

# „Intelligente“ Biomaterialien durch Selbstorganisation von Hybridhydrogelen

Jindřich Kopeček\* und Jiyuan Yang

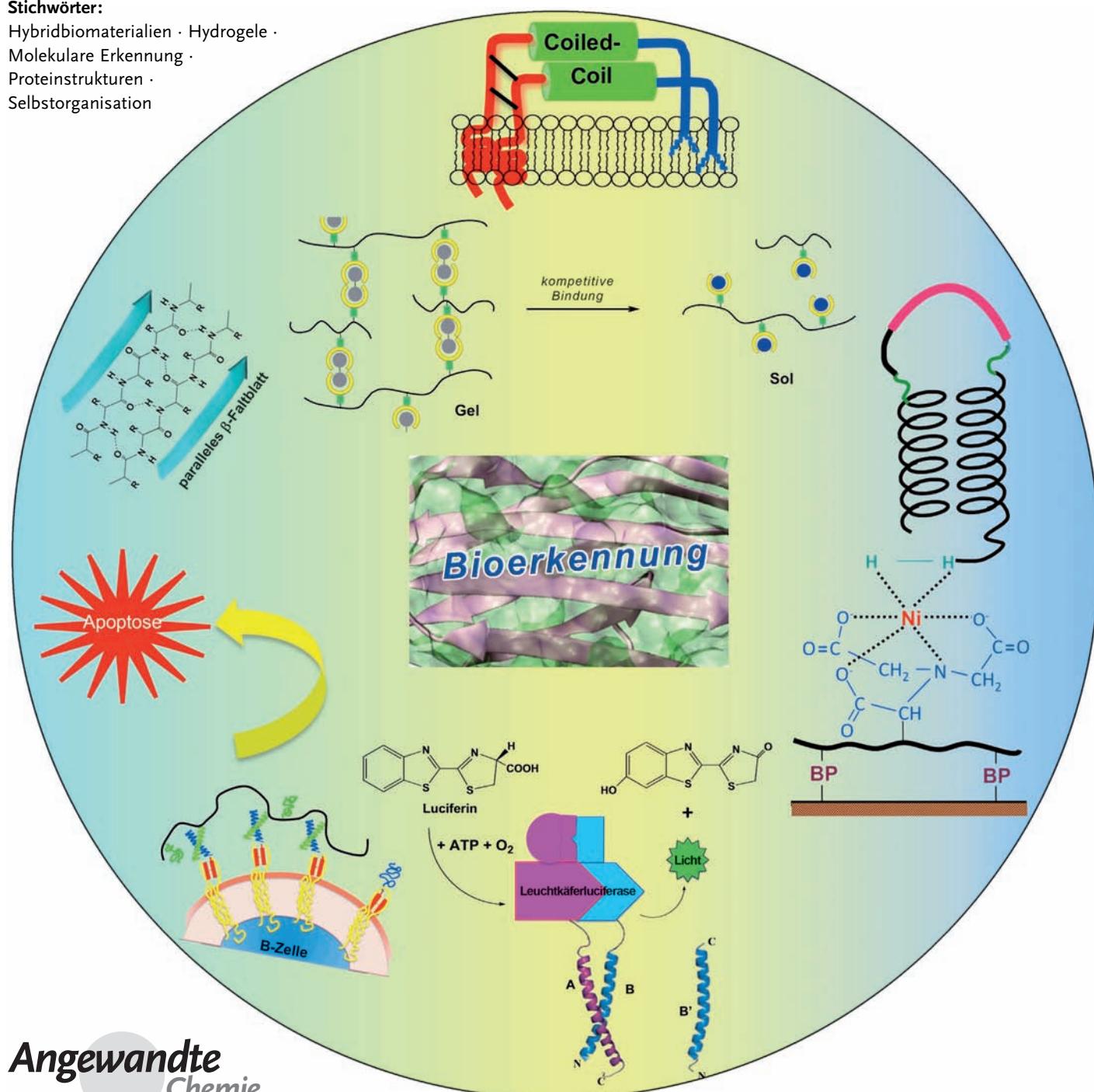
**Stichwörter:**

Hybridbiomaterialien · Hydrogele ·

Molekulare Erkennung ·

Proteinstrukturen ·

Selbstorganisation



**H**ybridbiomaterialien sind Systeme, die aus Bausteinen von mindestens zwei individuellen Molekülklassen erzeugt werden, z. B. aus synthetischen Makromolekülen sowie Proteinen oder Peptiddomänen. Die synergistische Kombination von zwei Strukturarten kann neue Materialien ergeben, die einen beispiellosen Grad an struktureller Organisation sowie neuartige Eigenschaften aufweisen. Dieser Aufsatz diskutiert die durch Bioerkennung gesteuerte Selbstorganisation von hybriden Makromolekülen zu funktionalen Hydrogel-Biomaterialien. Zuerst werden die grundlegenden Regeln besprochen, die die Sekundärstruktur von Peptiden bestimmen, und im Anschluss bewerten wir die Ansätze zur spezifischen Entwicklung von Hybrid-systemen mit maßgeschneiderten Eigenschaften. Nach einer Diskussion der Ähnlichkeiten der verschiedenen Designprinzipien für Biomaterialien und makromolekulare Therapeutika werden wir die zukünftige Entwicklung dieses Forschungsgebietes kurz zusammenfassen.

## 1. Einleitung

Das Prinzip der Selbstorganisation ist in der Natur im makroskopischen wie auch mikroskopischen Maßstab allgegenwärtig. Es beschreibt die Organisation und den spontanen Zusammenschluss von vielen individuellen Einheiten zu rationellen und wohldefinierten Strukturen ohne Beteiligung von außen.<sup>[1,2]</sup> Die molekulare Bioerkennung steht im Mittelpunkt aller biologischen Prozesse. Sie ist die Grundlage für die Entwicklung von genau definierten intelligenten Systemen, einschließlich zielgerichtet wirkender Therapeutika, Imaging-Substanzen sowie reizempfindlicher und selbstorganisierter Biomaterialien und Biosensoren.

Die Selbstorganisation durch Bioerkennung ist ein effizientes Mittel für den Aufbau neuer supramolekularer Architekturen und ermöglicht die Entwicklung von Materialien, die im Nano- bis Mikrometerbereich programmiert werden können.<sup>[3,4]</sup> Die Kombination von Selbstorganisation in verschiedenen Längenbereichen führt zu strukturellen Hierarchien;<sup>[5-7]</sup> z. B. erhält man eine Collagenfaser durch hierarchische Organisation vom Nano- bis hin zum Makrommaßstab: Drei Collagenmakromoleküle bilden eine Dreifachhelix, und mehrere Dreifachhelices ordnen sich zu Fibrillen an, die sich anschließend zu einer voll entwickelten Collagenfaser ausrichten.<sup>[8]</sup>

Hydrogele sind die ersten Biomaterialien, die für den biomedizinischen Gebrauch entwickelt wurden.<sup>[9]</sup> Sie sind Materialien mit einer ausgeprägten dreidimensionalen Struktur, die in Wasser quellen, sich aber nicht auflösen. Ihre Klassifikation kann sich auf folgende Kriterien beziehen: ihre Herkunft – natürliche und synthetische Hydrogele; die Natur der Vernetzung – kovalente oder physikalische Hydrogele; die Art des Netzwerkes – Homopolymeren-Netzwerke, Copolymeren-Netzwerke, Polymeren-Netzwerke mit gegenseitiger Durchdringung und Doppelnetzwerke; und ihr Verbleib im Organismus – abbaubare und nicht abbaubare Hydrogele.<sup>[10,11]</sup> Zu den verschiedenen Aspekten von Hydrogelen wurden bereits

zahlreiche Aufsätze<sup>[10-25]</sup> veröffentlicht; darum wird sich dieser Aufsatz auf selbstorganisierte Biomaterialien/Hydrogele aus gentechnisch hergestellten Polymeren und auf Hybridehydrogele aus mindestens zwei individuellen Makromolekülklassen konzentrieren, z. B. synthetische und biologische Makromoleküle, die kovalent oder nichtkovalent miteinander verbunden sind. Um das Thema weiter einzugrenzen, werden wir nur Peptide und Proteine als natürliche Komponenten von Hybridsystemen diskutieren.

## 2. Grundprinzipien der Peptidselbstorganisation

### 2.1. Coiled-Coils

Das Coiled-Coil-Motiv ist eines der grundlegenden Fal tungsmuster von natürlichen Proteinen. Es besteht aus zwei oder mehr rechtsgängigen  $\alpha$ -Helices, die sich zusammenwinden und eine leicht linksgängige Superhelix bilden.<sup>[26-29]</sup> Die Primärstruktur des Coiled-Coil-Motivs ist eine Sequenz sich wiederholender Heptaden, die als [a,b,c,d,e,f,g]<sub>n</sub> bezeichnet wird, wobei a und d normalerweise hydrophobe Aminosäurereste und die anderen polar sind. Zwei Helices assoziieren über die hydrophobe Oberfläche zwischen a und d, wodurch b, c und f nach außen zeigen. Interhelicale elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Resten e und g tragen zur Stabilität des Coiled-Coils bei. In Abhängigkeit von ihrer Detailstruktur können sich  $\alpha$ -Helices als Homodimere, Heterodimere in paralleler und antiparalleler Anordnung oder

## Aus dem Inhalt

1. Einleitung	7513
2. Grundprinzipien der Peptidselbstorganisation	7513
3. Selbstorganisierte Hybridbiomaterialien	7516
4. Strukturanalyse selbstorganisierter Hydrogele	7524
5. Designbeispiele	7525
6. Von Nanobiomaterialien zur Nanomedizin	7529
7. Schlussfolgerungen und Ausblick	7530

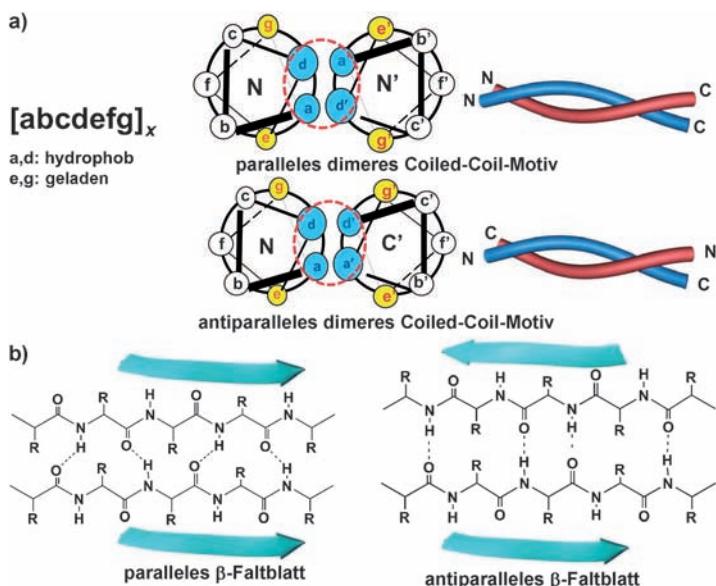


Abbildung 1. Die Strukturen von Coiled-Coils (a) und  $\beta$ -Faltblättern (b).

als Aggregate höherer Ordnung (z.B. Tetramere) zusammenschließen (Abbildung 1).<sup>[30–32]</sup>

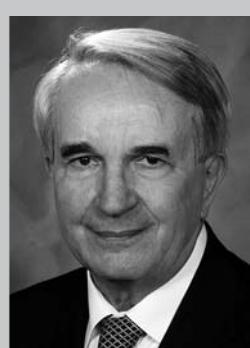
Hunderte natürlicher Proteine, z.B. Muskelproteine, Transkriptionsfaktoren, Cytoskelettproteine, Zell- und Virosoberflächenproteine, Tumorsuppressoren, molekulare Motoren und viele krankheits- und organspezifische Autoantigene, enthalten Coiled-Coil-Bereiche.<sup>[33]</sup> Die Coiled-Coil-Motive spielen für die Funktionen dieser Peptide eine wichtige Rolle: Eine charakteristische Eigenschaft von Coiled-Coils ist die spezifische räumliche Erkennung, Assoziation und Dissoziation von Helices, was sie zu einem idealen Modell für Proteinbiomaterialien macht, deren höhere Strukturen auf Basis der Primärsequenz vorhergesagt werden können. Verschiedene funktionelle Gruppen können in der Coiled-Coil-Struktur genau positioniert werden, wodurch spezifische intermolekulare Wechselwirkungen möglich werden.

Die typische  $\alpha$ -Helix ist rechtsgängig, und für eine komplette Umdrehung sind 3.6 Aminosäurereste notwendig. In einem linksgängigen Coiled-Coil (zusammengesetzt aus rechtsgängigen Helices) bildet eine Heptade genau zwei

Umdrehungen (so genannte  $\frac{7}{2}$ -Wiederholung – 7 Aminosäuren pro 2 Umdrehungen). In der Natur können Coiled-Coils mit verschiedenen Periodizitäten (z.B. Periodizitäten mit elf Resten) oder mit Einfügungen von einem oder mehreren Resten in das Heptadenmuster gefunden werden (Einfügungen von einem Rest werden „Skips“, von drei Resten „Stammers“ und von vier Resten „Stutters“ genannt).<sup>[26,34]</sup> In der Natur kommen Dimere, Trimere und Tetramere am häufigsten vor, aber auch die Bildung von Multimeren und komplexeren Anordnungen ist gut bekannt.<sup>[35]</sup> Vor Kurzem wurde eine neue Coiled-Coil-Anordnung, ein De-novo-Peptid, beschrieben, das ein Bündel aus sechs Helices mit einem zentralen Kanal bildet, der den Durchtritt von Wassermolekülen ermöglicht.<sup>[36]</sup> Die Vielseitigkeit des Coiled-Coil-Motivs, und hier besonders die Möglichkeit, seine Stabilität und Spezifität durch Modifikation der Primärstruktur zu beeinflussen (Stabilitäten bis zu  $10^{-15}$  M können erreicht werden<sup>[37]</sup>), ist vielversprechend für die Entwicklung neuer Biomaterialien.

Mit Blick auf die Entwicklung neuer Coiled-Coil-haltiger Materialien ist das bekannte Verhältnis zwischen der Struktur Coiled-Coil-bildender Sequenzen sowie ihrer Erkennung, Assoziation und Faltung ein großer Vorteil. Offenbar ist die  $\alpha$ -Helix wegen der Wiederholungshäufigkeit der Sequenz die einzige Art von Sekundärstruktur in Coiled-Coils.<sup>[38]</sup> Mutationen führen entweder zu einer vollständigen Zerstörung der Sekundärstruktur, oder die Struktur bleibt erhalten. Im Unterschied dazu gibt es viele Variationen in der Tertiär/Quartärstruktur von Coiled-Coils. Die Zahl der Stränge kann zwischen 2, 3, 4 und 5 wechseln, und die Orientierung zwischen den Helices kann parallel oder antiparallel sein.<sup>[39]</sup> Diese Strukturveränderungen entsprechen verschiedenen biologischen Funktionen.

Die Wechselwirkung von linksgängigen und rechtsgängigen  $\alpha$ -Helices (jede mit 30 Aminosäureresten) mit Peptiden, die D- und L-Aminosäuren enthalten, wurde untersucht (chiraliatsabhängige Peptidwechselwirkungen).<sup>[40]</sup> Das Helixnetzdiagramm sagt vorher, dass zwei Helices mit einer D/L-Struktur mit einem Packungswinkel von  $0^\circ$  packen, im Unterschied zu natürlichen L/L-Coiled-Coils, bei denen sich die Helices bei  $20^\circ$  kreuzen. Die beiden Peptide – D-Säure und L-Base – bilden stabile Heterotetramere, die Eigenschaften



Jindřich (Henry) Kopeček erhielt seinen Ph.D. in makromolekularer Chemie und seinen D.Sc. in Chemie von der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften. Nach der Promotion war er Postdoktorand am National Research Council of Canada. Derzeit ist er Distinguished Professor für Pharmazeutische Chemie und Distinguished Professor für Bioengineering an der University of Utah. Seine Forschung konzentriert sich auf die Bioerkennung von Makromolekülen, Biokonjugatchemie, gezielte makromolekulare Therapeutika und die Selbstorganisation von Block- und Ppropfcopolymeren zu Hydrogelen.



Jiyuan (Jane) Yang erhielt ihren B.S. in Chemischer Verfahrenstechnik von der Tsinghua University, ihren M.S. in Polymermaterialwissenschaften von der Dalian University of Technology und ihren Ph.D. in Biomedizinischen Polymerwissenschaften von der Peking University. Nach einem Postdoktorat am Institut Curie in Paris arbeitet sie seit 2003 an der University of Utah, zurzeit als Research Associate Professor für Pharmazie und Pharmazeutische Chemie. Sie befasst sich mit der Entwicklung abbaubarer polymerer Antikrebswirkstoffträger und mit der Selbstorganisation von Copolymeren zu Hydrogelen durch Bioerkennung von Peptiddomänen.

## Hydrogele

einer spezifischen wie auch einer nichtspezifischen Packung aufweisen.<sup>[40]</sup>

Es gibt mehrere Beispiele zur chirialitätsunabhängigen Peptid-/Proteinerkennung. Die Peptide der Transmembrandomänen von Glycophorin A (GPA) haben einen Mangel an Stereospezifität in GPA-Helix-Helix-Wechselwirkungen gezeigt.<sup>[41]</sup> Kolluri et al. konnten zeigen, dass ein Nur77-Peptid und sein Enantiomer an die Bcl-2-Schleife binden, wobei die Wirkung Bcl-2 von Krebszellen schützend zu Krebszellen vernichtend umgewandelt wird. Beide Stereoisomere dieses Nonapeptids (FSRSLRSLL) wirken als molekulare Schalter, die die Bcl-2-BH4-Domäne verschieben und damit die BH3-Domäne freilegen, die die Antiapoptoseaktivität von Bcl-X<sub>L</sub> blockiert.<sup>[42]</sup>

Solche Studien liefern eine wissenschaftliche Basis für die Entwicklung von D-Peptidinhibitoren helicaler L-Proteinziele.<sup>[40,43,44]</sup> Eine brauchbare Screening-Methode zur Identifizierung von D-Peptiden, die an spezifische Ziele binden, ist das spiegelbildliche Phagen-Display.<sup>[45]</sup>

### 2.2. β-Faltblätter

β-Faltblätter sind wichtige Strukturelemente von Proteinen. β-Stränge richten sich nebeneinander aus und werden durch Wasserstoffbrücken zwischen dem Carbonylsauerstoffatom einer Aminosäure in einem Strang und dem Rückgratamid einer zweiten Aminosäure in einem anderen Strang stabilisiert. Die Stränge (mindestens zwei, aber häufig mehr<sup>[46,47]</sup>) können sich zur Bildung des β-Faltblatts parallel oder antiparallel zueinander ausrichten. Die Stabilität von β-Faltblättern hängt von der Wechselwirkung der Seitenketten benachbarter Aminosäuren ab.<sup>[1,48]</sup> Diese Wechselwirkungen müssen den Verlust von translatorischer und Solvationsenergie des Peptids kompensieren (Abbildung 1).<sup>[49]</sup>

Studien zu homo- und heterochiralen Wechselwirkungen zwischen enantiomeren β-Faltblättern deuten an, dass die homochirale Paarung stark bevorzugt wird.<sup>[50]</sup> Auf ähnliche Art und Weise ordnen sich amphiphile Triblock-Oligopeptide, die aus D- oder L-Tetraleucindomänen mit pH-empfindlichen L- oder D-Octalysinsegmenten aufgebaut sind, selbstständig zu β-Faltblattstrukturen mit entgegengesetzter Chiralität an. Rasterkraftmikroskopische (AFM-)Studien haben gezeigt, dass homochirale Lösungen sich selbstständig zu Amyloidnanofasern anordnen, wohingegen die racemische Mischung nur kugelförmige Aggregate bildet.<sup>[51]</sup>

Die Wechselwirkungen von D- und L-Aminosäurepeptiden, die β-Faltblätter bilden, sind biologisch relevant: Die Polymerisation von Amyloid-β-Peptiden (Aβ) wurde als der Hauptfaktor in der Pathogenese der Alzheimerkrankheit identifiziert. Es wurde ein zwölf Reste langes D-Peptid (QSHYRHISPAQV) gefunden, das an Amyloidplaques im Hirngewebe von Alzheimerpatienten bindet.<sup>[52]</sup> Zusätzlich verringert es die durchschnittliche Größe von Aβ-Aggregaten und die Aβ-Cytotoxizität gegen PC12-Zellen.<sup>[53]</sup>

Zhang et al. bestimmten die Strukturdynamik eines selbstorganisierten, 16 Reste langen Peptids, das β-Faltblätter bildet.<sup>[54]</sup> Bei Raumtemperatur zeigte das D-EAK16-Peptid (AEAAEKAKAEAAKAK) ein typisches β-Faltblatt-

Circulardichroismus(CD)-Spektrum. Wenn die Temperatur auf 80 °C erhöht wurde, erfolgte eine Phasenumwandlung zur α-Helix, ohne dass dabei ein nachweisbares intermediäres Zufallsknäuel gebildet wurde. Studien zum Einfluss von Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke und Konzentration des Denaturierungsmittels zeigten, dass sich das D-Peptid nur in seinem Temperaturverhalten von seinem L-Gegenstück unterschied.<sup>[54]</sup> Chirale selbstorganisierte Peptidnanofaserrüste bildeten sich sowohl aus L- als auch aus D-Peptiden.<sup>[55]</sup> Wie zu erwarten war, erhielt man nur eine schlechte Selbstorganisation für Peptide, die alternierend aus D- und L-Aminosäuren aufgebaut waren.<sup>[56]</sup> Diese Befunde lassen darauf schließen, dass die Chiralität von Peptiden nicht hinderlich für die Bildung definierter Nanostrukturen ist.

