



# Durch Polymerase-Kettenreaktion erzeugte DNA-Peptid-Netzwerke als künstliche extrazelluläre Matrix

Alexander Finke<sup>+</sup>, Holger Bußkamp<sup>+</sup>, Marilena Manea und Andreas Marx\*

**Abstract:** Zellproliferation und Zelldifferenzierung in multizellulären Organismen werden unter anderem durch Signale der extrazellulären Matrix reguliert. Die Möglichkeit, eine extrazelluläre Matrix nachzuahmen, um bestimmte Zelltypen spezifisch zu erkennen, ist ein zentrales Konzept der Gewebezüchtung. Wir präsentieren ein neues DNA-basiertes Material mit Zellbindungseigenschaften, das durch kovalent gebundene DNA als Primer in einer PCR erzeugt wird. Mittels Klick-Chemie werden diese Primer mit dem cyclischen Peptid c(RGDfK) funktionalisiert. Es ist bekannt, dass c(RGDfK) vorwiegend an  $\alpha\beta$ 3-Integrine bindet, die beispielsweise auf Endothelzellen und Fibroblasten zu finden sind. Als kovalente Beschichtung auf Oberflächen zeigt dieses DNA-basierte Material in seinem unfunktionalisierten Zustand zellabweisende Eigenschaften. Nach Funktionalisierung mit c(RGDfK) entsteht Adhäsivität zu bestimmten Zellen. Solche Zellen bleiben dabei lebensfähig und können bei milden Bedingungen durch eine Behandlung mit DNase I abgelöst werden.

Multizelluläre Organismen müssen eine Vielzahl an Zellen und deren verschiedene Funktionen verwalten. Die Signalgebung zur Positionierung der Zellen und zum Informationsaustausch zwischen Zellen ist wichtig, um zelluläre Funktionen abzustimmen.<sup>[1]</sup> Die meisten Säugetierzellen binden an eine biologische Matrix, die extrazelluläre Matrix (EZM), die aus einem dichten Netzwerk unterschiedlichster struktureller und funktioneller Proteine besteht.<sup>[2]</sup> Die EZM überträgt Überlebenssignale an die Zellen<sup>[3]</sup> und ist darüber hinaus für die mechanische Stabilität von Bedeutung.<sup>[4]</sup> Zur Kultivierung in vitro bedarf es künstlicher Substrate, an denen Zellen binden.<sup>[5]</sup> Ohne die Anbindung an eine Matrix tritt bei den meisten Säugetierzellen Apoptose auf.<sup>[2b]</sup> Üblicherweise verwendet man vorwiegend feste Materialien, wie Glas und Polystyrol, an denen Adhäsionsproteine oder Peptide angelagert sind, um eine Vielzahl von Zellen zu binden.<sup>[6]</sup> Das Peptidmotiv Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) ist einer der am besten beschriebenen und am häufigsten verwendeten Vertreter.<sup>[7]</sup> Seine Sequenz spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Zelladhäsion und kann in mehreren Proteinen, z. B. Fibronectin oder Laminin, gefunden werden.<sup>[3]</sup> Circa

die Hälfte aller Integrine, eine große Familie heterodimerer transmembraner Zellrezeptoren, erkennt dieses Peptidmotiv und stellt somit die Verbindung zur EZM her.<sup>[8]</sup> Die Selektivität zu bestimmten Integrinen kann durch die eingeschränkte Konformation cyclischer RGD-Verbindungen stark verbessert werden.<sup>[9]</sup> Das cyclische Peptid c(RGDfK) wird unter anderem genutzt, um an  $\alpha\beta$ 3-Integrine zu binden, die auf kanzerogenen Zellen, beispielsweise HeLa-Zellen, überexprimiert werden.<sup>[10]</sup> Des Weiteren bietet der Einbau zusätzlicher Aminosäuren neben RGD die Möglichkeit, das äußere Peptidgerüst durch Anheftung von Farbstoffen oder Festkörpern zu modifizieren.

