

Immobilisierung von Liposomen und Vesikeln auf strukturierten Oberflächen mithilfe eines Coiled-Coil-Peptidbindungsmotivs**

Jens Voskuhl, Christian Wendeln, Frank Versluis, Eva-Corinna Fritz, Oliver Roling,
Harshal Zope, Christian Schulz, Stefan Rinnen, Heinrich F. Arlinghaus, Bart Jan Ravoo* und
Alexander Kros*

„Coiled-Coils“ sind ein in Proteinen sehr häufig anzutreffendes Strukturmotiv, das an vielfältigen Prozessen wie der Genregulation,^[1] der Zell-Zell-Kommunikation,^[2] dem Transport kleiner Moleküle^[3] und der Membranfusion^[4] beteiligt ist. So vermitteln SNARE-Proteine intra- und interzelluläre Fusionsprozesse und sind in entscheidender Weise an exo- und endozytotischen Transportprozessen beteiligt. Die gemeinsame Eigenschaft aller Coiled-Coils ist das Vorliegen mindestens zweier miteinander verwundeter α -Helices, die wie ein molekularer Klettverschluss aneinander haften. Die spezifische molekulare Erkennung zwischen den Helices in einem Coiled-Coil-Motiv hat zur Entwicklung hochkomplexer selbstorganisierter Materialien geführt.^[5-7] Hier berichten wir über die Verwendung des Bindungsmotivs zur Funktionalisierung von Oberflächen. Dabei wird gezeigt, dass ein komplementäres Oligopeptidpaar, bestehend aus „Peptid E“ (EIAALEK) und „Peptid K“ (KIAALKE), durch die Bildung paralleler, α -helikaler Coiled-Coil-Heterodimere dazu in der Lage ist, die selektive Anbindung von Liposomen und Cyclodextrin-Vesikeln (CD Vesikeln) auf strukturierten Oberflächen zu induzieren. Die Strukturierung der Oberflächen konnte durch den Mikrokontakteindruck eines funktionalisierter Peptidstranges erreicht werden.

Die Immobilisierung von Vesikeln und Liposomen auf Basis komplementärer DNA-Stränge,^[8] elektrostatischer Wechselwirkungen^[9] oder durch Protein-Ligand-Interaktionen^[10] hat in den letzten Jahren zunehmende Bedeutung er-

reicht. Dabei wurden Immobilisierungen auf einer Vielzahl unterschiedlicher Substrate durchgeführt. Die Methoden erlaubten die Entwicklung von Liposom-Mikroarrays^[11,12] oder von verschiedenen Sensoroberflächen.^[13-15] Weiterhin sind Reaktionen in immobilisierten Liposomen,^[16-19] wie unter anderem auch Einzelmolekülreaktionen,^[20] beschrieben worden.

In dieser Arbeit wurde das Mikrokontakteindruckverfahren dazu verwendet, Strukturen von alkinfunktionalisiertem Peptid E (**1**) durch kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) auf azidterminierten selbstorganisierten Monoschichten (SAMs) aufzubringen. Die Oberflächenstrukturierung durch Mikrokontakteichemie wurde in den vergangenen Jahren durch mehrere Arbeitsgruppen untersucht und konnte unter anderem dazu verwendet werden, Kohlenhydrat-,^[21,22] DNA-^[23] und Peptid-Mikroarrays^[24] herzustellen. Das auf diese Weise immobilisierte Peptid E bindet das komplementäre Peptid K unter Bildung eines Coiled-Coil-Bindungsmotivs. Die Wechselwirkung wurde kürzlich dazu verwendet, die Fusion von Liposomen in gepufferter, wässriger Lösung zu induzieren.^[25-27] Die Vorteile des komplementären Bindungsmotivs sind unter anderem seine Einfachheit, die hohe Selektivität, gute pH- und Temperaturstabilität sowie geringe Kosten.

Abbildung 1 beschreibt schematisch den Prozess der Immobilisierung von Liposomen oder Vesikeln auf Oberflächen. Die chemischen Strukturen der verwendeten Zielmoleküle sind in Schema 1 dargestellt. Im ersten Schritt wurden azidfunktionalisierte Monoschichten mithilfe von gemusterten Stempeln aus Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) durch den Cu^I-katalysierten Mikrokontakteindruck von Peptid E (**1**) strukturiert. Die verbliebenen Zwischenräume konnten anschließend durch die Reaktion mit Tetraethylenglycolalkin **2** passiviert werden. Eine Inkubation der bedruckten Oberflächen mit Liposomen oder CD-Vesikeln,^[28] die mit Peptid K modifiziert waren, führte zur Anbindung der Lipidkompartimente an die Substrate. Im Falle der CD-Vesikel gelang die Modifikation mit Peptid K **5** über die Bildung von Gast-Wirt-Einschluskomplexen. Dabei bindet der Adamantan-Anker an die Kavitäten der CDs. Die Modifikation der Liposomen mit Peptid K **4** wurde über die Integration seines hydrophoben Cholesterinrestes in die Membranen erreicht. Die nicht-kovalente, reversible Anbindung der Liposomen konnte durch das Waschen der Oberflächen mit Ethanol bzw. das Waschen der CD-Oberflächen mit einer gepufferten Lösung von β -CD in Wasser nachgewiesen werden.

