglich, wenn diese mit Substanzen beschichtet werden, die spezifisch mit einem Bestandteil des Virus interagieren können. Diese Möglichkeit wird z.B. in immunchromatographischen Methoden zur Aufreinigung von Viren wie auch in Protokollen zur Selektion von Viren bei kombinatorischen Techniken genutzt.^[61] In Kombination mit Mikro- oder Nanostrukturierungstechniken^[62] wie Mikrokontaktdruck,^[63] Dip-Pen-Nanolithographie,^[64] Langmuir-Blodgett-Lithographie,^[65] Molecular Combing^[66] und ähnlichen Methoden wird die Erzeugung zweidimensionaler Virenanordnungen in größeren Abmessungen möglich. Antikörper,^[67] Avidin,^[68] immobilisierte DNA^[69] oder chemisch reaktive Gruppen^[70] als verbindende Elemente wurden bereits für die selektive Bindung von Viren an Oberflächen verwendet.

Viren können auch in dreidimensionalen Strukturen angeordnet werden. Aus Viren bestehende Kristalle wurden als Template für die Synthese von Materialien eingesetzt.^[71] Manche Viren bilden durch Zentrifugation oder Sedimentation regelmäßige Anordnungen und wurden für den Aufbau photischer Kristalle verwendet.^[72] Aus Lipidschichten und Bakteriophagen konnten lamellare Strukturen erzeugt werden.^[73] Die Aggregation viraler Partikel kann über die Temperaturabhängigkeit der Paarung kovalent an Viren gekuppelter Oligonukleotide gesteuert werden.^[74] Durch die Verwendung von Pickering-Emulsions-Techniken können Viren an der Öl-Wasser-Grenzfläche angeordnet werden.^[75] Durch anschließende chemische Vernetzung entstehen Tröpfchen im Mikrometerbereich mit virenähnlicher Oberfläche.

Die Anwendung dieser Techniken auf Viren, deren Oberfläche mit molekularbiologischen Methoden verändert wurde, bietet äußerst vielfältige Möglichkeiten, um Oberflächen mit funktionalen Polypeptiden auszustatten.

Filamentöse M13-Phagen wurden mithilfe der Oberflächen-Display-Technik auf die Bindung anorganischer Materialien hin selektiert und als Template für die Keimbildung und das nachfolgende Kristallwachstum dieser Materialien genutzt.^[76] Die resultierenden stäbchenförmigen anorganischen Bauteile konnten zu Fasern, Filmen und flüssigkristallinen Materialien angeordnet werden.^[77] Ebenso konnten verzweigte Strukturen realisiert werden.^[78] Auf diese Weise erzeugte Nanodrähte könnten in elektronischen Funktions-einheiten Verwendung finden.

Viren wurden auch als Komponenten von Polyelektrolytmultischichten auf flachen Substraten verwendet, wobei die Layer-by-Layer-Technik eingesetzt wurde.^[79] Durch Anbindung geladener filamentöser M13-Phagen in Kompetition mit schwachen Polyelektrolyten als oberste Schicht wurde eine flüssigkristalline Monoschicht aus Viren erzeugt.^[80] Die Dichte dieser Schicht ist abhängig von der Ladung der viralen Partikel, die über den pH-Wert des Mediums einstellbar ist. Dieses Konzept wurde auf metallisierte Virenpartikel zur

Produktion dünner und flexibler Elektrodenmaterialien für Lithiumionenbatterien übertragen.^[81]

Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet von viralen Oberflächen-Display-Strategien betrifft das Design von Schnittstellen zur biologischen Welt. Viren mit maßgeschneiderten Oberflächen können hier Verwendung finden. In phagenbasierten Mikroarraytechniken werden anstelle proteinhaltiger Lösungen oberflächenmodifizierte Bakteriophagen als Einfang-Agentien für Biomarker verwendet. Ebenso können solche Phagen, ähnlich eines sekundären Antikörpers in der ELISA-Technik, als Detektionsagens verwendet werden. Über Immun-PCR kann das Genom gebundener Phagen direkt für die Signalverstärkung herangezogen werden.^[82] Kürzlich konnte die Eignung von Phagen-Mikroarrays zur Diagnose von Brust- und Prostatakrebs nachgewiesen werden.^[83] Dafür wurden oberflächenmodifizierte Phagen auf Bindung an Autoimmunantikörper in den Seren von Krebspatienten selektiert und für die Herstellung des Biochips verwendet (siehe Abbildung 3). Da bereits nachgewiesen wurde, dass Proteine in konventionellen Mik-

roarraytechniken durch oberflächenmodifizierte virale Partikel ersetzt werden können, ist anzunehmen, dass diese in Zukunft verstärkt als Bauteile für Schnittstellen zwischen technischen Materialien und biologischen Systemen zum Einsatz kommen werden.

