

Enzymreaktion in den Poren von CaCO_3 -Partikeln mit angelagerten, mit Substrat gefüllten Liposomen**

Alexey M. Yashchenok, Mihaela Delcea, Kristina Videnova, Elizabeth A. Jares-Erijman, Thomas M. Jovin, Manfred Konrad, Helmuth Möhwald und Andre G. Skirtach*

Das Einschleusen von Biomolekülen in Zellen und ihre kontrollierte Freisetzung dort^[1] sind von besonderer Bedeutung für Untersuchungen auf der Ebene einzelner Zellen, die zu einem tieferen Verständnis grundlegender biologischer Prozesse, z.B. der Aufnahme und des Transports von Biomolekülen in Zellen, führen sollten und schließlich neue Wege für Tumorthapien weisen könnten. Dieser Ansatz ist auch von Bedeutung für enzymkatalysierte Reaktionen und die Herstellung von Mikrokapseln^[2] durch Zusammenlagerung einzelner Polymerschichten (Layer by Layer, LbL).^[3] Bei der In-vivo- und In-vitro-Untersuchung von Immunantworten wurden Mikrokapseln^[4–6] beispielsweise zur Freisetzung kleiner Peptide, die mit Molekülen der MHC-Klasse I komplexieren, in Zellen genutzt.^[6] Das Auftreten von Peptiden auf der Zelloberfläche, ein wichtiger immunologischer Prozess, wurde in Echtzeit beobachtet.^[6]

Als Vorstufe für Anwendungen in Zellen eignet sich die Untersuchung biologischer Reaktionen in Modellsystemen. So bietet der Ablauf biochemischer Reaktionen in geschützten Kompartimenten^[7] die Möglichkeit, enzymatische Reaktionen ablaufen zu lassen und Aktivitäten in lebenden Zellen nachzuahmen. Aus mehreren konzentrisch angeordneten Kompartimenten aufgebaute Mikrokapseln^[8] oder kapselähnliche Kapsosomen^[9] können verwendet werden, um Reaktionen im Mikroskop zu beobachten. Jedoch werden Mikrokapseln,^[10a] die aus biologisch nicht abbaubaren^[10b] oder abbaubaren Polymeren^[10c] bestehen, bei der Phagozytose

durch Zellen verformt.^[10a] Bei der Aufnahme von Mikrokapseln in nichtphagozytierende lebende Zellen^[6] gelten noch strengere Anforderungen an die mechanische Stabilität. Denn in diesem Fall ist der auftretende Druck höher als bei der Phagozytose, sodass herkömmliche Kapseln unter der von den Zellen^[6] ausgeübten mechanischen Beanspruchung^[11a] aufbrechen und ihren Inhalt freisetzen. Hingegen widerstehen Mikrokapseln, die durch temperaturabhängiges Schrumpfen verkleinert wurden und dadurch erhöhte mechanische Stabilität erlangten,^[11b] dem bei der Aufnahme in Zellen auftretenden Druck.^[6] Das durch Erwärmen ausgelöste Schrumpfen der Kapseln ist jedoch kein allgemein anwendbares Verfahren, da die meisten Proteine bei höheren Temperaturen denaturieren. Auch ist das gemeinsame Verpacken und der Transport von mehreren, beispielsweise unterschiedlich großen Molekülen dadurch erschwert, dass sich die Anforderungen für ihre Verkapselung erheblich unterscheiden. Dennoch besteht großes Interesse an mechanisch robusten Systemen, die unterschiedliche Typen von Molekülen gleichzeitig transportieren und kontrolliert freisetzen können. Zu den Schwierigkeiten bei der Entwicklung solcher Trägerpartikel gehören die unterschiedlichen Anforderungen an die Kapselwände und die Notwendigkeit, die Permeabilität für einen Molekültyp (im Allgemeinen den kleineren) gezielt einzustellen, während der andere Molekültyp (im Allgemeinen der größere) zurückgehalten wird.


