



Multifunktionale Beschichtung verbessert Zelladhäsion auf Titan durch kooperativ wirkende Peptide

Mareen Pagel, Rayk Hassert, Torsten John, Klaus Braun[†], Manfred Wiesßler, Bernd Abel und Annette G. Beck-Sickinger*

In memoriam Klaus Braun

Abstract: Die Verbesserung der Zelladhäsion auf einer Biomaterialoberfläche ist entscheidend für den Langzeiterfolg eines Titanimplantats. Ein neues Konzept ist die Kombination aus sehr affiner und stabiler Adhäsion an Titanoberflächen mit spezifisch zellbindenden Motiven in einem Molekül. Ein L-3,4-Dihydroxyphenylalanin-haltiges Peptid wurde synthetisiert und auf seine Affinität für Titan untersucht. Die Modifizierung mit einem cyclischen RGD-Peptid und einem Heparin-Bindepeptid (HBP) gelang mittels einer effizienten Festphasenkombination aus einer Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf und einer Cu¹-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition. Darüber hinaus wurde das Peptid durch Thiol-Michael-Addition fluoreszenzmarkiert. Die Konjugation von RGD und HBP in einem Molekül führte zu verbesserter Ausbreitung, Proliferation, Viabilität und Entstehung eines gut ausgebildeten Aktinzytoskeletts sowie fokaler Adhäsionskomplexe von Osteoblast-ähnlichen Zellen.

Titan (Ti) ist das Material der Wahl für orthopädische und dentale Implantate, es können jedoch ungewünschte Prozesse wie Entzündung, Migration und Lockerung des Implantats aufgrund von ungenügender Osseointegration und unspezifischer Zelladhäsion auftreten.^[1] Peptidbeschichtungen, die von der extrazellulären Matrix abgeleitet sind, sollen die Biokompatibilität der Ti-Oberfläche optimieren sowie den spezifischen Kontakt zum umgebenden Gewebe stärken.^[2]

[*] M. Pagel, Dr. R. Hassert, Prof. Dr. A. G. Beck-Sickinger

Institut für Biochemie, Universität Leipzig
Brüderstraße 34, 04103 Leipzig (Deutschland)
E-Mail: abeck-sickinger@uni-leipzig.de

T. John, Prof. Dr. B. Abel

Leibniz-Institut für Oberflächenmodifizierung (IOM) und Wilhelm-Ostwald-Institut für Physikalische und Theoretische Chemie
Universität Leipzig
Permoserstraße 15, 04318 Leipzig (Deutschland)

Dr. K. Braun, Prof. Dr. M. Wiesßler

Deutsches Krebsforschungszentrum
Abteilung Medizinische Physik in der Radiologie
Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg (Deutschland)

Dr. R. Hassert

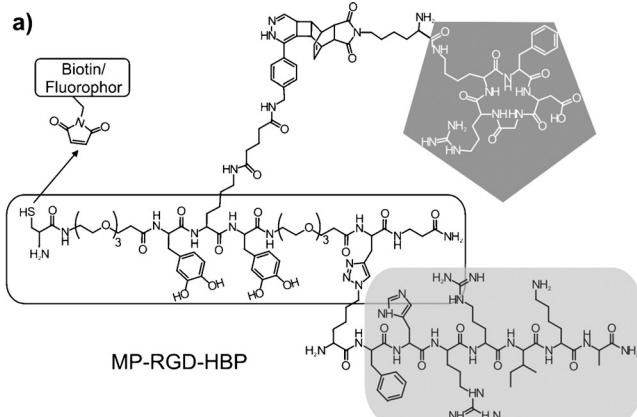
Aktuelle Adresse: Institut für Bioanalytische Chemie
Universität Leipzig
Deutscher Platz 5, 04103 Leipzig (Deutschland)

[†] Im August 2015 verstorben.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201511781> zu finden.