Um den Anforderungen für die Bindung verschiedener Zelltypen gerecht zu werden, wäre ein programmierbares Material von Vorteil. Die Möglichkeiten, DNA-basierte Materialien über Watson-Crick-Basenpaarungsregeln zu programmieren<sup>[11]</sup> und modifizierte Nukleinsäuren mit geringem Aufwand zu synthetisieren, sowie die Fülle an verfügbaren Enzymen, die DNA manipulieren, macht die DNA zu einem höchst interessanten Kandidaten für die Verwendung als programmierbares Material. Beispiele hierfür sind Ansätze, bei denen Zellen an immobilisierten DNA-Nanostrukturen gebunden wurden, sei es über Oligonukleotid-versehere Zelloberflächen,<sup>[12]</sup> Protein-konjugierte DNA-Mikroarrays<sup>[13]</sup> oder strukturell anpassbare DNA/Protein-basierte Matrizen.<sup>[14]</sup>

Des Weiteren wurden Aptamere (Oligonukleotide, die spezifisch an Zielmoleküle binden) zur Herstellung von DNA-Hydrogelen genutzt, die zusätzlich auch Zellen anlocken.<sup>[15]</sup> Letztendlich führt die selektive Hybridisierung Oligonukleotid-modifizierter Oberflächen definierter Zelltypen zur Bildung präzise hergestellter Gewebe mit programmierter Zell-Zell- oder Zell-Oberflächen-Konnektivität.<sup>[16]</sup>

Hier zeigen wir die Ausarbeitung eines DNA-Netzwerk-basierten Materials, das mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hergestellt wurde. Das Konzept basiert auf verzweigten DNA-Strängen, die als Primer in der PCR dienen (Abbildung 1 A, 2 A). Wir zielen darauf ab, die Synthese von DNA-Netzwerken an Glasoberflächen durchzuführen, die mit verzweigten Primern funktionalisiert sind. Während der enzymatischen Reaktion wird erwartet, dass sich ein vielschichtiges DNA-Netzwerk auf der Oberfläche aufbaut (Abbildung 2 A). Das erhaltene Material ist ein Polymernetzwerk, das wässrig aufgeschwemmt werden kann und dadurch die Voraussetzungen eines Hydrogels erfüllt. Die Bindung von Wassermolekülen ist eine intrinsische Eigenschaft der DNA, die durch ihre Hydrathülle beeinflusst wird.<sup>[17]</sup>

Da die verzweigten Primermoleküle mit Fängermolekülen zur Zelladhäsion modifiziert sind, ahmen die funktionalisierten DNA-Netzwerke die EZM nach und ermöglichen

[\*] A. Finke,<sup>[+]</sup> Dr. H. Bußkamp,<sup>[+]</sup> Dr. M. Manea, Prof. Dr. A. Marx  
Fachbereich Chemie und Konstanz Research School  
Chemical Biology, Universität Konstanz  
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)  
E-Mail: andreas.marx@uni-konstanz.de  
Homepage: <http://www.chemie.uni-konstanz.de/~agmarx/>

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

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter:  
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201604687> zu finden.



werk-Erzeugung eine bessere Netzwerkanbindung an die Oberfläche.

In diesem Fall wurden wieder die gleichen Primer genutzt wie für die DNA-Netzwerke in Lösung. Während in Lösung ein unstrukturiertes PCR-Produkt erhalten wurde, führte die Festphasen-PCR zu einem DNA-Hydrogel, das über die Fläche ausgebreitet war. Die Anheftung von DNA wurde mit einer SYBR-Green-I-Färbung analysiert. Mittels eines Blaulicht-Transilluminators konnte grüne Fluoreszenz ausschließlich bei PCR mit verzweigten Primern auf funktionalisierten Glasplatten mit verzweigter DNA beobachtet werden (Abbildung 2 C).