Wir stellen hier ein Verfahren vor, das von maßgeschneiderten, aus mehreren Schichten bestehenden, porösen CaCO_3 -Mikropartikeln^[12] als Alternative zu Mikrokapseln ausgeht. In den Poren der Mikropartikel können unterschiedliche Substanzen, darunter auch Proteine, untergebracht werden. Hierbei sorgt der aus CaCO_3 bestehende innere Kern für bessere mechanische Eigenschaften und erfüllt somit die Bedingung für ein erfolgreiches Einbringen insbesondere in nichtphagozytierende Zellen.^[10,11] Das Konzept der Erzeugung mehrerer Kompartimente wurde durch das Anheften kleinerer Nanobehälter (NBs) an Mikropartikel von Mikrometergröße überprüft. Wir verwendeten verschiedene NBs in unterschiedlichen Konzentrationen, um aus mehreren Kompartimenten aufgebaute Transporteinheiten herzustellen, die in ihrem Innern poröse CaCO_3 -Partikel enthielten (Hintergrundinformationen, Abschnitt 1). Mit diesen Untersuchungen sollten Fragen der Schichtdicke und des Aggregationsverhaltens beantwortet werden, die insbesondere für In-vivo-Anwendungen von Bedeutung sind. Zur Funktionalisierung der Oberflächen der CaCO_3 -Mikropartikel und NBs wurde die Selbstorganisation mithilfe der LbL-Technik genutzt.

[*] Dr. A. M. Yashchenok,^[+] Dr. M. Delcea,^[+] K. Videnova, Prof. H. Möhwald, Dr. A. G. Skirtach
Abteilung Grenzflächen
Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung
14424 Potsdam-Golm (Deutschland)
Fax: (+49) 331-567-9202
E-Mail: skirtach@mpikg.mpg.de

Dr. T. M. Jovin, Dr. M. Konrad
Labor für Zelluläre Dynamik (T.M.J.) und Labor für Enzym-Biochemie (M.K.), Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen (Deutschland)
Prof. E. A. Jares-Erijman
Departamento de Química Orgánica
Universidad de Buenos Aires (Argentinien)

[+] Diese Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit bei.

[**] Wir danken A. Praast, H. Zastrow und R. Pitschke für technische Hilfe. Diese Arbeit wurde durch Projektmittel des Programms PICT-2006-01365 (MPI-SeCyt Argentina) gefördert (E.J.-E.). A.M.Y. wurde durch ein DAAD-Programm (Nr. 325, A/09/03626) unterstützt.

 Hintergrundinformationen (Teil I: vollständige experimentelle Details, Teil II: sonstige Informationen) zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201003244> zu finden.

In Abbildung 1a ist schematisch der NB-Aufbau durch Adsorption dargestellt. In Abbildung 1b und c sind konfokalmikroskopische Aufnahmen eines experimentellen Systems aus einem CaCO_3 -Kern von Mikrometergröße und darauf sitzenden NBs von Nanometer- oder Submikromet-

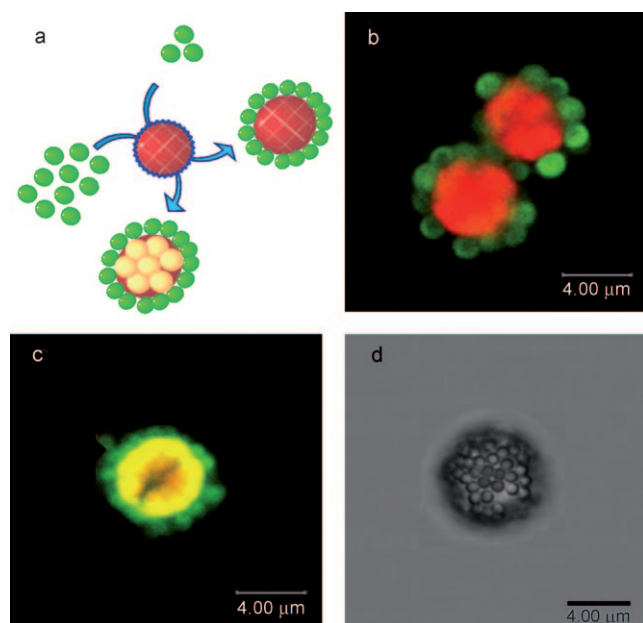


Abbildung 1. Herstellung von Transportbehältern mit mehreren Kompartimenten (a). Konfokalfluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Multikompartimentbehältern, die bei niedriger Konzentration von Polystyrol (8:1; b) oder hoher Konzentration von Silica-Nanobehältern (1:58; c) erhalten wurden (in beiden Fällen sind die Gewichtsverhältnisse von inneren:äußeren Subkompartimentpartikeln angegeben; siehe Hintergrundinformationen, Abschnitt 1). d) Konfokaldurchlichtermikroskopische Aufnahme eines Multikompartiments, das dem in (c) gezeigten ähnlich ist. Die Farben resultieren von TRITC (rot), FITC (grün) bzw. der Kombination von TRITC und FITC (gelb).

