

# Weiche Hydrogelpartikel als mechanische Kohlenhydratsensoren\*\*

Daniel Pussak, Daniela Ponader, Simone Mosca, Salomé Vargas Ruiz, Laura Hartmann\* und Stephan Schmidt\*

Affinitätsbiosensorsysteme basierend auf Oberflächenplasmonenresonanz (SPR), Impedanzspektroskopie oder Quarzkristallmikrowaagen (QCM) sind heute Standardwerkzeuge in der Wirkstoffforschung.<sup>[1]</sup> Der Vorteil dieser markierungsfreien Methoden liegt in ihrer hohen Selektivität ohne Verfälschung der gemessenen Bindungsaffinität, etwa durch Fluoreszenzmarkierungen. Hauptziele der aktuellen Forschung in diesem Bereich sind die Entwicklung noch kostengünstigerer Sensoren, ein erhöhter Probendurchsatz und verbesserte Sensitivität. Aktuelle Screeningmethoden zeigen Limitierungen vor allem für polare, niedermolekulare Analyten, da hierbei das Messsignal, etwa die Änderung des Brechungsindex (SPR) in Wasser, sehr klein ist. Kohlenhydrate sind ein wichtiges Beispiel dieser Analytklasse, die allerdings durch eine geringe Affinität zu ihren Rezeptoren charakterisiert sind<sup>[2]</sup> und so die Messung zusätzlich erschweren. Ein tieferes Verständnis der Kohlenhydrat-Wechselwirkung ist jedoch von großem Interesse, um die biomedizinische Forschung, insbesondere die Entwicklung zuckerbasierter Arzneimittel<sup>[3]</sup> oder die Diagnostik von Pathogenen,<sup>[4]</sup> voranzutreiben. Kräftebasierte Methoden wie die Rasterkraftmikroskopie (AFM) oder optische Fallen könnten hierfür die nötige Sensitivität und auch Informationen über die Art der Wechselwirkung (spezifisch/unspezifisch)<sup>[5]</sup> liefern. Eine Nutzung der Vorteile kräftebasierter Detektion für Affinitätsbiosensoren wäre daher erstrebenswert. Aufgrund des geringen Durchsatzes und hohen experimentellen Aufwands kräftebasierter Messtechniken wurde dieser Ansatz jedoch bisher nicht realisiert.

Wir beschreiben hier eine neue, einfach zu handhabende kräftebasierte Detektionsmethode, die einen hohen Durchsatz gewährleistet und leicht an verschiedene Analyten angepasst werden kann. Als Detektionsprinzip verwenden wir die mechanische Verformung von weichen Hydrogelsonden (SCP; soft colloidal probe), die durch spezifische Wechselwirkungen

an einer harten Oberfläche induziert wird. Mithilfe eines mechanischen Modells (JKR)<sup>[6]</sup> erhalten wir die Oberflächenenergie der SCP als Messsignal. Dies ist vergleichbar etwa zu den Resonanzfrequenzen, die man bei SPR oder QCM erhält. Die Messmethode wurde bislang zur Bestimmung von hydrophoben,<sup>[7]</sup> elektrostatischen<sup>[8]</sup> und Protein-Wechselwirkungen<sup>[9]</sup> eingesetzt, oder um mikroskopische Druckunterschiede zu bestimmen.<sup>[10]</sup> Wir erweiterten dieses Messprinzip und etablierten ein SCP-Screening-Assay für Kohlenhydratverbindungen. Im Folgenden beschreiben wir die Synthese von Ligand/Rezeptor-funktionalisierten SCP aus Polyethylenglykol(PEG)-Hydrogelen mit optimalen Materialparametern für die Kohlenhydraterkennung. Danach diskutieren wir den SCP-Screening-Assay am Beispiel verschiedener Kohlenhydrat-Analyten, variieren die Elastizität der Sonden und vergleichen die Ergebnisse mit SPR-Experimenten. Hierbei ist erwähnenswert, dass der SCP-Assay nicht nur auf Kohlenhydrate beschränkt ist, sondern an beliebige Ligand/Rezeptor-Paare angepasst werden kann.