Ein natürlicher Weg, um Viren in Grenzflächen zu integrieren, besteht darin, die Fusionsaktivität lipidumhüllter Viren gegenüber Lipidmembranen zu nutzen (siehe Abbildung 3). Lipidmembranen können auf eine Vielzahl von Unterlagen wie z.B. Glas oder Polymerkissen aufgebracht werden. Werden Polyelektrolytmultischichten als Unterlage für Lipidfilme verwendet, lässt sich die Multifunktionalität der LBL-Technik mit den zusätzlichen Möglichkeiten, die Lipidschichten bieten, kombinieren. Lipidumhüllte Viren, die ihre Wirtszellen über den endosomalen Weg infizieren, fusionieren mit Lipidmembranen unter leicht sauren Bedingungen. Die Fusion eines solchen Virus mit einer auf einem Substrat gespreiteten Lipidschicht kann daher durch Absenken des pH-Wertes induziert werden. Durch Nutzung kolloidaler, mit Polyelektrolytmultischichten versehener Parti-

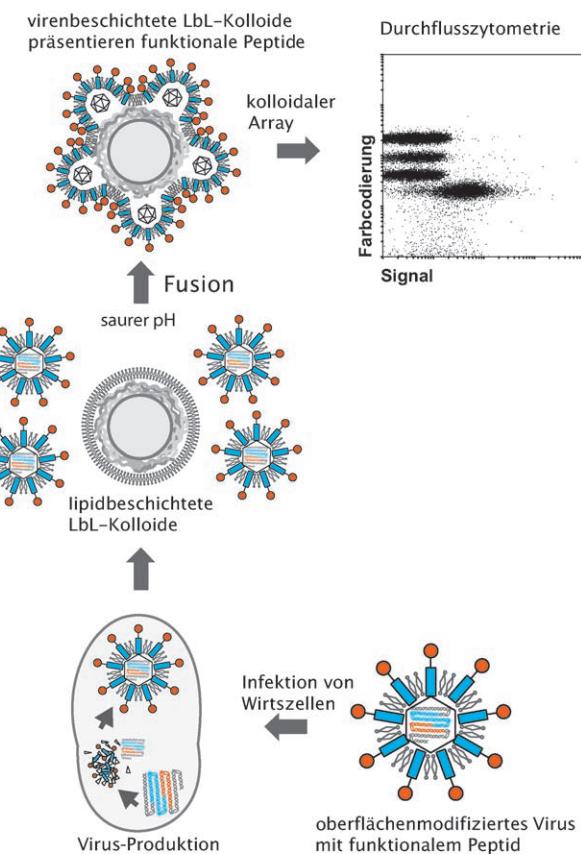
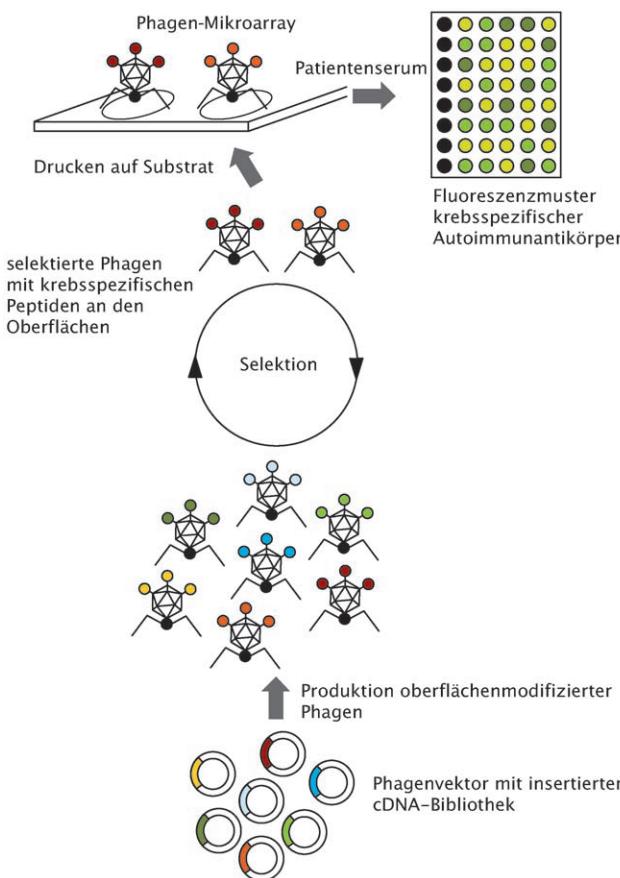