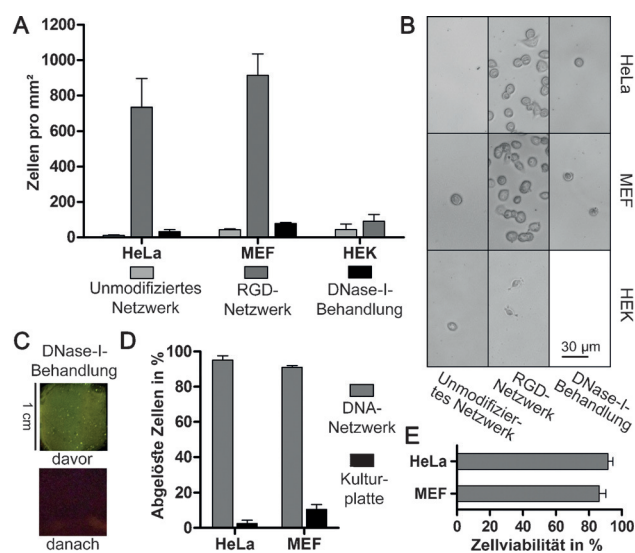
Danach untersuchten wir, ob die verzweigten Primer und die DNA-Netzwerke kompatibel mit CuAAC waren. Hierfür wurden Primer zunächst mit Cy5-Azid konjugiert und die Reaktion mittels Anionenaustauschchromatographie verfolgt (Abbildung S3). Nach 4 Stunden war die Reaktion abgeschlossen. Um herauszufinden, ob modifizierte Primer in die DNA-Netzwerke eingebunden werden, wurden verzweigte Primer mit azidofunktionalisiertem Biotin modifiziert.<sup>[21]</sup> Zusätzlich zur SYBR-Green-I-Färbung wurde die Entstehung biotinylierter DNA-Netzwerke mittels colorimetrischer Reaktion nachgewiesen, die bei Bindung des Konjugats aus Streptavidin und Alkalischer Phosphatase und der Behandlung mit einem geeigneten Chromogen auftrat. Die Farbentwicklung zeigte Biotin in DNA-Netzwerken, und dass Biotingruppen immer noch durch Proteine zugänglich sind (Abbildung 2 C).

Ermutigt durch diese Ergebnisse, stellen wir uns DNA-Netzwerke mit c(RGDfK)-Gruppen zur spezifischen Anheftung von Zellen vor. Wir synthetisierten **2** und konjugierten es an die verzweigten DNA-Primer mittels CuAAC, wie bereits mit Cy5-Azid durchgeführt. Schließlich wurden diese Primer verwendet, um die DNA-Netzwerke als Zellsustrat auf einer festen Oberfläche aufzubauen.

Im Folgenden untersuchten wir die Zellen auf DNA-modifizierten Oberflächen. Es wurden HeLa-Zellen und embryonale Fibroblasten von Mäusen (MEF-Zellen) gewählt, da sie bekanntermaßen an das RGD-Peptidmotiv binden.<sup>[19]</sup> Dies erfolgt über verschiedene Rezeptoren, wobei das  $\alpha\beta 3$ -Integrin die Hauptrolle zu spielen scheint.<sup>[22]</sup> Um die Spezifität unseres Vorgehens zu untersuchen, wählten wir des Weiteren als Zelltyp HEK 293T, das Berichten zufolge nicht an RGD-Motive binden soll.<sup>[23]</sup>

Um den Zellen unmodifizierte oder 2-funktionalisierte DNA-Netzwerke präsentieren zu können, wurden Glasplatten mit einer Kammer für das Medium versehen, in das die Zellen zum Adhärenz zugegeben wurden. Bevor man die Zellzahlen mittels Phasenkontrastmikroskopie bestimmte, wurden ungebundene Zellen durch Waschen mit PBS-Puffer entfernt. Abschließende SYBR-Green-I-Färbung bestätigte die Qualität der DNA-Netzwerke anhand der beobachteten grünen Fluoreszenz.

In allen Fällen adhären nur wenige Zellen an DNA-Netzwerk-basierte Hydrogele, die das Fängermolekül c-(RGDfK) nicht trugen.  $11 \pm 4$  HeLa-Zellen,  $43 \pm 5$  MEF-Zellen und  $45 \pm 31$  HEK-Zellen wurden pro  $\text{mm}^2$  gezählt (Abbildung 3 A,B, Durchschnitt  $\pm$  Standardfehler,  $n=4$ ). Dies zeigt, dass unmodifizierte DNA-Netzwerk-Hydrogele



