

# Supramolekulare In-vitro- und In-vivo-Funktionalisierung von Biomembranen durch ein lipidiertes Coiled-Coil-Bindungsmotiv\*\*

Harshal R. Zope, Frank Versluis, Anita Ordas, Jens Voskuhl, Herman P. Spaink und Alexander Kros\*

Die molekularen Bausteine biologischer Systeme besitzen die Fähigkeit, sich durch Selbstorganisation in sehr kontrollierter Weise anzuordnen. Voraussetzung für dieses Verhaltens ist ihre Flexibilität und Adaption gegenüber der Umgebung, mit der sie ihre Funktionsfähigkeit bewahren. Um diese übergeordneten Strukturen zu stabilisieren, nutzt die Natur verschiedene schwache Wechselwirkungen (z.B. Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Wechselwirkungen) als intramolekularen „Klebstoff“. Das kooperative Zusammenwirken dieser Wechselwirkungen führt zu relativ stabilen Strukturen, die weiterhin die Fähigkeit haben, auf externe Stimuli wie Fluktuationen der Ionenkonzentrationen oder Änderungen des pH-Wertes und der Temperatur zu reagieren.

Seit vielen Jahren inspiriert die Natur die supramolekulare Chemie.<sup>[1]</sup> Chemiker entwickeln einfache Moleküle, die die Fähigkeit zur spontanen Selbstorganisation haben und zu funktionellen Materialien mit wohldefinierten Eigenschaften führen. Dieser Ansatz wird gemeinhin als Bottom-up-Ansatz bezeichnet.<sup>[2]</sup> Auf diese Weise wurde eine Vielzahl responsiver Materialien erhalten, die zusehends die Eigenschaft haben, die Natur zu imitieren. Ein neuartiger Ansatz ist der Einsatz supramolekularer Systeme in In-vitro- oder In-vivo-Umgebungen, um den Einfluss dieser Strukturen auf biologische Prozesse in einem lebenden Organismus zu untersuchen. Supramolekulare Systeme können beispielsweise in die Zellmembran eingefügt werden, was die Modifikation zellulärer Prozesse durch künstliche externe Stimuli ermöglicht.<sup>[3]</sup> Es gibt im Allgemeinen zwei Arten von Ansätzen, um mittels supramolekularer Chemie eine künstliche chemische Komponente in eine Zellmembran einzufügen: 1) spezifische Bindung von Gastmolekülen an membranverankerte Biomoleküle wie natürliche Proteine;<sup>[4]</sup> 2) unspezifische Markierung von Membranen durch hydrophobe und elektrostati-

tische Wechselwirkung oder durch chemisch verbrückende Moleküle.<sup>[5]</sup>

Lipidierte Peptide haben sich als hervorragende Kandidaten zur Anwendung in biologischen Systemen erwiesen, da ihr Aggregationsverhalten durch geschicktes Design und Ausbalancieren der Hydrophobie des Lipidankers und der Hydrophilie des zu transportierenden Peptids beeinflusst werden kann,<sup>[6]</sup> was zur effektiven Verankerung der lipidierten Peptide in die Biomembran führen kann.

Hier beschreiben wir die Verwendung eines Peptids mit Coiled-Coil-Motiv, das ein hochspezifisches Segment zur molekularen Erkennung in lebenden Zellen darstellen kann. Dieses Bindungsmotiv wirkt als spezifische Einheit zur Verbrückung wohldefinierter Strukturen.<sup>[7]</sup> Ein aktuelles Beispiel für den Einsatz von Coiled-Coil-Bindungsmotiven zur spezifischen Markierung von Proteinen wurde von Matsuzaki et al. vorgestellt.<sup>[8]</sup> Weiterhin wurde die Oberflächenmodifikation von Zellmembranen durch unspezifische Bindung von Polymeren durch Ijiro et al. untersucht.<sup>[9]</sup> Lipidierte Polymere binden an Zellmembranen und sind potentielle Materialien für eine Vielzahl möglicher Anwendungen an der Zelloberfläche. Kationische Copolymeren interagieren elektrostatisch mit der leicht negativ geladenen Zellmembran, was zu signifikant veränderten Membranen führt.<sup>[10]</sup> Diese hier beschriebenen Ansätze illustrieren den Einsatz supramolekularer Systeme in In-vitro-Membranen, jedoch gibt es bis dato nur wenige solcher Ansätze für die effiziente Modellierung von In-vivo-Membranen.