Cyclische Arg-Gly-Asp(RGD)-Pentapeptide sind hoch affin und spezifisch gegenüber bestimmten Integrinen und vermitteln starke Zelladhäsion.^[3] Zudem wurde berichtet, dass die Peptidsequenz FHRRIKA, die vom Bone Sialoprotein abgeleitet ist, an Heparansulfat-haltigen Proteoglykanen bindet und dadurch das Anwachsen von Zellen fördert.^[4] Integrin-vermittelte Zelladhäsion kann durch Proteoglykan-Wechselwirkungen unterstützt werden.^[5] Daher streben wir eine Kombination an, die c[RGDFK] und FHRRIKA benachbart zueinander in einem Molekül vereint, um Zell-Oberflächen-Wechselwirkungen zu stimulieren. Zur Verankerung dieser zellbindenden Peptide an der Titanoberfläche wird DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin) genutzt. Diese posttranslational modifizierte Aminosäure, die in von der Miesmuschel (*Mytilus edulis*) sekretierten Proteinen gefunden wurde, bindet an die oxidierte Titanoberfläche ohne weitere chemische Funktionalisierung und unter wässrigen Bedingungen.^[6] Die Synthese eines artifiziellen DOPA-haltigen Polymers oder Peptids mittels Festphasenpeptidsynthese (SPPS) erweitert die Möglichkeiten zur Einführung verschiedener bioaktiver Moleküle gegenüber der rekombinanten Expression eines Muschelproteins ungemein.^[7]

Hier wurde ein von der Muschel abgeleitetes Peptid (MP) synthetisiert, das zwei zellbindende Motive und starke Affinität zur Ti-Oberfläche (TiO₂) vereint (Abbildung 1). Zwei orthogonale Cycloadditionen – die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (DAR_{inv}) und die Cu¹-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) – wurden an fester Phase durchgeführt, um das TiO₂-affine Ankerpeptid mit c[RGDFK] und dem Heparin-Bindepeptid (HBP; Aminosäuresequenz: FHRRIKA; Abbildung 1) zu modifizieren. Bisher sind keine Peptide beschrieben worden, die mehr als ein Zellbindemotiv und starke Oberflächenaffinität in einem Molekül vereinen. Eine Voraussetzung für diese Kombination ist die stabile und direkte Immobilisierung von Biomolekülen, vorzugsweise ohne weitere, oft komplexe und zeitintensive Oberflächenfunktionalisierung.^[8] Es wird angenommen, dass die Adhäsion von DOPA an TiO₂ koordinativ ist und DOPA damit eine höhere Affinität und Stabilität unter wässrigen Bedingungen als Thiole oder basische Aminosäuren aufweist.^[9] Ein modulares Peptid (MP), das DOPA, funktionelle Gruppen und Spacer enthält, wurde hergestellt. Dabei wurde Polyethylenglycol (PEG) in das Peptidrückrat integriert, um die Löslichkeit und den Abstand der Funktionalitäten zu erhöhen. Die Bindekapazität von MP wurde mit einem kürzlich beschriebenen Biotin-ELISA-ähnlichen



b)

- MP** Muschelpeptid (MP): Cys-PEG-DOPA-Lys-DOPA-PEG-Pra- β Ala
- HBP** Heparin-Bindepeptid (HBP): Phe-His-Arg-Arg-Ile-Lys-Ala
- RGD** cyclisches Integrin-Bindepeptid (RGD): c[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys]

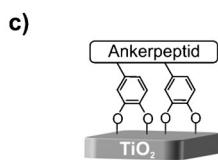


Abbildung 1. a) Struktur des adhäsiven Peptids MP-RGD-HBP. b) Das Konstrukt besteht aus drei funktionellen Peptiden. Das Ankerpeptid MP enthält DOPA für die Ti-Bindung, PEG-Einheiten und β -Alanin als Spacer sowie Pra, Cys und Lys für die Modifizierung. RGD und HBP werden für verbesserte Zelladhäsion eingesetzt. Die drei Peptide wurden modifiziert und ergeben durch die Ligation mithilfe zweier orthogonaler Cycloadditionen (CuAAC und DAR_{inv}) das multifunktionale Peptid MP-RGD-HBP. Das N-terminale Cys in MP wurde für die Markierung des Peptidkonstruktts mit Maleimid-modifizierter Biotin und Maleimid-modifizierten Fluorophoren genutzt. c) Koordinative Bindung von DOPA in MP (Ankerpeptid) an die natürlich oxidierte Titanoberfläche. d) Integrin- und Proteoglykan-vermittelte Zelladhäsion auf Ti durch MP-RGD-HBP.