**Abbildung 3.** A) Zellbindung auf DNA-Netzwerken. HeLa-, MEF- und HEK-Zellen wurden auf unmodifizierten und 2-modifizierten DNA-Netzwerken inkubiert. Ungebundene Zellen wurden durch Waschen mit PBS-Puffer entfernt, und die Zelldichte wurde mittels Phasenkontrastmikroskopie bestimmt. Auf unmodifizierter DNA wurden geringe Zelldichten für alle Zelltypen bestimmt, 11, 43 und 45 Zellen pro  $\text{mm}^2$  von links nach rechts. Zelldichte auf 2-modifizierter DNA war in gleicher Reihenfolge 734, 915 und 92 Zellen pro  $\text{mm}^2$ . Es zeigte sich eine hohe Zunahme für MEF- und HeLa-Zellen. DNase-I-Behandlung verringerte die HeLa- und MEF-Zelldichte auf jeweils 32 und 79 Zellen pro  $\text{mm}^2$ .  $n=4$ , Durchschnitt  $\pm$  Standardfehler. B) Repräsentative Bilder gebundener Zellen auf den DNA-Netzwerken. Phasenkontrastbilder von HeLa-, MEF- und HEK-Zellen, die an unmodifizierten und 2-modifizierten DNA-Netzwerken gebunden sind und die ungefähren Zelldichten wiedergeben. C) SYBR-Green-I-Färbung von DNA vor und nach Behandlung mit DNase I. D) Zellablösung nach Behandlung mit DNase I,  $n=4$ , Durchschnitt  $\pm$  Standardfehler. E: Lebensfähigkeit der DNase I behandelten Zellen,  $n=4$ , Durchschnitt  $\pm$  Standardfehler.

zellabweisende Eigenschaften besitzen. Verdeutlicht wird dies durch die unterbundene Zelladhäsion, die auf Glasplatten ohne DNA-Schicht auftritt (Abbildung S4). Dieses Merkmal ist vorteilhaft, da unspezifische Zellbindung auf ein Minimum verringert wird und nur zu vernachlässigende Auswirkungen auf spezifische Wechselwirkungen entstehen.

Auf 2-modifizierten DNA-Netzwerken wurden Zelldichten von  $734 \pm 162$  HeLa-Zellen pro  $\text{mm}^2$  und  $915 \pm 121$  MEF-Zellen pro  $\text{mm}^2$  beobachtet. Im Vergleich zu unmodifizierten DNA-Netzwerken erhöhte sich die Adhäsion um das 67-fache für HeLa und um das 21-fache für MEF-Zellen. Die anhaltende Zellbindung und Viabilität wurden noch nach 2 Tagen bestätigt. HEK-Zellen zeigten eine geringfügig bessere Adhäsion zu den modifizierten DNA-Netzwerken. Die absoluten Zellzahlen blieben jedoch vergleichsweise klein, mit einer zweifachen Erhöhung auf 92 Zellen pro  $\text{mm}^2$ . Dieses Ergebnis stimmt mit bereits publizierten Daten überein und zeigt, dass die Zelladhäsion durch Bindung von RGD an Integrine, z.B. an das  $\alpha\beta 3$ -Integrin, zustande kommt, welche eine hohe Affinität zu diesem Peptid haben. Bei HEK-Zellen führen die vorhandenen Integrine und deren Expressionsniveau jedoch nur zu einer schwachen Bindung an die Netzwerke.<sup>[24]</sup>