[*] Dr. J. Voskuhl, M. Sc. F. Versluis, M. Sc. H. Zope, Dr. A. Kros
Soft Matter Chemistry, Leiden Institute of Chemistry
P.O. Box 9502, 2300 RA Leiden (Niederlande)
E-Mail: a.kros@chem.leidenuniv.nl

Dr. C. Wendeln, M. Sc. E.-C. Fritz, M. Sc. O. Roling, Dr. C. Schulz,
Prof. Dr. B. J. Ravoo
Organisch-Chemisches Institut und CeNTech
Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Corrensstraße 40, 48149 Münster (Deutschland)
E-Mail: b.j.ravoo@uni-muenster.de

Dipl.-Phys. S. Rinnen, Prof. Dr. H. F. Arlinghaus
Physikalisches Institut, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Wilhelm-Klemm-Straße 10, 48149 Münster (Deutschland).

[**] A.K. dankt dem Europäischen Forschungsrat (ERC) für Fördergelder. B.J.R. dankt der DFG für finanzielle Unterstützung (Ra 1732/1). Siliciumoberflächen wurden freundlicherweise von der Siltronic AG zur Verfügung gestellt. Wir danken Patrick Seelheim und Prof. Dr. H. J. Galla für Hilfe mit den QCM-D-Messungen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201204836> zu finden.

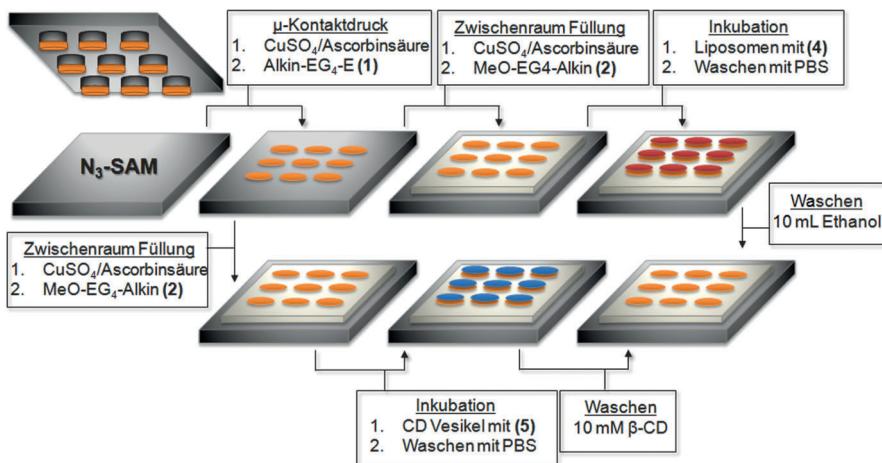
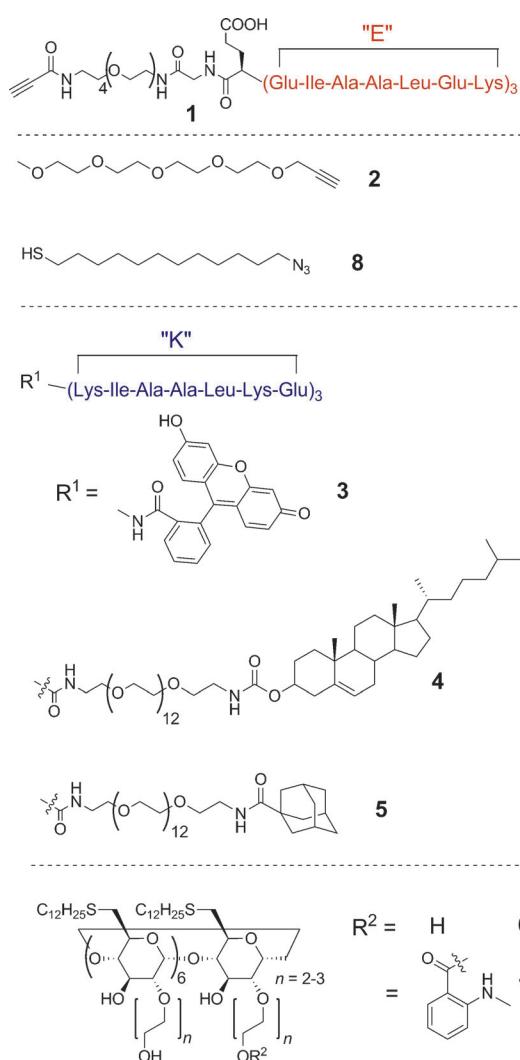


Abbildung 1. Arbeitsschritte für den Mikrokontakteindruck von Peptid E (**1**) und die Immobilisierung von Liposomen durch ein Coiled-Coil-Bindungsmotiv.