Die β-Haarnadel ist ein häufiges Motiv, bei dem zwei benachbarte antiparallele β-Stränge durch eine Schleife verbunden sind. β-Haarnadelpeptide können durch intramolekulares Falten und intermolekulare Zusammenlagerung Hydrogele bilden, was durch externe Reize, z.B. Änderungen des pH-Werts, der Ionenstärke oder der Temperatur, ausgelöst wird.<sup>[57,58]</sup> Zum Beispiel ist das MAX1-Peptid ((VK)<sub>4</sub>V<sup>D</sup>PPT-(KV)<sub>4</sub>-CONH<sub>2</sub>) aus zwei Strängen von alternierenden K- und V-Resten aufgebaut, die über eine Tetrapeptidschleife verbunden sind. Die Faltung von MAX1 in die Haarnadelkonformation kann durch eine Erhöhung des pH-Wertes<sup>[58]</sup> oder der Ionenstärke<sup>[59]</sup> ausgelöst werden. Die komplettete β-Faltblattumwandlung und Bildung der dreidimensionalen Hydrogelstruktur erfolgen unter physiologischen Bedingungen innerhalb von etwa 30 min.<sup>[60]</sup>

### 2.3. Die Reizempfindlichkeit von Coiled-Coils und β-Faltblättern

Die Stabilität von Coiled-Coils hängt von der Zahl der Heptaden (Länge des Peptids),<sup>[30]</sup> von der Packung am hydrophoben Kern (a-, d-Positionen)<sup>[61]</sup> und von den interhelicalen Ionenwechselwirkungen (e-, g-Positionen)<sup>[32,62]</sup> ab. Diese Wechselwirkungen sind wiederum von Umgebungs faktoren abhängig. In der Konsequenz hängt also die Stabilität des Coiled-Coil-Motivs von der Temperatur,<sup>[63]</sup> dem pH-Wert<sup>[64]</sup> und der Ionenstärke ab.<sup>[65]</sup> Ein interessanter Ansatz zur Herstellung reizempfindlicher Coiled-Coils ist das Nutzen von Metall-Ligand-Koordination als Triebkraft zur Manipulation der Konformation/Assoziation. Zwei Carboxygruppen in einer Peptidsequenz können einen Dirhodiumkomplex bilden und damit ein Coiled-Coil-Dimer reversibel zerlegen.<sup>[66]</sup>

Auf ähnliche Art und Weise wird der Prozess der β-Faltblattanordnung durch inter- und intramolekulare Wechselwirkungen bedingt, die elektrostatische, hydrophobe, π-Stapel- und Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen mit einschließen. Daraus folgt, dass dieser Prozess auf Änderungen des pH-Wertes, der Temperatur und des Lösungsmittels reagiert.<sup>[49,67]</sup> Ein wichtiger Faktor ist auch die Konzentration – Peptide können sich, nach Erreichen einer kritischen Konzentration, zu Streifen, Bändern, Fibrillen und Fasern selbst organisieren.<sup>[68]</sup>

## 2.4. Schalterpeptide

Des Weiteren wurden auch interessante Strukturen entwickelt, die als Reaktion auf verschiedene Reize, z. B. Änderungen der Temperatur, des pH-Werts oder der Konzentration, von einer bestimmten Sekundärstruktur in eine andere umschalten können. Mutter et al. beschrieben einen pH-abhängigen Schalter eines amphiphilen Peptides, der von einer  $\alpha$ -Helix zu einem  $\beta$ -Faltblatt umschaltet.<sup>[69]</sup> Weiterhin entwickelten sie ein Schalterpeptid, das die Amyloid- $\beta$ -Faltblattanordnung stört, indem die Peptide zu  $\alpha$ -Helices umgewandelt werden.<sup>[70]</sup> Koksch et al. synthetisierten das Peptid VW19 (LKVELKELKKELVVLKSELKELKKEL), das Strukturelemente enthält, die sowohl die  $\alpha$ -helicale Faltung als auch die  $\beta$ -Faltblattbildung ermöglichen. In Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen (pH-Wert und/oder Konzentration des Peptids) kann es als Zufallsknäuel,  $\beta$ -Faltblatt oder in der Coiled-Coil-Konformation vorliegen.<sup>[71]</sup> Auf ähnliche Art und Weise entwickelten Woolfson et al. Peptide mit Strukturdualität, die sich unter reduzierenden Bedingungen zu parallelen Leucin-Reißverschlussdimeren und bei Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken zu monomeren Haarnadeln falten.<sup>[72]</sup> Die Änderung der Sekundärstruktur kann auch mit der Anordnung zu dreidimensionalen Strukturen kombiniert werden: Schneider et al. stellten pH-empfindliche Hydrogele auf der Grundlage eines Peptids her, dessen Sekundärstruktur vom ungefalteten Zustand zur Amyloidanordnung umschalten kann.<sup>[58]</sup> Die Auswirkung von Metallionen auf die Umwandlung zwischen  $\alpha$ -helicaler und  $\beta$ -Faltblatt-Proteinstruktur wurde mithilfe eines antiparallelenen Coiled-Coil-Motivs mit Histidinresten untersucht. Die Zugabe von Cu<sup>2+</sup>- oder Zn<sup>2+</sup>-Ionen führte zu einem Abfall des Helixanteils bei gleichzeitigem Anstieg des  $\beta$ -Faltblattanteils.<sup>[73]</sup>

## 2.5. Auswirkungen der Anbindung eines linearen synthetischen Makromoleküls an ein Peptid auf dessen Sekundärstruktur

Bindet man eine synthetische Polymerkette an ein Coiled-Coil-bildendes Peptid an, ist die Stabilität des resultierenden Konstrukts ein wichtiger Faktor für die Entwicklung von hybriden Biomaterialien. Die Konjugation von  $\alpha$ -Methoxy-Poly(ethylenglycol) (mPEG, Molekulargewicht 2000) mit einer Reihe von Peptiden der allgemeinen Struktur (VSSLESK)<sub>n</sub> ( $n = 3-6$ ) hatte keinen störenden Einfluss auf die Coiled-Coil-Bildung, sondern verbesserte stattdessen die thermische Stabilität der Coiled-Coil-Überstruktur.<sup>[74]</sup> In einer ähnlichen Studie wurde ein Coiled-Coil-bildendes Peptid G(EAK-LAEI)<sub>3</sub>Y mit Polyethylenglycol (PEG; Molekulargewicht 750 und 2000) modifiziert. Die Anbindung von PEG verhinderte die Coiled-Coil-Bildung nicht, jedoch zeigten analytische Ultrazentrifugationsexperimente einen Abfall der relativen Konzentration von Coiled-Coil-Aggregaten mit ansteigender PEG-Kettenlänge.<sup>[75]</sup>

Der Einfluss der Anbindung eines synthetischen Polymers an ein Peptid, das  $\beta$ -Faltblätter bildet, wurde ebenfalls umfangreich untersucht.<sup>[67,76,77]</sup> Das semitelechale Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamid] [Poly(HPMA)] mit endständi-

gen SH-Gruppen wurde an das mit Maleimid modifizierte  $\beta$ -Faltblattpeptid QQRQWQFEQQ gebunden. CD-Spektroskopie und Bindungsstudien mit Kongorot zeigten, dass der Peptidblock dem Diblockcopolymer seine  $\beta$ -Faltblattanordnung aufzwingt. Mithilfe von Transmissionselektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass sowohl das Peptid als auch das Copolymer zu Fibrillen selbstorganisieren können.<sup>[67]</sup> Zur Bewertung des Einflusses des PEG-Molekulargewichts auf die Eigenschaften der PEG-Peptidkonjugate wurde ein Amyloidpeptidfragment (FFKLVFF) an PEG mit Molekulargewichten von 1, 2 und 10 kDa gebunden. Bei erhöhten Konzentrationen bildeten die Konjugate mit 1- und 2-kDa-PEG eine nematische und die Konjugate mit 10-kDa-PEG eine hexagonale kolumnare Phase.<sup>[76]</sup> Micellen aus Pluronic F127 waren in der Lage, die Sekundärstruktur eines eingeschlossenen Peptids (AKA<sub>3</sub>KA)<sub>2</sub> zu stabilisieren, was zu einem Anstieg der Helizität und einem Abfall der thermischen Denaturierung führte. Die kovalente Bindung des Peptids an Pluronic F127 führte zur Selbstorganisation zu Hydrogelen.<sup>[77]</sup> Die Anbindung von PEG (5 oder 10 kDa) an Alanin-reiche Polypeptide (ca. 12 kDa) resultiert wegen der sterischen Behinderung durch PEG und der Gesamtabschirmung von attraktiven Wechselwirkungen zwischen ungefalteten Struktursstrukturen in einer Hemmung der  $\beta$ -Faltblatt- und Fibrillenbildung.<sup>[78]</sup>

## 3. Selbstorganisierte Hybridbiomaterialien

Die Selbstorganisation von Hydrogelen aus herkömmlichen Block- und Ppropfcopolymeren kann durch hydrophobe Wechselwirkungen angetrieben werden, wie sie z. B. in ABA-Blockcopolymeren auftreten, in denen ein hydrophiler Block B von zwei hydrophoben Blöcken A eingeschlossen wird.<sup>[79,80]</sup> Die Entwicklung von Hydrogel-bildenden Polymeren auf Grundlage von Erkennungsmotiven aus der Natur liefert Hilfsmittel für das Design und die Synthese von genau definierten dreidimensionalen Strukturen.<sup>[81,82]</sup> Die Möglichkeit, die Selbstorganisation durch ein externes Signal (Reizempfindlichkeit) auszulösen, ist zur Kontrolle der Endstruktur sehr wichtig.<sup>[83]</sup> Der hohe Grad an Erkennung von Peptidmotiven resultiert in präzisen räumlichen Anordnungen von Makromolekülen in einer dreidimensionalen Struktur. Zwei Ansätze wurden zur Entwicklung von Strukturen verfolgt, die sich zu Biomaterialien und/oder Hydrogelen selbstorganisieren – Peptid/Protein-Materialien<sup>[84,85]</sup> und Hybridsysteme aus mindestens zwei Motiven, einem synthetischen Makromolekül und einem Peptid/Protein-Motiv.<sup>[63,86-91]</sup> Im Folgenden wollen wir die erreichten Ergebnisse beider Ansätze besprechen.

### 3.1. Gentechnisch konstruierte Copolymerne

Doel et al. versuchten als erste, ein gentechnisch konstruiertes Polymer herzustellen.<sup>[92]</sup> Es wurden Klone erzeugt, die Gene mit Kodierungen für bis zu 150 Wiederholungseinheiten von Aspartyl-Phenylalanin enthielten. Die polymeren Einfügungen wurden in *Escherichia coli* prozessiert, um ein

## Hydrogele

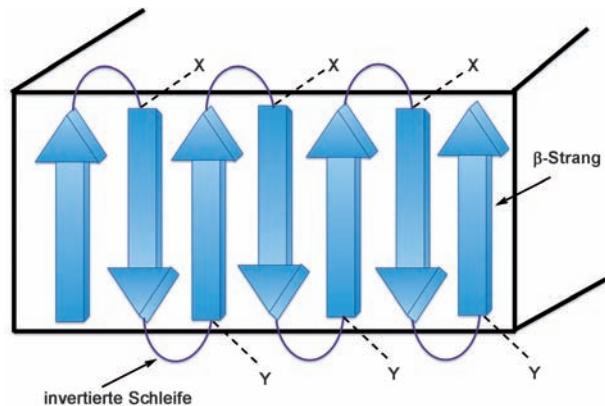
Polymer zu generieren, das enzymatisch zum künstlichen Süssstoff Asp-Phe abgebaut werden kann. Cappello et al. entwarfen zahlreiche Materialien durch Kombination von Motiven aus natürlichen Biomolekülen.<sup>[93,94]</sup> Das erste Proteinpolymer wurde aus zwei Oligopeptidblöcken, einem sechs Aminosäuren langen Block Seidenfibrin (GAGAGS) und einem zehn Aminosäure langen Block von humanem Fibronectin (VTGRGDSPAS) hergestellt; dabei wurden der Hexamerblock wegen seiner Neigung zur Bildung stabiler  $\beta$ -Faltblattstrukturen und das Decapeptid wegen seiner Zell-bindungseigenschaften ausgewählt. Ghandehari und Capello untersuchten Proteinpolymere aus im Tandemformat angeordneten Seiden- (GAGAGS) und Elastinblöcken (GVGV)<sup>[95]</sup> und ihre Selbstorganisation zu Hydrogele.<sup>[95–103]</sup> Die Seidenblöcke bilden Wasserstoff-verbrückte  $\beta$ -Faltblätter, die spontan kristallisieren, was ihnen thermische und chemische Stabilität verleiht. Der Einschluss von Elastinartigen Blöcken verringert die Kristallinität und erhöht die Flexibilität und Wasserlöslichkeit der Copolymere. Die Einführung eines ionisierbaren Restes (Glutaminsäure) in das Seide-Elastin-Proteinpolymer erhöht die pH- und Temperaturempfindlichkeit.<sup>[99]</sup> Zusätzlich zu den Umgebungsbedingungen (pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke) beeinflussen auch die Oberflächeneigenschaften die intermolekularen Wechselwirkungen und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Selbstorganisation.<sup>[104]</sup> Dank ihren Quell- und Transporteigenschaften sind Seide-Elastin-Hydrogele vielversprechend als Matrices für die kontrollierte Freisetzung von bioaktiven Materialien.<sup>[95,98,100–103]</sup>

Temperaturempfindliche Elastinhydrogele aus sich wiederholenden Pentapeptidmotiven  $(\text{VPVG})_x(\text{VPGXG})_y$  wurden hergestellt.<sup>[105,106]</sup> Ihr inverser Temperaturübergang kann durch die Änderung der Proteinzusammensetzung, des Ionisierungsgrades, des pH-Wertes, der Salzkonzentration oder der Phosphorylierung beeinflusst werden.<sup>[105]</sup> Bei niedrigen Temperaturen bleiben die Proteinketten wegen der umgebenden pentagonalen Wasserkäfige gestreckt. Wenn die Temperatur steigt (normalerweise über 25 °C), verlieren die pentagonalen Wasserkäfige ihre Struktur und verhalten sich wie ungeordnetes Wasser, was es wiederum den Proteinketten ermöglicht, sich zu kompakten Strukturen zu falten.

Die Beeinflussung der mechanischen Eigenschaften und des Phasenübergangs gelingt auch durch Kombination von mehreren Elastin-ähnlichen Strukturmotiven. Wright et al. kombinierten Elastin-mimetische Sequenzen mit verschiedenen mechanischen Eigenschaften zu Triblockcopolymeren. Nach der Phasentrennung aus wässriger Lösung bildeten die Copolymeren ein elastisches Hydrogel.<sup>[107]</sup> Die Weiterentwicklung dieser Blockcopolymeren unter Einschluss längerer Endblocksegmente führte zu Materialien, die deutlich größeren Belastungen standhalten können.<sup>[108]</sup>

Die Gruppe von Tirrell synthetisierte strukturell gut definierte Polypeptide mit vorhersagbarer Festkörperstruktur. Es wurde ein monodisperses Polymer mit 14 Wiederholungen der Undecapeptidsequenz  $(\text{AlaGly})_4\text{ProGluGly}$  hergestellt.<sup>[109]</sup> Anschließend wurden Polymere mit bis zu 54 Wiederholungseinheiten der Nonapeptidsequenz  $(\text{AlaGly})_3\text{ProGluGly}$  synthetisiert.<sup>[110]</sup> Diese Polymere wurden zur Synthese eines Lamellarproteins entwickelt, das sich in regel-

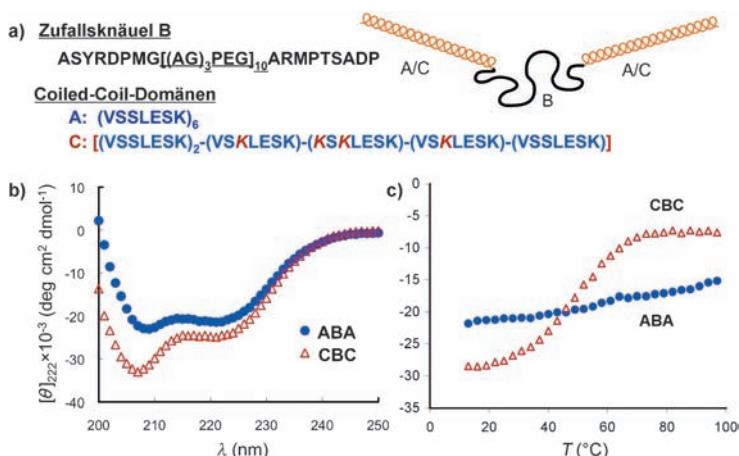
mäßigen Abständen zu- und wieder auffaltet und funktionelle Gruppen exponiert, die an den Falten positioniert sind. Der erste Entwurf benötigte eine Modifikation der Struktur: Die Entfernung der Prolinreste führte zu einer wohldefinierten Struktur mit kontrollierten Abständen zwischen den funktionellen Gruppen auf der Oberfläche (Wiederholungssequenz  $(\text{AlaGly})_x\text{GluGly}$ ; Abbildung 2).<sup>[111]</sup>



Seidenfibrinanalogen  $[(\text{AlaGly})_x\text{GlyGlu}]_n$   $x = 3–6; n = 14, 20, 28, 39$   
X, Y: funktionelle Gruppen

**Abbildung 2.** Das Design und die Synthese von strukturell gut definier-ten Polypeptiden. Die Festkörperoberfläche ist mit einem vorher fest-gelegten Muster von funktionellen Gruppen besetzt. Adaptiert aus Lit. [111].

Die Gruppe um Tirrell entwickelte einen Weg für die Selbstorganisation von gentechnisch konstruierten ABA-Triblockcopolymeren, die aus einem Zufallsknäuelblock (B), flankiert von zwei Coiled-Coil-bildenden Blöcken (A), be-stehen.<sup>[84]</sup> Die Selbstorganisation findet als Gleichgewicht zwischen der Oligomerisation der helicalen Enden und der Quellung des zentralen wasserlöslichen Zufallsknäuelseg-ments statt. Daraus folgt, dass eine Temperatur- und/oder pH-Empfindlichkeit durch Manipulation der Aminosäurese-quenz der Coiled-Coil-Domänen erreicht werden kann.<sup>[85,112]</sup> Kleine Änderungen in der Coiled-Coil-Blockstruktur haben einen großen Einfluss auf die Reizempfindlichkeit der selbstorganisierten Hydrogele. Zum Beispiel kann die Tem-peraturstabilität von Coiled-Coil-Proteinen auf vorhersagbare Weise durch den Austausch von Aminosäuren in der Coiled-Coil-Domäne beeinflusst werden (Abbildung 3).<sup>[85]</sup> Die intermolekulare Assoziation von A-Blöcken erzeugt physikalische Vernetzungen im Hydrogelnetzwerk. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die ABA-Ketten stark zur Bil-dung von intramolekularen Schleifen neigen, wodurch be-züglich der Elastizität ineffektive Ketten erzeugt werden.<sup>[113,114]</sup> Die kontinuierliche Neuordnung der A-Blöcke führt zu einer Oberflächenerosion des Netzwerks. Die Schleifenbildung kann leicht durch die Entwicklung von ABC-Blockcopolymeren vermieden werden, womit sich auch die Erosionsgeschwindigkeit kontrollieren lässt. In solchen ABC-Blockcopolymeren sind A und C Coiled-Coil-bildende Blöcke, die nicht miteinander assoziieren.<sup>[115]</sup>



**Abbildung 3.** Temperaturabhängigkeit der Sekundärstruktur von gentechnisch hergestellten ABA- und CBC-Proteintriblockcopolymeren; a) Struktur der Blöcke A, B und C. b) Das CD-Signal (Elliptizität) in Abhängigkeit von der Wellenlänge. c) Das CD-Signal bei 222 nm in Abhängigkeit von der Temperatur. Geringe Änderungen der Coiled-Coil-Blockstruktur (Struktur A wurde zu Struktur C geändert: in C ist in einer Position der vierten Heptade K durch V ersetzt worden, und drei zusätzliche K-Reste ersetzen S in den c-Positionen der dritten, vierten und fünften Heptade; der Zufallsknäuelblock B wurde nicht verändert) führten zu drastischen Änderungen der Stabilität. Adaptiert aus Lit. [85].