In Analogie zu Affinitätsbiosensoren erlaubt die SCP-Methode direkte Bindungstests sowie Inhibitionstests nach folgendem allgemeinen Prinzip: Ligand- oder rezeptorfunktionalisierte SCP werden in Puffer dispergiert und sedimentieren auf einen Glasträger, der mit dem entsprechenden Bindungspartner der SCP-Oberfläche funktionalisiert ist. Bei Kontakt binden Liganden und Rezeptoren, adhären die SCP und formen eine charakteristische Kontaktfläche auf dem Glas (Abbildung 1 a,b). Hoch-deformierbare Hydrogele werden hinreichend große Kontaktflächen aufweisen, die man bequem mittels Mikrointerferometrie (RICM) vermessen kann, um daraus die Oberflächenenergie  $W$  zu bestimmen:

$$a^3 = 6\pi \frac{W}{E_{\text{eff}}} R^2 \quad (1)$$

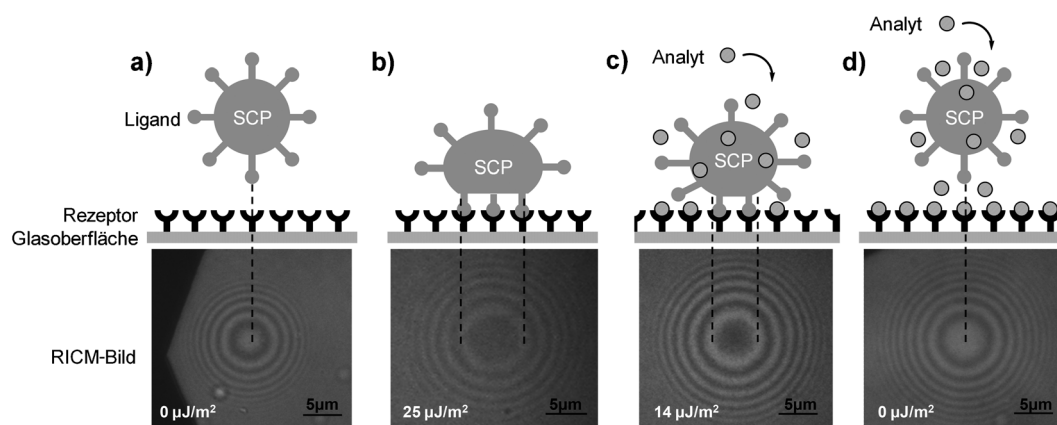
Hierbei ist  $a$  der Kontaktradius,  $R$  der Radius und  $E_{\text{eff}} = [4E/3(1-\nu^2)]$  der effektive Elastizitätsmodul der SCP ( $\nu$ : Poisson-Zahl,  $E$ : Elastizitätsmodul). Die so ermittelten Oberflächenenergien der SCP (Abbildung 1 b) entsprechen einem direkten Bindungstest, bei dem Rezeptor und Analyt auf der Glasoberfläche oder der SCP gebunden ist. Bei bekannter Dichte der Bindungspartner auf der Oberfläche kann die Ligand-Rezeptor-Bindungsenergie oder die spezifische (Bio-)Adhäsion auf Hydrogeloberflächen bestimmt werden. Dieser Test ist jedoch nicht für ein Hochdurchsatz-Screening geeignet, da jeder Analyt zunächst an eine der beiden Oberflächen gekuppelt werden müsste. Alternativ erhält man mithilfe von Inhibitionstests in Gegenwart von adhärenenden SCP (Abbildung 1 c,d) schnell und direkt die Analytaffinität.