Schema 1. Chemische Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten Verbindungen. **1:** Alkin-funktionalisiertes Peptid E; **2:** Tetraethylenglycolalkin; **3:** Fluorescein-markiertes Peptid K; **4:** Cholesterin-modifiziertes Peptid K; **5:** Adamantan-modifiziertes Peptid K; **6:** amphiphiles β-CD; **7:** Anthranilsäure-markiertes amphiphiles β-CD; **8:** 12-Azidododecan-thiol.

Die Immobilisierung von Peptid E (**1**) durch Mikrokontakteindruck verursacht aufgrund dessen polarer Molekülstruktur eine signifikante Veränderung der Oberflächenbenetzbarkeit. Dieser Umstand wurde durch Wasserkondensationsexperimente auf den bedruckten Oberflächen eindeutig nachgewiesen. Dabei wurde das Punktmuster durch die Abscheidung von Mikrotröpfchen sichtbar (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Durch den Mikrokontakteindruck mit PDMS-Flachstempeln konnte eine homogene Bedeckung mit dem Peptid erreicht werden. Der statische Kontaktwinkel sank dabei von etwa 83° für die azidterminierte Monoschicht auf etwa 50° für die Peptidoberfläche (Abbildung S1).

Neben Kontaktwinkelmessungen konnte das Vorhandensein des Peptids durch Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) bestätigt werden. Dabei wurden homogen beschichtete Peptidoberflächen, die chemisch mithilfe von Flachstempeln modifiziert wurden, untersucht. So konnten im C1s-Bereich charakteristische Signale für Kohlenstoffe in Amidbindungen (288.5 eV) detektiert werden, die eine Immobilisierung belegen (Abbildung 2 A). Gleichzeitig verschwanden im N1s-Bereich die zwei Stickstoffsignale der Azidgruppen (terminale und internes Stickstoffatom) und wurden durch ein einzelnes Signal, bestehend aus Amid- und Triazolstickstoffen, ersetzt (Abbildung 2 B).

Um die Strukturierung der Oberflächen durch den Mikrokontakteindruck von Peptid E (**1**) genauer zu untersuchen, wurde eine Analyse mittels Sekundärionen-Flugzeitmassenspektrometrie (ToF-SIMS) durchgeführt (Abbildung 2 E und F). Dabei wurden im Positiv- sowie im Negativionenmodus charakteristische Fragmente (vornehmlich C_xH_xO_x und C_xH_xN_x) identifiziert, die die Strukturierung mit dem Peptid verdeutlichen und das Punktmuster des Stempels widerspiegeln. Die Immobilisierung des Peptids konnte ebenfalls indirekt in einer Analyse des SiO₂-Signals nachgewiesen werden. Durch die abschirmende Wirkung des aufgedruckten Moleküls gegenüber den Primärionen kam es zu einer verringerten Ionisation der unterliegenden SiO₂-Schicht (Abbildung S2). Weiterhin wurden die strukturierten Oberflächen mithilfe von Rasterkraftmikroskopie (AFM) untersucht. Die Immobilisierung des Peptids war sowohl im Höhen- als auch im Phasenbild eindeutig zu erkennen (Abbildung 2 C und D). Die Höhendifferenz zwischen den bedruckten und den unbedruckten Bereichen betrug 0.7–1 nm (Abbildung S3).

Nach der detaillierten Analyse der hergestellten Oberflächen lag der Fokus weiterer Experimente auf der Untersuchung ihrer Bindungseigenschaften zu Systemen, die mit dem komplementären Peptid K modifiziert waren. In einem ersten Experiment wurden die strukturierten Oberflächen mit einer Lösung von mit Carboxyfluorescein markiertem Peptid K **3** (ohne Liposom oder Lipidanker) inkubiert.