Heilshorn et al. stellten ein Zweikomponentenhydrogel her, das aus zwei rekombinanten Proteinpolymeren besteht, von denen jedes mehrere Wiederholungen der CC43-WW-Domäne<sup>[116]</sup> oder ihres prolinreichen PPXY-Liganden enthält. Die 1:1-Wechselwirkung der Liganden ist die Grundlage für die spontane Hydrogelbildung beim Mischen der beiden Polymere. Die Bioerkennung wird nicht durch andere Biomoleküle gestört, was eine Zellverkapselung ermöglicht.<sup>[117,118]</sup>

Polyaminosäure-Diblock- und -Triblockcopolymeren, die durch kontrollierte Ringöffnungspolymerisation von Leuchs' Anhydriden hergestellt werden, wurden umfangreich von Deming und Mitarbeitern untersucht.<sup>[119–122]</sup> Die Diblockcopolypeptidamphiphile – Polymere aus geladenen (hydrophilen) und hydrophoben Aminosäureblöcken – zeigten ein ungewöhnliches Verhalten.<sup>[123]</sup> Blockcopolypeptide mit Poly(L-lysin) oder Poly(L-glutaminsäure) als hydrophilem Block und Poly(L-leucin), Poly(L-valin) oder Poly(D,L-leucin) als hydrophobem Block bildeten in wässrigen Lösungen keine Micellen, selbstorganisierten sich aber bei sehr geringen Polymerkonzentrationen zu dreidimensionalen Hydrogelstrukturen. Zusätzlich behielten die Hydrogele ihre mechanische Stärke auch bei hohen Temperaturen und erholten (reorganisierten) sich nach Stress schnell.<sup>[119]</sup> Ein Vergleich der Gelierungseigenschaften von Diblock- und Triblockcopolymeren stützt die Hypothese, dass sich beide Systeme auf ähnliche Art und Weise anordnen.<sup>[121]</sup> Die Triblockhydrogele haben jedoch eine größere Stärke und bessere Salztoleranz als Hydrogele aus Diblockcopolymeren.<sup>[120,121]</sup> Die Form der Polymerketten spielt eine wichtige Rolle bei der Selbstorganisation zu Hydrogelen (Gelierung). Es konnte gezeigt werden, dass α-helicale Segmente bessere Gelbildner als β-Strände sind, die wiederum besser als Zufallsknäuel sind. Die Bildung von Hydrogelen aus Diblockcopolymeren bei niedrigen Konzen-

trationen ist ein interessantes Phänomen und könnte eines Tages die Methoden für die Entwicklung, Synthese und Selbstorganisation von neuartigen Biomaterialien und von Systemen zum Wirkstofftransport und zur Wirkstofffreisetzung ergänzen.<sup>[119,123]</sup> Ein Diblockcopolymer, das durch die Kombination des Polypeptids Poly(γ-benzyl-L-glutamat) (PBLG) mit einem Coiled-Coil-Peptid {G-(EIAALEK)<sub>3</sub>} hergestellt wurde, selbstorganisierte sich in Abhängigkeit von der Länge des PBLG-Blocks (36–250 Reste) zu Polymersomen oder plättchenförmigen Micellen.<sup>[124]</sup>

Gentechnisch hergestelltes Pro-Resilin, das über Tyr-Tyr-Bindungen photovernetzt ist, bildete ein sehr langlebiges und belastbares Hydrogel.<sup>[125]</sup> Künstliche elastomere Proteine, die die molekulare Struktur von Titin imitieren, wurden durch Kombination von GB1 und Resilin-Proteindomänen, gefolgt von einer photochemischen Vernetzung, synthetisiert. Dadurch entstand ein Biomaterial, das bei niedriger Belastung sehr elastisch, bei hoher Belastung aber dehnbar und widerstandsfähig war – eine Imitation der Eigenschaften eines Muskels.<sup>[126]</sup> Inspiriert durch die Struktur zahlreicher extrazellulärer Matrixproteine, die eine modulare elastomere Tandemstruktur aus einzeln gefalteten Domänen aufweisen, entwarfen Li und Mitarbeiter Protein-basierte reversible Hydrogele. Zuerst konstruierten die Forscher ein Hydrogel basierend auf einem ABA-Triblockprotein, in dem acht GB1-Domänen (G<sub>8</sub>) in einer Tandemanordnung als zentraler Block angeordnet sind, der an beiden Seiten von einem Coiled-Coil-bildenden Peptidblock flankiert wird.<sup>[127]</sup> Um gewisse Einschränkungen des ersten Entwurfs – die hohe Erosionsgeschwindigkeit wegen Bildung intramolekularer Schleifen sowie die hohe Viskosität der Proteinlösung – zu überwinden, verwendeten sie beim nächsten Versuch zwei komplementäre Peptide (CCE und CCK), die nicht miteinander assoziieren, sondern antiparallele Coiled-Coil-Heterodimere bilden.<sup>[128]</sup> Zur Konstruktion von modularen Tandemproteinhydrogelen wurden gentechnisch zwei di- und trifunktionale modulare Tandemproteine mit den CCE- und CCK-Sequenzen hergestellt, d.h. CCK-G<sub>4</sub>-CCK und CCE-G<sub>5</sub>-CCE-G<sub>5</sub>-CCE. Nach dem Mischen kann die Lösung der beiden Proteine temperaturabhängigen, reversiblen Sol-Gel-Übergängen unterzogen werden.<sup>[129]</sup>

Der Einbau von Bioerkennungseinheiten in die Struktur von gentechnisch konstruierten Polymeren wurde ebenfalls realisiert. Integrin bindende Liganden wurden in gentechnisch konstruierte Biomaterialien (z.B. seidenartige,<sup>[130]</sup> elastinartige<sup>[131–133]</sup> und ABA-Triblockcopolymeren) eingebaut, in denen eine Zufallssequenz (mit drei Kopien der RGD-Sequenz) von Coiled-Coil-bildenden Domänen flankiert wird.<sup>[134]</sup> Seiden-Elastin-Proteinpolymere wurden so modifiziert, dass sie antimikrobielle, Textilien adressierende- oder UV-Schutz-Peptidblöcke enthalten, wodurch mögliche Anwendungen in der industriellen Biotechnologie, der persönlichen Gesundheitspflege oder der Bioabwehr demonstriert wurden.<sup>[135]</sup> Ein anderes Beispiel für die Einarbeitung von biologischen Funktionen in gentechnisch produzierte Bio-

materialien ist die Einfügung von drei verschiedenen antimikrobiellen Peptiden in einen Sicherungsseidenfaden der Spinne. Die Spinnenseidendomänen behalten die Selbstorganisations-Eigenschaften, und die Bildung von  $\beta$ -Faltblättern sorgt für die Entstehung dreidimensionaler Biomaterialien.<sup>[136]</sup>

### 3.2. Hybridsysteme

Als hybride Biomaterialien werden üblicherweise Systeme bezeichnet, die aus Komponenten von mindestens zwei verschiedenen Klassen von Molekülen bestehen, z.B. aus synthetischen Polymeren und biologischen Makromolekülen, die entweder kovalent oder nichtkovalent miteinander verbunden sind.<sup>[10–15]</sup> Die Konjugation von Peptiddomänen mit synthetischen Polymeren kann zu neuartigen Materialien führen, deren Eigenschaften besser sind als die der Einzelkomponenten. Im Unterschied zu synthetischen Polymeren haben Proteine und Proteinmodule wohldefinierte und homogene Strukturen, einheitliche mechanische Eigenschaften und kooperative Faltungs-/Entfaltungsumgänge. Die Peptiddomäne kann die Strukturbildung im Nanometermaßstab zu einem gewissen Maß steuern; der synthetische Teil kann zur Biokompatibilität des Hybridmaterials beitragen. Die synergistische Kombination zweier Strukturarten kann neue Materialien ergeben, die ein noch nie dagewesenes Maß an Strukturorganisation und neuartigen Eigenschaften aufweisen.<sup>[13, 137]</sup>

Peptid- und/oder Proteinsegmente wurden verwendet, um bei Hybridhydrogelstrukturen Abbaubarkeit,<sup>[138–140]</sup> temperaturinduzierte Phasenübergänge<sup>[60, 83]</sup> und Empfindlichkeit gegen biologisch aktive Moleküle<sup>[141–143]</sup> zu erzielen. Die Verknüpfung von synthetischen Segmenten und Protein-/Peptidsegmenten zu selbstorganisierten Hybridmaterialien eröffnet eine Möglichkeit, die Eigenschaften der Einzelbestandteile zu kombinieren. Inspiration für solche Strukturen liefern im Allgemeinen selbstorganisierte Systeme in der Natur.

#### 3.2.1. Hybride aus synthetischen Polymeren und $\alpha$ -helicalen Peptiden

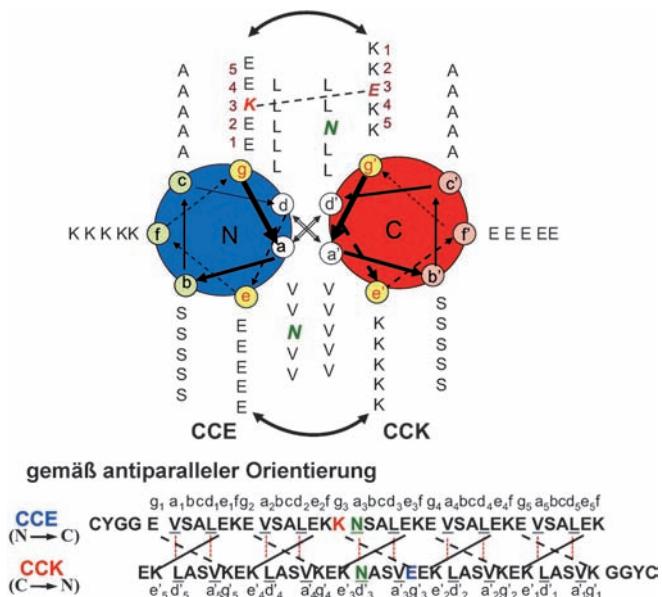
Der erste Entwurf eines selbstorganisierten Hybridhydrogels kombinierte die Bioerkennung eines  $\alpha$ -helicalen Motivs, das Homodimere bildet, mit einem HPMA-Copolymer.<sup>[63]</sup> Die wichtige Schlussfolgerung aus dieser Studie war die Bestätigung der Hypothese, dass die Eigenschaften eines Coiled-Coil-Proteinmotivs auf das Verhalten des gesamten Hybridhydrogels übertragen werden können. Die Temperaturen für den Schmelzpunkt des Peptidmotivs (ein Segment der Stielregion des *Drosophila*-Motorproteins Kinesin) und für den Phasenübergang (Kollaps) der Hybridhydrogelstruktur waren sehr ähnlich. Es wurde ein temperaturinduzierter Hydrogelkollaps beobachtet, der dem Strukturübergang der Coiled-Coil-Domänen von einer gestreckten Helix zum ungefalteten Zustand entspricht. Dies ist ein neuer Mechanismus der Reaktion auf eine Temperaturänderung, der über einen weiten Temperaturbereich eingestellt werden

kann, indem Gele aus Coiled-Coils mit verschiedenen Schmelztemperaturen aneinandergefügt werden. In dieser Studie wurden die gentechnisch konstruierten Proteinmotive über Metallkomplexbildung an das hydrophile HPMA-Copolymerrückgrat angebunden (His-Tag am Peptid mit Ni<sup>2+</sup> an den Seitenketten des Polymers). Die Struktur der Coiled-Coil-Vernetzungen war komplex: Die Peptidsequenzen bildeten Homodimere, und somit konnte sich eine bezüglich der elastischen Eigenschaften wirkungslose „Vernetzung“ durch Dimerisierung von Motiven auf demselben Makromolekül bilden; infolgedessen waren Tetramere und höhere Verbindungen für die Hydrogelbildung nötig. Damit war der Kollaps der dreidimensionalen Struktur irreversibel, was neue Designs erforderlich machte.

Triblock-ABA-Copolymere, deren mittlerer Block aus PEG besteht und deren A-Blöcke aus einem Peptid der Coiled-Coil-Region von Fibrin aufgebaut sind, ordnen sich zu viskoelastischen Hydrogelbiomaterialien an. Wie auch andere Materialien mit ähnlichem Aufbau lösen sich die Hydrogele nach ungefähr acht Tagen in einer Pufferlösung auf, was vermutlich an der Bildung von intramolekularen Schleifen liegt.<sup>[144]</sup> Sahin und Kiick synthetisierten hochmolekulare Multiblockpolymere aus alternierenden PEG- und Coiled-Coil-Peptidsegmenten durch Konjugation von zweifach mit  $\alpha, \omega$ -Disuccinimidylsuccinat funktionalisiertem PEG (3.4 kDa) sowie Arginin- und Glutaminsäure-reichen Coiled-Coil-bildenden Peptiden. Die Produkte behielten ihre Fähigkeit zur Erzeugung heterooligomerer Micellstrukturen.<sup>[145]</sup> Collagenpeptidhydrogele für dreidimensionales Zellwachstum wurden durch Vernetzung von Maleimid-funktionalisierten, achtarmigen PEG-Sternpolymeren mit Cystein-terminalen, Tripelhelix-bildenden Collagenpeptiden hergestellt.<sup>[146]</sup>

Neuere Entwürfe von Hybridhydrogelen basieren auf Ppropfcopolymeren, die ein Paar von Sequenzen enthalten, das antiparallele Coiled-Coil-Heterodimere bildet.<sup>[128, 147]</sup> Es wurde vorgeschlagen, dass die antiparallele Orientierung der Heterodimere zur Homogenität des selbstorganisierten Hybridhydrogels durch eine einzigartige Zwischenketten-Dimerisierung sowie verringerte sterisch hindernde Wirkung des (synthetischen) Polymerrückgrats auf die vollständig überlappende Ausrichtung des Heterodimers beiträgt. Mit anderen Worten: Die Verteilung von Vernetzungen in diesen selbstorganisierten Hydrogele ist gleichmäßiger als in solchen, die aus Ppropfcopolymeren mit homodimerisierenden Coiled-Coil-Einheiten bestehen oder die mit herkömmlichen Methoden hergestellt wurden. Darüber hinaus hat die vorgeschlagene Anordnung der selbstorganisierten Hybridhydrogele das Potenzial zur Weiterentwicklung zu einem Zweikomponenten-Wirkstofftransportsystem, das *in situ* ein Gel bildet.

Für den Aufbau eines Peptidpaars, das antiparallele Heterodimere bildet, wurden zwei gegensätzlich geladene Pentaheptadsequenzen (CCE und CCK; Abbildung 4) entwickelt.<sup>[128]</sup> Die drei wichtigsten stabilisierenden Wechselwirkungen wurden berücksichtigt: die hydrophoben Wechselwirkungen im Kern, die elektrostatische Anziehung über die Kontaktfläche sowie die Neigung zur Helixbildung. V und L wurden wegen ihrer hohen Hydrophobie, ihrer Fähigkeit,



**Abbildung 4.** Helixraddarstellung der zweisträngigen, antiparallelen  $\alpha$ -helicalen Coiled-Coils, die durch die Dimerisierung von CCE und CCK gebildet werden. Blick entlang der superhelicalen Achse ausgehend vom N-Terminus von CCE und vom C-Terminus von CCK. CC: Coiled-Coil-Peptide; E, K: Peptide, in denen die meisten der e- und g-Positionen durch Glutaminsäure bzw. Lysin besetzt sind. Die Sequenzen sind mit dem Einbuchstabencode für Aminosäuren bezeichnet. Die Positionen a und d der Heptadenwiederholung sind unterstrichen und bilden den hydrophoben Kern des Coiled-Coil-Motivs. Adaptiert aus Lit. [128].

sich in den Kern zu packen, und ihrer Neigung, die Bildung von dimeren Coiled-Coils in zahlreichen Leucin-Reißverschluss-Mutanten zu fördern, für die a- und d-Positionen ausgewählt. Die geladenen Reste (E und K) wurden an die Positionen e und g gesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die potenziell anziehenden oder abstoßenden elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen diesen Resten die Komplementärstrangspezifität und Orientierungspräferenz beeinflussen. Die e- und g-Positionen besetzt E im einen Strang (CCE) und K im anderen (CCK). Diese Anordnung minimiert die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Homodimeren, da diese durch elektrostatische Abstoßung destabilisiert werden. Außerdem wurde ein einzelner Rest an der g-Position der vierten Heptade in jedem Strang durch einen entgegengesetzt geladenen Rest ersetzt. Die Orientierungspräferenz wurde damit verbessert, da alle potenziell anziehenden Wechselwirkungen nur für die antiparallele Anordnung erwartet werden.<sup>[64, 148, 149]</sup> Die Positionen b und c wurden mit S- bzw. A-Resten gefüllt. In diesen Positionen wurden ungeladene Reste verwendet, um elektrostatische Wechselwirkungen mit benachbarten Resten in den Positionen e und g zu vermeiden. S wurde gewählt, um die Löslichkeit zu verbessern; A hat eine starke Neigung zur Helixbildung und sollte die Helixbildung fördern. K wurde für die Position f im CCE- und E für die Position f im CCK-Knäuel gewählt, um die Gesamtladung jedes Peptids auszugleichen und die Löslichkeit zu erhöhen. Verborgene polare Wechselwirkungen spielen eine Schlüsselrolle bei der strukturellen Ausprägung von Coiled-Coils. Tatsächlich war eine einzelne derartige polare Wechselwir-

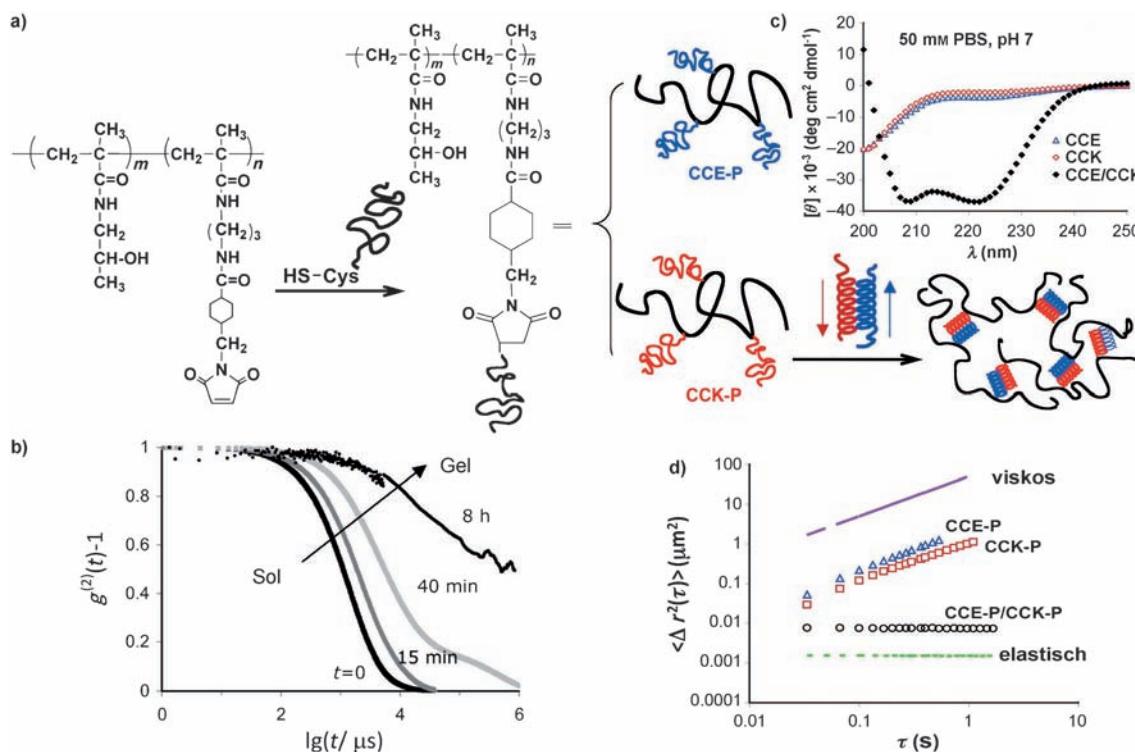
kung an der hydrophoben Grenzfläche der Helices eines Coiled-Coil-Motivs ausreichend, um eine antiparallele Anordnung zu erzwingen.<sup>[150]</sup> Darum wurden an die a- und d'-Positionen der dritten Heptade des CCE- bzw. CCK-Knäuels N-Reste gesetzt. Schließlich wurden die Coiled-Coil-Sequenzen am N-Terminus mit dem CYGG-Tetrapeptid-Spacer flankiert, um die sterisch hindernde Wirkung des Polymerrückgrats auf die Bildung der antiparallelen Heterodimere zu verringern und einen Anbindungspunkt zu installieren.

Selbstorganisation von HPMA-Copolymeren mit CCE- und CCK-Pfropfen zu Hydrogelen: Es konnte keine homodimele Assoziation der Pfropfcopolymere CCK-P oder CCE-P (P ist das HPMA-Copolymerrückgrat) beobachtet werden. Einzelne Pfropfcopolymere liegen überwiegend in der Zufallsknäuelkonformation vor. Allerdings bilden äquimolare Mischungen von CCK-P und CCE-P spontan Coiled-Coils und selbstorganisieren sich bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen (0.1 Gew.-%) zu Hydrogelen (Abbildung 5).<sup>[128]</sup> Untersuchungen des zeitlichen Verlaufs der Selbstorganisation mithilfe der dynamischen Lichtstreuung (dynamic light scattering, DLS)<sup>[147]</sup> zeigten, dass Konzentration und Zeit den Selbstorganisationsprozess von HPMA-Pfropfcopolymeren beeinflussen. Die umgehende Verschiebung der Zerfallszeitverteilung der äquimolaren Mischung von CCE-P und CCK-P hin zu längeren Zerfallszeiten zeigt eine sofortige Assoziation der Komplementärpeptide an. Die normierten Intensitätsautokorrelationsfunktionen verbreitern sich mit der Zeit und verschieben sich zu längeren Zerfallszeiten, was eine Verlangsamung der Lösungsdynamik bei Annäherung an den Gelierpunkt kennzeichnet.<sup>[147]</sup> CCE und CCK vermitteln auch die Selbstorganisation von gentechnisch hergestellten Tandemproteinen<sup>[129]</sup> (siehe Abschnitt 3.1).

### 3.2.2. Hybride aus synthetischen Polymeren und $\beta$ -Faltblattpeptiden

Die Selbstorganisation von hybriden Block- und Pfropfcopolymeren, die aus einem synthetischen Polymerrückgrat und  $\beta$ -Faltblattmotiven aufgebaut sind, wurde ebenfalls untersucht.<sup>[67, 87, 151, 152]</sup> Die I28-Immunglobulin(Ig)-Domäne von menschlichem Herzitin wurde zur Vernetzung von Acrylamidcopolymeren zu temperaturempfindlichen Hydrogelen verwendet. Die Ig-Domäne liegt als Schichtanordnung von zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern vor, die sich bei einem Mittelwert von 58 °C entfalten. Acrylamidhydrogele, die mit der Ig-Domäne vernetzt sind, zeigen oberhalb der Schmelztemperatur der Querverbindungen eine positive Temperaturempfindlichkeit (Anstieg der Quellung; Abbildung 6).<sup>[87]</sup> Es wurde ein Modell zur Beschreibung der Quellungsänderungen in Hydrogelen vorgestellt, die durch die Entfaltung der Querverbindungen zustande kommen.<sup>[153]</sup>

Zahlreiche Entwürfe von Hybridblockcopolymeren konzentrierten sich auf kürzere  $\beta$ -Faltblattpeptide.<sup>[67, 154–159]</sup> Das erste Beispiel eines Blockcopolymers aus Polyethylenglycol (PEG) und einem  $\beta$ -Faltblattpeptid wurde von Lynn und Mitarbeitern beschrieben. Die Anbindung von PEG (Molekulargewicht 3000) an den C-Terminus der Reste 10–35 von A $\beta$  (A $\beta$ (10–35)) des Amyloidpeptids macht die Bildung von Fibrillen vollständig reversibel, anders als im Fall natürlicher



**Abbildung 5.** a) Selbstorganisation der HPMA-Pfropfcopolymeren CCE-P und CCK-P, die entgegengesetzt geladene Peptideinheiten enthalten (P ist das HPMA-Copolymerrückgrat). Wässrige Lösungen von CCE-P oder CCK-P bilden keine Hydrogels. Dagegen werden gelartige Materialien aus äquimolaren Mischungen von CCE-P/CCK-P bei niedrigen Konzentrationen erhalten. b) Normierte Intensitätsautokorrelationsfunktionen,  $g^{(2)}(t)^{-1}$ , für Lösungen äquimolaler Mischungen von CCE-P und CCK-P (Gesamtkonzentration  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) bei verschiedenen Inkubationszeiten. c) CD-Spektren von CCE, CCK und der äquimolaren Mischung CCE/CCK. PBS = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung. d) Mikrorheologie von 1-proz. (w/v) Lösungen von CCE-P, CCK-P und der äquimolaren Mischung von CCE-P/CCK-P. Mittlere quadratische Teilchenverschiebung in Abhängigkeit von der Zeit. Adaptiert aus Lit. [128, 147].