Unser Ziel war es, Lipidmembranen in vitro und in vivo mithilfe gerichteter und spezifischer supramolekularer Wechselwirkungen zu modifizieren. Hierfür wurde ein Paar komplementärer Coiled-Coil-bildender Peptide (E und K)<sup>[7a,11]</sup> eingeführt, um ein bioorthogonales, nichtkovalentes und spezifisches Bindungsmotiv in der Zellmembran zu etablieren (Schema 1).

Wir beschreiben hier einen allgemeinen supramolekularen Ansatz zur schnellen und effizienten Bildung eines Coiled-Coil-Bindungsmotivs an der Oberfläche von biologischen Membranen, der die Einführung einer Vielzahl molekulärer Funktionen ermöglicht. Die Coiled-Coil-bildenden Peptide E [(EIAALEK)<sub>3</sub>] und K [(KIAALKE)<sub>3</sub>]<sup>[12]</sup> wurden zunächst mit einer PEG<sub>12</sub>-Einheit (PEG = Polyethylenglykol) und dann mit einer Cholesteroleinheit substituiert, die als Lipidanker durch hydrophobe Wechselwirkungen an biologische Membranen binden kann. Dies führte zu den Peptiden CPE und CPK (Schema 1 A).<sup>[13]</sup> Die PEG-Kette wurde als Abstandhalter eingeführt, um eine effiziente Wechselwirkung der komplementären Peptide zu gewährleisten. Vor kurzem konnten wir bereits zeigen, dass micellare Lösungen der

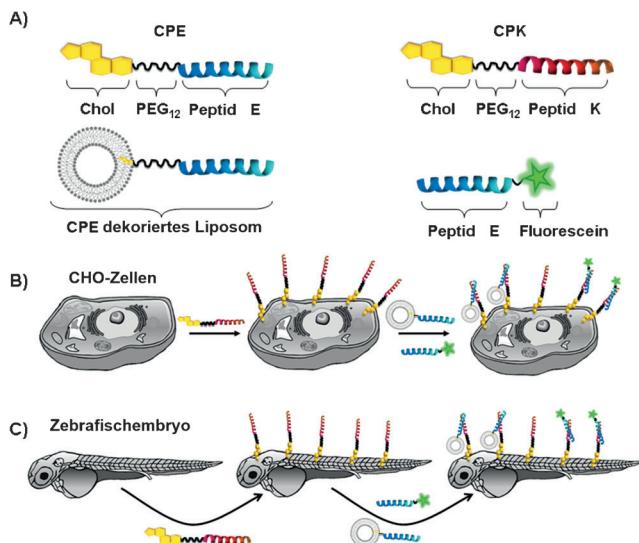
[\*] M. Sc. H. R. Zope,<sup>[+]</sup> M. Sc. F. Versluis,<sup>[+]</sup> Dr. J. Voskuhl, Dr. A. Kros  
Soft Matter Chemistry, Leiden Institute of Chemistry  
Leiden University  
P.O. Box 9502, 2300 RA Leiden (Niederlande)  
E-Mail: a.kros@chem.leidenuniv.nl

Dr. A. Ordas, Dr. H. P. Spaink  
Molecular Cell Biology, Institute of Biology, Leiden University  
P.O. Box 9502, 2300 RA Leiden (Niederlande)

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[\*\*] A.K., H.Z., F.V. und J.V. danken dem European Research Council (ERC) (Starting Grants), H.S. und A.O. danken dem Leiden University Fund (LUF). Wir danken Dr. A. Boyle für Anmerkungen zum Manuscript.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201306033> zu finden.