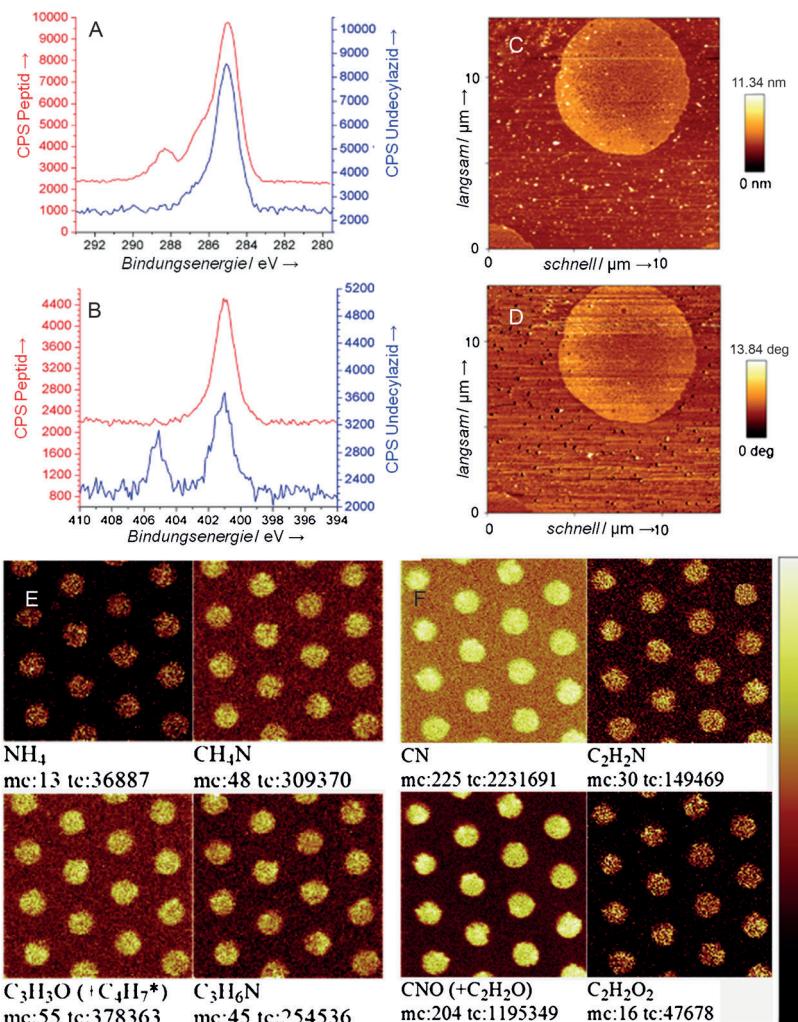


Abbildung 2. A) XPS-Analyse der C1s-Region einer Undecylazid-Monoschicht auf Silicium vor und nach dem Bedrucken mit Peptid E (**1**). B) XPS-Analysen der N1s-Regionen derselben Oberflächen. C) AFM-Höhenbild und D) Phasenbild einer mit Peptid E (**1**) bedruckten Siliciumoberfläche. E) und F) Ausgewählte Sekundärionenbilder einer ToF-SIMS-Untersuchung im Positiv- (E) sowie im Negativionenmodus (F) (abgebildete Fläche: $50 \times 50 \mu\text{m}^2$). Der Maßstabsbalken in (C)–(F) entspricht 10 μm .

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen belegten anhand der Bildung eines grün fluoreszierenden Punktmusters, dass die immobilisierten Peptide nach wie vor dazu in der Lage sind, einen Coiled-Coil-Komplex mit dem komplementären Peptid K zu bilden (Abbildung 3A).

In einem nächsten Schritt wurden Anbindungsstudien mit modifizierten Liposomen und Vesikeln durchgeführt. Zunächst wurde Peptid K mithilfe eines Lipidankers in Liposomen, die aus einer Mischung von DOPC, DOPE und Cholesterin bestanden (50:25:25 Mol-%), integriert. Zur Verankerung wurde Peptid K mit einer Cholesterineinheit versehen, da sich dieses Sterin effektiv durch hydrophobe Wechselwirkungen in Lipiddoppelschichten einlager. Die Herstellung der Liposomen geschah ausgehend von einem Lipidfilm, bestehend aus der oben genannten Zusammensetzung und 1 Mol-% Peptid K **4**. Der Film konnte durch langsames Verdampfen des Lösungsmittels (MeOH/CHCl₃) im Argonstrom erzeugt werden. Die Liposomen wurden über

die Hydratation dieses Films mittels PBS-Puffer (phosphate-buffered saline; 100 mM) und 5–10 min Ultraschallbehandlung gewonnen. Dabei handelte es sich um unilamellare Liposomen mit einem mittleren Durchmesser von etwa 150 nm. Die finale Konzentration wurde auf 0.1 mM eingestellt.