ergröße zu sehen. Die Multikompartimente wurden mit TRITC-Dextran (innerer Kern) und FITC-PAH (äußere NBs) markiert (TRITC = Tetramethylrhodaminisothiocyanat, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, PAH = Polyallylaminhydrochlorid). Strukturen, die sich bei niedrigen NB-Konzentrationen bilden (Abbildung 1b), enthalten die NBs (grün gefärbt) nur an der Außenzone des inneren Kompartiments, das deshalb seine rote Farbe und die Kugelform beibehält. Bei höheren Konzentrationen (Abbildung 1c) integrieren sich die NBs in den inneren Kern, was zu einer Mischfarbe (gelb) führt. Die transmissionselektronenmikroskopische Analyse bestätigte die Anlagerung von Silica-NBs an die CaCO_3 -Partikel (siehe Hintergrundinformationen). Die Gesamtgröße der Multibehälter entsprach dem anfänglichen Durchmesser des inneren Subkompartiments, denn die an dessen Oberfläche gebundenen NBs beeinflussen die Gesamtgröße nur wenig.

Es ist anzumerken, dass die Bindung kleiner Kolloide an die Oberfläche großer Partikel nicht nur durch ihre Anfangskonzentration, sondern auch durch die Salzkonzentration und die Zusammensetzung der Trägerpolyelektrolyte

gesteuert werden kann. Wir fanden, dass die Zahl an NBs, die sich an das innere Subkompartiment anlagerten, um 30 % höher war, wenn dieses mit Polyelektrolytpolymeren in 0.5 M NaCl statt in 0.15 M NaCl hergestellt wurde (Hintergrundinformationen, Abschnitt 2). Wir führen diesen Unterschied auf die Bildung einer dickeren Polymerschicht auf den kolloidalen Partikeln zurück, d. h., die Polymere ändern ihre Struktur von einer gestreckten Konformation im Medium niedriger Ionenstärke zu einer dichten, kollabierten Konformation bei hoher Ionenstärke.^[13] Die Adsorption von NBs kann auch mit Methoden erreicht werden, die den für Nanopartikel entwickelten ähnlich sind.^[14] In unseren Untersuchungen stellten wir fest, dass a) abnehmende Konzentrationen der inneren und äußeren Subkompartimente die Aggregation von Mikropartikeln verringern, b) bei annähernd gleichen relativen Konzentrationen der äußeren und inneren Subkompartimente sich die Belegungsdichte des inneren Subkompartiments einstellen lässt und c) die Porosität von Mikropartikeln für die Adsorption von Materialien von Vorteil ist, jedoch eine stärkere Aggregation der Mikropartikel auslöst (Hintergrundinformationen, Abschnitte 1 und 2).

Die Herstellung eines Mehrfachkompartiments, wie es als Beispiel für ein auf NBs beruhendes Mikropartikelsystem gezeigt wurde, ist von besonderem Interesse für Enzyme und enzymkatalysierte Reaktionen.^[15] Um ein solches System zu erhalten, schlossen wir das Substrat in Liposomen ein und lagerten diese als äußere Kompartimente an ein CaCO_3 -Partikel (das innere Subkompartiment) an, welches das Enzym Peroxidase enthielt. Wir konnten die Freisetzung eines kleinen Substratmoleküls auslösen, während ein größeres Molekül, das Enzym, im begrenzten und geschützten Innern der Mikropartikel verblieb. Die katalytische Aktivität des Enzyms als wichtiges Kriterium für seine Funktionalität^[16] wurde experimentell überprüft, indem die Kinetik der Enzymreaktion im Innern der porösen Mikropartikel mit der verglichen wurde, die in polymeren, mit dem Enzym gefüllten Mikrokapseln abläuft.

Um Untersuchungen an Multikompartimentbehältern, die von NBs abgeleitet sind, mit solchen zu verbinden, die Liposomen enthalten, adsorbierten wir lipidbeschichtete Silicapartikel an polyelektrolytbedeckte CaCO_3 -Kerne. Die Adsorption von POPC- und DOPC-Lipiden (POPC = Phosphatidylcholin, DOPC = 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin) an Silicapartikel war zuvor NMR-spektroskopisch untersucht worden.^[17a] In unseren Untersuchungen beobachteten wir eine betragsmäßige Abnahme des Z-Potentials der Silicapartikel von -50 auf -8 mV. Die Adsorption von Liposomen an polyelektrolytbeschichtete Partikel ist in Einklang mit Ergebnissen, über die von anderen Arbeitsgruppen berichtet wurde.^[9,17b] Obwohl eine Mischung von sauren und zwitterionischen Lipiden eine bessere Doppelschicht ergab als die einzelnen Lipide, wurde eine schwache Wechselwirkung zwischen Liposomen beobachtet, die aus zwitterionischen Lipiden zusammengesetzt sind.^[17c,d] Geladene Lipidgruppen tragen zu stärkerer Wechselwirkung mit geladenen Oberflächen bei.^[17d-f] Durch Anpassung der Ladung und Zusammensetzung der Liposomen lassen sich sowohl die Liposomenadsorption als auch das Belegen von Polyelektrolyt-Multischichten mit Lipiden steuern.^[17d]