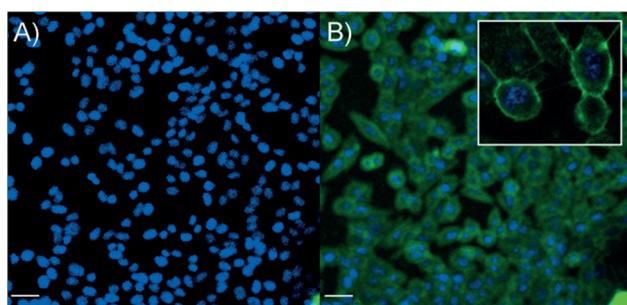


**Schema 1.** A) Aufbau der lipidierten Peptide E und K, eines CPE-dekorierten Liposoms und des fluoreszenzmarkierten Peptids E. B) Verankerung von CPE in die CHO-Zellmembran und Bildung des Coiled-Coil-Bindungsmotivs mit dem fluoreszenzmarkierten Peptid E oder mit CPE-dekorierten Liposomen. C) Verankerung von CPE in die Zellmembran von Zebrafischembryonen und Bildung des Coiled-Coil-Bindungsmotivs mit dem fluoreszenzmarkierten Peptid E oder mit CPE-dekorierten Liposomen. (Die Abbildung zeigt nicht die tatsächlichen Größenverhältnisse.)

Peptide CPE oder CPK spontan in die Membran von Liposomen insertieren.<sup>[13]</sup>

In der vorliegenden Studie wurden die Zellmembranen von CHO-Zellen (CHO = Chinese hamster ovarian) und von Zebrafischembryonen mit den Coiled-Coil-bildenden Peptiden durch die Zugabe micellarer Lösungen von entweder CPE oder CPK modifiziert. Dies führte zur spontanen Verankerung dieser Amphiphile in die Membranen, was in Anwesenheit des komplementären Peptids zur Bildung eines Heterodimers führte. Dieses System ermöglicht das Andocken einer Vielzahl von molekularen Strukturen (Schema 1 B und C).

In einem ersten Versuch wurde zunächst überprüft, ob der Cholesterin-Anker in die Zellmembran von CHO-Zellen insertiert werden kann. Hierzu wurde das mit Carboxyfluorescein markierte Peptid CPE (5  $\mu$ M) zu den Zellen gegeben und für einige Minuten inkubiert. Konfokalmikroskopie zeigte, dass alle Zellmembranen eine starke grüne Fluoreszenz aufwiesen, was auf eine Bindung der Cholesteroleinheit des Peptids in die Biomembran hinweist (Abbildung 1). Überraschenderweise wurde auch eine Internalisierung des CPE in die Zellen nachgewiesen, was in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Irvine et al. ist, die ein Dialkylipid ( $C_{18}$ ) und Cholesterin zur Verankerung von Oligonukleotiden nutzten.<sup>[14]</sup> Diese lipidierten Oligonukleotide konnten nach einer Inkubationszeit von etwa 30 min in der Membran verankert werden, wohingegen unsere lipidierten Peptide CPE und CPK in weniger als 5 min eine ähnliche Distribution zeigten. Eine Erklärung hierfür ist der stärkere anionische Charakter der Oligonukleotide, der zu einer elektrostatischen Abstoßung durch die negativ geladene Membran führen



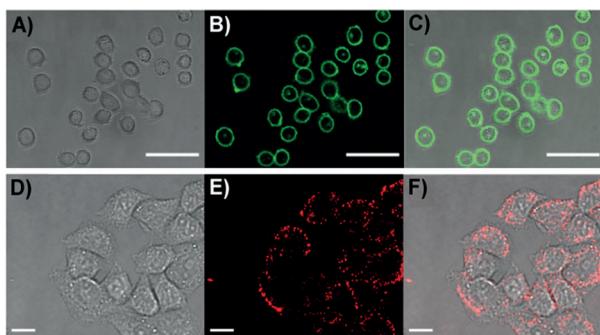
**Abbildung 1.** Konfokalmikroskopie von CHO-Zellen. Die Zellen wurden mit dem Zellkernfarbstoff Hoechst 30 min inkubiert und anschließend mit dem fluoreszierenden amphiphilen Peptid CPE bei 37°C inkubiert. A) 0 min und B) 10 min nach der Zugabe von CPE (5  $\mu$ M effektive Konzentration). Der Einschub ist ein vergrößerter Ausschnitt von (B) und zeigt eine schwache Internalisierung des Lipopeptids. Skalenbalken: 25  $\mu$ m.