[\*] D. Pussak, D. Ponader, S. Mosca, S. V. Ruiz, Dr. L. Hartmann, Dr. S. Schmidt  
MPI für Kolloid und Grenzflächenforschung  
Am Mühlenberg 1, 14424 Potsdam (Deutschland)  
E-Mail: laura.hartmann@mpikg.mpg.de  
stephan.schmidt@mpikg.mpg.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Emmy Noether-Programm HA5950/1-1 und SFB 765), das Center for Supramolecular Interactions (CSI) der Freien Universität Berlin und die Max-Planck-Gesellschaft finanziert. Die Autoren danken P. H. Seeberger, P. Fratzl, M. Harrington und T. Pompe für Unterstützung sowie J. Erath für Hilfe bei der Kalibrierung des RICM-Aufbaus.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201300469> zu finden.



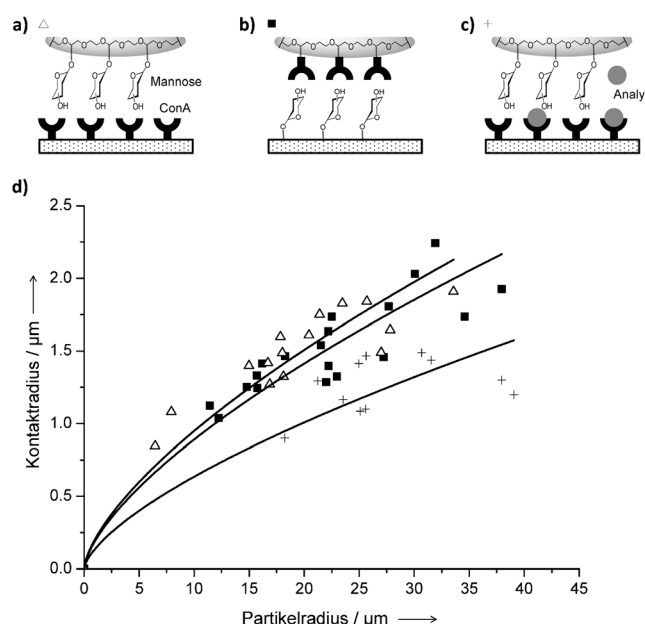
**Abbildung 1.** Allgemeines Prinzip: a) Die mit ligandfunktionalisierte Hydrogelsonde (SCP) und die rezeptorfunktionale Oberfläche kommen in Kontakt. b) Bei Kontakt werden Ligand-Rezeptor-Komplexe gebildet. Dies induziert die mechanische Verformung der SCP und Bildung der Kontaktfläche. c) Inhibitionstest nach Zugabe des Analyten und Bestimmung der Kontaktfläche bis d) die SCP nicht mehr an der Rezeptoroberfläche bindet. Die RICM-Bilder zeigen die Kontaktfläche (dunkle Fläche im Zentrum). Die obere Skizze ist nicht maßstabsgetreu, und die geometrische Übereinstimmung zwischen der Ligand- und Rezeptoroberfläche ist visuell idealisiert.

Zu den SCP hinzugegebene Analytmoleküle konkurrieren mit den Bindungen zwischen SCP und Glasoberfläche und inhibieren so die spezifische Adhäsion der SCP. In Abhängigkeit von Analytkonzentration und -affinität kommt es demzufolge zur Verkleinerung von Kontaktfläche und Oberflächenenergie (Abbildung 1 b–d). Wenn alle Bindungsstellen besetzt sind, löst sich die SCP komplett von der Oberfläche. Aus der Kontaktflächenänderung nach der Zugabe des Analyten erhält man so die inhibitorische Konzentration bzw. die Bindungsaffinität des Analyten.