Assay untersucht.^[10] Dabei wurden N-terminal biotinylierte Derivate genutzt (Abbildung 2a; **1–3**). Ein Peptid (**2**), das vom natürlich vorkommenden mefp-1 (*M.-edulis*-Fußprotein-1) abgeleitet ist, wurde als Positivkontrolle genutzt, um die adhäsiven Eigenschaften zu vergleichen.^[11] Konzentrations-Wirkungs-Kurven ergaben, dass das artifizielle Peptid MP (**1**; EC₅₀ = 23.6 nm, pEC₅₀ = 7.6 ± 0.1) mit ähnlicher Affinität wie das natürliche Peptid (**2**; EC₅₀ = 6.4 nm, pEC₅₀ = 8.2 ± 0.1), mit einer im nm Bereich beginnenden Sättigungsphase, bindet (Abbildung 2b). Stark verringerte adhäsive Eigenschaften resultierten aus einem Austausch von DOPA gegen Tyrosin (**3**; EC₅₀ > 10000 nm, pEC₅₀ > 4.6 ± 0.1). Dies unterstreicht die essenzielle Rolle der Catecholeinheit. Mithilfe von Rasterkraftmikroskopie (AFM) konnte die Sättigung der Titanoberfläche durch MP im nm Bereich bestätigt werden (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen). Darüber hinaus wurde die Bindungsstabilität der DOPA-haltigen Peptide (**1** und **2**) getestet. Nach Inkubation in Zellüberstand von SaOS-2-Zellen bei 37°C wurde verbliebenes Peptid auf Ti durch den

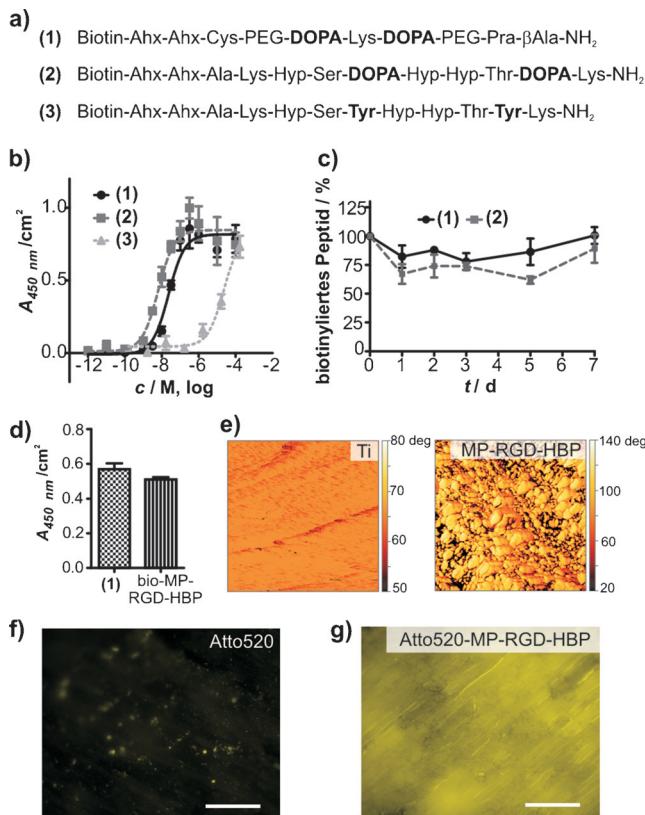


Abbildung 2. a) Sequenzen der von der Natur abgeleiteten (2, 3) und artifiziellen Peptide (1); Hyp = 4-Hydroxyprolin, Ahx = Aminohexansäure. b) Konzentrations-Wirkungs-Kurven des Biotin-ELISA-ähnlichen Assays. c) Stabilität der DOPA-haltigen Peptide auf Ti in SaOS-2-Zellüberstand bei 37°C für bis zu sieben Tage (7 d), die durch einen Biotin-ELISA-ähnlichen Assay ermittelt wurde. d) Biotin-ELISA-Assay von MP (1) und MP-RGD-HBP bei $c = 1 \mu\text{M}$. e) AFM-Phasenbilder ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$) von unbeschichtetem Ti und MP-RGD-HBP. f, g) Fluoreszenzmikroskopiebilder von f) Atto520 auf Ti und g) Atto520-MP-RGD-HBP auf Ti. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittels (SEM) aus $n \geq 2$ dargestellt.