kann. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Einführung einer langen PEG-Gruppe (PEG<sub>24</sub>) zwischen den Oligonukleotiden und dem Lipidanker zu einer verminderten Aufnahme in die Biomembran führte. Die von uns verwendete PEG<sub>12</sub>-Einheit zeigte keinerlei negativen Einfluss auf die Insertion der Amphiphile.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob immobilisierte Peptide an der Oberfläche der CHO-Zellen weiterhin für die Bildung von Coiled-Coils mit den komplementären Peptiden zugänglich sind. Hierzu wurden die Zellen 5 min mit CPK inkubiert, gefolgt von einem Waschvorgang mit HBSS-Puffer (Hank's balanced salt solution), um ungebundene, freie Amphiphile zu entfernen. Im Anschluss wurden die Zellen 10 min mit dem fluoreszierenden Peptid E (2.5  $\mu$ M Endkonzentration) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen angefertigt, die eindeutig eine grüne Fluoreszenz in den Zellmembranen aufzeigten (Abbildung 2). Als Kontrolle wurde das zuvor beschriebene Experiment wiederholt, jedoch wurde das amphiphile Peptid CPK weggelassen, und es wurde daraufhin keine signifikante Fluoreszenz in den Zellmembranen beobachtet (Hintergrundinformationen, Abbildung S1).

Diese Beobachtungen bewiesen klar die effiziente Bildung von Coiled-Coils zwischen dem membrangebundenen Peptid K und Peptid E. Weiterhin kann auch die umgekehrte Route gewählt werden, bei der zunächst Peptid E immobilisiert wird und mit Peptid K inkubiert wird. Diese Herangehensweise führte zu vergleichbaren Ergebnissen (Abbildung S2). Auch wurde in beiden Experimenten eine Internalisierung der lipidierten Peptide beobachtet, was deutlich zeigt, dass sowohl CPE als auch CPK die Eigenschaft haben die CHO-Zellmembran zu funktionalisieren.

Im Gegensatz dazu hatten Matsuzaki et al. in einer Protein-Engineering-Studie gefunden, dass eine Bildung der Coiled-Coils nur möglich ist, wenn Peptid E membrangebunden ist, jedoch nicht umgekehrt.<sup>[15]</sup> Weiterhin erlaubt unser System möglicherweise die Modifizierung von Zellmembranen verschiedener Zelllinien, ohne die Membranproteine durch komplizierte experimentelle Protokolle verändern zu müssen. Darüber hinaus ist unsere supramoleku-



**Abbildung 2.** A–C) Konfokalmikroskopische Aufnahmen (A: Lichtmikroskopie, B: Fluoreszenz, C: Überlagerung), die die Bildung von Coiled-Coils zwischen Peptid E und K an der Oberfläche von CHO-Zellen verdeutlichen. Zunächst wurde CPK in einer Endkonzentration von  $5 \mu\text{m}$  in HBSS zu den CHO-Zellen gegeben und für 5 min inkubiert, gefolgt vom fluoreszenzmarkierten Peptid E ( $2.5 \mu\text{m}$  Endkonzentration) und einer weiteren Inkubation für 5 min. Nach dreimaligem Waschen wurden die Bilder bei  $37^\circ\text{C}$  aufgenommen. Skalenbalken:  $50 \mu\text{m}$ . D–F) Konfokalmikroskopische Aufnahmen (D: Lichtmikroskopie, E: Fluoreszenz, F: Überlagerung), die das Andocken von Liposomen an die Oberfläche von CHO-Zellen verdeutlichen. Zunächst wurde CPK in einer Endkonzentration von  $5 \mu\text{m}$  in HBSS zu den CHO-Zellen gegeben und für 5 min inkubiert, gefolgt von CPE-dekorierten Liposomen ( $0.25 \text{ mM}$  Gesamtlipidkonzentration und 1% CPE und 1% DHPE-TR). Alle Experimente wurden bei  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt. Skalenbalken:  $25 \mu\text{m}$ .

lare Methode schnell und effektiv, da die erforderlichen Peptide in einem Tag hergestellt werden können, und sie ist somit signifikant schneller als ein Protein-Engineering von Membranproteinen.