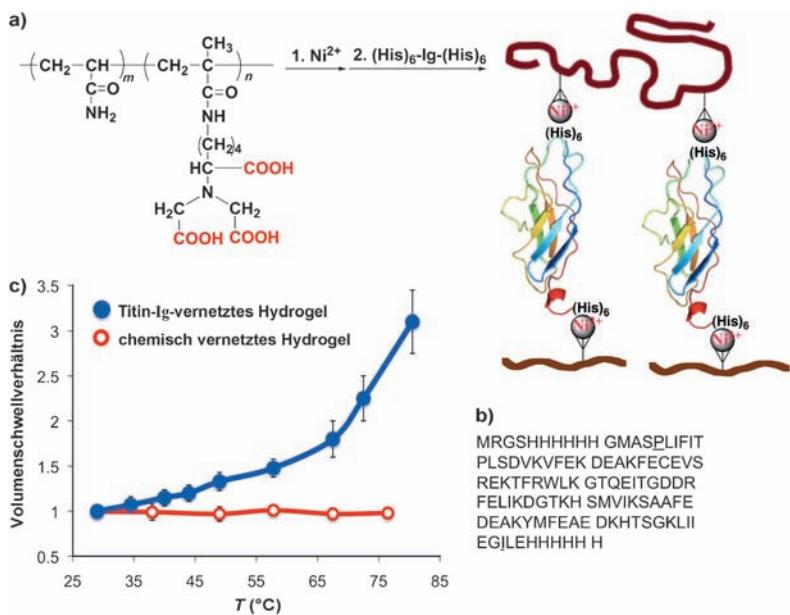
Peptide. Das Hybridmaterial nimmt eine Struktur an, in der bis zu sechs (erweiterte) lamellare, parallele  $\beta$ -Faltblätter vom PEG-Block umgeben sind. Anscheinend verhindert PEG die laterale Assoziation der Fibrillen und unterbindet somit den irreversiblen Schritt der Fibrillogenese.<sup>[156–158]</sup>

Börner et al. demonstrierten die peptidgesteuerte Anordnung von PEG-Peptidkonjugaten zu Bandstrukturen.<sup>[159]</sup> Klok et al. stellten Blockcopolymere aus amphiphilen  $\beta$ -Strangpeptidsequenzen her, die von ein oder zwei PEG-Ketten flankiert werden. Die PEG-Konjugation stabilisierte die  $\beta$ -Strangsekundärstruktur gegenüber dem unveränderten Peptid und verringerte die Empfindlichkeit der Peptidsekundärstruktur gegen pH-Änderungen.<sup>[154, 155]</sup> Pechar et al. kuppelten mit 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) geschütztes PEG (Molekulargewicht 500) an  $(\text{VPGVG})_4$  und  $(\text{VPAVG})_4$  und untersuchten die resultierenden Eigenschaften. Während die Diblockcopolymere PEG-(VPGVG)<sub>4</sub> und PEG-(VPAVG)<sub>4</sub> keine makroskopischen temperaturinduzierten Phasenübergänge durchliefen, verursachte die Gegenwart der hydrophoben Fmoc-Gruppe am Ende des Peptids oder der PEG-Kette die reversible, temperaturreponsive Selbstorganisation der Moleküle.<sup>[160]</sup>

Ein Blockcopolymer aus poly(HPMA) (2 und 5 kDa) und ein  $\beta$ -Faltblattpeptid (QQRFQWQFEQQ-NH<sub>2</sub>) wurden durch eine Thiol-Maleimid-Kupplung hergestellt. Das semi-telechyle poly(HPMA)-SH wurde durch die reversible Ad-

ditions-Fragmentierungs-Kettenübertragungs(RAFT)-Polymerisation von HPMA mit nachfolgender Aminolyse synthetisiert. Das Diblockcopolymer wurde durch eine polymeranaloge Reaktion am N-terminalen Maleimid-modifizierten  $\beta$ -Faltblattpeptid erhalten. Transmissionselektronenmikroskopie und Atomkraftmikroskopie zeigten, dass sich die Peptid- und Blockcopolymere zu Fibrillen selbstorganisieren konnten. Interessanterweise unterschied sich der pH-Wert der  $\beta$ -Faltblattbildung für das freie Peptid von dem des Polymerkonjugats.<sup>[67]</sup>

HPMA-Hybridpfropfcopolymeren wurden durch Anbindung eines N-terminal CGG-modifizierten  $\beta$ -Faltblattpeptids (CGGTTRFTWTFTTT) an eine Maleimid-funktionalisierte poly(HPMA)-Vorstufe erhalten. CD-Spektren zeigten, dass die starke Tendenz des Peptids zur Selbstorganisation zu  $\beta$ -Faltblättern in den Copolymeren erhalten blieb. Zusätzlich verringerte sich wegen der Abschirmung durch poly(HPMA) die Empfindlichkeit des  $\beta$ -Faltblatts gegen pH- und Temperaturänderungen. Atomkraftmikroskopie und Kleinwinkelröntgenstreuung zufolge hat das Copolymer die Fähigkeit, sich zu Fibrillen anzurichten.<sup>[151]</sup> Transmissionselektronenmikroskopie zeigte, dass poly(HPMA)-g-CGGTTRFTWTFTTT-Fibrillen Matrices mit minimaler lateraler Aggregation bildeten, was sie deutlich von den stark lateral aggregierten Peptidfibrillen unterscheidet.<sup>[151]</sup> Diese Beobachtung stimmt mit den FTIR-spektroskopischen Befunden überein,



**Abbildung 6.** Polyacrylamidhybridhydrogele, die durch Selbstorganisation von Acrylamidcopolymer (AAm) und dem ( $\beta$ -Faltblatt-)I28-Ig-Modul von humanem Herztitin (einem elastischen Muskelprotein) hergestellt wurden. Das Hydrogel wurde durch die Metallkomplexbildung der angebundenen Metallchelat-bildenden Liganden NTA-Ni<sup>2+</sup> auf dem Polymer mit den endständigen His-Tags des Proteins gebildet. a) Chemische Struktur des Metallchelat-bildenden Copolymers Poly(AAm-co-2-methacroylamidobutyl-nitrolotriessigsäure) (MABNTA). Das Polymer wurde durch Copolymerisation von AAm mit dem Comonomer des Metallchelatbildners MABNTA in einem Tris-Puffer (pH 8.9) in Stickstoffatmosphäre unter Verwendung von Ammoniumpersulfat und  $N,N,N',N'$ -Tetramethylendiamin als Redoxinitiator hergestellt. b) Die Proteinsequenz des rekombinanten Titin-I28-Vernetzers (His)<sub>6</sub>-I28-(His)<sub>6</sub>. Das Protein trägt His-Tags an beiden Enden. Die unterstrichenen Aminosäurereste kennzeichnen den Anfang und das Ende des menschlichen Herztitin-I28-Segments. Das rekombinante Proteinmodul enthält 111 Aminosäuren mit einer erwarteten molekularen Masse von 12.2 kDa. c) Temperaturantwort des Hydrogels in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (pH 7.2). Das Volumenquellverhältnis ist das Verhältnis des Hydrogelvolumens bei einer erhöhten Temperatur zum Volumen bei 29 °C. ●: vernetztes (His)<sub>6</sub>-I28-(His)<sub>6</sub>-Titinhydrogel; ○: Methylenbis(acrylamid)-vernetztes Hydrogel. Adaptiert aus Lit. [87].

die nahe legen, dass poly(HPMA) durch die antiparallele Anordnung der  $\beta$ -Strangpeptide die Verdrillung der Fibrillen behindert, die im Copolymer gebildet werden. Zum Schluss wurde untersucht, ob ein selbstorganisiertes Hybridhydrogel aus HPMA-Copolymeren und den komplementären  $\beta$ -Faltblatteinheiten (TTRFTWTFITTT-NH<sub>2</sub> und TTEFTWTFETT-NH<sub>2</sub>) die Fähigkeit hat, als Gerüst für die Konstruktion von Knochengewebe zu fungieren.<sup>[152]</sup> Das Hydrogel weist eine anisotrope Porosität auf und bietet somit außer seiner Funktion als Trägermaterial für Präosteoblastzellen auch eine Oberfläche, deren Beschaffenheit sich für die Epitaxie, d.h. die templatunterstützte Mineralisation von Hydroxyapatit eignet (Abbildung 7). Das Überleben und die Vermehrung der Zellen über einen längeren Zeitraum belegen, dass dieses  $\beta$ -Faltblatt-Hybridhydrogel nicht zytotoxisch ist und deshalb als Knochengerüst verwendet werden könnte. Solche neuartigen Nanostrukturen und Hydrogele könnten für eine Reihe von biomedizinischen Anwendungen genutzt werden – von Depots für den Wirkstofftransport über Gerüste für die Zellabgabe bis zur Gewebezüchtung.

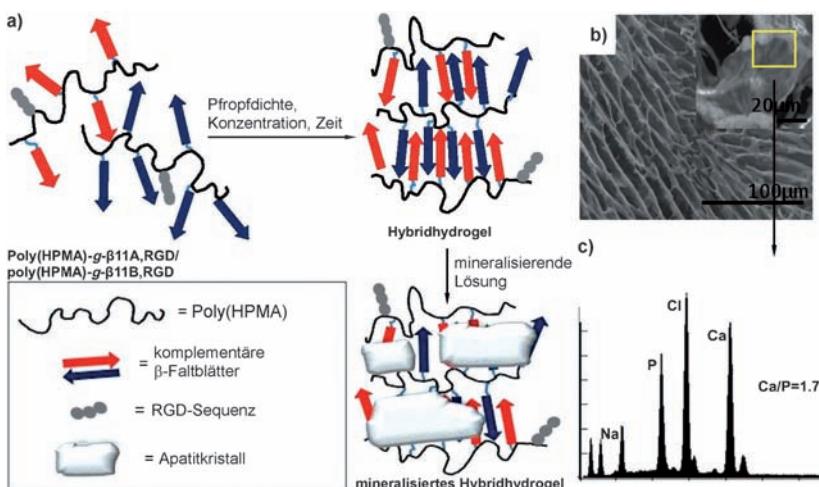
### **3.2.3. Hybride aus synthetischen Polymeren und Proteinmutanten**

Hydrogele aus Proteinen, die infolge eines Reizes eine umfangreiche Konformationsänderung durchlaufen, können möglicherweise als Sensoren, in der Mikrofluidik oder als miniaturisierte Wirkstofftransportsysteme verwendet werden. Durch Copolymerisation von Acrylamid, *N,N'*-Methylenbis(acrylamid), einem Calmodulin-Makromonomer (das eine Allylgruppe enthält) und einem polymerisierbaren Phenothiazinderivat synthetisierten Daunert und Mitarbeiter<sup>[161]</sup> Hydrogele mit kovalent gebundenem Calmodulin, einem Calcium bindenden Protein. Calmodulin erfährt ausgehend vom natürlichen Zustand zwei Konformationsänderungen: in eine Hantelkonformation, wenn es an Ca<sup>2+</sup> gebunden ist, und in eine eingeschränktere Konformation, wenn es an Phenothiazin gebunden ist. Das Hydrogel reagierte sowohl auf Ca<sup>2+</sup> als auch auf Phenothiazin. Sein Einbau in ein einfaches Mikrofluidiksystem zeigte das Potenzial des Hydrogels, den Durchfluss zu steuern (Abbildung 8).<sup>[161]</sup> Mrksich und Mitarbeiter modifizierten Calmodulin gentechnisch derart, dass es zwei Cysteinreste enthält.<sup>[162]</sup> Dieser Mutant wurde als Vernetzer (zusätzlich zu Dithiothreitol, DTT) für vierarmiges PEG mit Acrylatgruppen verwendet. Die resultierenden Hydrogele erfuhren durch die Bindung des Calmodulinliganden Trifluoperazine eine Änderung des Quellgleichgewichts.<sup>[162]</sup> Murphy et al. veränderten eine Calmodulin-Mutante (T34C, T110C) mit Poly(ethylenglycol)diacrylat, um ein Protein mit zwei polymerisierbaren Gruppen zu erhalten.<sup>[163]</sup> Dieses wurde im Anschluss zu einem reizempfindlichen Hydrogel photovernetzt, dessen Quellung erazin beeinflusst werden kann. Glucoseemp-

mit Trifluoperazin beeinflusst werden kann. Glucoseempfindliche Hydrogele wurden durch Einbau von Mutanten des Glucose/Galactose bindenden Proteins (GBP) in ein Acrylamidhydrogel erhalten. GBP besteht aus zwei Domänen, die durch eine Drehachse miteinander verbunden sind. Bei Bindung von Glucose rotieren die beiden Domänen gegeneinander und bilden einen geschlossenen Zustand. Das GBP-Hydrogel zeigt eine dynamische Reaktion auf Glucose.<sup>[164]</sup>

Hydrogele, die in der Lage sind, Konformationsänderungen, die durch Enzym-Substrat-Erkennung ausgelöst werden, in makroskopische Bewegung zu übertragen, wurden ebenfalls hergestellt.<sup>[165]</sup> Ihr Design nutzt die Substrat-Enzym-Wechselwirkungen der Adenylatkinase mit Adenosin-5'-triphosphat (ATP), um eine Konformationsänderung zu bewirken, die mit einer Verringerung des Hydrogelvolumens einhergeht. Die *Escherichia coli*-Adenylatkinase (AK<sub>E</sub>; EC 2.7.4.3) ist ein drei Domänen umfassendes Bakterienenzym (Transferase) aus 214 Resten, das die Phosphoryltransferreaktion  $Mg^{2+} \cdot ATP + AMP \rightleftharpoons Mg^{2+} \cdot ADP + ADP$  katalysiert. Durch die Bindung eines Substrats (oder Inhibitors)

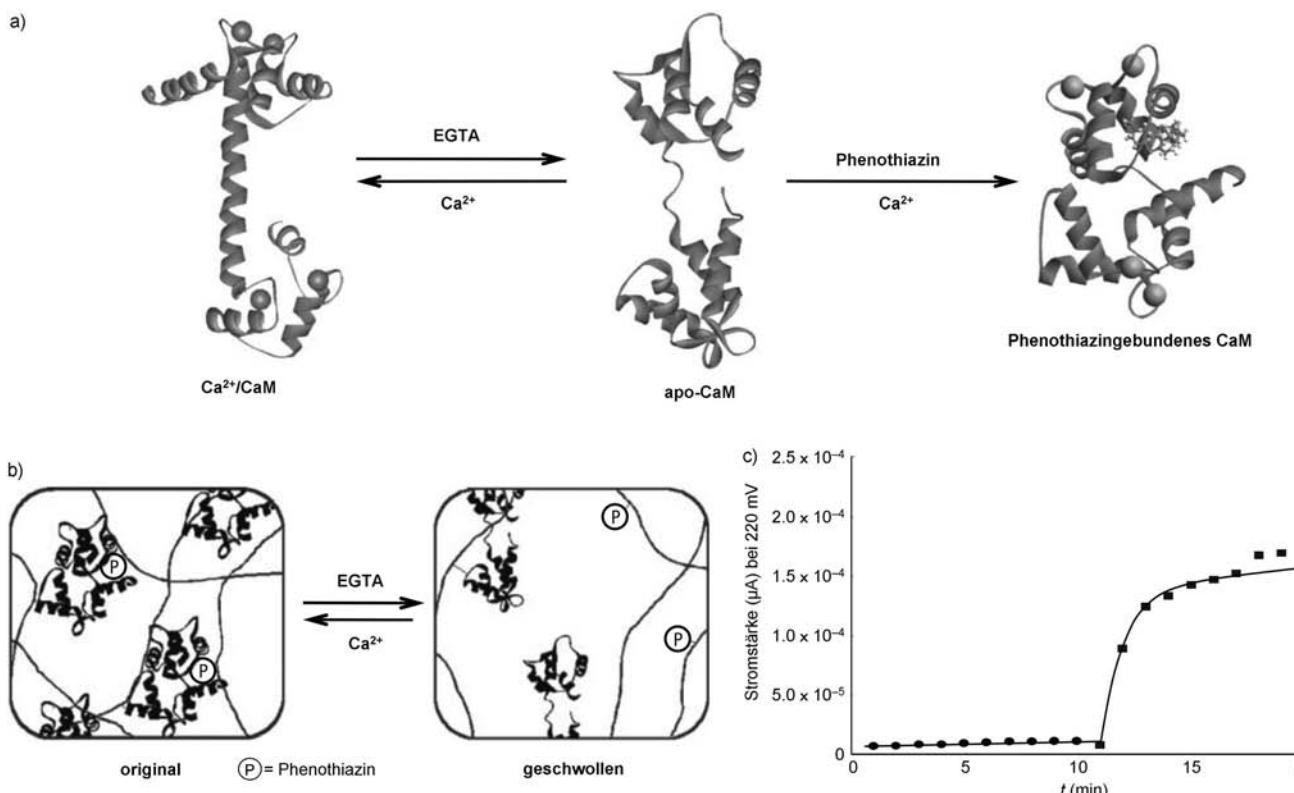
## Hydrogele



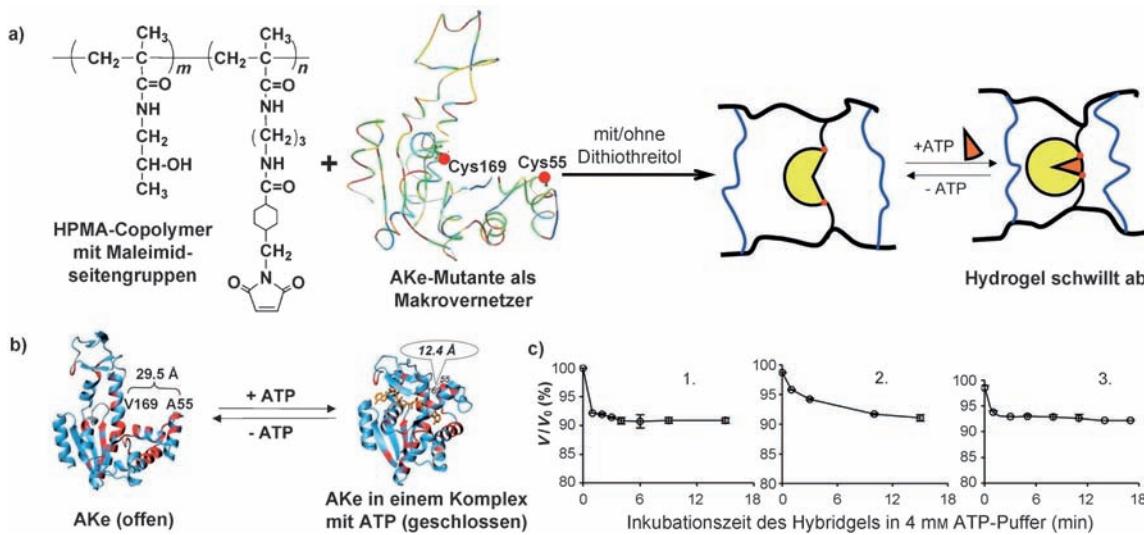
**Abbildung 7.** a) Selbstorganisation von HPMA-Pfropfcopolymeren, die komplementäre β-Faltblatt-bildende Gruppen enthalten. b) Rasterelektronenmikroskopisches (SEM)-Mikrobild von lyophilisiertem (Poly(HPMA)-g-β11A,RGD/ Poly(HPMA)-g-β11B,RGD)-Hydrogel vor der Mineralisation; Einschub: SEM-Bilder von Hydroxyapatit(HA)-Kristallen, die auf der Oberfläche von (Poly(HPMA)-g-β11A,RGD/ Poly(HPMA)-g-β11B,RGD) abgeschieden und dann simulierter Körperflüssigkeit ausgesetzt wurden. Der Pfeil zeigt auf (c), die EDS-Analyse (EDS = energiedisperse Spektroskopie) gehört zum im Einschub von (b) gezeigten Mineral. c) EDS-Spektren von Mineralien am Rand der Poren. Adaptiert aus Lit. [152].

durchläuft AKe eine ausgeprägte Konformationsänderung. Die sperrige Deckeldomäne schließt sich über dem aktiven

Zentrum und schützt es vor Wasser, wodurch die Substrathydrolyse vermieden wird, und vereinfacht die Übertragung der Phosphatgruppe (Abbildung 9). AKe wurde über eine Thiol-Maleimid-Reaktion in definierte Hydrogelstrukturen eingebaut. Synthetische HPMA-Copolymere mit Maleimidgruppen wurden als Rückgrat gewählt. Das Wildtypenzym hat einen Cysteinrest in Position 77, dessen Mutation ohne Aktivitätsverlust möglich ist. Um zwei Anbindungspunkte zu erzeugen, wurde eine Dreifachmutante der Adenylatkinase [AKtm (C77S, A55C, V169C)] hergestellt und aufgereinigt. Der Abstand zwischen den C<sup>α</sup>-Atomen der Reste 55 und 169 verringert sich von 29.5 Å im Apoenzym auf 12.4 Å im Enzym-Substrat-Komplex. Zusätzlich sind die SH-Gruppen der Positionen 55 und 169 leicht zugänglich.<sup>[166]</sup> Die enzymatische Aktivität von AKtm entspricht der von AKe.<sup>[165]</sup> Die hybriden HPMA-Hydrogele wurden in einer Form durch Vernetzung des HPMA-Copolymers entweder nur mit AKtm oder mit AKtm und dem zusätzlichen Vernetzer DTT synthetisiert. Durch Vernetzung mit DTT allein wurde ein Kontrollgel hergestellt. Wie bereits



**Abbildung 8.** Ein reizempfindliches Hydrogel aus Acrylamid, Methylenbis(acrylamid) und polymerisierbaren Derivaten von Phenothiazin und Calmodulin (CaM). a) CaM kann drei Konformationen annehmen: 1. die Hantel (Ca<sup>2+</sup>-gebunden); 2. die natürliche Konformation (in Abwesenheit von Calcium); 3. die Phenothiazin- und Calcium-gebundene Konformation. b) Die Hydrogelstruktur bei verschiedenen Bedingungen; EGTA [Ethyleneglycolbis(β-aminoethylether)-N,N',N'-tetraessigsäure]] entfernt Calcium von seinen Bindungsstellen. c) Die Effizienz des Hydrogels als Ventil in einem Mikrofluidiksystem; ● Ventil geschlossen, keine Freisetzung; ■ Ventil offen, Ca<sup>2+</sup> vorhanden. Adaptiert aus Lit. [161].