Biotin-ELISA-ähnlichen Assay nachgewiesen. Wegen der starken und stabilen Wechselwirkung zwischen der Catecholseinheit und TiO_2 wurden in einem Zeitraum von sieben Tagen konstant mehr als 80 % des biotinylierten Peptids auf der Oberfläche detektiert (Abbildung 2c).^[12] Biotinyliertes MP-RGD-HBP führte zu einer MP-ähnlichen Oberflächenbedeckung, die mithilfe des Biotin-ELISA-ähnlichen Assays bei einer Konzentration von 1 μM erhalten wurde (Abbildung 2d). AFM-Aufnahmen bekräftigten zudem eine vollständige Peptidschicht von MP-RGD-HBP, den einfach modifizierten Konstrukten und MP (Abbildungen 2e, S2 und S3). Eine Inkubation der Ti-Oberflächen mit den Peptiden über Nacht, wie auch für die In-vitro-Tests durchgeführt, resultierte in einer dickeren Peptidschicht als bei zweistündiger Immersion (Abbildung S2). Die Markierung der Peptide durch Michael-Addition am N-terminalen Cys ermöglichte die Detektion der mit Peptid beschichteten Oberflächen durch Fluoreszenzmikroskopie. Eine gesättigte Oberfläche konnte für di- und monofunktionalisierte Konstrukte festge-

stellt werden (Abbildungen 2g und S4). Zudem konnte das fluoreszenzmarkierte Peptid nach Zelladhäsion als homogene Schicht detektiert werden (Abbildung S5).

Klick-Chemie in Kombination mit SPPS wurde genutzt, um das Ankerpeptid MP mit selektiv zelladhäsiven Motiven in einem Peptid zu funktionalisieren. Die Peptide können dadurch vor der Immobilisierung vollständig analysiert, sterilfiltriert und lyophilisiert gelagert werden. Mit der DAR_{inv} wurde ein cyclischer Integrinligand spezifisch an das TiO_2 -bindende Peptid konjugiert. Damit wird ein Spacer, der für effiziente Zelladhäsion notwendig ist, zwischen Anker- und RGD-Peptid generiert (Abbildung 3a).^[13] Dafür wurde das

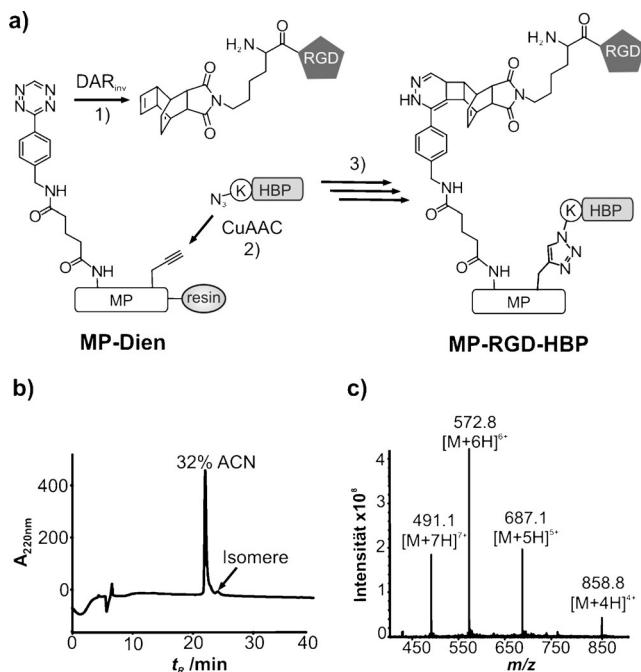


Abbildung 3. a) Reaktionsschema der DAR_{inv} und CuAAC; Reagentien und Bedingungen: 1) Wasser, RT, 5 h; 2) CuSO_4 , Tris(3-hydroxypropyltriaziolmethyl)amin (THPTA), Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) in Wasser, RT, 24 h; 3) das Peptid wurde vom Harz abgespalten. b) RP-HPLC-Chromatogramm und c) ESI-Ionenfallen-MS des gereinigten MP-RGD-HBP.