Diese Vorversuche haben klar demonstriert, dass Inkubieren mit einem Cholesterol-substituierten Peptid und dem entsprechenden komplementären Peptid zur Bildung von Coiled-Coils an der Oberfläche von CHO-Zellen führen kann. Dieses System ermöglicht das Andocken verschiedenster Moleküle und Nanopartikel an die Zellen. Vor kurzem wurde gezeigt, dass Liposomen einer Größe von  $100 \text{ nm}$  mithilfe dieses Systems auf Glas und Siliciumoberflächen immobilisiert werden können.<sup>[16]</sup>

Daher war es von großem Interesse, ob auch Liposomen über ein Coiled-Coil-Bindungsmotiv an die Oberfläche von Zellen andocken können. Hierzu wurde anstelle eines fluoreszierenden Peptids ein in fluoreszierenden Liposomen eingebundenes komplementäres Peptid eingesetzt (Abbildung 2). Nach der Membranfunktionalisierung mit CPK wurden die CHO-Zellen mit fluoreszierenden Liposomen (1 Mol-% DHPE-TR (Texas Red/1,2-Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin) und 1 Mol-% CPE) 5–10 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Die Bilder zeigen klar einen Fluoreszenzanstieg in den Zellmembranen und eine partielle Internalisierung. Zur Kontrolle wurde in einem äquivalenten Experiment das membrangebundene CPK weggelassen. Es konnte keine signifikante Fluoreszenz nachgewiesen werden. (Abbildung S3). Dieses Experiment zeigte eindeutig, dass große supramolekulare Strukturen mithilfe eines orthogonalen nichtkovalenten Coiled-Coil-

Bindungsmotiv an Membranen in einer In-vitro-Umgebung angebunden werden können.

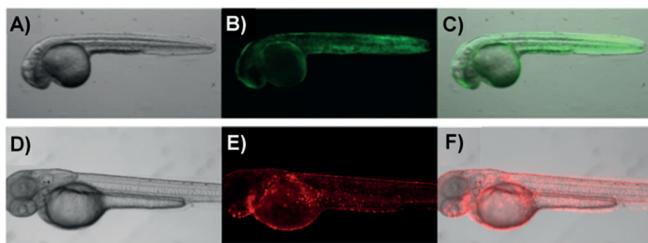
Diese Beobachtungen ermöglichen weitere Untersuchungen wie biophysikalische Studien und pharmazeutische Forschung. So besteht die Möglichkeit, modifizierte Zellen in Tiere zu injizieren, was zu einem zellbasierten Therapieansatz führen könnte.<sup>[17]</sup> Vorklinische Studien werden benötigt, um Innovationen vom Laboreinsatz hin zur klinischen Anwendung zu bringen. Aktuelle Restriktionen bezüglich der Anwendung von Tierversuchen führten zur Verwendung von Zebrafischen als alternatives Tiermodell für medizinische Untersuchungen. Zebrafische schlagen die Brücke zwischen zellbasierten Ansätzen und Tiermodellen.<sup>[18]</sup> Aufgrund der geringen Kosten, der optischen Transparenz und der hohen Reproduzierbarkeit stellen Zebrafischembryonen ein geeignetes System zur Entwicklung von Wirkstofftransporten für verschiedenste menschliche Krankheiten dar.<sup>[19]</sup>

Aus diesem Grund wurde untersucht, ob unser Coiled-Coil-System auch in Zebrafischembryonen funktioniert. Soweit wir wissen, wurde die Modifikation der Membran von Zebrafischen bisher noch nicht untersucht (Schema 1C). Eintägige Zebrafischembryonen wurden mit CPE in Eiwasser inkubiert. In einem zweiten Schritt wurde mit dem fluoreszenzmarkierten Peptid E weitere 30 min inkubiert, dreimal gewaschen und dann mikroskopisch untersucht. Es wurde eine signifikante Fluoreszenz an der Oberfläche der Zebrafische beobachtet, was auf eine spezifische Coiled-Coil-Bildung *in vivo* hinweist. Ein Kontrollexperiment ohne CPK zeigte keine signifikante Fluoreszenz (Abbildung S4). Diese Beobachtungen belegen eindeutig, dass CPK effizient in die Zebrafischmembran eingelagert wird und für die Bildung eines Coiled-Coils zur Verfügung steht.