**Abbildung 9.** Hydrogele, die eine dreifache Mutante der Adenylatkinase AKtm (C77S, A55C, V169C) als Vernetzer enthalten, können eine Konformationsänderung des Enzyms, die durch die Bindung eines Substrats hervorgerufen wird, in eine mechanische Bewegung überführen. a) Das Hydrogel entsteht durch die Vernetzung eines HPMA-Copolymers, dessen Seitenketten mit Maleimid funktionalisiert sind, über Thioetherbindungen, die durch Reaktion von Cys169 und Cys55 mit den Maleimidinen gebildet werden. b) Bänderdarstellung der Adenylatkinasestruktur (AK) in zwei Konformationszuständen: offen und geschlossen. c) Drei Zyklen des Abschwellens eines Hydrogels, das mit 100% AKtm vernetzt ist. Adaptiert aus Lit. [165].

erwartet, fand ein Übergang von einer „offenen“ zu einer „geschlossenen“ Konformation statt, wenn die Hydrogele ATP (Substrat) ausgesetzt wurden. Dies führte zu einem Kollaps des Hydrogelvolumens um ca. 5–17 %, proportional zum AKtm-Gehalt. Das Kontrollgel, das nur mit DTT vernetzt wurde, änderte sein Volumen nicht. Der Grad an Entquellung des Hydrogels erhöhte sich mit der Substratkonzentration. Die Reproduzierbarkeit der Änderung der Hydrogelquellung und der AKtm-Konformation wurde durch den wiederholten Kontakt des Hydrogels mit ATP-Puffer, gefolgt von einem Waschvorgang in ATP-freiem Puffer, demonstriert (Abbildung 9).<sup>[165]</sup> Die Neuartigkeit dieses Konzepts beruht auf der Kombination von Bioerkennung mit einer katalytischen Reaktion – der Übertragung eines Phosphats von ATP auf Adenosin-5'-monophosphat (AMP). Es gibt zahlreiche Enzyme, die durch die Anbindung eines Substrats an das aktive Zentrum eine Konformationsänderung erfahren. Somit handelt es sich hierbei um eine neue Strategie für die Entwicklung von Hybridhydrogelen, bei dem eine Vielfalt von chemischen Reaktionen mit Bioerkennung kombiniert werden kann, um nanoskalige Konformationsänderungen in makroskopische Bewegung umzusetzen.

#### 4. Strukturanalyse selbstorganisierter Hydrogele

Für die Hydrogelcharakterisierung sind zusätzlich zu den herkömmlichen Methoden (z.B. Rheologie, Quellung, Bestimmung der Reizempfindlichkeit, CD-Spektroskopie und analytische Ultrazentrifugation (AUC)) weitere analytische Techniken nötig, um die Hypothese zu bestätigen, dass die Selbstorganisation von löslichen Polymeren zu Hydrogelen durch Bioerkennung zu präzisen dreidimensionalen Strukturen mit Eigenschaften führt, die denen herkömmlicher Hy-

drogele überlegen sind. Zur Entwicklung von entsprechenden Techniken und zur Erstellung einer Experimentdatenbank, die als Referenz verwendet werden könnte, sind weitere Anstrengungen erforderlich.

Die zu beantwortenden Fragen sind anspruchsvoll und ergeben sich aus der Schwierigkeit der Aufgabe, den Selbstorganisationsprozesses zu steuern und Defekte in den Endstrukturen zu vermeiden.<sup>[83]</sup> Für ein Hydrogel, das sich durch Coiled-Coil-Bildung selbstorganisiert, ergeben sich z.B. folgende Fragen: Was ist der Anteil an Coiled-Coils, bei denen die Heptaden völlig überlappen? Welcher Anteil an Coiled-Coils agiert als elastisch wirkungsvolle Vernetzer? Welchen Umfang hat die Cyclisierung? Gibt es gebundene Peptid-einheiten, die nicht in Coiled-Coils assoziiert sind? Einige der verwendeten Techniken und die damit gewonnenen Erkenntnisse werden in diesem Abschnitt beschrieben.

Mit <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-Festkörper-NMR-Spektroskopie untersuchten Hong et al. die dynamische Struktur eines Hydrogels aus einem ABA-Triblockcopolymer, dessen A-Blöcke Coiled-Coil-bildende Domänen (sechs Heptaden) und dessen B-Block ein Zufallsblock (reich an A, G und E) war. Die Befunde lassen auf unterschiedliche Dynamiken zwischen dem B-Block und den A-Blöcken schließen. Auf der Mikrosekundenzeitskala war der B-Block isotrop mobil, während die Leucin-Reißverschluss-A-Blöcke starr waren.<sup>[167]</sup> Diese Beobachtung passt zu einer Hydrogelstruktur, in der die B-Domänen als Quellungsvermittler des Netzwerkes agieren und die A-Domäne an physikalischen Vernetzungen beteiligt ist. Hong et al. untersuchten die Konformation des Elastin-mimetischen rekombinanten Proteins [(VPGVG)<sub>4</sub>-(VPGKG)]<sub>39</sub> mithilfe der MAS-NMR-Spektroskopie (MAS = Rotation um den magischen Winkel). Die durchschnittlichen chemischen Verschiebungen des festen Proteins ähneln den Werten, die in Lösung erhalten werden, und legen

nahe, dass in beiden Fällen eine ähnliche Konformation vorliegt.<sup>[168]</sup> Kržík und Mitarbeiter untersuchten die Struktur von Elastinpolypeptiden [Poly(GVGVP) und Poly(AGVGP);  $M_n \approx 10^5$ ] in wässriger Umgebung mit  $^1\text{H}$ -,  $^2\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektroskopie und konnten unter Erhöhung der Temperatur vier physikalische Zustände beobachten: Zustand I: statistisch geformtes, komplett hydratisiertes Polymer; Zustand II: relativ verknäult und kugelförmig; Zustand III: straff verknäult und kompakter; Zustand IV: aggregiertes Polymer.<sup>[169]</sup> Die heterodimere Coiled-Coil-Struktur eines stabilen Coiled-Coil-Motivs IAAL (E3/K3) in Lösung wurde mithilfe von  $^1\text{H}$ -NOE-NMR-Spektroskopie (NOE = Kern-Overhauser-Effekt) und strukturellen Einschränkungen bestimmt.<sup>[170]</sup> Koksch et al. verwendeten eine Kombination von resonantem Fluoreszenzenergietransfer (FRET) und NMR-Spektroskopie, um die Struktur von Coiled-Coil-Heterodimeren zu lösen.<sup>[171]</sup> Sahin und Kiick nutzten die Kombination aus NMR-Spektroskopie, Größenausschlusschromatographie (SEC) und elektrophoretischer Analyse, um die Struktur von Blockcopolymeren aus PEG und Coiled-Coil-Peptiden zu dekodieren.<sup>[145]</sup> Diese Ergebnisse sind ermutigend, aber eine detailliertere Analyse von selbstorganisierten Hydrogelelen ist notwendig. Für Hydrogele aus Ppropfcopolymeren mit Peptideinheiten, die antiparallele Heterodimere bilden, müssen z.B. einige Fragen geklärt werden (siehe oben), die sich auf die Detailstruktur des dreidimensionalen Netzwerks beziehen (Anteil an Ppropfeinheiten, die Vernetzungen bilden; Anteil an Vernetzungsheterodimeren; Ausrichtung; Ausmaß der Cyclisierung).<sup>[172]</sup>

DLS ist eine sehr geeignete Methode, um den zeitlichen Verlauf der Selbstorganisation zu untersuchen. Mit ihr kann der kontinuierliche Anstieg des Molekulargewichts (hydrodynamisches Volumen) in der Vorgelierungsregion beobachtet werden, und die Bestimmung des Sol-Gel-Übergangs ist möglich.<sup>[173]</sup> Das Profil der Homodyn-Autokorrelationsfunktion ändert sich mit ansteigender Konzentration der assoziierenden Makromoleküle von einer gestreckten Exponentialfunktion hin zum Potenzgesetz am Gelierungspunkt, und die Dynamik der Lösung vor der Gelierung verlangsamt sich mit der Annäherung an den Gelierungspunkt.<sup>[173]</sup> Beide Effekte stehen im Zusammenhang mit der Polydispersität von Clustern, die sich durch zufällige Assoziation gebildet haben. Kopplungeffekte, die denen in glasartigen Systemen ähneln, können bei Konzentrationen wichtig werden, bei denen kleinere Cluster teilweise die größeren durchdringen. Zum Beispiel wurde DLS für die Untersuchung der zufälligen Assoziation von hydrophob modifizierten wasserlöslichen Polymeren,<sup>[174]</sup> Blockcopolymeren aus Elastin- und PEG-Blöcken<sup>[156]</sup> und Multiblockcopolymern verwendet.<sup>[175]</sup>

Die dynamische Vielfachstreuung von Licht (diffusing-wave spectroscopy, DWS) wird genutzt, um das viskoelastische Verhalten einer komplexen Flüssigkeit zu bestimmen. Die zeitliche Entwicklung der mittleren quadratischen Teilchenverschiebung einer Suspension von Partikeln, die sich wie harte Kugeln in einem viskoelastischen Medium verhalten, kann zu den Speicher- und Verlustmoduln des Mediums ins Verhältnis gesetzt werden.<sup>[176]</sup>

Die Mikrorheologie ist eine Methode zur Messung der mechanischen Eigenschaften eines Materials, indem die Be-

wegung von mikrometergroßen Tracer-Partikeln beobachtet wird. Anders als herkömmliche mechanische Rheometer, für die üblicherweise ein Milliliter einer Probe benötigt wird, braucht die Mikrorheologie nur kleine Probenvolumen von meist weniger als 10 µL. Bei der passiven Mikrorheologie wirkt keine externe Triebkraft auf die Tracer-Partikel; es wird nur die intrinsische Brownsche Bewegung der Partikel genutzt, die durch die thermische Energie  $k_B T$  bedingt ist. Die theoretische Grundlage der passiven Mikrorheologie ist die verallgemeinerte Stokes-Einstein-Beziehung (generalized Stokes-Einstein relation, GSER) für Materialien mit viskoelastischen Eigenschaften,<sup>[177–179]</sup> die gemäß Gleichung (1)

$$\langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle = \frac{dk_B T}{3\pi a s \tilde{G}(s)} \quad (1)$$

ausgedrückt werden kann, wobei  $\langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle$  die Laplace-Transformation der mittleren quadratischen Verschiebung (mean square displacement, MSD)  $\langle (r(t+\tau)-r(t))^2 \rangle$  der Tracerpartikel,  $d$  die Dimensionalität des Austauschvektors (normalerweise 2 in der Videomikroskopie),  $s$  die Laplace-Frequenz,  $a$  der Partikelradius und  $\tilde{G}(s)$  die Laplace-Darstellung des komplexen Moduls ist, der sowohl den Speichermodul  $G'$  als auch den Verlustmodul  $G''$  umfasst. Die Mikrorheologie wurde für Untersuchungen von Flüssig-fest-Übergängen während der Gelierung<sup>[188]</sup> von Blockcopolymeren<sup>[85,112]</sup> und hybriden Ppropfcopolymeren verwendet.<sup>[128,151,180,181]</sup>

Die Kleinwinkelneutronenstreuung ist für die Bestimmung von Volumen-Phasenübergängen und Mikrophasentrennung, den Nachweis von Inhomogenitäten in der Hydrogelstruktur und für die strukturelle Charakterisierung von sehr widerstandsfähigen Gelen geeignet.<sup>[182]</sup>

FRET kann genutzt werden, um die Ausrichtung von Coiled-Coils einzuschätzen.<sup>[183,184]</sup> Zum Beispiel kann der Donor (Tyr) in der einen Helix und der Akzeptor (Trp) im komplementären Coiled-Coil-Motiv platziert werden. Nur die perfekte Ausrichtung liefert dann ein starkes FRET-Signal.<sup>[185]</sup>

## 5. Designbeispiele

Die obige Diskussion bietet Richtlinien für die Entwicklung von selbstorganisierten Hybridbiomaterialien. Trotzdem müssen für einzelne Anwendungen verschiedene Aspekte berücksichtigt werden, sodass die resultierenden multifunktionalen Materialien die optimale Kombination von strukturellen, mechanischen und biologischen Eigenschaften aufweisen.<sup>[186]</sup>

### 5.1. Mimetika der extrazellulären Matrix

Die Selbstorganisation durch Bioerkennung von Materialien spielt eine Rolle bei der Entwicklung funktionaler extrazellulärer Matrices (extracellular matrices, ECMs), weil sie die Herstellung dreidimensionaler Anordnungen mit hoher Genauigkeit ermöglicht. Hybridhydrogele sind viel-

versprechende Matrices für die Untersuchung der Zellphysiologie und für die Entwicklung von Gewebeersatz.<sup>[17]</sup> Sie können unter zellkompatiblen Bedingungen hergestellt werden, und ihre physikochemischen Eigenschaften sind sehr gut steuerbar; darüber hinaus können auch zellbindende Liganden einfach eingebaut werden.<sup>[187–189]</sup> Die Möglichkeit zur Steuerung der Porosität und Interkonnektivität der dreidimensionalen Hydrogelstruktur ermöglicht die gleichzeitige Steuerung der Gas- und Nährstoffversorgung in einer dreidimensionalen Umgebung.<sup>[187,190]</sup> Das Steuern der mechanischen Eigenschaften des Trägermaterials beeinflusst auch die Ausdifferenzierung der Zellen.<sup>[191]</sup> Um physikalische Einschränkungen zu umgehen, die die Zellproliferation und Migration behindern, müssen entweder Materialien mit genügend hoher Porosität verwendet werden oder Hydrogele mit Oligopeptidvernetzungen, die von in Zellen natürlich vorkommenden Proteasen gespalten werden können.<sup>[192,193]</sup>

Die Gruppe um Bissell hat als erstes den Unterschied zwischen zwei- und dreidimensionalen Zellkultursystemen klar aufgezeigt. Menschliche Brustepithelzellen entwickelten sich als Tumorzellen in einer zweidimensionalen Kultur, verhielten sich aber wieder normal, wenn sie in dreidimensionalen Analoga ihrer natürlichen Mikroumgebung kultiviert wurden.<sup>[194]</sup> Um den Einfluss der nanoskaligen Ligandenorganisation auf die Regulierung der Zellfunktion zu demonstrieren, untersuchten Mooney und Mitarbeiter Alginathydrogele mit verschiedenen Abständen zwischen den RGD-Liganden und konnten zeigen, dass die Zahl der Liganden, die an einer Stelle angehäuft waren (bulk island density), den Osteoblastphänotyp kontrollierte. Die Kontrolle über die Ligandenabstände regulierte die Adhäsion, Proliferation und Ausdifferenzierung von Osteoblasten.<sup>[195]</sup> Anseth und Mitarbeiter passten die Elastizität von Polymersubstraten *in situ* an und bewerteten die Auswirkung des elastischen Moduls auf die Aktivierung der interstitiellen Klappenzellen (valvular interstitial cell, VIC) zu Myofibroblasten. Sie konnten zeigen, dass Myofibroblasten allein durch die Änderung des Elastizitätsmoduls des zugrundeliegenden Substrats deaktiviert werden können.<sup>[196]</sup> Sie wiesen nach, dass gentechnisch konstruierte Seidenelastinprotein-Hydrogele (SELP-Hydrogele) die Ausdifferenzierung von Chondrozyten und die Anreicherung von Knorpelmatrix humaner Mesenchymstammzellen (human mesenchymal stem cells, hMSCs) fördern. Die Möglichkeit zur Veränderung der SELP-Struktur ist ein Zeichen dafür, dass Materialien mit genau definierter dreidimensionaler Struktur als Gerüste für die Verkapselung und Chondrogenese von hMSCs entwickelt werden können.<sup>[197]</sup>

## 5.2. Peptidvermittelter Wirkstofftransport

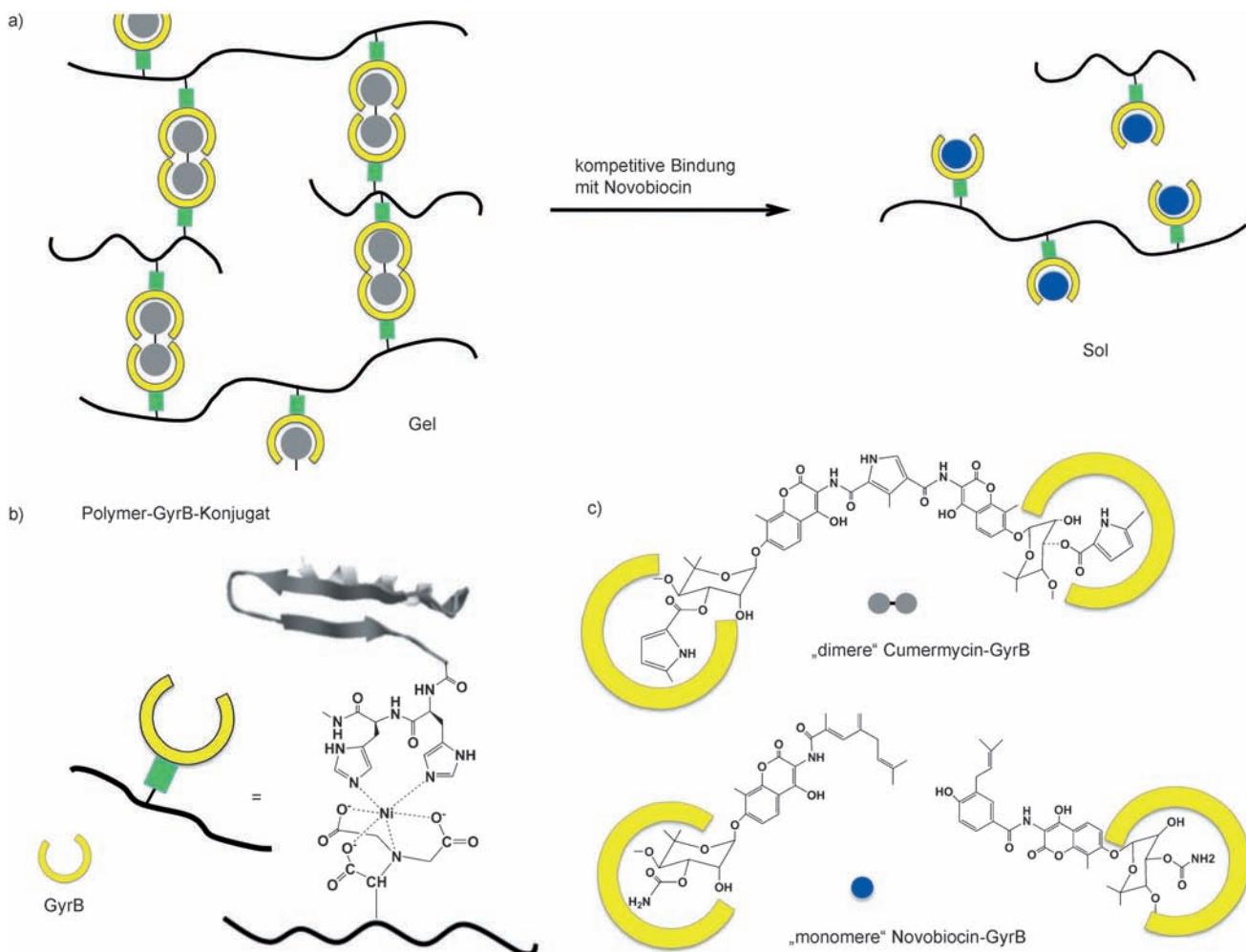
Gentechnisch konstruierte SELPs, die sich zu Hydrogele selbstorganisieren (siehe Abschnitt 3.1), wurden auch als Matrices für den Wirkstofftransport verwendet. Plasmid-DNA, die durch ein SELP-Hydrogel abgegeben worden ist, zeigt eine um 1–3 Größenordnungen höhere Transfektion im Mausmodell von menschlichem Brustkrebs als freie DNA.<sup>[152]</sup> SELP-Hydrogele wurden auch für die Intratumorabgabe von Adenoviren in feste Tumoren des Halses und Nackens an-

gewendet.<sup>[103,198–202]</sup> Die Befunde zeigen deutlich, dass die rekombinannten Polymere die Sicherheit der Adenovirustherapie verbessert haben.<sup>[201]</sup>

Selbstorganisierte Hybridhydrogele könnten als Depots für die verzögerte Freisetzung von therapeutischen Proteinen fungieren. Mit geeigneten Selbstorganisationskinetiken<sup>[147]</sup> kann das Depot *in situ* gebildet werden, z.B. nach einer subkutanen Injektion. Die Aufgabe ist hierbei, die Freisetzung der biologisch aktiven Verbindung (Protein) zu steuern. Schneider und Mitarbeiter studierten die kontrollierte Freisetzung von Proteinen mit verschiedenen Molekulargewichten und Ladungen aus selbstorganisiertem Haarnadel-MAX8-Hydrogel. Die Freisetzung von positiv geladenen und neutralen Proteinen wurde hauptsächlich durch die räumlichen Gegebenheiten des Netzwerks reguliert. Negativ geladene Proteine wechselwirken jedoch sehr stark mit dem positiv geladenen Hydrogel, wodurch ihre Freisetzung eingeschränkt ist.<sup>[203]</sup>