Liposomen gelten wegen ihrer geringen Größe und ihrer Fähigkeit, kleine Moleküle einzuschließen, als vielversprechende Trägerpartikel.^[18] Die Adsorption von Liposomen an CaCO_3 -Partikel wurde durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie verfolgt (Hintergrundinformationen). Im Falle von polyelektrolytbeladenen Partikeln stimmten die Ergebnisse mit jenen überein, die unter Verwendung von Kapseln gewonnen wurden.^[9] Wir wählten Ultraschall^[19–21] als eine von zahlreichen Methoden,^[22] welche die Freisetzung von Substanzen auslösen und damit die Enzymreaktion in Gang setzen können. Beim Aufbrechen von Liposomen wurde das Substrat frei und diffundiert in das innere, das Enzym enthaltende Subkompartiment. Der zeitliche Verlauf der Reaktion wurde in einem Mikroskop beobachtet (Abbildung 2).

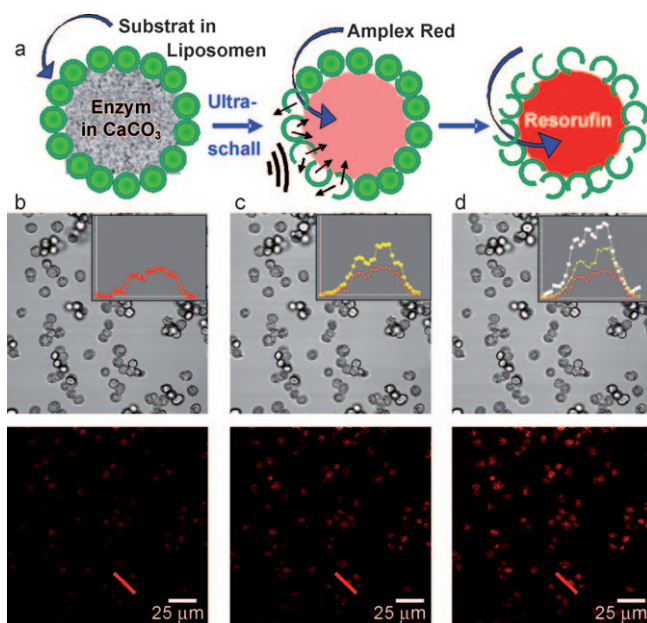
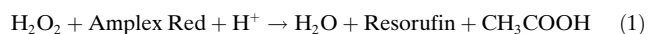


Abbildung 2. Ablauf einer enzymkatalysierten Reaktion in porösen Mikropartikeln (a). Konfokaldurchlichtmikroskopische (obere Reihe) und -fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (untere Reihe) von Mikropartikeln nach 1 (b), 10 (c) und 15 min (d) Ultraschallbehandlung und Zugabe von H_2O_2 . Die Fluoreszenzprofile in den Einschüben wurden entlang den roten Linien in der unteren Reihe erhalten. Das rot gezeichnete Profil entspricht der Emission nach 1 min, das gelbe der nach 10 min und das weiße der nach 15 min Ultraschallbehandlung (Hintergrundinformationen, Abschnitt 3).

Das Substrat Amplex Red reagiert in Gegenwart von Peroxidase mit H_2O_2 zu dem rot fluoreszierenden Produkt Resorufin [Gl. (1)]. Die Abbildungen 2b–d belegen, dass die Fluoreszenzintensitäten der Kapsel (roter Kanal) mit der Zeit zunehmen. Nach 15 min erreichte das Signal seinen höchsten Wert (weiße Kurve in Abbildung 2d).