Interessanterweise wurde eine Funktionalisierung des gesamten Zebrafischembryos beobachtet. Dies ist darin begründet, dass die Epidermis des Zebrafischembryos ausschließlich aus lebenden Zellen besteht und keine toten keratisierten Zellen vorhanden sind.<sup>[20]</sup>

Entsprechend der In-vitro-Experimente wurde versucht, die Reihenfolge der Peptide umzukehren. So wurde zunächst mit CPE inkubiert, gefolgt vom fluoreszenzmarkierten Peptid K. Interessanterweise wurde bei dieser Reihenfolge keine signifikante Fluoreszenz beobachtet, was mit den zellbasierten Experimenten kontrastiert. Zu erklären ist dieses Verhalten mit einer anderen Zusammensetzung der Fischmembran, von der bekannt ist, dass sie größere Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthält,<sup>[21]</sup> die das positiv geladene Peptid K gegenüber Peptid E bevorzugen. Jedoch sind weitere Untersuchungen notwendig, um das unterschiedliche Verhalten der Peptide E und K in CHO-Zellen und an der Oberfläche von Zebrafischen genauer zu verstehen.

Als finales Experiment wurde untersucht, ob ein Andocken von Liposomen an die Oberfläche von Zebrafischembryonen in gleicher Weise wie auch für die CHO-Zellen möglich ist. 2 Tage alte Embryonen wurden selektiert und zunächst 30 min bei  $34^\circ\text{C}$  mit CPE inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Embryonen gewaschen und 30 min mit CPE-dekorierten fluoreszierenden Liposomen inkubiert ( $0.25 \text{ mM}$  Gesamtlipidkonzentration mit 1% CPE und 1% DHPE-TR).



**Abbildung 3.** A–C) Coiled-Coil-Bildung zwischen CPK und fluoreszenzmarkiertem Peptid E an der Oberfläche von eintägigen Zebrafischembryonen. Die Embryonen wurden mit 5  $\mu\text{M}$  CPK vorinkubiert, gefolgt von 2.5  $\mu\text{M}$  des komplementären Peptids E in Eiwasser bei 34°C für 30 min. (A: Lichtmikroskopie, B: Fluoreszenz, C: Überlagerung). D–F) Andocken von Liposomen an die Oberfläche von Zebrafischembryonen durch Bildung von Coiled-Coils. Mikroskopische Aufnahmen von vorinkubierten Embryonen (5  $\mu\text{M}$  Endkonzentration an CPK in Eiwasser), gefolgt von einer Inkubation für 30 min bei 34°C mit fluoreszierenden Liposomen (0.25 mM Gesamtlipidkonzentration mit 1% CPE und 1% DHPE-TR). (D: Lichtmikroskopie, E: Fluoreszenz, F: Überlagerung). Die Embryonen sind in lateraler Sicht dargestellt.

Mikroskopische Aufnahmen zeigten eine starke Fluoreszenz an der Zebrafischmembran, was deutlich auf die Bindung der Liposomen und die Bildung des entsprechenden Coiled-Coil-Bildungsmotives hinweist (Abbildung 3D–F). Kontrollexperimente ohne CPK zeigten keine Fluoreszenz, was auf die Abwesenheit von Liposomen hinweist (Abbildung S5).

Zebrafische wurden als Modell für Studien einer Vielzahl infektiöser Krankheiten verwendet.<sup>[22]</sup> Der hier beschriebene Ansatz ermöglicht zukünftige Studien, in denen infizierte Zebrafische mit therapeutischen Liposomen auf einer supramolekularen Ebene therapiert werden können. Liposomen bestehen aus sowohl hydrophoben als auch hydrophilen Regionen, die eine Vielzahl von Einschlussmöglichkeiten von Wirkstoffen ermöglichen. Diese könnten somit als Transporter in Zebrafischembryonen verwendet werden. Zukünftige Studien werden ein Screening verschiedenster Wirkstoffe beinhalten, um ihren Einfluss auf eine große Anzahl von Krankheiten zu untersuchen.<sup>[23]</sup> Weiterhin ist es möglich, eine größere In-vivo-Selektivität in unser Modellsystem einzuführen. Beispielsweise könnten Aptamere kovalent an das lipidierte Peptid gekuppelt werden, oder es könnten gemischte Micellen (CPK + lipidiertes Aptamer) verwendet werden, um die Zell- und Organselektivität zu erhöhen. Eine technische Alternative wäre die Verwendung von automatisierten Mikroinjektionen der lipidierten Peptide oder der gemischten Micellen in die Zebrafischembryonen oder in die Hauptblutgefäße.<sup>[24]</sup>