Das allgemeine SCP-Messprinzip wurde dann am Beispiel von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen getestet. Als Referenz-Bindungspartner für den Inhibitionstest wurden der Ligand Mannose (Man) und der Man-spezifische Rezeptor Concanavalin A (ConA) gewählt. Hauptkriterien für robuste und sensitive SCP-Assays sind die Reduzierung unspezifischer Wechselwirkungen und eine hohe Deformierbarkeit (Weichheit) der Sonden. Diese Kriterien werden z. B. von PEG-Mikrogelen erfüllt, wie wir kürzlich zeigen konnten.<sup>[8]</sup> Für die Sondensynthese haben wir langkettige PEG-Makromonomere (8–20 kDa) verwendet und somit hochflexible Sonden mit Elastizitätsmodulen von 4–32 kPa erhalten (Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Durch die Verwendung von neutralen und inerten PEG werden unspezifische Wechselwirkungen der SCP minimiert, dies erschwert jedoch zugleich die Biokonjugation von Man oder ConA an die Hydrogelmatrix. Dieses Problem konnte durch radikalische Funktionalisierung des PEG unter UV-Einstrahlung gelöst werden.<sup>[11]</sup> Es konnten Carboxylgruppen eingeführt werden, an die anschließend Aminoethyl-Man bzw. ConA gekuppelt wurde (Abbildung S2).

Dementsprechend wurden zwei SCP-Systeme hergestellt a) Man-SCP (4, 15 und 32 kPa), die mit Man-Liganden konjugiert sind, und b) ConA-SCP (32 kPa), die mit ConA-Rezeptoren konjugiert sind (Abbildung 2 a,b). Homogenität und Biokonjugationsgrad der SCP wurden mithilfe von konfokaler Mikroskopie, ATR-FTIR und Aminosäureanalyse untersucht. Wir konnten zeigen, dass die Man-SCP etwa einen Man-Liganden pro 180 PEG-Wiederholungseinheiten prä-

sentierte und dass die ConA-SCP maximal mit ConA-Rezeptoren bedeckt ist – genauer  $3.6 \times 10^{16}$  ConA pro  $\text{m}^2$  (Abbildung S3). Der zweite Teil des SCP-Kohlenhydratsensors sind Glasoberflächen, die Man oder ConA als Bindungspartner zur SCP präsentieren. Entsprechend wurden durch Silanisierung zwei Glaträgersysteme hergestellt:<sup>[8]</sup> a) ConA-funktionalisierte Deckgläser und b) Man-funktionalisierte Deckgläser (Abbildung S4). Die Aminosäureanalyse der Deckgläser ergab eine nahezu dichteste Packung ( $4 \times 10^{15}$  ConA pro  $\text{m}^2$ )



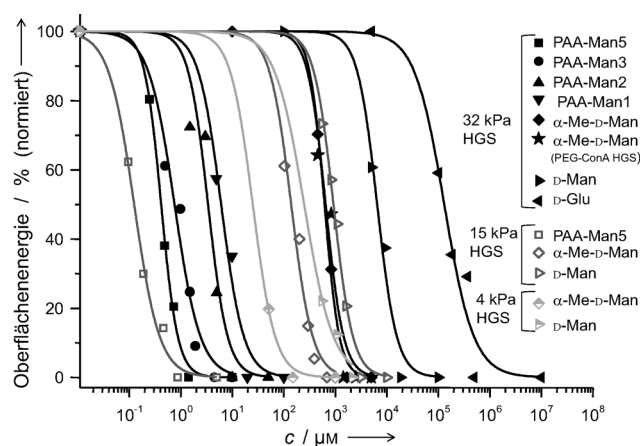
**Abbildung 2.** Die verschiedenen Versuchsanordnungen: a) SCP mit Man-Liganden und einer ConA-funktionalisierten Glasoberfläche b) SCP mit ConA und einer Man-funktionalisierten Glasoberfläche c) Zugabe eines Analyten. d) Kontaktradius in Abhängigkeit vom Partikelradius; die Oberflächenenergien  $W$  wurden durch Kurvenangleiche (durchgezogene Linien) von Gleichung (1) an die Messdaten ermittelt. ■: PEG-ConA,  $W = 21.3 \pm 1.7 \mu\text{J m}^{-2}$ ; △: PEG-Man,  $W = 25.8 \pm 2.3 \mu\text{J m}^{-2}$ ; +: PEG-Man,  $W = 7.3 \pm 1.4 \mu\text{J m}^{-2}$  (mit 833  $\mu\text{m}$   $\alpha$ -Methyl-D-mannose).

von kovalent bzw. Man-gebundenen ConA-Rezeptoren auf der Oberfläche.