Abbildung 3. Links: Herstellung eines Phagen-Mikroarrays zur Detektion prostatakrebspezifischer Autoimmunantikörper in Seren. Eine cDNA-Bibliothek, die aus von Prostatakrebsgewebe isolierter mRNA aufgebaut wurde, wird in einen Phagenvektor insertiert, und die oberflächenmodifizierten Bakteriophagen werden in *E. coli* produziert. Über mehrere Selektionsrunden werden zuerst an Seren von gesunder Spender bindende Viren entfernt und nachfolgend an Seren von Krebspatienten bindende vermehrt. Einige der selektierten Phagen werden auf ein Glassubstrat gedruckt. Nach Inkubation dieses Biochips mit Patientenserum und nachfolgend mit einem antihumanen fluoreszenten IgG-Antikörper kann die Autoantikörpersignatur des Patientenserums für die Diagnose ausgelesen werden.^[83] Rechts: Ein ähnliches Verfahren für die Herstellung eines kolloidalen Partikel-Arrays zur Detektion viraler Antikörper in Seren. Lipidumhüllte Viren, die mit Lipidmembranen im sauren pH-Bereich fusionieren, können als Bauteile verwendet werden. Native oder oberflächenmodifizierte Viren, die durch rationale Manipulation oder Oberflächen-Display-Techniken erzeugt wurden, werden mit lipidbeschichteten LbL-Kolloiden fusioniert. Die Kolloide können durch den Einbau von mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Polyelektrolyten farblich codiert werden.^[85, 86]

kel als Unterlage für die Lipidbeschichtung können Komposite mit virenähnlichen Oberflächen erzeugt werden, die durch Variation der verwendeten Polyelektrolyte mit zusätzlichen Funktionalitäten ausgestattet werden können.^[84] Diese Kolloide präsentieren die viralen Hüllproteine, native wie gentechnisch veränderte, authentisch an ihren Oberflächen.^[85] Als Beispiel für die Kombinierbarkeit der Layer-by-Layer-Technik mit viralen Funktionen wurde ein kolloidaler Array für die simultane Detektion viraler Antikörper in Seren hergestellt.^[86]

6. Ausblick

Viren können als Nanopartikel gesehen werden, die viele Freiheitsgrade in Bezug auf das Design ihrer Oberflächen-eigenschaften bieten. Zur Erzeugung dieser zusätzlichen Funktionalitäten können Biokonjugationsmethoden oder molekularbiologische Methoden genutzt werden. Virales Oberflächen-Display ist eine sehr vielseitige kombinatorische Technik, um neue funktionale Polypeptide, die an viralen Oberflächen präsentiert sind, zu evolvieren.

Eine auf dem Design des genetischen Codes basierende Virentechnologie wird sich in naher Zukunft äußerst schnell entwickeln. Der enorme Fortschritt in der chemischen Synthese von Nukleinsäuren wurde bereits genutzt, um ganze virale Genome synthetisch herzustellen.^[87] Zusätzlich ermöglicht ein wachsendes Verständnis der Funktion viraler Nukleinsäuresequenzen die systematische Neugestaltung viralen Genome, wie unlängst durch die Erzeugung des Phagen T7.1 gezeigt werden konnte.^[88] Das genetische Engineering von Viren steht in Analogie zur Produktion von Software, da Codes kostensparend multipliziert, zu einem künstlichen Genom zusammengefügt und anschließend in der zellulären Maschinerie verarbeitet werden können. Kollektionen standardisierter genetischer Elemente sind bereits im Aufbau begriffen.^[89]