Eine Visualisierung der Anbindung auf Oberflächen mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde mithilfe von Liposomen, die mit DOPE-LR (1 Mol-%) markiert waren, nach 15 min Inkubation erreicht. Zur Verminderung von hydrophoben Wechselwirkungen mit den unpolaren Alkylazidgruppen der Substrate wurden restliche Azide nach dem Mikrokontaktdruck von Peptid E (**1**) jeweils durch die Reaktion mit dem alkinfunktionalisierten Tetraethylenglycolderivat **2** via CuAAC abgesättigt (Abbildung S4). Die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der Oberfläche im Anschluss an ein vorsichtiges Waschen mit 100 mM PBS (10 mL) ergab, dass die Vesikel effektiv auf den mit Peptid E bedruckten Oberflächenbereichen immobilisiert wurden (Abbildung 3B). Die Punktstruktur blieb selbst nach intensivem Waschen mit PBS bestehen (Abbildung S5). Wurde die Oberfläche allerdings mit Ethanol (10 mL) gespült, so konnten die Liposomen aufgrund der Zerstörung des Coiled-Coil-Motivs sowie der Lipiddoppelschichten effektiv von der Oberfläche entfernt werden (Abbildung S5).

Um zu ergründen, ob die Liposomen auch nach ihrer Immobilisierung auf den Oberflächen intakt bleiben, wurden Lösungen von Sulforhodamin (20 mM) in HEPES-Puffer in die mit Peptid K **4** modifizierten Liposomen eingeschlossen und diese im Anschluss an ihre Aufreinigung durch Größenausschlusschromatographie über Sephadex G50 mit einer vorstrukturierten Oberfläche inkubiert. Nach

15 min wurde die Oberfläche mehrfach mit HEPES-Puffer gewaschen. Die anschließende Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie belegte aufgrund des Vorhandenseins des erwarteten Punktmusters das Vorliegen intakter Liposomen (Abbildung S6).

Weitere Studien wurden mittels Oberflächenplasmonenresonanz(SPR)-Spektroskopie und einer Quarzkristall-Mikrowaage mit Dissipationsmessung (QCM-D) durchgeführt. Dazu wurden zunächst Goldoberflächen (SPR-Goldchips und goldbeschichtete Quarzkristalle) über Nacht mit Thiol **8** inkubiert. Die Inkubation führte zur Bedeckung der Oberflächen mit azidterminierten Alkylthiol-Monoschichten, die im Anschluss durch die kupferkatalysierte Immobilisierung von Peptid E (**1**) weiter funktionalisiert wurden. Verbliebene Azide wurden wie im Fall der gemusterten Oberflächen durch die Reaktion mit Alkin **2** abgesättigt. Eine Anbindung von mit Peptid K **4** modifizierten Liposomen (1 Mol-%) an die hergestellten Goldoberflächen konnte mittels SPR-Spektro-

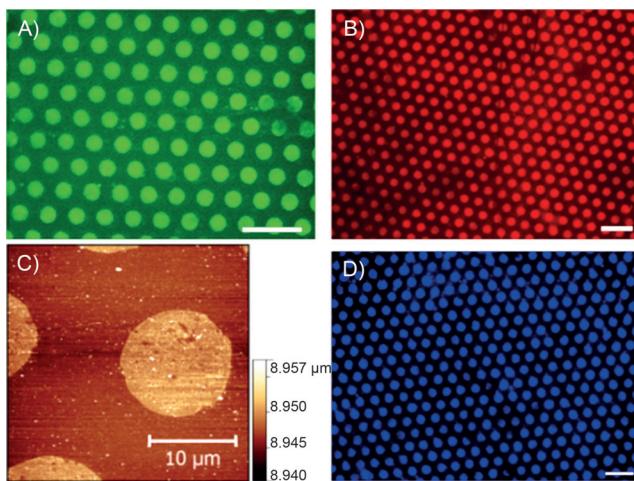


Abbildung 3. A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Punktstruktur von Peptid E (1) nach 15 min Inkubation mit Peptid K 2. B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Punktstruktur von 1 nach der Inkubation mit Liposomen, die mit Peptid K 3 und DOPE-LR modifiziert waren. C) AFM-Höhenbild der Analyse von immobilisierten Liposomen auf einer Punktstruktur von Peptid E (1). D) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Anbindung von CD-Vesikeln, die mit Peptid K 5 modifiziert waren an eine mit Peptid E (1) bedruckte Oberfläche. Die Maßstabsbalken in (A), (B) und (D) entsprechen 40 µm.

skopie verfolgt werden (Abbildung 4 A). Dabei führte die Anbindung zur deutlichen Steigerung des Brechungsindex, während nackte Liposomen nur eine leichte Änderung des Signals bewirkten. Auch die Wechselwirkung von mit Peptid K 4 modifizierten Liposomen mit einer Oberfläche, die lediglich mit dem Tetraethylenglycolderivat **2** zur Reaktion gebracht wurde, fiel gering aus. Hieraus kann geschlossen werden, dass die Anbindung der modifizierten Liposomen an die Substratoberflächen selektiv abläuft.