Mit diesen Glaträgern und den 32-kPa-SCP wurden zunächst direkte Bindungstests durchgeführt und dabei zwei Messoptionen verglichen: a) Man-SCP gegen ConA-Oberflächen und b) ConA-SCP gegen Man-Oberflächen (Abbildung 2). Die SCP-Oberflächenenergie  $W$  wurde aus den Kontaktflächen auf der Glasoberfläche mittels RCM bestimmt (Abbildung S7). Dazu wurden die ermittelten Kontaktradien und SCP-Radien mit der Gleichung (1) gefittet (Abbildung 2d). Die Oberflächenenergie durch direkte Bindung von Man-SCP auf ConA betrug  $25 \pm 2 \mu\text{J m}^{-2}$ , bzw.  $21 \pm 2 \mu\text{J m}^{-2}$  für die ConA-SCP, die auf der Man-Oberfläche binden. Beide Messoptionen zeigen ähnliche Oberflächenenergien, was auf eine ähnliche Dichte der Bindungspartner hindeutet, wie bereits die Aminosäureanalyse zeigte. Ebenso ist die Methode unabhängig von der Positionierung der Bindungspartner (entweder auf SCP oder Glaträgern). Um die ermittelten Oberflächenenergien zu evaluieren, vergleichen wir sie mit ihrem theoretischen Maximum: Dabei nehmen wir an, dass alle ConA-Bindungstaschen auf der Oberfläche einen Man-Liganden mit einem Beitrag von  $5.2 \text{ kcal mol}^{-1}$  zur Oberflächenenergie binden. Nach den ermittelten ConA-Dichten läge das Maximum für die Oberflächenenergie bei  $290 \mu\text{J m}^{-2}$  und damit 10-mal höher als die gemessenen Werte. Die Differenz zwischen theoretischem und gemessenem Wert kann durch die Oberflächenrauigkeit in der Größenordnung von 3 nm und der nicht-idealen Verteilung der Bindungspartner erklärt werden: Die Man-Liganden haben einen ähnlichen, aber zufälligen Abstand im Vergleich zu den ConA-Bindungstaschen. Daher stimmen die Positionen der meisten Bindungspartner nicht vollständig überein, wodurch die Man/ConA-Wechselwirkungen zwischen den Oberflächen im Vergleich zum theoretischen Maximum abgeschwächt sind (Abbildung S5).

Die Spezifität der SCP-Bindung konnte durch Zugabe von kompetitiv bindenden Kohlenhydratliganden (z.B. 10 mM  $\alpha$ -Me-D-Man) gezeigt werden. Bei dieser Konzentration des kompetitiven Liganden binden die SCP nicht mehr auf den Oberflächen. Dies zeigt die hohe Spezifität der SCP-Glaträger-Interaktion. Wichtig hierbei ist, dass bei Hinzufügen niedrigerer Konzentrationen von  $\alpha$ -Me-D-Man bis zu 1 mM die SCP noch binden (Abbildung 2d, Kreuzmarkierung) und die Oberflächenenergie nur allmählich mit der Konzentration des zugegebenen Zuckers sinkt (Abbildung 3). Demzufolge werden die ConA-Rezeptoren nur teilweise inhibiert, in Abhängigkeit von Konzentration und Affinität der Liganden. Dies kann direkt durch den abnehmenden SCP-Kontaktradius bei Zugabe des Zuckers visualisiert und mithilfe der Oberflächenenergien quantifiziert werden.