Zusammenfassend haben wir ein allgemeines System für die schnelle und effektive Funktionalisierung von Zellen und Zebrafischembryonen entwickelt. Durch die Verwendung eines orthogonalen Coiled-Coil-bildenden Peptidpaars war es möglich, die Oberfläche von Zellen und Zebrafischen zu funktionalisieren. Die Methode ermöglicht das Andocken einer Vielzahl von Materialien in hoher lokaler Konzentration, wie durch das Anlagern von Liposomen in vitro und in vivo gezeigt wurde. Das hier beschriebene System stellt eine elegante und schnelle Methode zur supramolekularen Funktionalisierung von Biomembranen und zum Wirkstoff-

transport dar. Weiterhin ermöglicht es weitere biophysikalische Studien von biologischen Prozessen an Membranen.

Eingegangen am 11. Juli 2013,  
veränderte Fassung am 30. August 2013  
Online veröffentlicht am 8. November 2013

**Stichwörter:** Coiled-Coil · Membranen · Peptidamphiphile · Selbstorganisation · Supramolekulare Chemie

- [1] a) J. Voskuhl, B. J. Ravoo, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 495–505; b) D. A. Uhlenheuer, D. Wasserberg, C. Haase, H. D. Nguyen, J. H. Schenkel, J. Huskens, B. J. Ravoo, P. Jonkheijm, L. Bruns-veld, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6788–6794; c) R. V. Ulijn, A. M. Smith, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 664–675; d) M. A. Kostiainen, O. Kasyutich, J. Cornelissen, R. J. M. Nolte, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 394–399.
- [2] a) J. M. Lehn, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1347–1362; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 1304–1319; b) C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, *382*, 607–609; c) L. C. Palmer, S. I. Stupp, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1674–1684; d) R. P. Sijbesma, E. W. Meijer, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1999**, *4*, 24–32.
- [3] B. R. Peterson, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3607–3612.
- [4] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108–7133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.
- [5] a) J. H. Felgner, R. Kumar, C. N. Sridhar, C. J. Wheeler, Y. J. Tsai, R. Border, P. Ramsey, M. Martin, P. L. Felgner, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 2550–2561; b) F. Borcard, A. Godinat, D. Staedler, H. C. Blanco, A. L. Dumont, C. Chapuis-Bernasconi, C. Scaletta, L. A. Applegate, F. K. Juillerat, U. T. Gonzenbach, S. Gerber-Lemaire, L. Juillerat-Jeanneret, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1422–1432; c) D. Dutta, A. Pulsipher, W. Luo, H. Mak, M. N. Yousaf, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2423–2433.
- [6] F. Versluis, H. R. Marsden, A. Kros, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3434–3444.
- [7] a) A. L. Boyle, D. N. Woolfson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4295–4306; b) H. Gradišar, S. Božič, T. Doles, D. Vengust, I. Hafner-Bratkovič, A. Mertelj, B. Webb, A. Šali, S. Klavžar, R. Jerala, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 362–366; c) B. Apostolovic, M. Danial, H. A. Klok, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3541–3575; d) H. R. Marsden, A. V. Korobko, E. N. M. van Leeuwen, E. M. Pouget, S. J. Veen, N. Sommerdijk, A. Kros, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9386–9393; e) J. M. Mason, K. M. Arndt, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 170–176; f) W. A. Petka, J. L. Harden, K. P. McGrath, D. Wirtz, D. A. Tirrell, *Science* **1998**, *281*, 389–392.
- [8] Y. Yano, K. Matsuzaki, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2009**, *1788*, 2124–2131.
- [9] R. Kamitani, K. Niikura, T. Okajima, Y. Matsuo, K. Ijiro, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 230–233.
- [10] J. T. Wilson, V. R. Krishnamurthy, W. X. Cui, Z. Qu, E. L. Chaikof, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18228–18229.
- [11] a) H. Robson Marsden, A. V. Korobko, T. Zheng, J. Voskuhl, A. Kros, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2013**, *1*, 1046–1054; b) T. Zheng, J. Voskuhl, F. Versluis, H. R. Zope, I. Tomatsu, H. R. Marsden, A. Kros, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 3649–3651.
- [12] a) J. R. Litowski, R. S. Hodges, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 37272–37279; b) H. Robson Marsden, N. A. Elbers, P. H. H. Bomans, N. Sommerdijk, A. Kros, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2366–2369; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2330–2333; c) B. Apostolovic, S. P. E. Deacon, R. Duncan, H. A. Klok, *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 11–18; d) M. B. Hansen, W. P. R. Verduren, E. H. P. Leunissen, I. Minten, J. C. M. van Hest, R. Brock, D. Lowik, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2294–2297.