Poröse Nanopartikel zeichnen sich dadurch aus, dass der zeitliche Verlauf der Peroxidase-Reaktion durch die Zusammensetzung des inneren Kerns und die Konzentration des Elektronendonors beeinflusst werden kann. Im Gegensatz zu

den aus mehreren Kompartimenten aufgebauten Mikrokapseln^[8,9] erhöht der partikelähnliche innere Kern solcher Transportfähren die mechanische Stabilität des Behälters. Es ist jedoch anzumerken, dass die enzymkatalysierte Reaktion in Partikeln bedeutend langsamer abläuft als in Polyelektrolyt-Mikrokapseln^[8] (Abbildung 3). Dieser Unterschied kann mit der Annahme erklärt werden, dass in CaCO_3 -Partikeln nur der an der Oberfläche sitzende Anteil der Enzymmoleküle aktiv ist.

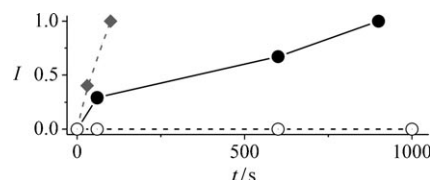


Abbildung 3. Kinetik der enzymkatalysierten Reaktion in Mikrokapseln (graue Quadrate) und porösen Mikropartikeln (schwarze Kreise) nach Aufbrechen der an die Polyelektrolytschale angelagerten Liposomen. Der Verlauf der Reaktion ohne Ultraschallbehandlung ist ebenfalls gezeigt (offene Kreise). Die Enzymmenge in Partikeln und Kapseln wurde als ähnlich angenommen, da bei der Herstellung der Mikrokapseln kein Verlust an Protein beobachtet wurde.

Um weitere Einblicke in den Mechanismus der Liposomenauflösung zu gewinnen, behandelten wir Liposomen, die das Substrat nicht in Assoziation mit Mikropartikeln enthielten, mit Ultraschall unter Bedingungen, die identisch waren mit jenen, die für die enzymkatalysierte Reaktion in einzelnen Mikropartikeln verwendet wurden, und mischten anschließend die Suspension mit Mikropartikeln, die das Enzym enthielten. Unter diesen Bedingungen wurde keine Reaktion beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Ultraschallintensität, die zum Aufbrechen der nicht mit Nanopartikeln assoziierten Liposomen verwendet wurde, unter dem Schwellenwert der Freisetzung lag (ca. 2 W cm^{-2}).^[20a] Wurden hingegen Mikropartikel, die das Enzym in ihren Poren enthielten und an ihrer Oberfläche mit substratgefüllten Liposomen besetzt waren, unter den gleichen Bedingungen mit Ultraschall behandelt, lief die Enzymreaktion wieder ab. Dieses Experiment bestätigte, dass sich die Liposomen dort öffnen, wo sie an die Mikropartikel assoziiert sind; dieses Ergebnis wurde erwartet, da Ultraschall auf den Dichtegradienten wirkt, der an solchen Übergangsstellen auftritt. Im Gegensatz dazu bildet sich an Lipidhüllen von Liposomen, die frei in Lösung suspendiert sind, kein ausreichend starker Dichtegradient aus, um die Liposomen durchlässig zu machen. Die Absorption von Ultraschall durch Partikel ist bei den hier verwendeten niedrigen Frequenzen sehr gering (für Silicapartikel $< 0.1 \text{ dB cm}^{-1} \text{ MHz}^{-1}$ ^[20b]), aber die höhere Partikeldichte in der Nähe der Liposomen ist für das Aufbrechen der Lipidmembran ausreichend. Beim Transport durch die Lipidmembran scheint die Bildung von transienten hydrophilen oder hydrophoben Poren eine Rolle zu spielen.^[20c] Eine Verbesserung des Öffnens durch Ultraschall sollte durch Variierung der Lipidart möglich sein, z. B. durch Verwendung von Lipiden, die nahe an ihrem Phasenübergang beschallt werden können.

Unser experimenteller Ansatz zeichnet sich insbesondere dadurch aus, dass wir Enzyme und Substrate gleichzeitig in ein und demselben Transportbehälter erhöhter mechanischer Stabilität bereitstellen. Früher beschriebene Methoden, die vornehmlich für die In-situ-Untersuchung von Reaktionen entwickelt wurden, lieferten Transportfähren, die nur Proteine enthielten. So wurde in einem Fall das Substrat zu einer Lösung gegeben, die Mikrokapseln enthielt,^[8,9] während in einem anderen Fall das Enzym an die Oberfläche von Mikrokapseln^[23a] oder Nanopartikeln^[23b] gebunden war oder zur Beobachtung gekoppelter Enzymreaktionen verwendet wurde.^[23c] Eine weitere wichtige Eigenschaft des hier vorgestellten Systems ist die Möglichkeit, eine enzymkatalysierte Reaktion durch Ultraschall auszulösen; die Energie, bei der die Liposomen aufgebrochen wurden (50 mW cm^{-2}), war erheblich niedriger als jene, die zuvor für das Öffnen von Liposomen genannt worden war.^[20a] Tatsächlich liegt die in unseren Experimenten verwendete Ultraschallstärke in dem Bereich, der für medizinische Ultraschallbehandlungen in Frage kommt ($0.08\text{--}8 \text{ W cm}^{-2}$).^[20d] Darüber hinaus sind die hier beschriebenen Methoden für das gleichzeitige Einbringen mehrerer Moleküle in Zellen von Bedeutung und könnten potenziell auch in vivo verwendet werden.