Beispiele für Freisetzungstrigger schließen die ligandeninduzierte Konformationsänderung, die ligandeninduzierte Herabsetzung der Vernetzungsdichte und Erosion in Gegenwart des entsprechenden Rezeptors ein. Eine ligandeninduzierte Konformationsänderung des Proteins in Hydrogelmikrokugeln wurde genutzt, um die Volumenänderung (Quellung) und die Freisetzung von verkapselten Wirkstoffen zu steuern. Eine modifizierte Version von Calmodulin (CaM) mit zwei SH-Gruppen wurde mit PEG<sub>575</sub>-Diacrylat durch eine Michael-Addition verknüpft.<sup>[204]</sup> Mithilfe der Emulsionspolymerisation wurden Mikrokugeln hergestellt und mit vaskulärem Endothelwachstumsfaktor (VEGF) beladen. Die ligandeninduzierte (Trifluoperazin) Konformationsänderung von CaM ermöglicht die Modulierung der VEGF-Freisetzung.<sup>[205]</sup> Ein Antibiotika-empfindliches Hydrogel für die Manipulation der Vernetzungsdichte unter gleichzeitiger VEGF-Freisetzung wurde hergestellt, indem die gentechnisch konstruierte bakterielle Gyrase-Untereinheit B (GyrB) an Polyacrylamid angebunden wurde, gefolgt von einer Vernetzung mit dem Anticumarin-Antibiotikum Cumermycin. Durch Kontakt mit Novobiocin dissoziieren die GyrB-Untereinheiten, was zu einer Abnahme der Vernetzungsdichte bei gleichzeitiger dosis- und zeitabhängiger Freisetzung des eingeschlossenen VEGF führt (Abbildung 10).<sup>[206]</sup> Kiick und Mitarbeiter demonstrierten eine rezeptorvermittelte Proteinfreisetzung. Dabei wirken VEGF-Moleküle als elastische Vernetzer in nichtkovalent verknüpften Hydrogelnetzwerken. Diese Netzwerke, erhalten durch die Wechselwirkung von Stern-PEG, das mit niedermolekularem Heparin functionalisiert ist, mit einem dimeren Heparin bindenden VEGF, zersetzen sich in Gegenwart des entsprechenden Rezeptors und setzen VEGF frei.<sup>[207]</sup>

Die Coiled-Coil-Bildung zwischen einer Peptideinheit, die an ein synthetisches Copolymer gebunden ist, und einer komplementären Einheit, die eine biologisch aktive Verbindung enthält, wurde für die Entwicklung von neuartigen Wirkstofftransportsystemen genutzt. Pechar und Mitarbeiter verwendeten Coiled-Coil-Peptide für die Anbindung von rekombinannten Proteinen an makromolekulare HPMA-Copolymer-Therapeutika.<sup>[208]</sup> Apostolovic et al. untersuchten anhand von B16F10-Zellen die Aufnahme und den subzellu-



**Abbildung 10.** Entwicklung und Synthese pharmakologisch gesteuerter Hydrogele: ein Antibiotika-empfindliches Hydrogel für die induzierte Freisetzung von VEGF. Die an Polyacrylamid gekuppelte, gentechnisch konstruierte bakterielle GyrB wurde durch Zugabe von Cumermycin dimerisiert, was zur Hydrogelbildung führte. Versetzen mit steigender Konzentration von Novobiocin spaltet die GyrB-Untereinheiten und sorgt für die Auflösung des Hydrogels und Freisetzung von VEGF. a) Gel-Sol-Übergang durch Exposition von Cumermycin-vernetztem Hydrogel gegenüber Novobiocin; b) Struktur von Polymer-GyrB-Konjugaten; c) Bindung von GyrB mit Cumermycin und Novobiocin. Adaptiert aus Lit. [206].

lären Transport von HPMA-Copolymeren mit K3-Einheiten, die mit Methotrexat-terminierten E3-Peptiden dimerisiert waren.<sup>[209,210]</sup> Als vorbereitende Arbeiten für die mögliche Anwendung im Wirkstofftransport PEGyierten Deacon et al. das synthetische Peptid FosW und demonstrierten, dass es mit der c-Jun-Sequenz des AP-1-Transkriptionsfaktors ein Coiled-Coil-Heterodimer bildet. Erwartungsgemäß fand keine sterische Hinderung der Hybridisierung durch PEG statt.<sup>[211]</sup>

### 5.3. Biomineralisationsmatrices

In dem Bestreben der Herstellung von Biomaterialien, die die Struktur und Eigenschaften von Knochen simulieren sowie aktiv vom Körper integriert und umgebildet werden können, werden die Strategien zur Gewebezüchtung von Knochen und zur Knorpelregeneration ständig verbessert. Es werden biomimetische Gerüste benötigt, die die Eigenschaften der natürlichen extrazellulären Matrix imitieren. Hydro-

gele scheinen wegen ihrer Biokompatibilität, ihres hohen Wassergehalts, ihrer Viskoelastizität und Permeabilität geeignete Matrices für die Züchtung von Muskeln und Knochen zu sein.<sup>[212]</sup> Zusätzlich zu den herkömmlichen Hydrogelen,<sup>[213]</sup> Peptiden<sup>[214]</sup> und Peptidamphiphilen<sup>[215]</sup> sind selbstorganisierte, gentechnisch konstruierte Polymere<sup>[216]</sup> und Hybridpolymere vielversprechende Kandidaten für die Knorpelregeneration und ähnliche Anwendungen.

Eine neue Generation von Knochengerüsten wurde entwickelt, die auf selbstorganisierten Hybridhydrogelen aus HPMA-Pfropfcopolymeren basieren, die komplementäre  $\beta$ -Faltblattpeptide enthalten. Dabei wird angenommen, dass das Gel durch die Bildung von knochenähnlichem Hydroxyapatit innerhalb der  $\beta$ -Faltblatt-Fibrillentemplate biomineralsiert wird. Dieser Ansatz würde die Grundlage für die Entwicklung von dreidimensionalen Verbundmaterialien bieten, die in der Lage sind, als Matrix für das Osteoblastwachstum und die Ausdifferenzierung in vitro und in vivo zu fungieren.<sup>[152]</sup> Die Vorteile des vorgeschlagenen Systems – faserartige Struktur, einstellbares/programmierbares Design auf

Grundlage der Assoziation der  $\beta$ -Faltblattdomänen sowie die Fähigkeit der  $\beta$ -Faltblätter, die Ablagerung von Hydroxyapatit zu ermöglichen (Abbildung 7)<sup>[217,218]</sup> – sichern die erfolgreiche Konstruktion neuer Trägermaterialien für die Knochengewebezüchtung.

Gungormus et al. nutzten eine Konstruktion aus einem  $\beta$ -Haarnadelpeptid und einem Heptapeptid (MLPHHGA) für die Herstellung von Hydrogelen, die das Peptid an der Außenseite der Fibrillenoberfläche präsentieren und die Biomineralisierung lenken.<sup>[219]</sup> Das Peptid wurde durch Phagedisplay identifiziert und kann die Mineralbildung in Lösung steuern.<sup>[220]</sup>

#### 5.4. Sensoren und Regler

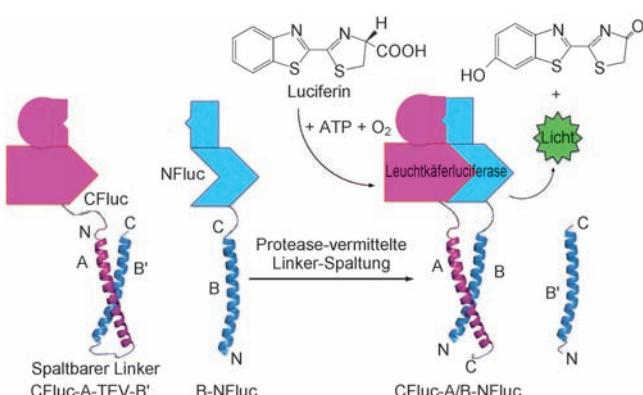
Ghosh und Mitarbeiter entwickelten eine Reihe von Proteasebiosensoren, die auf einem autoinhibierten Coiled-Coil-Schalter beruhen. Der Biosensor besteht aus drei modularen Domänen: einem gespaltenen Reporterprotein, einem antiparallelen heterodimeren Coiled-Coil-Motiv und einem Protease-empfindlichen Linker. Anfänglich ist die Assoziation der beiden Reporterfragmente autoinhibiert, weil die Wechselwirkung der Coiled-Coils A und B' thermodynamisch günstig ist. Nach der Spaltung des Linkers findet eine Coiled-Coil-vermittelte Komplementierung des gespaltenen Reporterproteins unter Wiederherstellung der Reporteraktivität statt. Das Konstruktionsprinzip ist in Abbildung 11 dargestellt.<sup>[221]</sup> Die Bioerkennung von E/K-Coiled-Coils (E: [EVSALEK]<sub>5</sub>; K: [KVSALEK]<sub>5</sub>) wurde für die Proteindetektion durch Western-Blot<sup>[222]</sup> und für die Entwicklung eines Coiled-Coil-basierten analytischen ELISA-Systems verwendet.<sup>[223]</sup> Die Coiled-Coil-Erkennung kann auch für die spezifische Markierung von Proteinen in lebenden Zellen verwendet werden.<sup>[224,225]</sup> Eine Peptidsonde K3

(KIAALKE)<sub>3</sub>, die mit einem Fluorophor markiert ist, kann spezifisch die oberflächenexponierte Marker-Sequenz E3 (EIAALEK)<sub>3</sub> am Prostaglandinrezeptor in lebenden Zellen anfärben.<sup>[224]</sup> Auf ähnliche Weise können selbstorganisierte Proteinfasern durch die Wechselwirkung zweier komplementärer Leucin-Reißverschluss-Peptide nichtkovalent funktionalisiert werden.<sup>[226]</sup>

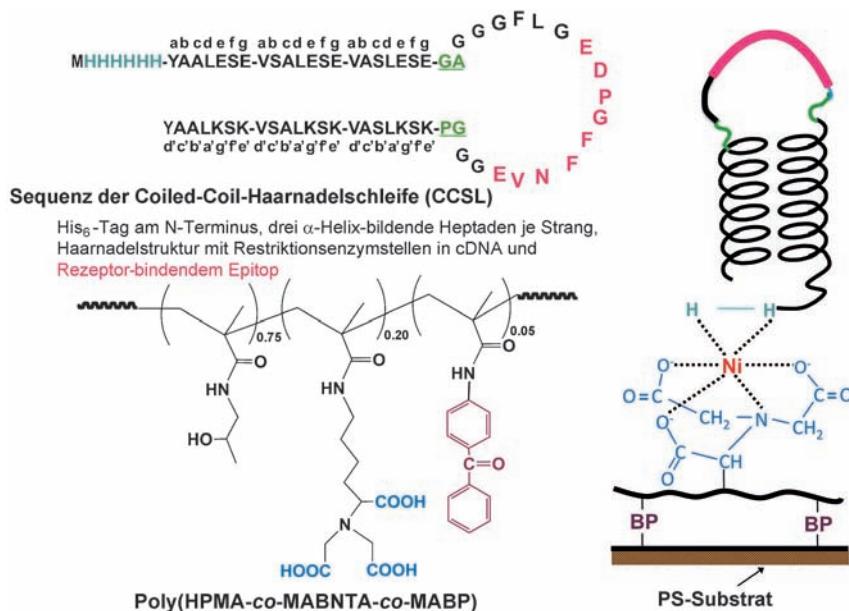
Yoshida et al. entwickelten selbstoszillierende Hydrogele, die ohne externen Impuls expandieren und sich zusammenziehen können. Die mechanische Oszillation des Gels wird durch Dissipation der chemischen Energie der oszillierenden Belousov-Zhabotinsky-Reaktion (BZ-Reaktion) hervorgerufen. Der Katalysator der BZ-Reaktion, Tris(2,2'-bipyridyl)Ruthenium(II),  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ , wurde kovalent an Poly(*N*-isopropylacrylamid)(PNIPAAm)-Ketten im Hydrogel gebunden. In einer Lösung der BZ-Substrate führt die autonome Oxidation ( $\text{Ru}^{\text{III}}$ ) und Reduktion ( $\text{Ru}^{\text{II}}$ ) zu einer Änderung der Hydrogelquellung.<sup>[227–229]</sup> Anscheinend wird die chemische Energie der BZ-Reaktion in mechanische Oszillation des Gels überführt.<sup>[230]</sup> Um die Anwendbarkeit dieses Systems unter physiologischen Bedingungen zu demonstrieren, stellten Yoshida und Uesusuki ein biomimetisches anionisches Hydrogel (vernetztes Copolymer aus NIPAAm und 2-Methacryloyloxyethylphosphat) mit immobilisierter Creatinkinase her, das in einer ATP-Lösung selbsttätig eine schlagende Bewegung ausführte – ähnlich einem Herzmuskel. Die enzymatische Reaktion führt zur Änderung der Calciumionenkonzentration, und da  $\text{Ca}^{2+}$  Phosphorgruppen chelatisiert (vernetzt), bilden und trennen sich Vernetzungen periodisch, wobei sich der Quellungsgrad des Gels ändert.<sup>[231]</sup> Ein Hydrogel, das unter konstanten Bedingungen periodisch an- und abschwellt, kann zu einem autonomen Massetransportsystem entwickelt werden.<sup>[232]</sup>

Für Bioerkennungsstudien wurde ein Modell entwickelt, das als Biosensor Anwendung finden könnte und auf einem Epitop-Präsentationsgerüst aufbaut. Das ist ein Peptid mit einer antiparallelen Coiled-Coil-Heterodimer-Haarnadelstruktur (coiled-coil heterodimer stem loop, CCSL), das sich auf einem festen Trägermaterial selbstorganisiert. His-markierte CCSL-Peptide mit Peptidepitopsequenzen in der Haarnadelstruktur, die durch den CD21-Rezeptor erkannt werden können, wurden gentechnisch hergestellt.<sup>[233–235]</sup> Diese Peptide selbstorganisieren sich in der Gegenwart von Nickel auf einem Polystyrolträgermaterial, an das kovalent ein HPMA-Copolymer mit Nitritotriessigsäuregruppen aufgepropft wurde. Die rezeptorbindenden Epitope wurden durch die selektive Bindung von Raji-B-Zellen und/oder löslichen CD21-Rezeptoren an die selbstorganisierte Monolage identifiziert (Abbildung 12). Die Wirksamkeit von ausgewählten Epitopen als Targeting-Einheiten in HPMA-Copolymer-Doxorubicin-Konjugaten wurde an CD21-positiven Raji-B-Zellen untersucht.<sup>[236]</sup>

Die Oberfläche von Poly(acrylamid)-Hydrogel wurde durch Selbstorganisation eines Coiled-Coil-Heterodimers mit RGD-haltigen Zelladhäsionsliganden funktionalisiert.<sup>[237]</sup> In einem anspruchsvoller Entwurf wurden auf Coiled-Coil-Basis unter Verwendung eines heterodimerisierenden Peptidpaars bioaktive Oberflächen hergestellt, die in der Lage waren, dynamisch und reversibel immobilisierte Liganden zu



**Abbildung 11.** Proteasebiosensoren auf Basis eines autoinhibierten Coiled-Coil-Schalters. Intramolekulare Coiled-Coil-Spaltung führt zu einer Komplementierung des gespaltenen Proteins – die beiden Hälften der Leuchtkäferluciferase werden wieder zum aktiven Protein zusammengesetzt, das die Monooxygenierung von Luciferin katalysiert und so Licht erzeugt. CFluc: C-terminales Fragment der Leuchtkäferluciferase (Fluc), Reste 398–550; NFluc: N-terminales Fragment von Fluc, Reste 2–416. Die Helices A und B' enthalten ein intramolekulares dimeres Coiled-Coil-Motiv, das über eine Tabakätzvirus(TEV)-Protease-Spaltstelle verknüpft ist. Adaptiert aus Lit. [221].



**Abbildung 12.** Oberflächenmodifizierung mit selbstorganisierten, gentechnisch hergestellten Peptiden, deren exponierte Epitope von humanen Lymphomzellen erkannt werden. Eine antiparallele CCSL selbstorganisiert sich auf einer Polystyrol-Zellkulturschale, deren Oberfläche mit einem HPMA-Copolymer mit Nitritotriessigsäuregruppen (NTA; zur Komplexierung von  $\text{Ni}^{2+}$ ) und Benzophenongruppen (BP) für die kovalente Anbindung an die Oberfläche funktionalisiert ist. Die Bioerkennung des exponierten Peptids kann unter Verwendung von CD21-positiven B-Zellen oder des löslichen CD21-Rezeptors untersucht werden. Adaptiert aus Lit. [234, 235].

regulieren. Peptid 1 wurde dabei mit einem Ende auf der Oberfläche immobilisiert, während das andere Ende mit dem zelladhäsiven RGD-Liganden modifiziert wurde. Komplementärpeptid 2 wurde an PEG gebunden. Bei Bildung des Heterodimers (zwischen 1 und 2) wurde die RGD-Sequenz durch PEG abgeschirmt und so die Zellanbindung verhindert. Die Zugabe eines Überschusses an 2 (nicht an PEG konjugiert) führte zu einer Ablösung des 2-PEG-Konjugates von der Oberfläche, wodurch der RGD-Ligand freigelegt wurde.<sup>[238]</sup>

Die spezifische biomolekulare Erkennung zwischen Coiled-Coil-bildenden Sequenzen wurde für die Anordnung von Goldnanopartikeln<sup>[239]</sup> oder Kohlenstoffnanoröhren genutzt.<sup>[240]</sup> Die Verwendung von Hydrogelen als Durchflussregler beim Wirkstofftransport wurde von Eddington und Beebe untersucht.<sup>[241]</sup> Hydrogelen können auch als Widerstandsventile, Mantelventile, elektrisch auslösbar Ventile und biomimetische Ventile verwendet werden. Das Ziel ist letztlich, eine physiologische Rückkopplung zu ermöglichen, um die Infusionsrate eines Wirkstofftransportsystems zu steuern.

### 5.5. Bildung supramolekularer Strukturen durch Bioerkennung von Peptiddomänen

Die Bioerkennung von Coiled-Coils kann für die programmierte Anordnung selbstorganisierter Systeme höherer Ordnung genutzt werden.<sup>[242]</sup> Die nichtkovalente supramolekulare Anordnung von mehreren Proteinen auf einem Den-

drimergerüst führt zu dendrimerfixierten Fasern mit helicaler Sekundärstruktur.<sup>[242]</sup> Auf ähnliche Art und Weise steuert die Bildung eines antiparallelen Leucin-Reißverschlusses den Wiederzusammensetzenbau von grün fluoreszierendem Protein (GFP). Zwei Peptidfragmente von GFP wurden mit Coiled-Coil-bildenden Peptiden modifiziert. Nach dem Wiederzusammensetzen zeigt das GFP seine charakteristische Fluoreszenz.<sup>[243]</sup> Chelur und Chalfie zeigten, dass die Coexpression von Caspase-3-Untereinheiten eine Aktivität von konstitutiv aktiver (d.h. aktiv nach Rekonstitution von Fragmenten) Caspase bewirkt, die zum Zelltod führt. Die Caspaseaktivität tritt nur auf, wenn die Untereinheiten durch eine Bindung mit der angekoppelten antiparallelen Coiled-Coil-Domäne assoziieren.<sup>[244]</sup> Die Bildung von Molekülen mit hoher Avidität (d.h. kombinierter Stärke von mehrfachen bindenden Wechselwirkungen) wurde durch Coiled-Coil-Erkennung erreicht. Tetravalente Miniantikörper wurden durch Selbstorganisation von vier einkettigen variablen Fragmenten (Fvs) hergestellt, die über eine flexible Drehachse zu einem tetrameren helicalen Peptid verbunden sind.<sup>[245]</sup> Ein pentameres mehrwertiges Bindungsmolekül („Peptabody“) wurde durch Selbstorganisation eines kurzen Peptidliganzen gebildet, der über eine halbstarre Drehachse mit der Coiled-Coil-Domäne des oligomeren Knorpelmatrixproteins verbunden ist.<sup>[246]</sup> Diehl et al. verwendeten mit Phenylalanin modifizierte Elastinpeptide für die Herstellung mehrteiliger Biomotoren. Die kooperative Wechselwirkung zwischen monomeren Kinesin-1-Motoren, die an Proteingerüste gebunden sind, verbesserten die hydrolytische Aktivität und die Gleitgeschwindigkeit von Mikrotubuli.<sup>[247]</sup> Die Erkennung von Coiled-Coil-Heterodimeren wurde auch für die Anordnung des nichtkovalenten Triblockcopolymers PEG-Coiled-Coil-Polystyrol genutzt.<sup>[248]</sup> Ryadnov und Mitarbeiter entwickelten einen Cyclopeptidblock aus zwei Domänen, die durch Bildung eines parallelen Coiled-Coil-Heterodimers oligomerisieren. Die Selbstorganisation führt zur Bildung von hochverzweigten nano- bis mikroskaligen Fibrillennetzwerken.<sup>[249]</sup>

## 6. Von Nanobiomaterialien zur Nanomedizin

Die Selbstorganisation von Hybridmaterialien aus synthetischen und biologischen Makromolekülen wird durch die Bioerkennung von biologischen Motiven vermittelt. Dabei fungiert ein Paar von gegensätzlich geladenen Pentaheptapeptiden (CCE und CCK), das antiparallele Coiled-Coil-Heterodimere bildet, als physikalischer Vernetzer bei der Selbstorganisation der HPMA-Pfropfcopolymere CCE-P und CCK-P zu Hydrogelen. Es wurde angenommen, dass diese

besondere Bioerkennung von CCK- und CCE-Peptidmotiven über die Konstruktion von Biomaterialien hinaus in der Art erweitert werden kann, dass sie auf lebende Systeme angewendet wird und biologische Prozesse vermittelt. Sie könnte eine Brücke zwischen dem Design von Biomaterialien und makromolekularen Therapeutika bilden.<sup>[236]</sup>