Proteine, die in Kompositmaterialien als funktionale Elemente Verwendung finden, können in vielen Fällen durch dementsprechend oberflächenmodifizierte virale Partikel ersetzt werden. Diese Alternative kann insbesondere von Vorteil sein, wenn die betreffende Anwendung auf dem Zusammenspiel vieler unterschiedlicher Funktionalitäten beruht. Neue Entwicklungen in der Mikrofluidik^[90] könnten die parallele Produktion einer Vielfalt oberflächenmodifizierter Viren bei vertretbarem Aufwand ermöglichen. Obwohl sich dieses Feld noch in den Anfängen befindet, scheint die automatische parallele Produktion viraler Bausteine durch Fortschritte, die von Chip-basierter DNA-Manipulation^[91] bis zu Zellkulturtechniken^[92] reichen, in greifbarer Nähe.

Diese Arbeit wurde durch ein Projekt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) (DO 410/4-1) unterstützt. Wir danken Paula Pescador für kritisches Lesen des Manuskripts, Bernhard Benke für das Anfertigen des Bildmaterials und Elke Papp für Hilfe bei der Übersetzung.

Eingegangen am 23. August 2006
Online veröffentlicht am 9. März 2007

- [1] U. B. Sleytr, P. Messner, D. Pum, M. Sára, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1098; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1034.
- [2] a) Q. Wang, T. Lin, L. Tang, J. E. Johnson, M. G. Finn, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 477; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 459; b) Q. Wang, E. Kaltgrad, T. Lin, J. E. Johnson, M. G. Finn, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 805; c) E. Gillitzer, D. Willits, M. Young, T. Douglas, *Chem. Commun.* **2002**, *20*, 2390; d) P. S. Arora, K. Kirshenbaum, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 418.
- [3] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4643; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128.
- [4] T. Douglas, M. Young, *Science* **2006**, *312*, 873.
- [5] a) D. M. Vriezema, M. C. Aragonès, J. A. A. W. Elemans, J. J. L. M. Cornelissen, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1445; b) E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6166; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6042.
- [6] P. Singh, M. J. Gonzalez, M. Manchester, *Drug Dev. Res.* **2006**, *67*, 23.
- [7] N. F. Steinmetz, G. P. Lomonosoff, D. J. Evans, *Small* **2006**, *2*, 530.
- [8] C. Radloff, R. A. Vaia, J. Brunton, G. T. Bouwer, V. K. Ward, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1187.
- [9] A. S. Blum, C. M. Soto, C. D. Wilson, T. L. Brower, S. K. Pollack, T. L. Schull, A. Chatterji, T. Lin, J. E. Johnson, C. Amsinck, P. Franzon, R. Shashidhar, B. R. Ratna, *Small* **2005**, *1*, 702.
- [10] K. S. Raja, Q. Wang, M. G. Finn, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1348.