Wir haben hier das Auslösen einer enzymkatalysierten Reaktion in einem aus mehreren Kompartimenten bestehenden, porösen CaCO_3 -Partikel beschrieben und die Reaktion mit jener verglichen, die in Mikrokapseln ablief, welche aus mehreren Polyelektrolytschichten zusammengesetzt waren. Die Subkompartimentierung wurde erreicht, indem ein größerer Mikrobehälter mit kleineren Subkompartimenten (Liposomen) besetzt wurde. Wir identifizierten Eigenschaften wie Porosität, Ionenstärke und Partikelkonzentration als kritische Faktoren, welche die Adsorption von Nano-behältern und Liposomen an den größeren inneren Kern des Behälters kontrollieren. Die hier vorgestellte Strategie ermöglicht das gleichzeitige Einbringen großer und kleiner Moleküle, beispielsweise eines Enzyms und seiner Substrate, in das gleiche Partikel oder in eine Mikrokapsel, wodurch sich eine spezifische biochemische Reaktion in einer definierten dreidimensionalen Umgebung in Gang setzen lässt. Unser System zeichnet sich durch eine erhöhte mechanische Stabilität der Partikel aus. Nach dem Aufbrechen der äußeren Subkompartimente lief eine Enzym-Substrat-Reaktion zwischen dem freigesetzten Substrat und dem im begrenzten und geschützten Innern der Mikropartikel oder Mikrokapseln zurückgehaltenen Enzym ab. Das Aufbrechen gelang mit Ultraschall unter Bedingungen, die den bei medizinischen Behandlungen verwendeten nahekommen; als wichtigster Parameter kann der Dichtegradient um die Lipidmembran gelten. Die Reaktion in einem Mikropartikel ist allerdings um mehr als eine Größenordnung langsamer als die in einer mit dem Enzym gefüllten, hohlen Polymermikrokapsel. Wir erwarten, dass sich das von uns vorgestellte System im Zusammenspiel mit verschiedenen Typen^[24] von Kapseln als sehr nützlich für das gleichzeitige Einbringen und Aktivieren von Molekülen verschiedener Größe erweisen wird, und zwar auf so weit auseinanderliegenden Gebieten wie Biomedizin,^[25a] Sensoren^[25b] und Korrosionsschutz.^[25c]

Eingegangen am 28. Mai 2010

Online veröffentlicht am 21. September 2010

Stichwörter: Enzymreaktionen · Mikropartikel · Nano-behälter · Ultraschall · Wirkstofftransport