Eine weitergehende Analyse der Struktur der immobilisierten Liposomen konnte mithilfe einer Quarzkristall-Mikrowaage vorgenommen werden.^[29] Die Inkubation einer mit Peptid E (1) bedeckten Goldoberfläche mit Liposomen, die mit Peptid K modifiziert waren (1 Mol-%), führte zu einem signifikanten Anstieg der Dissipation (Abbildung 4B) und gleichzeitig zu einem Abfall der Schwingungsfrequenz (Abbildung 4C). Dieses belegt eine dissipative Stoffadsorption auf der Oberfläche, die allein durch die Immobilisierung einer intakten Liposomschicht erklärt werden kann, da bei Lipiddoppelschichten keine signifikante Dissipationsänderung zu erwarten ist.^[29] Das Waschen der Oberflächen mit PBS hatte keinen Einfluss auf das Signal (blauer Pfeil). Der Zusatz von Triton X zum Puffer führte jedoch zu einer Zerstörung der immobilisierten Liposomen (schwarzer Pfeil). Nackte Liposomen zeigten nur eine vernachlässigbare Anbindung an eine modifizierte Goldoberfläche, was die Spezifität des Coiled-Coil-Paares veranschaulicht. Mithilfe der Blindproben konnte berechnet werden, dass ca. 7% der Liposomen durch unspezifische Wechselwirkungen an die Oberfläche binden. Zusammenfassend muss aus den Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 3B und Abbil-

dung S6 sowie den QCM-D- und SPR-Ergebnissen aus Abbildung 4 geschlossen werden, dass mithilfe des Coiled-Coil-Strukturmotivs intakte Liposomen auf den Oberflächen immobilisiert werden können.

Die Untersuchung von mit Peptid K 4 modifizierten Liposomen auf Siliciumoberflächen mithilfe von Rasterkraftmikroskopie deutete jedoch stark darauf hin, dass es nach längerer Lagerung in Puffer (3–4 h) zum Kollabieren der Liposomen und zur Bildung von Lipiddoppelschichten kommt. Abbildung 3C belegt die Ansammlung von Lipidmaterial auf den aufgedruckten Punktstrukturen von immobilisiertem Peptid E (1). Die Höhendifferenz im Vergleich zu den mit Tetraethylenglycol bedeckten Arealen betrug 5–6 nm (Abbildung S3). Dieser Wert stimmt in guter Näherung mit dem Durchmesser einer Lipiddoppelschicht überein. Die Entstehung von Doppelschichten nach längerer Zeit ist aufgrund der großen Kraft, mit der die Coiled-Coils die Liposomen an die Oberfläche ziehen, leicht zu erklären. Durch die starke Wechselwirkung (Assoziationskonstante $K_a \approx 10^7 \text{ M}^{-1}$) flachen die Liposomen ab, und es bilden sich schließlich Lipiddoppelschichten.

Um die Anwendbarkeit des Systems zu verdeutlichen, wurden auch Vesikel aus dem amphiphilen CD 6^[28] mithilfe