Die konzentrationsabhängige Änderung der Oberflächenenergien ermöglicht SCP-Inhibitionsassays zur Affinitätsbestimmung der zugegebenen Zuckeranalyten. Dabei wird die Analytkonzentration variiert, die Änderung der Oberflächenenergie gemessen und daraus die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) als Maß für die Analytaffinität bestimmt. Die SCP-Methode wurde zuerst anhand verschiedener Monosaccharid-Analyten mit unterschiedlicher Affinität zu ConA getestet:  $\alpha$ -Me-D-Man, D-Man und D-Glu.



**Abbildung 3.**  $IC_{50}$ -Kurven für verschiedene Analyten, die die Man/ConA-Wechselwirkung inhibieren.

Alle Messungen wurden mit dem SCP-System in Abbildung 2a durchgeführt. Um den Einfluss der Flexibilität der PEG-Sonden auf die  $IC_{50}$ -Werte zu untersuchen, haben wir darüber hinaus die Elastizitätsmodule der SCP variiert (4, 15 und 32 kPa). Zunächst wurde die direkte Bindung zwischen Man-SCP und ConA-Oberflächen ohne Analyt als Referenz detektiert. Dann wurden die verschiedenen Analyten zugegeben und die Abnahme der Oberflächenenergie als Funktion der Analytkonzentration registriert (Abbildung 3).

Die so erhaltenen Inhibitionskurven wurden mit der Hill-Gleichung gefittet und die  $IC_{50}$ -Werte ermittelt. Um die  $IC_{50}$ -Werte untereinander und mit anderen Methoden vergleichen zu können, führen wir die „relative Affinität“ ein, die die Analyten mit der  $IC_{50}$  von  $\alpha$ -Me-D-Man in Beziehung setzt (Tabelle 1). Wie aus kalorimetrischen Studien erwartet,<sup>[12]</sup> zeigte  $\alpha$ -Me-D-Man die höchste, D-Man eine mittlere und D-Glu die geringste relative Affinität.

Um zu zeigen, dass der SCP-Assay auch in der Lage ist, strukturell komplexere Modellwirkstoffe zu charakterisieren, wurden multivalente Glykooligomere mit einem, zwei, drei und fünf Mannose-Einheiten als Analyt untersucht. Die Mannose-Einheiten werden auf einem monodispersen, sequenzdefinierten Oligo(Amidoamin) (PAA) konstanter Länge (2 kDa) präsentiert (entsprechend PAA-Man1, PAA-Man2, PAA-Man3, PAA-Man5).<sup>[13]</sup> Diese Strukturen weisen deutlich kleinere  $IC_{50}$ -Werte im mikromolaren Bereich auf und zeigen die schon aus vorangegangenen SPR-Untersuchungen bekannte Abhängigkeit der Affinität von der Anzahl der Man-Gruppen auf der PAA-Sequenz.<sup>[13]</sup> Es ist anzunehmen, dass diese multivalenten Verbindungen kooperativ binden, was üblicherweise aus der Steigung der Hill-Kurven abzulesen ist. Jedoch weist jede Kurve eine ungefähre Steigung von 2 auf, unabhängig von mono- oder multivalenter Man-Präsentation. Dies würde bedeuten, dass ein bindender, auch monovalenter, Analyt nicht nur eine einzelne Bindungstasche inhibiert, sondern auch die Wahrscheinlichkeit erhöht, eine benachbarte Bindungstasche von der SCP-Oberfläche zu lösen. Diese „kooperative Inhibition“ benötigt daher keine multivalenten, kooperativen Analyten, sondern ist schon durch die Inhibition einzelner Bindungen zwischen SCP-Man und ConA-Glasoberfläche gegeben. Des Weiteren

**Tabelle 1:** IC<sub>50</sub>-Werte und relative Aktivitäten normiert pro Man-Einheit des Kohlenhydratanalyten gemessen mit SCP und SPR.