- [11] J. Lanciotti, A. Song, J. Doukas, B. Sosnowski, G. Pierce, R. Gregory, S. Wadsworth, C. O'Riordan, *Mol. Ther.* **2003**, *8*, 99.
- [12] Q. Zhong, J. K. Kolls, P. Schwarzenberger, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 2083.
- [13] M. Everts, V. Saini, J. L. Leddon, R. J. Kok, M. Stoff-Khalili, M. A. Preuss, C. L. Millican, G. Perkins, J. M. Brown, H. Bagaria, D. E. Nikles, D. T. Johnson, V. P. Zharov, D. T. Curiel, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 587.
- [14] a) W. Shenton, T. Douglas, M. Young, G. Stubbs, S. Mann, *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 253; b) C. F. Fowler, W. Shenton, G. Stubbs, S. Mann, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 1266; c) E. Dujardin, C. Peet, G. Stubbs, J. N. Culver, S. Mann, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 413; d) M. Knez, A. M. Bittner, F. Boes, C. Wege, H. Jeske, E. Maiß, K. Kern, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1079; e) M. Knez, M. Sumser, A. M. Bittner, C. Wege, H. Jeske, T. P. Martin, K. Kern, *Adv. Funct. Mater.* **2004**, *14*, 116.
- [15] L. K. Pattenden, A. P. J. Middelberg, M. Niebert, D. I. Lipin, *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 523.
- [16] T. Douglas, M. Young, *Nature* **1998**, *393*, 152.
- [17] S. M. Barr, K. Keck, H. V. Aposhian, *Virology* **1979**, *96*, 656.
- [18] T. Douglas, M. Young, *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 679.
- [19] C. Chen, M.-C. Daniel, Z. T. Quinkert, M. D. B. Stein, V. D. Bowman, P. R. Chipman, V. M. Rotello, C. C. Kao, B. Dragnea, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 611.
- [20] a) K. Ramani, R. S. Bora, M. Kumar, S. K. Tyagi, D. P. Sarkar, *FEBS Lett.* **1997**, *404*, 164; b) K. Ramani, Q. Hassan, B. Venkiah, S. E. Hasnain, D. P. Shankar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 11886; c) J. Shoji, Y. Tanihara, T. Uchiyama, A. Kawai, *Microbiol. Immunol.* **2004**, *48*, 163.
- [21] a) T. Daemen, A. de Mare, L. Bungener, J. de Jonge, A. Huckriede, J. Wilschut, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 451; b) A. Huckriede, L. Bungener, T. Stegmann, T. Daemen, J. Medema, A. M. Palache, J. Wilschut, *Vaccine* **2005**, *23*, S26.
- [22] a) R. L. Garcea, L. Gissmann, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 513; b) R. Noad, P. Roy, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 438.
- [23] a) D. S. Wilson, S. Nock, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 510; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 494; b) K. Tomizaki, K. Usui, H. Mihara, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 782; c) W. Kusnezow, J. D. Hoheisel, *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16*, 165.
- [24] Q. Wang, T. Lin, J. E. Johnson, M. G. Finn, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 813.