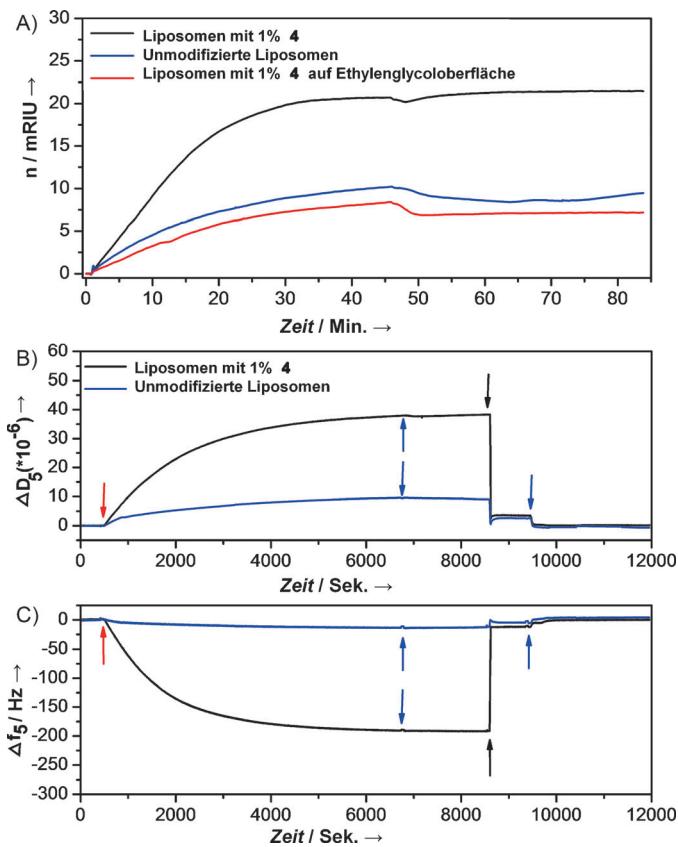


Abbildung 4. A) SPR-Sensogramm von mit Peptid K 4 modifizierten Liposomen sowie von zwei Blindproben; [Liposomen] = 0.2 mM. B) und C) QCM-D-Messungen: Dissipation (B) und Frequenz des fünften Oberschalls (C); Inkubation mit Liposomen (0.1 mM) mit (schwarze Kurve) und ohne (blaue Kurve) Peptid K 4. Rote Pfeile: Inkubation mit Liposomen, blaue Pfeile: Waschen mit PBS, schwarze Pfeile: Inkubation mit Triton X (0.1 Gew.-%).

des Coiled-Coil-Bindungsmotivs auf Oberflächen immobilisiert. Dazu wurden die CD-Vesikel mit einer Lösung von Adamantan-funktionalisiertem Peptid K **5** vermischt. Adamantan ist bekannt dafür, stabile Einschluskomplexe mit β -CD zu bilden, sodass eine effektive Umhüllung mit Peptid K gewährleistet werden kann. Um die Vesikel sichtbar zu machen, wurden durch Beimengung des CD **7** mit Methylanthranilsäure markierte Vesikel hergestellt. Dazu wurde eine Lösung der Verbindungen **6** und **7** (9:1) in Argonstrom eingedampft, wonach ein dünner Lipiddfilm erhalten wurde. Dieser konnte anschließend durch die Zugabe von PBS hydratisiert und durch Ultraschallbehandlung (10 min) in CD-Vesikel mit einem mittleren Durchmesser von etwa 150 nm transformiert werden. Nach der Zugabe von Peptid K **5** (1 Mol-%) wurden die hergestellten Vesikel mit einer vorstrukturierten, komplementären Peptidoberfläche inkubiert (15 min). Eine darauffolgende fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der Oberflächen belegte anhand der Entstehung eines blauen Punktmusters, dass die CD-Vesikel effektiv immobilisiert wurden (Abbildung 3D). Die Stärke der Anbindung ist auf die Bildung multivalenter Bindungen zurückzuführen, auch wenn die Bindungskonstante zwischen Adamantan und β -CD eher klein ist ($K_a \approx 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$).^[28b] Um nachzuweisen, dass die Anbindung tatsächlich auf der genannten Gast-Wirt-Wechselwirkung beruht, wurden die Oberflächen mit einer wässrigen Lösung von β -CD (10 mM) gewaschen. Der Waschvorgang führte zur konkurrierenden Komplexierung der oberflächenverankerten Adamantane und damit zur Zerstörung der Einschluskomplexe mit den CD-Vesikelmembranen, wodurch es zum vollständigen Verschwinden des fluoreszierenden Musters kam (Abbildung S7).

Zusammenfassend wurde eine biomimetische, nichtkovalente Methode zur Immobilisierung von Liposomen und zur Herstellung oberflächenverankerter Lipiddoppelschichten beschrieben. Die Immobilisierung gelang auf mittels Mikrokontaktdruck strukturierten Oberflächen und unter der Verwendung eines Coiled-Coil-Bindungsmotivs. Der Ansatz besitzt unserer Ansicht nach großes Potential in Hinblick auf das Studium der Fluidität von Lipiddoppelschichten sowie ihrer Erkennungsprozesse. Weitere Arbeiten zur Untersuchung der Orthogonalität des Coiled-Coil-Bindungsmotivs und zur Herstellung von Arrays mit verschiedenen Lipidzusammensetzungen sind geplant.

Eingegangen am 20. Juni 2012

Stichwörter: Coiled-Coil-Peptide · Klickchemie · Liposome · Mikrokontaktdruck · Vesikel

- [1] E. Santelli, T. J. Richmond, *J. Mol. Biol.* **2000**, *297*, 437–449.
- [2] K. K. S. Ng, S. Park-Snyder, W. I. Weis, *Biochemistry* **1998**, *37*, 17965–17976.
- [3] S. Özbek, J. Engel, J. Stetefeld, *EMBO J.* **2002**, *21*, 5960–5968.
- [4] R. Jahn, R. H. Scheller, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 631–643.
- [5] B. Apostolovic, M. Danial, H.-A. Klok, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3541–3575.