Neben der Anheftung von Zellen sollte mittels DNA-spaltenden Enzymen eine anschließende milde Ablösung ermöglicht werden. HeLa- und MEF-Zellkulturen, die an den DNA-Netzwerken gebunden waren, wurden daher DNase I ausgesetzt. Die Spaltung der DNA-Netzwerke nach Behandlung mit DNase I wurde über SYBR-Green-I-Färbung im Vorher-Nachher-Vergleich bestätigt (Abbildung 3C). Zellen lösten sich bereitwillig ab: nach Inkubation für 10 min blieben  $32 \pm 13$  HeLa-Zellen pro  $\text{mm}^2$  und  $79 \pm 6$  MEF-Zellen pro  $\text{mm}^2$ , was einer Ablöseeffizienz von  $95\% \pm 3\%$  HeLa- und  $91\% \pm 1\%$  MEF-Zellen entspricht. Dagegen lösten sich auf herkömmlichen Zellkulturplatten nur  $2.4\% \pm 1.9\%$  HeLa- und  $11\% \pm 3\%$  MEF-Zellen ab (Abbildung 3D). Diese Feststellung stützt die Überlegung, dass die Zellfreisetzung aufgrund des DNA-Verdaus einsetzt. Weiterhin konnten Zellen, die an DNA-modifizierten Glasplatten gebunden waren, erfolgreich auf Zellkulturplatten übertragen werden, auf denen nach anfänglicher Adhäsion die Proliferation fortgesetzt wurde. Zellbestimmung mittels Trypanblau-Färbung zeigte eine Zellviabilität von  $92\% \pm 5\%$  für HeLa- und  $86\% \pm 7\%$  für MEF-Zellen für die verwendeten DNase-I-Konzentrationen und Inkubationszeiten (Abbildung 3E). Die Toleranz der Zellen gegen DNase I qualifiziert diese als Reagenz für eine milde Zellablösung, die auch anderweitig in ähnlichen Untersuchungen verwendet wurde.<sup>[15,25]</sup>

Die Herstellung künstlicher EZM ist in den letzten Jahrzehnten zu einem aktiven Forschungsthema geworden.<sup>[26]</sup> Die EZM können unterschiedlich kategorisiert werden, z. B. unter Berücksichtigung ihrer Bausteine. Diese können von natürlichem Gewebe abgeleitet sein, wie Kollagen, oder synthetisch sein, wie z. B. Polyethylenglykol.<sup>[26]</sup> In unserem Ansatz verbinden wir natürliche Bausteine (z. B. DNA) auf synthetischem Wege miteinander. Synthetische Gerüststrukturen haben den offensichtlichen Mangel, dass es an Zellerkennungsmotiven fehlt, an die Zellen anheften können. Dieses Defizit haben wir behoben, indem wir das Anbringen von Fängermolekülen über bioorthogonale chemische Prozesse ermöglicht haben. Dadurch können die Eigenschaften und die Konzentration der präsentierten Fängermoleküle kontrolliert und verschiedene Zelltypen angesprochen werden. Weiterhin bietet die definierte Konjugation unseres Materials mit Fängermolekülen geringere Chargenvariabilität im Vergleich zu Proteingemischextrakten wie Matrigel.<sup>[27]</sup> Neben Zellbindungsmotiven haben auch mechanische Eigenschaften des Gerüsts einen Einfluss auf die Zellen. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass weiche Substrate die neurogene Differenzierung gegenüber der osteogenen Differenzierung fördern.<sup>[28]</sup> In anderen Fällen wurden poröse Materialien für kontrollierte Wirkmittelabgabe oder 3D-Zellkultursysteme für bessere Zellwechselwirkungen genutzt.<sup>[29]</sup>

Leider erlauben Porosität und Materialherstellung derzeit keine Zelleinkapselung, obwohl die Maschengröße der DNA-Netzwerke zu einem weichen und flexiblen Material führt. Im Unterschied zu den meisten erwähnten DNA-basierten Materialien ist unser Ansatz unabhängig von der DNA-Sequenz, da die Zellwechselwirkung über konjugierte Peptide hergestellt wird.<sup>[12–16]</sup> Viele andere DNA-basierte Vorgehen benötigen spezifische DNA-DNA-Wechselwirkungen, die ein

ausgeklügeltes Sequenzdesign erfordern, um unerwünschte Hybridisierung mit dem DNA-Gerüst zu vermeiden.

Zusammenfassend berichten wir über ein neues Hydrogel, basierend auf DNA-Netzwerken, die durch enzymatisches Verlängern und Verbinden von verzweigten Primern aufgebaut und auf festem Untergrund immobilisiert werden. Ergebnisse der Zellkulturexperimente zeigen einerseits zell-abweisende Eigenschaften der DNA-Netzwerke und ermöglichen die Beschichtung von festen Oberflächen zur Reduzierung unspezifischer Zellbindungen. Andererseits demonstrieren wir, dass durch die Modifizierung des DNA-Netzwerk-Hydrogels mit Fängermolekülen eine spezifische Zellbindung durch Wechselwirkung mit gewünschten Zelloberflächenmarkern ermöglicht wird. Des Weiteren können diese Zellen anschließend effizient mittels DNase I für weitere Benutzung in gutem Zustand abgelöst werden.