- [25] P. Malik, T. D. Terry, L. R. Gowda, A. Langara, S. A. Petukhov, M. F. Symmons, L. C. Welsh, D. A. Marvin, R. N. Perham, *J. Mol. Biol.* **1996**, *260*, 9.
- [26] T. J. Wickham, *Nat. Med.* **2003**, *9*, 135.
- [27] a) S. C. Noureddini, D. T. Curiel, *Mol. Pharm.* **2005**, *2*, 341; b) J. Li, L. Le, D. A. Sibley, J. M. Mathis, D. T. Curiel, *Virology* **2005**, *338*, 247.
- [28] C. Li, D. E. Bowles, T. van Dyke, R. J. Samulski, *Cancer Gene Ther.* **2005**, *12*, 913.
- [29] a) M. Suomalainen, *Traffic* **2002**, *3*, 705; b) D. P. Nayak, E. K. Hui, S. Barman, *Virus Res.* **2004**, *106*, 147; c) N. Chazal, D. Gerlier, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 226.
- [30] a) D. S. Dimitrov, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 109; b) T. S. Jarrettzky, R. A. Lamb, *Nature* **2004**, *427*, 307; c) P. J. Klaske, R. Bron, M. Marsh, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1998**, *34*, 65; d) P. M. Colman, M. C. Lawrence, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 309; e) L. Pelkmans, A. Helenius, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15*, 414.
- [31] a) W. J. Ernst, A. Spenger, L. Toellner, H. Kattinger, R. M. Grabherr, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 4033; b) W. Ernst, T. Schinko, A. Spenger, C. Oker-Blom, R. Grabherr, *J. Biotechnol.* **2006**, *126*, 237.
- [32] P. D. Khare, S. J. Russell, M. J. Federspiel, *Virology* **2003**, *315*, 303.
- [33] L. D. Schlehuber, J. K. Rose, *J. Virol.* **2004**, *78*, 5079.
- [34] S. C. Kayman, H. Park, M. Saxon, A. Pinter, *J. Virol.* **1999**, *73*, 1802.
- [35] Z. Li, S. N. Mueller, L. Ye, Z. Bu, C. Yang, R. Ahmed, D. A. Steinhauer, *J. Virol.* **2005**, *79*, 10003.
- [36] a) W. F. Pickl, F. X. Pimentel-Muinos, B. Seed, *J. Virol.* **2001**, *75*, 7175; b) J. A. G. Briggs, T. Wilk, S. D. Fuller, *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 757.
- [37] a) E. Verhoyen, F. Cosset, *J. Gene Med.* **2004**, *6*, 83; b) J. C. Pagès, T. Bru, *J. Gene Med.* **2004**, *6*, 67; c) D. Lavillette, S. J. Russell, F. Cosset, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 461.
- [38] a) S. D. J. Chapple, I. M. Jones, *J. Biotechnol.* **2002**, *95*, 269; b) J. Borg, P. Nevsten, R. Wallenberg, M. Stenstrom, S. Cardell, C. Falkenberg, C. Holm, *J. Biotechnol.* **2004**, *114*, 21; c) M. J. Schnell, L. Buonocore, E. Kretzschmar, E. Johnson, J. K. Rose, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 11359; d) T. Matano, T. Odawara, A. Iwamoto, H. Yoshikura, *J. Gen. Virol.* **1995**, *76*, 3165; e) L. Yang, L. Bailey, D. Baltimore, P. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 11479.
- [39] a) S. Y. Lee, J. H. Choi, Z. Xu, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 45; b) T. Jostock, S. Dübel, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2005**, *8*, 127; c) P. Samuelson, E. Gunnarsson, P. Nygren, S. Stahl, *J. Biotechnol.* **2002**, *96*, 129.
- [40] a) M. Ho, S. Nagata, I. Pastan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 9637; b) F. Crawford, E. Huseby, J. White, P. Marrack, J. W. Kappler, *PLoS Biol.* **2004**, *2*, 523; c) A. Kondo, M. Ueda, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64*, 28.
- [41] a) T. T. Takahashi, R. J. Austin, R. W. Roberts, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 159; b) W. J. Dower, L. C. Mattheakis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 390.
- [42] G. P. Smith, *Science* **1985**, *228*, 1315.
- [43] I. Benhar, *Biotechnol. Adv.* **2001**, *19*, 1.
- [44] a) M. Paschke, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *70*, 2; b) J. W. Kehoe, B. K. Kay, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4056; c) H. R. Hogenboom, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1105; d) S. S. Sidhu, W. J. Fairbrother, K. Deshayes, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 14.
- [45] a) U. Kriplani, B. K. Kay, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 470; b) M. Sarikaya, C. Tamerler, A. K. Jen, K. Schulten, F. Baneyx, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 577; c) M. Sarikaya, C. Tamerler, D. T. Schwartz, F. Baneyx, *Annu. Rev. Mater. Res.* **2004**, *34*, 373; d) A. B. Sanghvi, K. P. Miller, A. M. Belcher, C. E. Schmidt, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 496.
- [46] K. Wiesehan, D. Willbold, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 811.