- [13] F. Versluis, J. Voskuhl, B. van Kolck, H. Zope, M. Bremmer, T. Albregtse, A. Kros, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8057–8062.
- [14] H. P. Liu, B. Kwong, D. J. Irvine, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7190–7193; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7052–7055.
- [15] Y. Yano, A. Yano, S. Oishi, Y. Sugimoto, G. Tsujimoto, N. Fujii, K. Matsuzaki, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 341–345.
- [16] J. Voskuhl, C. Wendeln, F. Versluis, E. C. Fritz, O. Roling, H. Zope, C. Schulz, S. Rinnen, H. F. Arlinghaus, B. J. Ravoo, A. Kros, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 12786–12790; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12616–12620.
- [17] M. T. Stephan, J. J. Moon, S. H. Um, A. Bershteyn, D. J. Irvine, *Nat. Med.* **2010**, *16*, 1035–1135.
- [18] S. A. Brittijn, S. J. Duivesteijn, M. Belmamoune, L. F. M. Berthens, W. Bitter, J. D. De Bruijn, D. L. Champagne, E. Cuppen, G. Flik, C. M. Vandenbroucke-Grauls, R. A. J. Janssen, I. M. L. De Jong, E. R. De Kloet, A. Kros, A. H. Meijer, J. R. Metz, A. M. Van der Sar, M. J. M. Schaaf, S. Schulte-Merker, H. P. Spaink, P. P. Tak, F. J. Verbeek, M. J. Vervoordeldonk, F. J. Vonk, F. Witte, H. P. Yuan, M. K. Richardson, *Int. J. Dev. Biol.* **2009**, *53*, 835–850.
- [19] C. Chakraborty, C. H. Hsu, Z. H. Wen, C. S. Lin, G. Agoramoothry, *Curr. Drug Metab.* **2009**, *10*, 116–124.
- [20] D. Le Guellec, G. Morvain Dubois, J. M. Sire, *Int. J. Dev. Biol.* **2004**, *48*, 217–231.
- [21] a) R. J. Henderson, D. R. Tocher, *Prog. Lipid Res.* **1987**, *26*, 281–347; b) M. Holtta-Vuori, V. T. V. Salo, L. Nyberg, C. Brackmann, A. Enejder, P. Panula, E. Ikonen, *Biochem. J.* **2010**, *429*, 235–242.
- [22] a) A. M. van der Sar, B. J. Appelmelk, C. Vandenbroucke-Grauls, W. Bitter, *Trends Microbiol.* **2004**, *12*, 451–457; b) G. J. Lieschke, P. D. Currie, *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 353–367.
- [23] R. Carvalho, J. de Sonneville, O. W. Stockhammer, N. D. L. Savage, W. J. Veneman, T. H. M. Ottenhoff, R. P. Dirks, A. H. Meijer, H. P. Spaink, *PLoS One* **2011**, *6*, e16779.
- [24] W. J. Veneman, O. W. Stockhammer, L. de Boer, S. A. J. Zaaij, A. H. Meijer, H. P. Spaink, *BMC Genomics*, **2013**, *14*, 255.