Selbst wenn der derzeitige Ansatz momentan wenig attraktiv für die Herstellung großer Mengen ist, wie bei Polyethylenglykol-basierten Materialien möglich,<sup>[30]</sup> ist er doch für kleinere, zielgerichtete Anwendungen gut geeignet. Zahlreiche Fragestellungen in Zusammenhang mit Zellstudien könnten mithilfe dieses DNA-basierten Materials, das mit unterschiedlichen bioaktiven Molekülen ausgestattet werden kann, angegangen werden. Zusätzlich zu Fängermolekülen für eine selektive Zellbindung könnte das Material auch mit kovalent gebundenen Wachstumsfaktoren versehen werden, um die Proliferation zu verbessern oder eine Differenzierung gebundener Zellen einzuleiten.<sup>[31]</sup>

## Danksagung

Wir danken der Baden-Württemberg Stiftung für finanzielle Förderung, der Konstanz Research School für ihre Unterstützung, und dem Bioimaging Center (Universität Konstanz) für den Gebrauch ihrer Anlagen. Weiterhin danken wir M. Scheffner (Universität Konstanz) für die Bereitstellung der HEK 293T- und HeLa-Zellen und C. R. Hauck (Universität Konstanz) für die MEF-Zellen.

**Stichwörter:** DNA · DNA-Nanotechnologie · Polymerase-Kettenreaktion · RGD-Integrin-Wechselwirkung · Zelladhäsion

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 10136–10140  
*Angew. Chem.* **2016**, 128, 10291–10295

[1] S. Huang, D. E. Ingber, *Nat. Cell Biol.* **1999**, 1, 131–138.

[2] a) P. Lu, V. M. Weaver, Z. Werb, *J. Cell Biol.* **2012**, 196, 395–406; b) M. W. Pickup, J. K. Mouw, V. M. Weaver, *EMBO Rep.* **2014**, 15, 1243–1253; c) G. A. Di Lullo, S. M. Sweeney, J. Körkkö, L. Ala-Kokko, J. D. San Antonio, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 4223–4231; d) A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, N. K. Karamanos, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2016**, 97, 4–27; e) R. Pankov, K. M. Yamada, *J. Cell Sci.* **2002**, 115, 3861–3863.

[3] E. Ruoslahti, M. Pierschbacher, *Science* **1987**, 238, 491–497.

[4] a) D. E. Discher, P. Janmey, Y.-I. Wang, *Science* **2005**, 310, 1139–1143; b) T. Yeung, P. C. Georges, L. A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Ming, V. Weaver, P. A. Janmey, *Cell Motil. Cytoskeleton* **2005**, 60, 24–34.