- [47] a) L. Wang, A. Brock, B. Herberich, P. G. Schultz, *Science* **2001**, *292*, 498; b) L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *116*, 34; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 34; c) R. A. Mehl, J. C. Anderson, S. W. Santoro, L. Wang, A. B. Martin, D. S. King, D. M. Horn, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 935; d) J. H. van Maarseveen, J. W. Back, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6106; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5926; e) A. Rinaldi, *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 336.
- [48] a) F. Tian, M. Tsao, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15962; b) M. Pastrnak, P. G. Schultz, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2373.
- [49] a) Y. Nagai, *Glycoconjugate J.* **2002**, *19*, 161; b) R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683.
- [50] C. Schäffer, M. Graninger, P. Messner, *Proteomics* **2001**, *1*, 248.
- [51] A. D. Smith, S. C. Geisler, A. A. Chen, D. A. Resnick, B. M. Roy, P. J. Lewi, E. Arnold, G. F. Arnold, *J. Virol.* **1998**, *72*, 651.
- [52] a) L. Perabo, H. Büning, D. M. Kofler, M. U. Ried, A. Girod, C. M. Wendtner, J. Enssle, M. Hallek, *Mol. Ther.* **2003**, *8*, 151; b) L. Perabo, J. Endell, S. King, K. Lux, D. Goldnau, M. Hallek, H. Büning, *J. Gene Med.* **2006**, *8*, 155.
- [53] a) W. Ernst, R. Grabherr, D. Wegner, N. Borth, A. Grassauer, H. Kattinger, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 1718; b) R. Grabherr, W. Ernst, C. Oker-Blom, I. Jones, *Trends Biotechnol.* **2001**, *19*, 231; c) C. Oker-Blom, K. J. Airenne, R. Grabherr, *Briefings Funct. Genomics Proteomics* **2003**, *2*, 244; d) T. A. Kost, J. P. Condreay, D. L. Jarvis, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 567.
- [54] J. H. Urban, R. M. Schneider, M. Compte, C. Finger, K. Cichutek, L. Álvarez-Vallina, C. J. Buchholz, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*.
- [55] P. D. Khare, A. G. Rosales, K. R. Bailey, S. J. Russell, M. J. Federspiel, *Virology* **2003**, *315*, 313.
- [56] G. L. Moore, C. D. Maranas, *AIChE J.* **2004**, *50*, 262.
- [57] a) U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3285; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3105; b) J. A. Kolkman, W. P. C. Stemmer, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 423; c) J. M. Bacher, B. D. Reiss, A. D. Ellington, *Adv. Genome Biol.* **2002**, *3*, 1021.1; d) L. G. Otten, W. J. Quax, *Biomol. Eng.* **2005**, *22*, 1.
- [58] N. Soong, L. Nomura, K. Pekrun, M. Reed, L. Sheppard, G. Dawes, W. P. C. Stemmer, *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 436.
- [59] a) N. Maheshri, J. T. Koerber, B. K. Kaspar, D. V. Schaffer, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 198; b) A. Asokan, R. J. Samulski, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 158.
- [60] S. K. Powell, M. A. Kaloss, A. Pinkstaff, R. McKee, I. Burimski, M. Pensiero, E. Otto, W. P. C. Stemmer, N. Soong, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1279.
- [61] A. R. M. Bradbury, J. D. Marks, *J. Immunol. Methods* **2004**, *290*, 29.
- [62] M. Geissler, Y. Xia, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 1249.
- [63] a) Y. Xia, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 568; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 550; b) A. P. Quist, E. Pavlovic, S. Oscarsson, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 591; c) A. Bernard, J. P. Renault, B. Michel, H. R. Bosshard, E. Delamarche, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 1067.
- [64] a) R. A. Vega, D. MasPOCH, K. Salaita, C. A. Mirkin, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6167; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6031; b) D. S. Ginger, H. Zhang, C. A. Mirkin, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 30; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 30.
- [65] a) Q. Guo, X. Teng, S. Rahman, H. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 630; b) S. Lenhert, L. Zhang, J. Mueller, H. P. Wiesmann, G. Erker, H. Fuchs, L. Chi, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 619.
- [66] a) J. Hu, Z.-H. Zhang, Z.-Q. Ouyang, S.-F. Chen, M.-Q. Li, F.-J. Yang, *J. Vac. Sci. Technol. B* **1998**, *16*, 2841; b) J. Guan, L. J. Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 18321.
- [67] K. Y. Suh, A. Khademhosseini, S. Jon, R. Langer, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1196.
- [68] I. L. Medintz, K. E. Sapsford, J. H. Konnert, A. Chatterji, T. Lin, J. E. Johnson, H. Matoussi, *Langmuir* **2005**, *21*, 5501.