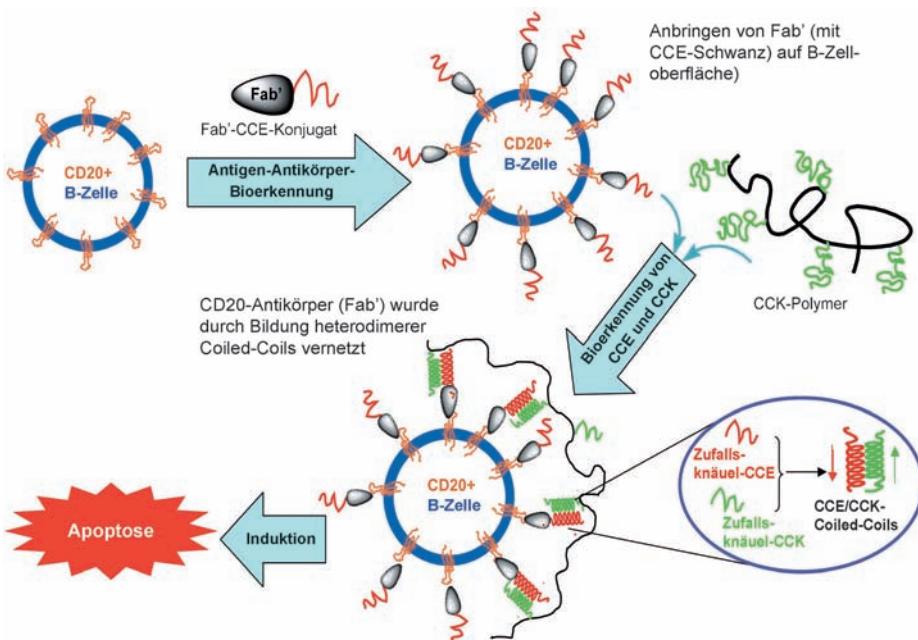
Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden CCE und CCK für die Konstruktion eines neuen Systems zur Induktion der Apoptose in CD20-positiven Zellen, eines so genannten wirkstofffreien makromolekularen Therapeutikums, verwendet.<sup>[250, 251]</sup> CD20 ist einer der zuverlässigsten Biomarker für B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). CD20 ist ein nicht internalisierendes Antigen, das auf der Zelloberfläche verbleibt, wenn es an einen komplementären Antikörper bindet. Die Vernetzung von CD20-gebundenen Antikörpern mit einem sekundären Antikörper führt jedoch zur Apoptose. Um dieses Phänomen zu nutzen, wurde ein System aus CCE- und CCK-Peptiden, einem Fab'-Fragment des 1F5-Anti-CD20-Antikörpers und einem HPMA-Copolymer entwickelt (Abbildung 13). Werden CD20-positive Raji-B-Zellen dem Fab'-CCE ausgesetzt, führt dies durch Bioerkennung des Antigen-Antikörper-Fragments zu einer Dekoration der Zelloberfläche mit mehreren Kopien des CCE-Peptids. Wei-

teres Aussetzen der dekorierten Zellen gegenüber dem HPMA-Copolymer, das mit mehreren Kopien von CCK funktionalisiert ist, führt zur Bildung von CCE-CCK-Coiled-Coil-Heterodimeren auf der Zelloberfläche. Dieses zweite Bioerkennungsereignis induziert die Vernetzung des CD20-Rezeptors und löst die Apoptose der Raji-B-Zellen aus.<sup>[179]</sup> Dieses System ist auch *in vivo* aktiv: Die intravenöse Verabreichung des Fab'-CCE-Konjugats, gefolgt von der Verabreichung von CCK-P, führte zum Langzeitüberleben bei SCID-Mäusen (CB-17), die ein humanes B-Lymphom-Herotransplantat trugen.<sup>[251]</sup>

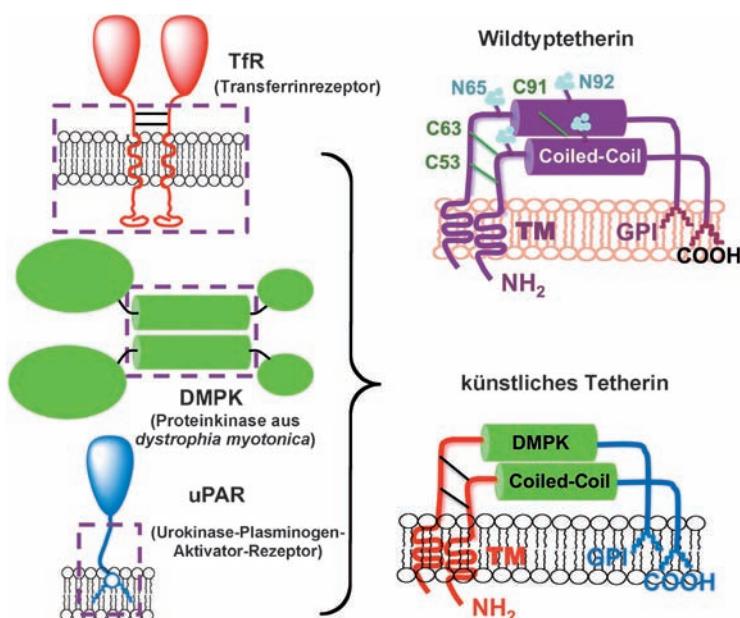
Die Begründung für die Entwicklung wirkstofffreier makromolekularer Therapeutika ist, dass niedermolekulare Wirkstoffe fehlen, sowie die Tatsache, dass die Vernetzung von CD20 auf der B-Zelloberfläche zur Apoptose führt. Dieser Ansatz liefert neue Modelle für die Beeinflussung der molekularen Erkennung bei der Entwicklung verbesserter Krebstherapien.

## 7. Schlussfolgerungen und Ausblick

Peptide und Proteine bieten reichlich Möglichkeiten für die Entwicklung selbstorganisierter bioerkennbarer Nanomaterialien. Die meisten der derzeitigen Designs sind von der Natur inspiriert. Das Verstehen der Grundlagen der Proteinkonstruktion ermöglicht es, funktionale Proteine zu entwickeln und sie künftig in Hybridsysteme mit neuartiger Struktur und Funktion einzubauen. Jüngst wurden mehrere moderne Ansätze veröffentlicht, die den Nutzen des Protein-Engineering aufzeigen: Cornelissen et al. verwendeten die heterodimere Coiled-Coil-Bioerkennung zur Verkapselung eines Proteins (enhanced green fluorescent protein) in einem Viruskapsid (Cowpea Chlorotic Mottle Virus).<sup>[252]</sup> Koder et al. synthetisierten ein Sauerstofftransportprotein über einen vierstufigen Prozess: Aufbau eines Vier-Helix-Bündels; Einbringen einer Cofaktor-bindenden Aminosäure; Anpassen der Sequenz zur Verbesserung der Strukturauflösung; Abstimmen der Funktion.<sup>[253]</sup> Tetherin ist ein Coiled-Coil-haltiges Protein, dessen Expression die Freisetzung von HIV-1 und anderen eingeschlossenen viralen Partikeln aus Wirtzellen blockiert.<sup>[254]</sup> Perez-Caballero et al. konnten zeigen, dass für seine antivirale



**Abbildung 13.** Design wirkstofffreier makromolekulärer Therapeutika. Gesamtaufbau und möglicher Mechanismus der Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphoma (NHL) mit Konjugaten der Coiled-Coil-bildenden Peptide CCE und CCK. Die Induktion der Apoptose in menschlichen Burkitt-NHL-Raji-B-Zellen wurde durch Vernetzung des Oberflächen-CD20-Antigens ausgelöst, die durch Bioerkennung zwischen Antigen-Antikörper-Fragment und komplementären Peptiden zustande kommt. Durch den Kontakt der Raji-B-Zellen mit einem Anti-CD20-Fab'-CCE-Konjugat wird die Zelloberfläche durch Antigen-Antikörper-Fragmenterkennung mit CCE dekoriert (CD20 ist ein nicht internalisierender Rezeptor). Der weitere Kontakt der dekorierten Zellen mit CCK-P (mit mehreren Kopien von CCK funktionalisiert) führt zur Bildung von CCE/CCK-Coiled-Coil-Heterodimeren auf der Zelloberfläche. Diese zweite Bioerkennung induziert die Vernetzung der CD20-Rezeptoren und löst die Apoptose der Raji-B-Zellen aus. Fab'-CCE ist ein Konjugat des Fab'-Fragments des 1F5-Antikörpers und des CCE-Peptids (YGG-EVSALEKEVSALEKKNSALEKEVSALEK); CCK-P ist ein HPMA-Copolymer, das neun Einheiten des CCK-Peptids (CYGGKVSALKEKVSALKEEVSANKEKVSALKE) enthält. Adaptiert aus Lit. [250].



**Abbildung 14.** Die De-novo-Entwicklung von funktionalen Peptiden/Proteinen. Der Austausch von funktionalen Domänen von Tetherin mit analogen Motiven aus nicht verwandten Proteinen führt zu einem funktionalen Konstrukt. Das künstliche Tetherin besteht aus Domänen des Transferrinrezeptors (TfR), der *Dystrophia-Myotonia*-Protein kinase (DMPK) und des Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptors (uPAR). Das komplett künstliche Protein, dem jede Sequenzhomologie mit dem natürlichen Tetherin fehlt, imitiert die antivirale Aktivität von Tetherin. Adaptiert aus Lit. [255, 256].

Aktivität die Tetherinkonfiguration (oder -struktur) entscheidend ist, und nicht die Primärsequenz.<sup>[255]</sup> Die Autoren ersetzten die Hauptdomänen von Tetherin – die Transmembran-, Coiled-Coil- und Glycophosphatidylinosit-Anker-Domäne – mit analogen Motiven aus drei nicht verwandten Proteinen,<sup>[255, 256]</sup> und diese komplett künstliche Form des Tetherins blockierte die Partikelfreisetzung auf die gleiche Art und Weise wie das natürliche Molekül (Abbildung 14).

Peptide, Proteine, Polyaminosäuren und hybride Makromoleküle können sich spontan durch Bioerkennung zu genau definierten dreidimensionalen Hydrogelstrukturen selbstorganisieren. Um die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten dieser Systeme nutzen zu können, müssen die Faktoren, die die Faltung und Selbstorganisation beeinflussen, genau bestimmt werden.<sup>[257–259]</sup> Designs, die sich auf solide wissenschaftliche Grundlagen stützen und zugleich die biologischen und technischen Anforderungen erfüllen, werden auf praktische Anwendungen übertragen werden. Für die nahe Zukunft können z.B. folgende Entwicklungen erwartet werden: das Design von Hydrogelen mit mehreren Funktionen; Hydrogele, die gegen mehrere Reizarten empfindlich sind; Hydrogele mit programmierbarem Antwortverhalten; und Hydrogele, die Substraterkennung in mechanische Bewegung überführen können. Die weitere Miniaturisierung präzise konstruierter Hydrogelbestandteile von biomedizinischen Bauteilen, Nanomedikamenten, Sensoren, Mikrofluidiksystemen, Nanoreaktoren und interaktiven Oberflächen mit einer hohen Genauigkeit in der Bioerkennung ist in greifbarer Nähe.

Die in diesem Aufsatz beschriebene Forschung wurde teilweise von den NIH (EB005288 und GM095606 und der University of Utah Research Foundation unterstützt. Wir danken Michael Jacobsen für die sorgfältige Überarbeitung des Manuskriptes.

Eingegangen am 7. Februar 2012  
Online veröffentlicht am 11. ■■■■■

Übersetzt von Dr. Julianne Keilitz, Berlin

- [1] S. Kyle, A. Aggeli, E. Ingham, M. J. McPherson, *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 423–433.
- [2] S. Zhang, *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 321–339.
- [3] M. G. Ryadnov, A. Bella, S. Timson, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13240–13241.
- [4] K. Rajagopal, J. P. Schneider, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 480–486.
- [5] O. Ikkala, G. ten Brinke, *Chem. Commun.* **2004**, 2131–2137.
- [6] J. B. Matson, S. I. Stupp, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 26–33.
- [7] C. Cai, L. Wang, J. Lin, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11189–11203.
- [8] M. Heim, L. Römer, T. Scheibel, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 156–164.
- [9] O. Wichterle, D. Lím, *Nature* **1960**, *185*, 117–118.
- [10] J. Kopeček, J. Yang, *Polym. Int.* **2007**, *56*, 1078–1098.
- [11] J. Kopeček, *J. Polym. Sci. Part A* **2009**, *47*, 5929–5946.
- [12] J. Kopeček, A. Tang, C. Wang, R. J. Stewart, *Macromol. Symp.* **2001**, *174*, 31–42.
- [13] G. W. M. Vandermeulen, H. A. Klokk, *Macromol. Biosci.* **2004**, *4*, 383–398.
- [14] J. Kopeček, J. Yang, *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 805–816.
- [15] C. Xu, J. Kopeček, *Polym. Bull.* **2007**, *58*, 53–63.
- [16] C. Wang, R. R. Varshney, D. A. Wang, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, *62*, 699–710.
- [17] M. W. Tibbitt, K. S. Anseth, *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *103*, 655–663.
- [18] X. Jia, K. L. Kiick, *Macromol. Biosci.* **2009**, *9*, 140–156.
- [19] C. C. Lin, K. S. Anseth, *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 631–643.
- [20] J. J. Schmidt, J. Rowley, H. J. Kong, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2008**, *87*, 1113–1122.
- [21] J. Elisseeff, A. Ferran, S. Hwang, S. Varghese, Z. Zhang, *Stem Cells Dev.* **2006**, *15*, 295–303.
- [22] N. A. Peppas, J. Z. Hilt, A. Khademhosseini, R. Langer, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1345–1360.
- [23] S. Nayak, L. A. Lyon, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7862–7886; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7686–7708.
- [24] J. Zhu, R. E. Marchant, *Expert Rev. Med. Devices* **2011**, *8*, 607–626.
- [25] R. Censi, P. Di Martino, T. Vermonden, W. E. Hennink, *J. Controlled Release* **2012**, *161*, 680–692.
- [26] A. N. Lupas, M. Gruber, *Adv. Protein Chem.* **2005**, *70*, 37–78.
- [27] D. N. Woolfson, *Adv. Protein Chem.* **2005**, *70*, 79–112.
- [28] D. A. Parry, R. D. Fraser, J. M. Squire, *J. Struct. Biol.* **2008**, *163*, 258–269.
- [29] E. Moutevelis, D. N. Woolfson, *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 726–732.
- [30] J. Y. Su, R. S. Hodges, C. M. Kay, *Biochemistry* **1994**, *33*, 15501–15510.
- [31] M. G. Oakley, J. J. Hollenbeck, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 450–457.
- [32] B. Yu, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 1113–1129.
- [33] J. Walshaw, D. N. Woolfson, *J. Mol. Biol.* **2001**, *307*, 1427–1450.

- [34] M. Gruber, A. N. Lupas, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 679–685.
- [35] D. N. Woolfson, G. J. Bartlett, M. Bruning, A. R. Thomson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 1–10.
- [36] N. R. Zaccai, B. Chi, A. R. Thomson, A. L. Boyle, G. J. Bartlett, M. Bruning, N. Linden, R. B. Sessions, P. J. Booth, R. L. Brady, D. N. Woolfson, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 935–941.
- [37] J. R. Moll, S. B. Ruvinov, I. Pastan, C. Vinson, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 649–655.
- [38] M. Singh, B. Berger, P. S. Kim, *J. Mol. Biol.* **1999**, *290*, 1031–1041.
- [39] R. S. Hodges, *Biochem. Cell Biol.* **1996**, *74*, 133–154.
- [40] S. K. Sia, P. S. Kim, *Biochemistry* **2001**, *40*, 8981–8989.
- [41] D. Gerber, Y. Shai, *J. Mol. Biol.* **2002**, *322*, 491–495.
- [42] S. K. Kolluri, X. Zhu, X. Zhou, B. Lin, Y. Chen, K. Sun, X. Tian, J. Town, X. Cao, F. Lin, D. Zhai, S. Kitada, F. Luciano, E. O'Donnell, Y. Cao, F. He, J. Lin, J. C. Reed, A. C. Satterthwait, X. K. Zhang, *Cancer Cell* **2008**, *14*, 285–298.
- [43] B. D. Welch, A. P. VanDemark, A. Heroux, C. P. Hill, M. S. Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16828–16833.
- [44] B. D. Welch, J. N. Francis, J. S. Redman, S. Paul, M. T. Weinstock, J. D. Reeves, Y. S. Lie, F. G. Whitby, D. M. Eckert, C. P. Hill, M. J. Root, M. S. Kay, *J. Virol.* **2010**, *84*, 11235–11244.
- [45] S. A. Funke, D. Willbold, *Mol. BioSyst.* **2009**, *5*, 783–786.
- [46] D. Pantoja-Uceda, C. M. Santiveri, M. A. Jiménez, *Methods Mol. Biol.* **2006**, *340*, 27–51.
- [47] R. V. Rughani, D. A. Salick, M. S. Lamm, T. Yucl, D. J. Pochan, J. P. Schneider, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1295–1304.
- [48] R. P. W. Davies, A. Aggeli, *J. Pept. Sci.* **2011**, *17*, 107–114.
- [49] A. Aggeli, M. Bell, N. Boden, J. N. Keen, T. C. B. McLeish, I. Nyrkova, S. E. Radford, A. Semenov, *J. Mater. Chem.* **1997**, *7*, 1135–1145.
- [50] D. M. Chung, J. S. Nowick, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3062–3063.
- [51] T. Koga, M. Matsuoka, N. Higashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17596–17597.
- [52] K. Wiesehan, K. Buder, R. P. Linke, S. Patt, M. Stoldt, E. Unger, B. Schmitt, E. Bucci, D. Willbold, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 748–753.
- [53] K. Wiesehan, J. Stöhr, L. Nager-Steger, T. van Groen, D. Riesner, D. Willbold, *Protein Eng. Des. Sel.* **2008**, *21*, 241–246.
- [54] Z. Luo, X. Zhao, S. Zhang, *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2364.
- [55] Z. Luo, X. Zhao, S. Zhang, *Macromol. Biosci.* **2008**, *8*, 785–791.
- [56] Z. Luo, S. Wang, S. Zhang, *Biomaterials* **2011**, *32*, 2013–2020.
- [57] A. Altunbas, D. J. Pochan, *Top. Curr. Chem.* **2012**, *310*, 135–167.
- [58] J. P. Schneider, D. J. Pochan, B. Ozbas, K. Rajagopal, L. Pakstis, J. Kretsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 15030–15037.
- [59] B. Ozbas, J. Kretsinger, K. Rajagopal, J. P. Schneider, D. J. Pochan, *Macromolecules* **2004**, *37*, 7331–7337.
- [60] L. Haines-Butterick, K. Rajagopal, M. Branco, D. Salick, R. Rughani, M. Pilarz, M. S. Lamm, D. J. Pochan, J. P. Schneider, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7791–7796.
- [61] J. M. Mason, U. B. Hagemann, K. M. Arndt, *Biochemistry* **2009**, *48*, 10380–10388.
- [62] J. M. Mason, K. M. Arndt, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 170–176.
- [63] C. Wang, R. J. Stewart, J. Kopeček, *Nature* **1999**, *397*, 417–420.
- [64] J. R. Litowski, R. S. Hodges, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 37272–37279.
- [65] Y. Yu, O. D. Monera, R. S. Hodges, P. L. Privalov, *J. Mol. Biol.* **1996**, *255*, 367–372.
- [66] A. N. Zaykov, K. R. MacKenzie, Z. T. Ball, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 8961–8965.
- [67] L. C. Radu, J. Yang, J. Kopeček, *Macromol. Biosci.* **2009**, *9*, 36–44.
- [68] A. Aggeli, I. A. Nyrkova, M. Bell, R. Harding, L. Carrick, T. C. B. McLeish, A. N. Semenov, N. Boden, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11857–11862.
- [69] M. Mutter, R. Gassmann, U. Buttks, K. H. Altmann, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1504–1506; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1514–1516.
- [70] R. Mimna, M.-S. Camus, A. Schmid, G. Tuchscherer, H. A. Lashuel, M. Mutter, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2735–2738; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2681–2684.
- [71] K. Pagel, S. C. Wagner, K. Samedov, H. von Berlepsch, C. Böttcher, B. Koksch, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2196–2197.
- [72] M. J. Pandya, E. Cerasoli, A. Joseph, R. G. Stoneman, E. Waite, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 17016–17024.
- [73] K. Pagel, T. Vagt, T. Kohajda, B. Koksch, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2500–2502.
- [74] M. Pechar, P. Kopečková, L. Joss, J. Kopeček, *Macromol. Biosci.* **2002**, *2*, 199–206.
- [75] G. W. M. Vandermeulen, C. Tziatzios, H. A. Klok, *Macromolecules* **2003**, *36*, 4107–4114.
- [76] V. Castelletto, G. E. Newby, Z. Zhu, I. W. Hamley, L. Noirez, *Langmuir* **2010**, *26*, 9986–9996.
- [77] S. E. Grieshaber, T. Nie, C. Yan, S. Zhong, S. S. Teller, R. J. Clifton, D. J. Pochan, K. L. Kiick, X. Jia, *Macromol. Chem. Phys.* **2011**, *212*, 229–239.
- [78] A. Top, C. J. Roberts, K. L. Kiick, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2184–2192.
- [79] G. Tae, J. A. Kornfeld, J. A. Hubbell, *Biomaterials* **2005**, *26*, 5259–5266.
- [80] D. Quémener, A. Deratani, S. Lecommandoux, *Top. Curr. Chem.* **2012**, *322*, 165–192.
- [81] M. Pechar, R. Pola, *Biotech. Adv.* **2012**, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.003.
- [82] J. Kopeček, *Biomaterials* **2007**, *28*, 5185–5192.
- [83] R. V. Ulijn, A. M. Smith, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 664–675.
- [84] W. A. Petka, J. L. Harden, K. P. McGrath, D. Wirtz, D. A. Tirrell, *Science* **1998**, *281*, 389–392.
- [85] C. Xu, V. Breedveld, J. Kopeček, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1739–1749.
- [86] C. Wang, J. Kopeček, R. J. Stewart, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 912–920.
- [87] L. Chen, J. Kopeček, R. J. Stewart, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 734–740.
- [88] B. Apostolovic, M. Danial, H.-A. Klok, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3541–3575.
- [89] J. W. Sadownik, R. V. Ulijn, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 401–411.
- [90] H. Robson Mardsen, A. Kros, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3050–3068; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2988–3005.
- [91] J. H. Collier, T. Segura, *Biomaterials* **2011**, *32*, 4198–4204.
- [92] M. T. Doel, M. Eaton, E. A. Cook, H. Lewis, T. Patel, N. H. Carrey, *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 4575–4592.
- [93] J. Cappello, *Trends Biotechnol.* **1990**, *8*, 309–311.
- [94] J. Cappello in *Handbook of Biodegradable Polymers* (Hrsg.: A. J. Domb, J. Kost, D. M. Wiseman) Harwood Academic Publishers, Amsterdam, **1997**, S. 387–416.
- [95] H. Ghandehari, J. Capello, *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 813–815.
- [96] A. A. Dinerman, J. Capello, H. Ghandehari, S. W. Hoag, *Biomaterials* **2002**, *23*, 4203–4210.
- [97] A. A. Dinerman, J. Capello, H. Ghandehari, S. W. Hoag, *J. Controlled Release* **2002**, *82*, 277–287.
- [98] Z. Megeed, J. Capello, H. Ghandehari, *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 954–959.
- [99] A. Nagarsekar, J. Crissman, M. Crissman, F. Ferrari, J. Capello, H. Ghandehari, *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *62*, 195–203.
- [100] A. Nagarsekar, J. Crissman, M. Crissman, F. Ferrari, J. Capello, H. Ghandehari, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 602–607.