Inhibitor	SPR <sup>[13]</sup> IC <sub>50</sub> [μM]	SCP-RICM <sup>[a]</sup> IC <sub>50</sub> [μM]	Relative Aktivität/Man
D-Glu	n.d.	1.3 × 10 <sup>5</sup> ± 1.9 × 10 <sup>4</sup>	0.005
D-Man	6500	6490 ± 500 (32 kPa SCP) 920 ± 36 (15 kPa SCP) 248 ± 81 (4 kPa SCP)	0.1 0.15 0.1
α-Me-D-Man	750	620 ± 20 (32 kPa SCP) 140 ± 12 (15 kPa SCP) 25 ± 2 (4 kPa SCP)	1 1 1
α-Me-D-Man <sup>[b]</sup>	750	650 ± 80	1
PAA-Man1	8	6.1 ± 0.7	101
PAA-Man2	5	3.4 ± 0.5	91
PAA-Man3	1	0.8 ± 0.1	258
PAA-Man5	n.d.	0.4 ± 0.1 (32 kPa SCP) 0.12 ± 0.02 (15 kPa SCP) < 0.05 (4 kPa SCP)	248 234 > 100

[a] Wenn nicht anders bezeichnet, wurden die Messungen mit 32-kPa SCP-durchgeführt. [b] Invertiertes System ConA-SCP vs. Man-Glasträger.

beobachteten wir eine Verringerung der IC<sub>50</sub> um den Faktor 25 bei Verringerung des Elastizitätsmoduls der SCP von 32 kPa auf 4 kPa. Dieser Effekt entsteht wahrscheinlich durch den erhöhten Entropiegewinn bei Ablösen der weichen, flexibleren PEG-Ketten von der Rezeptoroberfläche.<sup>[14]</sup>

Aus technischer Sicht ist es wichtig zu betonen, dass die relativen Affinitäten auch bei Variation des Elastizitätsmoduls der Sonden konstant sind und dass sie gut mit den Werten aus SPR-Messungen übereinstimmen (Tabelle 1).<sup>[13]</sup> Die Methode lieferte zudem reproduzierbare Ergebnisse und ist sehr robust auch bei wiederholten Messungen auf gewaschenen, regenerierten Glasträgern (Abbildung S6). Der SCP-Assay zur Bestimmung von Oberflächenenergien (direkter Bindungstest) ist jedoch optisch limitiert, da Änderungen des Kontaktradius kleiner als 0.5 μm prinzipiell nicht detektierbar sind. Durch Einsatz weicherer SCP konnten wir jedoch zeigen, dass die Auflösung der Methode signifikant verbessert werden kann. Es gelang die Darstellung von Hydrogelsonden mit 10-fach kleineren Elastizitätsmodulen (0.3 kPa) durch Verringerung der Initiatorkonzentration bei Vernetzung der PEG-Mikrogele. Mit diesen Sonden können Oberflächenenergien im Bereich 0.1 μJm<sup>-2</sup> detektiert werden. Damit läge das Detektionslimit noch unterhalb der Nachweisgrenze der Oberflächenkraftapparatur oder ähnlicher Methoden.

Insgesamt zeigte die SCP-Methode eine hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit insbesondere für Screeningassays mit Kohlenhydratanalyten. Im Vergleich zu den existierenden markierungsfreien Techniken ist zu betonen, dass die SCP-Methode keine aufwändigen Instrumente oder kostenintensive Verbrauchsmaterialien wie z.B. metallbedampfte Biochips benötigt. Des Weiteren zeigte die erfolgreiche Charakterisierung der Kohlenhydrate, dass die Methode auch für niedermolekulare Analyten mit wasserähnlichen Brechungsindizes gut geeignet ist.