- [69] H. Yi, S. Nisar, S.-Y. Lee, M. A. Powers, W. E. Bentley, G. F. Payne, R. Ghodssi, G. W. Rubloff, M. T. Harris, J. N. Culver, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1931.
- [70] a) C. L. Cheung, J. A. Camarero, B. W. Woods, T. Lin, J. E. Johnson, J. J. De Yoreo, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6848; b) M. T. Klem, D. Willits, M. Young, T. Douglas, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10806.
- [71] J. C. Falkner, M. E. Turner, J. K. Bosworth, T. J. Trentler, J. E. Johnson, T. Lin, V. L. Colvin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5274.
- [72] S. B. Juhl, E. P. Chan, Y.-H. Ha, M. Maldovan, J. Brunton, V. Ward, T. Dokland, J. Kalmakoff, B. Farmer, E. L. Thomas, R. A. Vaia, *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 1086.
- [73] L. Yang, H. Liang, T. E. Angelini, J. Butler, R. Coridan, J. X. Tang, G. C. L. Wong, *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 615.
- [74] E. Strable, J. E. Johnson, M. G. Finn, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1385.
- [75] a) J. T. Russell, Y. Lin, A. Böker, L. Su, P. Carl, H. Zettl, J. He, K. Sill, R. Tangirala, T. Emrick, K. Littrell, P. Thiagarajan, D. Cookson, A. Fery, Q. Wang, T. P. Russell, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2472; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2420; b) W. H. Binder, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5300; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5172.
- [76] a) C. E. Flynn, S.-W. Lee, B. R. Peele, A. M. Belcher, *Acta Mater.* **2003**, *51*, 5867; b) A. Merzlyak, S.-W. Lee, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 246.
- [77] a) S.-W. Lee, A. M. Belcher, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 387; b) S.-W. Lee, C. Mao, C. E. Flynn, A. M. Belcher, *Science* **2002**, *296*, 892; c) C. Mao, C. E. Flynn, A. Hayhurst, R. Sweeney, J. Qi, G. Georgiou, B. Iverson, A. M. Belcher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6946; d) C. Mao, D. J. Solis, B. D. Reiss, S. T. Kottmann, R. Y. Sweeney, A. Hayhurst, G. Georgiou, B. Iverson, A. M. Belcher, *Science* **2004**, *303*, 213.
- [78] Y. Huang, C.-Y. Chiang, S. K. Lee, Y. Gao, E. L. Hu, J. D. Yoreo, A. M. Belcher, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1429.
- [79] Y. Lvov, H. Haas, G. Decher, H. Möhwald, A. Mikhailov, B. Mtchedlishvily, E. Morganova, B. Vainshtein, *Langmuir* **1994**, *10*, 4232.
- [80] P. J. Yoo, K. T. Nam, J. Qi, S.-K. Lee, J. Park, A. M. Belcher, P. T. Hammond, *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 234.
- [81] K. T. Nam, D.-W. Kim, P. J. Yoo, C.-Y. Chiang, N. Meethong, P. T. Hammond, Y.-M. Chiang, A. M. Belcher, *Science* **2006**, *312*, 885.
- [82] Y.-C. Guo, Y.-F. Zhou, X.-E. Zhang, Z.-P. Zhang, Y.-M. Qiao, L.-J. Bi, J.-K. Wen, M.-F. Liang, J.-B. Zhang, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e62.
- [83] a) L. Cekaite, O. Haug, O. Myklebost, M. Aldrin, B. Ostenstad, M. Holden, A. Frigessi, E. Hovig, M. Sioud, *Proteomics* **2004**, *4*, 2572; b) X. Wang, J. Yu, A. Sreekumar, S. Varambally, R. Shen, D. Giachero, R. Mehra, J. E. Montie, K. J. Pienta, M. G. Sanda, P. W. Kantoff, M. A. Rubin, J. T. Wei, D. Ghosh, A. M. Chinaiyan, *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 1224.
- [84] M. Fischlechner, O. Zschörnig, J. Hofmann, E. Donath, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2952; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2892.
- [85] M. Fischlechner, L. Toellner, P. Messner, R. Grabherr, E. Donath, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 798; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 784.
- [86] L. Toellner, M. Fischlechner, B. Ferko, R. M. Grabherr, E. Donath, *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 1575.
- [87] a) J. Cello, A. V. Paul, E. Wimmer, *Science* **2002**, *297*, 1016; b) H. O. Smith, C. A. Hutchison III, C. Pfannkoch, J. C. Venter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 15440.
- [88] L. Y. Chan, S. Kosuri, D. Endy, *Mol. Syst. Biol.* **2005**, *1*, 2005.0018; doi:10.1038/msb4100025.
- [89] a) D. Endy, *Nature* **2005**, *438*, 449, <http://parts.mit.edu>; b) H. Breithaupt, *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 21.
- [90] a) D. Erickson, D. Li, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *507*, 11; b) E. Delamarche, D. Juncker, H. Schmid, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2911.
- [91] a) J. Tian, H. Gong, N. Sheng, X. Zhou, E. Gulari, X. Gao, G. Church, *Nature* **2004**, *432*, 1050; b) J. W. Engels, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7328; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7166; c) C. Zhang, J. Xu, W. Ma, W. Zheng, *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24*, 243.
- [92] a) C. Yi, C. Li, S. Ji, M. Yang, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *560*, 1; b) M. B. Fox, D. C. Esveld, A. Valero, R. Luttge, H. C. Mastwijk, P. V. Bartels, A. van den Berg, R. M. Boom, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 474; c) E. E. Endler, K. A. Duca, P. F. Nealey, G. M. Whitesides, J. Yin, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *81*, 719.