- [1] A. G. Skirtach, A. M. Javier, O. Kreft, K. Köhler, A. P. Alberola, H. Möhwald, W. J. Parak, G. B. Sukhorukov, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4728–4733; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4612–4617.
- [2] E. Donath, G. B. Sukhorukov, F. Caruso, S. Davis, H. Möhwald, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2323–2327; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2201–2205.
- [3] a) G. Decher, J. D. Hong, J. Schmitt, *Thin Solid Films* **1992**, *210*, 831–835; b) Y. Lvov, G. Decher, H. Möhwald, *Langmuir* **1993**, *9*, 481–486; c) F. Caruso, M. Spasova, V. Saiguerino-Maceira, L. M. Liz-Marzan, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 1090; d) M. Schönhoff, *J. Phys. Condens. Matter* **2003**, *15*, R1781–R1808; e) D. M. De-longchamp, P. T. Hammond, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 1165–1173; f) E. Kharlampieva, V. A. Izumrudov, S. A. Sukhishvili, *Macromolecules* **2007**, *40*, 37–44; g) T. Boudou, Y. Crouzier, K. Ren, G. Blin, C. Picart, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 441–467.
- [4] R. De Rose, A. N. Zelikin, A. P. R. Johnston, A. Sexton, S. F. Chong, C. Cortez, W. Mulholland, F. Caruso, S. J. Kent, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4698–4703.
- [5] S. De Koker, B. G. De Geest, S. K. Singh, R. De Rycke, T. Naessens, Y. Van Kooyk, J. Demeester, S. C. De Smedt, J. Grooten, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8637–8641; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8485–8489.
- [6] R. Palankar, A. G. Skirtach, O. Kreft, M. Bedard, M. Garstka, K. Gould, H. Möhwald, G. B. Sukhorukov, M. Winterhalter, S. Springer, *Small* **2009**, *5*, 2168–2176.
- [7] O. Kreft, A. G. Skirtach, G. B. Sukhorukov, H. Möhwald, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 3142–3145.
- [8] O. Kreft, M. Prevot, H. Möhwald, G. B. Sukhorukov, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5702–5705; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5605–5608.
- [9] B. Städler, R. Chandrawati, A. D. Price, S. F. Chong, K. Brehe-ney, A. Postma, L. A. Connal, A. N. Zelikin, F. Caruso, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4423–4426; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4359–4362.
- [10] a) G. B. Sukhorukov, A. L. Rogach, B. Zebli, T. Liedl, A. G. Skirtach, K. Koehler, A. A. Antipov, N. Gaponik, A. S. Susa, M. Winterhalter, W. J. Parak, *Small* **2005**, *1*, 194–200; b) A. Muñoz Javier, O. Kreft, M. Semmling, S. Kempter, A. G. Skirtach, O. T. Bruns, P. del Pino, M. F. Bedard, J. Raedler, J. Kaes, C. Planck, G. B. Sukhorukov, W. J. Parak, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4281–4287; c) P. Rivera-Gil, S. De Kokker, B. G. De Geest, W. J. Parak, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 4398–4402.
- [11] a) P. A. L. Fernandes, M. Delcea, A. G. Skirtach, H. Möhwald, A. Fery, *Soft Matter* **2010**, *6*, 1879–1883; b) R. Mueller, K. Köhler, R. Weinkamer, G. B. Sukhorukov, A. Fery, *Macromolecules* **2005**, *38*, 9766–9771.
- [12] a) A. I. Petrov, D. V. Volodkin, G. B. Sukhorukov, *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 918–925; b) D. V. Volodkin, N. I. Larionova, G. B. Sukhorukov, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1962–1972; c) D. Halozan, U. Riebertanz, M. Brumen, E. Donath, *Colloids Surf. A* **2009**, *342*, 115–121.
- [13] K. Büscher, K. Graf, H. Ahrens, C. A. Helm, *Langmuir* **2002**, *18*, 3585–3591.
- [14] a) A. G. Skirtach, C. Dejuguat, D. Braun, A. S. Sucha, A. L. Rogach, G. B. Sukhorukov, *J. Chem. Phys. C* **2007**, *111*, 555–564; b) B. V. Parakhonskiy, M. F. Bedard, T. V. Bukreeva, G. B. Sukhorukov, H. Möhwald, A. G. Skirtach, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 1996–2002.