- [5] a) A. M. Ross, Z. Jiang, M. Bastmeyer, J. Lahann, *Small* **2012**, *8*, 336–355; b) D. G. Castner, B. D. Ratner, *Surf. Sci.* **2002**, *500*, 28–60; c) M. S. Liberio, M. C. Sadowski, C. Soekmadji, R. A. Davis, C. C. Nelson, *PLoS One* **2014**, *9*, e112122.
- [6] a) A. S. Curtis, J. V. Forrester, C. McInnes, F. Lawrie, *J. Cell Biol.* **1983**, *97*, 1500–1506; b) C. F. Amstein, P. A. Hartman, *J. Clin. Microbiol.* **1975**, *2*, 46–54.
- [7] F. Danhier, A. Le Breton, V. Preat, *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 2961–2973.
- [8] E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 697–715.
- [9] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461–7472.
- [10] a) D. Heckmann, H. Kessler, *Methods Enzymol.* **2007**, *426*, 463–503; b) L. Xiong, M. Yu, M. Cheng, M. Zhang, X. Zhang, C. Xu, F. Li, *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 241–243.
- [11] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- [12] K. Vogel, M. Glettenberg, H. Schroeder, C. M. Niemeyer, *Small* **2013**, *9*, 255–262.
- [13] a) S. Reisewitz, H. Schroeder, N. Tort, K. A. Edwards, A. J. Baeumner, C. M. Niemeyer, *Small* **2010**, *6*, 2162–2168; b) H. Schroeder, B. Ellinger, C. F. W. Becker, H. Waldmann, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4180–4183; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4258–4261.
- [14] a) F. A. Aldaye, W. T. Senapedis, P. A. Silver, J. C. Way, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14727–14729; b) A. Angelin, S. Weigel, R. Garrecht, R. Meyer, J. Bauer, R. K. Kumar, M. Hirtz, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15813–15817; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 16039–16043.
- [15] W. A. Zhao, C. H. Cui, S. Bose, D. G. Guo, C. Shen, W. P. Wong, K. Halvorsen, O. C. Farokhzad, G. S. L. Teo, J. A. Phillips, D. M. Dorfman, R. Karnik, J. M. Karp, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 19626–19631.
- [16] a) U. Vermesh, O. Vermesh, J. Wang, G. A. Kwong, C. Ma, K. Hwang, J. R. Heath, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7378–7380; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7516–7518; b) Z. J. Gartner, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 4606–4610.
- [17] a) E. M. Ahmed, *J. Adv. Res.* **2015**, *6*, 105–121; b) I. Brovchenko, A. Krukau, A. Oleinikova, A. K. Mazur, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 3258–3266.
- [18] a) R. Huisgen, *Proc. Chem. Soc.* **1964**, 385–434; b) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075.
- [19] K. M. Hodivala-Dilke, K. P. McHugh, D. A. Tsakiris, H. Rayburn, D. Crowley, M. Ullman-Cullere, F. P. Ross, B. S. Collier, S. Teitelbaum, R. O. Hynes, *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 229–238.
- [20] a) S. Keller, J. Wang, M. Chandra, R. Berger, A. Marx, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13188–13189; b) M. Chandra, S. Keller, C. Gloeckner, B. Bornemann, A. Marx, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 3558–3564; c) H. Bußkamp, S. Keller, M. Robotta, M. Drescher, A. Marx, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1037–1046.
- [21] Y. Wang, D. Rösner, M. Grzywa, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8159–8162; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 8298–8301.
- [22] M. Schottelius, B. Laufer, H. Kessler, H. J. Wester, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 969–980.
- [23] D. Zhou, G. Zhang, Z. Gan, *J. Controlled Release* **2013**, *169*, 204–210.
- [24] a) A. Taherian, X. L. Li, Y. Q. Liu, T. A. Haas, *BMC Cancer* **2011**, *11*, 293; b) A. Raj, P. Saraf, N. M. Javali, X. Li, B. Jasti, *J. Drug Targeting* **2014**, *22*, 518–527.
- [25] K. Barker, S. K. Rastogi, J. Dominguez, T. Cantu, W. Brittain, J. Irvin, T. Betancourt, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2016**, *27*, 22–39.
- [26] B. S. Kim, I. K. Park, T. Hoshiba, H. L. Jiang, Y. J. Choi, T. Akaike, C. S. Cho, *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36*, 238–268.
- [27] C. S. Hughes, L. M. Postovit, G. A. Lajoie, *Proteomics* **2010**, *10*, 1886–1890.
- [28] Y. S. Pek, A. C. A. Wan, J. Y. Ying, *Biomaterials* **2010**, *31*, 385–391.
- [29] H. Geckil, F. Xu, X. H. Zhang, S. Moon, U. Demirci, *Nanomedicine* **2010**, *5*, 469–484.
- [30] S. J. Bryant, G. D. Nicodemus, I. Villanueva, *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 2379–2386.
- [31] a) V. H. Fan, K. Tamama, A. Au, R. Littrell, L. B. Richardson, J. W. Wright, A. Wells, L. G. Griffith, *Stem Cells* **2007**, *25*, 1241–1251; b) K. Tashiro, G. C. Sephel, B. Weeks, M. Sasaki, G. R. Martin, H. K. Kleinman, Y. Yamada, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 16174–16182.

Eingegangen am 13. Mai 2016

Online veröffentlicht am 13. Juli 2016