Neben der Entwicklung neuer Wirkstoffassays ist das Themenfeld der biologischen Grenzflächen ein weiterer Einsatzbereich der Methode. In diesem Kontext seien neue theoretische Modelle erwähnt, die zeigen, dass die mechanische Flexibilität der Grenzfläche die Kooperativität spezifischer Bindungen beeinflusst.<sup>[15]</sup> In der Praxis beobachtet man zudem, dass die Elastizität der Matrix einen entscheidenden Einfluss auf die Adhäsion von Zellen hat.<sup>[16]</sup> Die Bindung der SCP auf Rezeptoroberflächen kann im Prinzip als ein stark reduziertes Zell-Matrix-Modellsystem betrachtet werden. In der Tat beobachteten wir einen deutlichen Einfluss des Elastizitätsmoduls der Hydrogele auf spezifische Bindung und inhibitorische Konzentration. Weitere SCP-Untersuchungen unter verbesserter Kontrolle der Ligand- und Rezeptordichten werden dazu beitragen, den Einfluss von mechanischer Flexibilität und Multivalenz auf die spezifische Adhäsion biologischer Grenzflächen besser zu verstehen.

Eingegangen am 18. Januar 2013,  
veränderte Fassung am 5. März 2013  
Online veröffentlicht am 25. April 2013

**Stichwörter:** Biologische Grenzflächen · Biosensoren · Glykopolymere · Mikrointerferometrie · Molekulare Erkennung

- [1] a) J. S. Daniels, N. Pourmand, *Electroanalysis* **2007**, *19*, 1239–1257; b) G. N. M. Ferreira, A.-C. da-Silva, B. Tomé, *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 689–697.
- [2] X. Q. Zeng, C. A. S. Andrade, M. D. L. Oliveira, X. L. Sun, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 3161–3176.
- [3] a) C. R. Bertozzi, L. L. Kiessling, *Science* **2001**, *291*, 2357–2364; b) H. Ghazarian, B. Idoni, S. B. Oppenheimer, *Acta Histochem.* **2011**, *113*, 236–247.
- [4] M. D. Disney, P. H. Seeberger, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1701–1707.
- [5] D. J. Müller, Y. F. Dufrène, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 261–269.
- [6] K. L. Johnson, K. Kendall, A. D. Roberts, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1971**, *324*, 301–313.
- [7] J. Erath, S. Schmidt, A. Fery, *Soft Matter* **2010**, *6*, 1432–1437.
- [8] D. Pussak, M. Behra, S. Schmidt, L. Hartmann, *Soft Matter* **2012**, *8*, 1664–1672.
- [9] V. T. Moy, Y. K. Jiao, T. Hillmann, H. Lehmann, T. Sano, *Biophys. J.* **1999**, *76*, 1632–1638.
- [10] J. Bünsow, J. Erath, P. M. Biesheuvel, A. Fery, W. T. S. Huck, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9803–9806; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9629–9632.
- [11] W. J. Lee, D. K. Choi, Y. Lee, D. N. Kim, J. W. Park, W. G. Koh, *Sens. Actuators B* **2008**, *129*, 841–849.
- [12] I. J. Goldstein, C. E. Hollerman, E. E. Smith, *Biochemistry* **1965**, *4*, 876–883.
- [13] D. Ponader, F. Wojcik, F. Beceren-Braun, J. Darnedde, L. Hartmann, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1845–1852.
- [14] a) M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908–2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794; b) C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Koks, J. Darnedde, C. Graf, E.-W. Knapp, R. Haag, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10622–10650; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10472–10498.
- [15] a) T. R. Weikl, M. Asfaw, H. Krobath, B. Rozycki, R. Lipowsky, *Soft Matter* **2009**, *5*, 3213–3224; b) C. Forrey, J. F. Douglas, M. K. Gilson, *Soft Matter* **2012**, *8*, 6385–6392.
- [16] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, D. E. Discher, *Cell* **2006**, *126*, 677–689.