- [15] a) B. Samanta, X.-C. Yang, Y. Ofir, M.-H. Park, D. Patra, S. S. Agasti, O. R. Miranda, Z.-H. Mo, V. M. Rotello, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5445–5448; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5341–5344; b) P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schroeder, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9762–9792; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9618–9647.
- [16] A. Dyal, K. Loos, M. Noto, S. W. Chang, C. Spagnoli, K. V. P. M. Shafi, A. Ulman, M. Cowman, R. A. Gross, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1684–1685.
- [17] a) T. Köchy, T. M. Bayerl, *Phys. Rev. E* **1993**, *47*, 2109–2116; b) M. Fischlechner, M. Zaulig, S. Meyer, I. Estrela-Lopis, L. Cuellar, J. Irigoyen, P. Pescador, M. Brumen, P. Messner, S. Moya, E. Donath, *Soft Matter* **2008**, *4*, 2245–2258; c) D. V. Volodkin, P. Schaaf, H. Möhwald, J.-C. Voegel, V. Ball, *Soft Matter* **2009**, *5*, 1394–1405; d) R. P. Richter, R. Berat, A. R. Brisson, *Langmuir* **2006**, *22*, 3497–3505; e) Q. He, Y. Cui, J. B. Li, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2292–2303; f) L. Wang, M. Schoenhoff, H. Möhwald, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 9135–9142; g) A. S. Angelatos, S. Smith, F. Caruso, *Soft Matter* **2006**, *2*, 18–23.
- [18] a) M. Winterhalter, D. D. Lasic, *Chem. Phys. Lipids* **1993**, *64*, 35–43; b) T. L. Andresen, S. S. Jensen, K. Jorgensen, *Prog. Lipid Res.* **2005**, *44*, 68–97.
- [19] a) K. S. Suslick, *Ultrasound—Its Chemical, Physical and Biological Effects*, VCH, New York, **1988**; b) E. C. Unger, E. Hersch, M. Vannan, T. McCreery, *Echocardiography* **2001**, *18*, 355–361; c) A. G. Skirtach, B. G. De Geest, A. Mamedov, A. A. Antipov, N. A. Kotov, G. B. Sukhorukov, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 1050–1054.
- [20] a) H.-Y. Lin, J. L. Thomas, *Langmuir* **2003**, *19*, 1098–1105; b) F. Babick, A. Richter, *J. Acoust. Soc. Am.* **2006**, *119*, 1441–1448; c) A. Schroeder, J. Kost, Y. Barenholz, *Chem. Phys. Lipids* **2009**, *162*, 1–16; d) M. Kinoshita, N. McDannold, F. A. Jolesz, K. Hynynen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 11719–11723.
- [21] a) J. Busby, E. G. Richardson, *Proc. Phys. Soc. London Sect. B* **1956**, *69*, 193–202; b) S. H. Bloch, M. Wan, P. A. Dayton, K. W. Ferrara, *Appl. Phys. Lett.* **2004**, *84*, 631–633; c) M. Postema, A. van Wamel, F. J. Ten Cate, N. de Jong, *Med. Phys.* **2005**, *32*, 3707–3711; d) S.-L. Huang, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1167–1176; e) L. H. Lindner, M. Hossann, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2010**, *13*, 111–123.
- [22] a) S. Erokhina, L. Benassi, P. Bianchini, A. Diaspro, V. Erokhin, M. P. Fontana, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9800–9804; b) B. G. De Geest, R. E. Vandenbrücke, A. M. Guenther, G. B. Sukhorukov, W. E. Hennink, N. N. Sanders, J. Demeester, S. C. De Smedt, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1005–1009; c) A. Angelatos, B. Radt, F. Caruso, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 3071–3076; d) A. G. Skirtach, C. Dejugnat, D. Braun, A. S. Susa, A. L. Rogach, W. J. Parak, H. Möhwald, G. B. Sukhorukov, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1371–1377; e) A. G. Skirtach, A. A. Antipov, D. G. Shchukin, G. B. Sukhorukov, *Langmuir* **2004**, *20*, 6988–6992; f) J. Yu, D. Javier, M. A. Yaseen, N. Nitin, R. Richards-Kortum, B. Anvari, M. S. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1929–1938; g) M. F. Bédard, S. Sadasivan, G. B. Sukhorukov, A. G. Skirtach, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 2226–2233; h) A. P. R. Johnston, G. K. Such, F. Caruso, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2723–2725; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2664–2666; i) K. Katagiri, M. Nakamura, K. Koutomo, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2010**, *2*, 768–773; j) E. M. Rosenbauer, M. Wagner, A. Musyanovych, K. Landfester, *Macromolecules* **2010**, *43*, 5083–5093; k) J. Zhang, Y. Fu, F. Jiang, J. R. Lakowicz, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 7653–7659; l) S. H. Hu, C. H. Tsai, C. F. Liao, D. M. Liu, S. Y. Chen, *Langmuir* **2008**, *24*, 11811–11818.
- [23] a) T. Shutava, Z. Zheng, V. John, Y. Lvov, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 914–921; b) P. Scodeller, V. Flexer, R. Szamocki, E. J. Calvo, N. Tognalli, H. Troiani, A. Fainstein, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12690–12697; c) H. Bäumler, R. Georgieva, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1480–1487.
- [24] a) S. F. M. van Dongen, H.-P. M. de Hoog, R. J. R. W. Peters, M. Nallani, R. J. M. Nolte, J. C. M. van Hest, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6212–6274; b) K. Landfester, A. Musyanovych, V. Mailander, *J. Polym. Sci. Part A* **2010**, *48*, 493–515.
- [25] a) A. N. Zelikin, Q. Li, F. Caruso, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7907–7909; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7743–7745; b) J. Q. Brown, R. Srivastava, M. J. McShane, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 212–216; c) E. V. Skorb, A. G. Skirtach, D. V. Sviridov, D. G. Shchukin, H. Möhwald, *ACS Nano* **2009**, *3*, 1753–1760.