- [101] M. Haider, V. Leung, F. Ferrari, J. Crissman, J. Powell, J. Capello, H. Ghandehari, *Mol. Pharm.* **2005**, *2*, 139–150.
- [102] D. Hwang, V. Moolchandani, R. Dandu, M. Haider, J. Capello, H. Ghandehari, *Int. J. Pharm.* **2009**, *368*, 215–219.
- [103] K. Greish, K. Araki, D. Li, B. W. O’Malley, Jr., R. Dandu, J. Frandsen, J. Capello, H. Ghandehari, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2183–2188.
- [104] W. Hwang, B. H. Kim, R. Dandu, J. Capello, H. Ghandehari, J. Seong, *Langmuir* **2009**, *25*, 12682–12686.
- [105] D. W. Urry, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 859–883; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 819–841.
- [106] D. W. Urry, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 249–257.
- [107] E. R. Wright, R. A. McMillan, A. Cooper, R. P. Apkarian, V. P. Conticello, *Adv. Funct. Mater.* **2002**, *12*, 149–154.
- [108] X. Wu, R. E. Sallach, J. M. Caves, V. P. Conticello, E. L. Chai-kof, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1787–1794.
- [109] H. S. Creel, M. J. Fournier, T. L. Mason, D. A. Tirrell, *Macromolecules* **1991**, *24*, 1213–1214.
- [110] K. P. McGrath, M. J. Fournier, T. L. Mason, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 727–733.
- [111] M. T. Krejchi, E. D. T. Atkins, A. J. Waddon, M. J. Fournier, T. L. Mason, D. A. Tirrell, *Science* **1994**, *265*, 1427–1432.
- [112] C. Xu, J. Kopeček, *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 674–682.
- [113] W. Shen, Dissertation, California Institute of Technology, Pasadena, **2005**.
- [114] W. Shen, J. A. Kornfeld, D. A. Tirrell, *Soft Mater.* **2007**, *3*, 99–107.
- [115] W. Shen, K. Zhang, J. A. Kornfeld, D. A. Tirrell, *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 153–158.
- [116] M. J. Macias, V. Gervais, C. Civera, H. Oschkinat, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 375–379.
- [117] C. T. S. Wong Po Foo, J. S. Lee, W. Mulyasasmita, A. Parisi-Amon, S. C. Heilshorn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 22067–22072.
- [118] W. Mulyasasmita, J. S. Lee, S. C. Heilshorn, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3406–3411.
- [119] A. P. Nowak, V. Breedveld, L. Pakstis, B. Ozbas, D. J. Pine, D. Pochan, T. J. Deming, *Nature* **2002**, *417*, 424–428.
- [120] V. Breedveld, A. P. Nowak, J. Sato, T. J. Deming, D. J. Pine, *Macromolecules* **2004**, *37*, 3943–3953.
- [121] A. P. Nowak, J. Sato, V. Breedveld, T. J. Deming, *Supramol. Chem.* **2006**, *18*, 423–427.
- [122] T. J. Deming, *Soft Matter* **2005**, *1*, 28–35.
- [123] J. Kopeček, *Nature* **2002**, *417*, 388–391.
- [124] H. R. Madsen, J. W. Handgraaf, F. Nudelman, N. A. J. M. Sommerdijk, A. Kros, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2370–2377.
- [125] C. M. Elvin, A. G. Carr, M. G. Huson, J. M. Maxwell, R. D. Pearson, T. Vuocolo, N. E. Liyou, D. C. Wong, D. J. Merritt, N. E. Dixon, *Nature* **2005**, *437*, 999–1002.
- [126] S. Lv, D. M. Dudek, Y. Cao, M. M. Balamurali, J. Gosline, H. Li, *Nature* **2010**, *465*, 69–73.
- [127] Y. Cao, H. Li, *Chem. Commun.* **2008**, 4144–4146.
- [128] J. Yang, C. Xu, C. Wang, J. Kopeček, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1187–1195.
- [129] S. Lv, Y. Cao, H. Li, *Langmuir* **2012**, *28*, 2269–2274.
- [130] J. S. Chen, G. H. Altman, V. Karageorgiou, R. Horan, A. Collette, V. Volloch, T. Colabro, D. L. Kaplan, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2003**, *67*, 559–570.
- [131] D. W. Urry, A. Pattanaik, J. Xu, T. C. Woods, D. T. McPherson, T. M. Parker, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1998**, *9*, 1015–1048.
- [132] E. Kobatake, K. Onoda, Y. Yanagida, M. Aizawa, *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 382–386.
- [133] J. C. Liu, S. C. Heilshorn, D. A. Tirrell, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 497–504.
- [134] L. Mi, S. Fischer, B. Chung, S. Sundelacruz, J. L. Harden, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 38–47.
- [135] M. Kumar, K. J. Sanford, W. P. Cuevas, M. Du, K. D. Collier, N. Chow, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2543–2551.
- [136] S. C. Gomes, I. B. Leonor, J. F. Mano, R. L. Reis, D. L. Kaplan, *Biomaterials* **2011**, *32*, 4255–4266.
- [137] J. Kopeček, C. Wang, R. Stewart, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **1998**, *216*, U56–U57.
- [138] K. Ulbrich, J. Strohalm, J. Kopeček, *Biomaterials* **1982**, *3*, 150–154.
- [139] P. Rejmanová, J. Pohl, M. Baudyš, V. Kostka, J. Kopeček, *Makromol. Chem.* **1983**, *184*, 2009–2020.
- [140] V. Šubr, R. Duncan, J. Kopeček, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1990**, *1*, 261–278.
- [141] T. Miyata, T. Asami, T. Uragami, *Nature* **1999**, *399*, 766–769.
- [142] Z. R. Lu, P. Kopečková, J. Kopeček, *Macromol. Biosci.* **2003**, *3*, 296–300.
- [143] B. H. Hu, P. B. Messersmith, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14298–14299.
- [144] P. Jing, J. S. Rudra, A. B. Herr, J. H. Collier, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2438–2446.
- [145] E. Sahin, K. L. Kiick, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2740–2749.
- [146] C. M. Rubert Pérez, A. Panitch, J. Chmielewski, *Macromol. Biosci.* **2011**, *11*, 1426–1431.
- [147] J. Yang, K. Wu, Č. Koňák, J. Kopeček, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 510–517.
- [148] D. L. McClain, H. L. Woods, M. G. Oakley, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3151–3152.
- [149] Siehe Lit. [31].
- [150] M. G. Oakley, P. S. Kim, *Biochemistry* **1998**, *37*, 12603–12610.
- [151] L. Radu-Wu, J. Yang, K. Wu, J. Kopeček, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2319–2327.
- [152] L. Wu, J. Yang, J. Kopeček, *Biomaterials* **2011**, *32*, 5341–5353.
- [153] K. Dušek, M. Dušková-Smrčková, R. Stewart, J. Kopeček, *Polym. Bull.* **2001**, *47*, 351–358.
- [154] I. W. Hamley, I. A. Ansari, V. Castelletto, H. Nuhn, A. Rösler, H.-A. Klok, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1310–1315.
- [155] A. Rösler, H.-A. Klok, I. W. Hamley, V. Castelletto, O. O. Mykhaylyk, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 859–863.
- [156] T. S. Burkoth, T. L. S. Benzinger, D. N. M. Jones, K. Hallenga, S. C. Meredith, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7655–7656.
- [157] T. S. Burkoth, T. L. S. Benzinger, V. Urban, D. G. Lynn, S. C. Meredith, P. Thiagarajan, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7429–7430.
- [158] T. S. Burkoth, T. L. S. Benzinger, V. Urban, D. M. Morgan, D. M. Gregory, P. Thiagarajan, R. E. Botto, S. C. Meredith, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7883–7889.
- [159] J. Hentschel, E. Krause, H. G. Börner, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7722–7723.
- [160] M. Pechar, J. Brus, L. Kostka, Č. Koňák, M. Urbanová, M. Šlouf, *Macromol. Biosci.* **2007**, *7*, 56–69.
- [161] J. D. Ehrick, S. K. Deo, T. W. Browning, L. G. Bachas, M. J. Madou, S. Daunert, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 298–302.
- [162] W. L. Murphy, W. S. Dillmore, J. Modica, M. Mrksich, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3126–3129; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3066–3069.
- [163] Z. Sui, W. J. King, W. L. Murphy, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 3377–3380.
- [164] J. D. Ehrick, M. R. Luckett, S. Khatwani, Y. Wei, S. K. Deo, L. G. Bachas, S. Daunert, *Macromol. Biosci.* **2009**, *9*, 864–868.
- [165] W. Yuan, J. Yang, P. Kopečková, J. Kopeček, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15760–15761.
- [166] M. H. Jacob, D. Amir, V. Ratner, E. Gussakowsky, E. Haas, *Biochemistry* **2005**, *44*, 13664–13672.
- [167] S. B. Kennedy, E. R. deAzevedo, W. A. Petka, T. P. Russell, D. A. Tirrell, M. Hong, *Macromolecules* **2001**, *34*, 8675–8685.
- [168] M. Hong, D. Isailovic, R. A. McMillan, V. P. Conticello, *Bio-polymers* **2003**, *70*, 158–168.

- [169] D. Kurková, J. Kříž, P. Schmidt, J. Dybal, J. C. Rodríguez-Cabello, M. Alonso, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 589–601.
- [170] D. A. Lindhout, J. R. Litkowski, P. Mercier, R. S. Hodges, B. D. Sykes, *Biopolymers* **2004**, *75*, 367–375.
- [171] K. Pagel, K. Seeger, B. Seiwert, A. Villaq, A. E. Mark, S. Berger, B. Koksich, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1189–1194.
- [172] K. Dušek, M. Dušková-Smrčková, J. Yang, J. Kopeček, *Macromolecules* **2009**, *42*, 2265–2274.
- [173] L. Fang, W. Brown, Č. Koňák, *Macromolecules* **1991**, *24*, 6839–6842.
- [174] Č. Koňák, P. Kopečková, J. Kopeček, *Macromolecules* **1992**, *25*, 5451–5456.
- [175] H. Nie, M. Li, R. Bansil, Č. Koňák, M. Helmstedt, J. Lal, *Polymer* **2004**, *45*, 8791–8799.
- [176] T. G. Mason, H. Gang, D. A. Weitz, *J. Opt. Soc. Am. A* **1997**, *14*, 139–149.
- [177] T. G. Mason, D. A. Weitz, *Phys. Rev. Lett.* **1995**, *74*, 1250–1253.
- [178] J. C. Crocker, M. T. Valentine, E. R. Weeks, T. Gisler, P. D. Kaplan, A. G. Yodh, D. A. Weitz, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85*, 888–891.
- [179] T. H. Larsen, E. M. Furst, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 146001.
- [180] J. Yang, C. Xu, P. Kopečková, J. Kopeček, *Macromol. Biosci.* **2006**, *6*, 201–209.
- [181] K. Wu, J. Yang, Č. Koňák, P. Kopečková, J. Kopeček, *Macromol. Chem. Phys.* **2008**, *209*, 467–475.
- [182] M. Shibayama, *Polym. J.* **2011**, *43*, 18–34, zit. Lit.
- [183] N. Zizlsperger, V. N. Malashkevich, S. Pillay, A. E. Keating, *Biochemistry* **2008**, *47*, 11858–11868.
- [184] M. Salwiczek, S. Samsonov, T. Vagt, E. Nyakatura, E. Fleige, J. Numata, H. Cölfen, M. T. Pisabarro, B. Koksich, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7628–7636.
- [185] M. Eisenhawer, S. Cattarinussi, A. Kuhn, H. Vogel, *Biochemistry* **2001**, *40*, 12321–12328.
- [186] S. A. Maskarinec, D. A. Tirrell, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 422–426.
- [187] M. P. Lutolf, P. M. Gilbert, H. M. Blau, *Nature* **2009**, *462*, 433–441.
- [188] D. E. Discher, D. J. Mooney, P. W. Zandstra, *Science* **2009**, *324*, 1673–1677.
- [189] S.-H. Lee, J. J. Moon, J. L. West, *Biomaterials* **2008**, *29*, 2962–2968.
- [190] L. Šprincl, J. Kopeček, D. Lím, *Calc. Tiss. Res.* **1973**, *13*, 63–72.
- [191] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, D. E. Discher, *Cell* **2006**, *126*, 677–689.
- [192] M. P. Lutolf, J. A. Hubbell, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 47–55.
- [193] M. P. Lutolf, J. L. Lauer-Fields, H. G. Schmoekel, A. T. Metters, F. E. Weber, G. B. Fields, J. A. Hubbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5413–5418.
- [194] O. W. Petersen, L. Rønnow-Jessen, A. R. Howlett, M. J. Bissell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 9064–9068.
- [195] K. Y. Lee, E. Alsberg, S. Hsiong, W. Comisar, J. Linderman, R. Ziff, D. Mooney, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1501–1506.
- [196] A. M. Kloxin, J. A. Benton, K. S. Anseth, *Biomaterials* **2010**, *31*, 1–8.
- [197] M. Haider, J. Capello, H. Ghandehari, K. W. Leong, *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 692–699.
- [198] Z. Megeed, M. Haider, D. Li, B. W. O'Malley, Jr., J. Cappello, H. Ghandehari, *J. Controlled Release* **2004**, *94*, 433–445.
- [199] A. V. Cresce, R. Dandu, A. Burger, J. Cappello, H. Ghandehari, *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 891–897.
- [200] J. Gustafson, K. Greish, J. Frandsen, J. Cappello, H. Ghandehari, *J. Controlled Release* **2009**, *140*, 256–261.
- [201] J. A. Gustafson, R. A. Price, K. Greish, J. Cappello, H. Ghandehari, *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 1050–1056.
- [202] J. A. Gustafson, H. Ghandehari, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, *62*, 1509–1523.
- [203] M. C. Branco, D. J. Pochan, N. J. Wagner, J. P. Schneider, *Biomaterials* **2010**, *31*, 9527–9534.
- [204] W. J. King, J. S. Mohammed, W. L. Murphy, *Soft Matter* **2009**, *5*, 2399–2406.
- [205] W. J. King, N. J. Pytel, K. Ng, W. L. Murphy, *Macromol. Biosci.* **2010**, *10*, 580–584.
- [206] M. Ehrbar, R. Schoenmakers, E. H. Christen, M. Fussenegger, W. Weber, *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 800–804; Kommentar: C. Alexander, *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 767.
- [207] N. Yamaguchi, L. Zhang, B.-S. Chae, C. S. Palla, E. M. Furst, K. L. Kiick, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3040–3041.
- [208] M. Pechar, R. Pola, R. Laga, K. Ulbrich, L. Bednárová, P. Maloň, I. Sieglová, V. Král, M. Fábry, O. Vaněk, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3645–3655.
- [209] B. Apostolovic, S. P. E. Deacon, R. Duncan, H.-A. Klok, *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 11–18.
- [210] B. Apostolovic, S. P. E. Deacon, R. Duncan, H.-A. Klok, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1187–1195.
- [211] S. P. E. Deacon, B. Apostolovic, R. J. Carbajo, A.-K. Schott, K. Beck, M. J. Vicent, A. Pineda-Lucena, H.-A. Klok, R. Duncan, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 19–27.
- [212] S. Varghese, J. H. Elisseeff, *Adv. Polym. Sci.* **2006**, *203*, 95–144.
- [213] K. Yasuda, N. Kitamura, J. P. Gong, K. Arakaki, H. J. Kwon, S. Onodera, Y. M. Chen, T. Kurokawa, F. Kanaya, Y. Ohmiya, Y. Osada, *Macromol. Biosci.* **2009**, *9*, 307–316.
- [214] C. E. Semino, *J. Dent. Res.* **2008**, *87*, 606–616.
- [215] R. N. Shah, N. A. Shah, M. M. Del Rosario Lim, C. Hsieh, G. Nuber, S. I. Stupp, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 3293–3298.
- [216] H. Betre, L. A. Seton, D. E. Meyer, A. Chilkoti, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 910–916.
- [217] J. D. Hartgerink, E. Beniash, S. I. Stupp, *Science* **2001**, *294*, 1684–1688.
- [218] S. Segman-Magidovich, H. Grisaru, T. Gitli, Y. Levi-Kalisman, H. Rapaport, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 2156–2161.
- [219] M. Gungormus, M. Branco, H. Fong, J. P. Schneider, C. Tamlerler, M. Sarikaya, *Biomaterials* **2010**, *31*, 7266–7274.
- [220] M. Gungormus, H. Fong, I. W. Kim, J. S. Evans, C. Tamlerler, M. Sarikaya, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 966–973.
- [221] S. S. Shekhawat, J. R. Porter, A. Sriprasad, I. Ghosh, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15284–15290.
- [222] C. Boucher, G. St-Laurent, M. Jolicœur, G. De Crescenzo, Y. Durocher, *Anal. Biochem.* **2010**, *399*, 138–140.
- [223] B. Liberelle, L. Bartholin, C. Boucher, F. Murschel, M. Jolicœur, Y. Durocher, A. Merzouki, G. De Crescenzo, *J. Immunol. Methods* **2010**, *362*, 161–167.
- [224] Y. Yano, A. Yano, S. Oishi, Y. Sugimoto, G. Tsujimoto, N. Fujii, K. Matsuzaki, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 341–345.
- [225] Y. Yano, K. Kawano, K. Omae, K. Matsuzaki, *Methods Enzymol.* **2012**, *504*, 355–370.
- [226] Z. H. Mahmoud, D. J. Grundy, K. J. Channon, D. N. Woolfson, *Biomaterials* **2010**, *31*, 7468–7474.
- [227] R. Yoshida, T. Takahashi, T. Yamaguchi, H. Ichijo, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5134–5135.
- [228] R. Yoshida, K. Takei, T. Yamaguchi, *Macromolecules* **2003**, *36*, 1759–1761.
- [229] S. Tateyama, Y. Shibuta, R. Yoshida, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 1777–1782.
- [230] V. V. Yashin, O. Kuksenok, A. C. Balasz, *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 155–173.
- [231] R. Yoshida, Y. Uesusuki, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2923–2926.
- [232] Y. Murase, R. Takeshima, R. Yoshida, *Macromol. Biosci.* **2011**, *11*, 1713–1721.
- [233] A. Tang, C. Wang, R. Stewart, J. Kopeček, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 363–371.

- [234] A. Tang, C. Wang, R. J. Stewart, J. Kopeček, *J. Controlled Release* **2001**, *72*, 57–70.
- [235] A. Tang, J. Kopeček, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 421–431.
- [236] A. Tang, P. Kopečková, J. Kopeček, *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 360–367.
- [237] P. J. Wilcox, C. A. Reinhart-King, S. J. Lahr, W. F. DeGrado, D. A. Hammer, *Biomaterials* **2005**, *26*, 4757–4766.
- [238] B. Liu, Y. Liu, J. J. Riesberg, W. Shen, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13630–13632.
- [239] M. M. Stevens, N. T. Flynn, C. Wang, D. A. Tirrell, R. Langer, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 915–918.
- [240] M. R. Contarino, M. Sergi, A. E. Harrington, A. Lazareck, J. Xu, I. Chaiken, *J. Mol. Recognit.* **2006**, *19*, 363–371.
- [241] D. T. Eddington, D. J. Beebe, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 199–210.
- [242] M. Zhou, D. Bentley, I. Ghosh, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 734–735.
- [243] I. Ghosh, A. D. Hamilton, L. Regan, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5658–5659.
- [244] D. S. Chelur, M. Chalfie, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2283–2288.
- [245] P. Pack, K. Müller, R. Zahn, A. Plückthun, *J. Mol. Biol.* **1995**, *246*, 28–34.
- [246] A. V. Terskikh, J.-M. Le Doussal, R. Crameri, I. Fisch, J.-P. Mach, A. V. Kajava, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 1663–1668.
- [247] M. R. Diehl, K. Zhang, H. J. Lee, D. A. Tirrell, *Science* **2006**, *311*, 1468–1471.
- [248] H. R. Marsden, A. V. Korobko, E. N. M. van Leeuwen, E. M. Pouget, S. J. Veen, N. A. J. M. Sommerdijk, A. Kros, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9386–9393.
- [249] A. Bella, S. Ray, M. Shaw, M. G. Ryadnov, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 443–446; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 428–431.
- [250] K. Wu, J. Liu, R. N. Johnson, J. Yang, J. Kopeček, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1493–1497; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1451–1455.
- [251] K. Wu, J. Yang, J. Liu, J. Kopeček, *J. Controlled Release* **2012**, *157*, 126–131.
- [252] I. J. Minten, L. J. A. Hendriks, R. J. M. Nolte, J. J. L. M. Cornelissen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17771–17773.
- [253] R. L. Koder, J. L. R. Anderson, L. A. Solomon, K. S. Reddy, C. C. Moser, P. L. Dutton, *Nature* **2009**, *458*, 305–309.
- [254] S. J. Neil, T. Zang, P. D. Beniasz, *Nature* **2008**, *451*, 425–430.
- [255] D. Perez-Caballero, T. Zang, A. Ebrahimi, M. W. McNatt, D. A. Gregory, M. C. Johnson, P. D. Beniasz, *Cell* **2009**, *139*, 499–511.
- [256] J. Hammonds, P. Spearman, *Cell* **2009**, *139*, 456–457.
- [257] S. C. Wagner, M. Roskamp, M. Pallerla, R. R. Araghi, S. Schlecht, B. Koksch, *Small* **2010**, *6*, 1321–1328.
- [258] A. W. Reinke, R. A. Grant, A. E. Keating, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6025–6031.
- [259] Y. Yang, P. Ringler, S. A. Müller, P. Burkhard, *J. Struct. Biol.* **2012**, *177*, 168–176.