- [6] D. N. Woolfson, G. J. Bartlett, M. Bruning, A. R. Thomson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 432–441.
- [7] M. M. Stevens, N. T. Flynn, C. Wang, D. A. Tirrell, R. Langer, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 915–918.
- [8] a) S. Svedhem, I. Pfeiffer, C. Larsson, C. Wingren, C. Borrebaeck, F. Hook, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 339–343; b) M. R. Dusseiller, B. Niederberger, B. Stadler, D. Falconnier, M. Textor, J. Voros, *Lab Chip* **2005**, *5*, 1387–1392; c) C. Yoshina-Ishii, G. P. Miller, M. L. Kraft, E. T. Kool, S. G. Boxer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1356–1357; d) U. Jakobsen, A. C. Simonsen, S. Vogel, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10462–10463; e) B. van Lengerich, R. J. Rawle, S. G. Boxer, *Langmuir* **2010**, *26*, 8666–8672.
- [9] L. Zhang, L. Hong, Y. Yu, S. Chul Bae, S. Granick, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9026–9027.
- [10] a) P. Vermette, H. J. Griesser, P. Kambouris, L. Meagher, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1496–1502; b) P. Lenz, C. M. Ajo-Franklin, S. G. Boxer, *Langmuir* **2004**, *20*, 11092–11099.
- [11] D. Stamou, C. Duschl, E. Delamarche, H. Vogel, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5738–5741; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5580–5583.
- [12] N. D. Kalyankar, M. K. Sharma, S. V. Vaidya, D. Calhoun, C. Maldarelli, A. Couzis, L. Gilchrist, *Langmuir* **2006**, *22*, 5403–5411.
- [13] S. M. Christensen, D. G. Stamou, *Sensors* **2010**, *10*, 11352–11368.
- [14] M. Bally, K. Bailey, K. Sugihara, D. Grieshaber, J. Voros, B. Stadler, *Small* **2010**, *6*, 2481–2497.
- [15] A. Shoji, E. Sugimoto, S. Orita, K. Nozawa, A. Yanagida, Y. Shibusawa, M. Sugawara, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 1377–1381.
- [16] D. T. Chiu, C. F. Wilson, F. Ryttsen, A. Stromberg, C. Farre, A. Karlsson, S. Nordholm, A. Gaggar, B. P. Modi, A. Moscho, R. A. Garza-Lopez, O. Orwar, R. N. Zare, *Science* **1999**, *283*, 1892–1895.
- [17] P. Y. Bolinger, D. Stamou, H. Vogel, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8594–8595.
- [18] H. Pick, E. L. Schmid, A. P. Tairi, E. Illegems, R. Hovius, H. Vogel, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2908–2912.
- [19] a) S. M. Christensen, D. Stamou, *Soft Matter* **2007**, *3*, 828–836; b) S. M. Christensen, P. Y. Bolinger, N. S. Hatzakis, M. W. Mortensen, D. Stamou, *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 51–55.
- [20] a) E. Rhoades, E. Gussakovskiy, G. Haran, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3197–3202; b) Y. Rondelez, G. Tresset, K. V. Tabata, H. Arata, H. Fujita, S. Takeuchi, H. Noji, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 361–365.
- [21] O. Michel, B. J. Ravoo, *Langmuir* **2008**, *24*, 12116–12118.
- [22] C. Wendeln, A. Heile, H. F. Arlinghaus, B. J. Ravoo, *Langmuir* **2010**, *26*, 4933–4940.
- [23] D. I. Rozkiewicz, W. Brugman, R. M. Kerkhoven, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11593–11599.
- [24] N. S. Kehr, K. Riehemann, J. El-Gindi, A. Schäfer, H. Fuchs, H. J. Galla, L. De Cola, *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 2248–2254.
- [25] H. R. Marsden, N. A. Elbers, P. H. H. N. A. J. M. Somerdijk, A. Kros, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2366–2369; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2330–2333.
- [26] H. R. Marsden, M. Rabe, F. Versluis, T. Zheng, H. Zope, A. Kros, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 18927–18933.
- [27] H. R. Marsden, A. Kros, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3050–3068; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2988–3005.
- [28] a) B. J. Ravoo, R. Darcy, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4494–4496; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4324–4326; b) P. Falvey, C. W. Lim, R. Darcy, T. Revermann, U. Karst, M. Giesbers, A. T. M. Marcelis, A. Lazar, A. W. Coleman, D. N. Reinhoudt, B. J. Ravoo, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1171–1180.
- [29] A. R. Patel, C. W. Frank, *Langmuir* **2006**, *22*, 7587–7599.