am Harz gebundene MP-Dien, das an der Lys-Seitenkette modifiziert ist, 5 h mit einer wässrigen Lösung von c[RGDFK(Dienophil)] inkubiert. Dabei konnten das gewünschte Konjugat MP-RGD und die entsprechenden Isomeren erhalten werden. Orthogonalität zwischen der DAR_{inv} und der CuAAC ermöglichte die weitere Modifizierung von MP-RGD, das L-Propargylglycin (Pra) als Alkineinheit enthält, mit einem Azid-modifizierten HBP. Die Seitenketten-schutzgruppen von DOPA verhinderten zudem die Oxidation der Catecholseinheiten zu einem weniger adhäsiven Chinon.^[14] Die Vollabspaltung des ligierten Peptids führte zum gewünschten Produkt mit einem Umsatz von 75% (Abbildung S6). Nach Isolierung des Peptids in einer Ausbeute von etwa 20% konnte das Produkt mit RP-HPLC sowie MALDI-ToF- (Abbildung S6) und ESI-Ionenfallen-Massenspektrometrie charakterisiert werden (Abbil-

dung 3b,c). Das Durchführen der Reaktion am polymeren Träger erleichtert die Synthese und erhöht die finale Ausbeute.

Um die Immobilisierungsfähigkeit der DOPA-haltigen Plattform MP zu testen, wurden Zelladhäsionsassays durchgeführt. Osteoblast-ähnliche Zellen (SaOS-2) wurden auf Titanplättchen, die durch Immersion in den Peptidlösungen beschichtet wurden, ausgesät und mit Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Zellviabilität und -proliferation wurden nach dreitägiger SaOS-2-Adhäsion getestet. Auf MP adhärierte Zellen zeigten vorwiegend eine sphärische Form mit schwach ausgebildetem Zytoskelett (Abbildung 4a). Zwei kurze PEG-

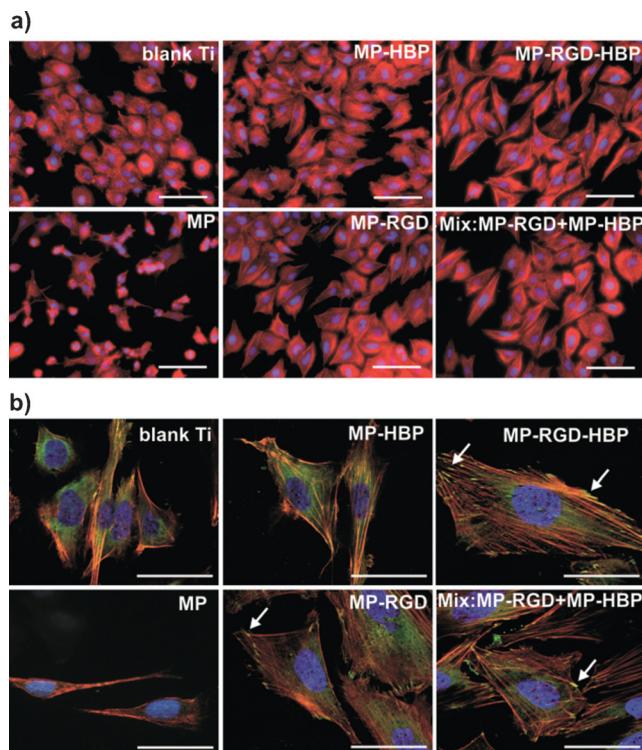


Abbildung 4. a) Zelladhäsion nach 6 h auf den synthetisierten Peptiden und unbeschichtetem Titan (blank Ti). Maßstab: 100 μm . b) Immunmarkierung der fokalen Kontakte, durch Pfeile kenntlich gemacht: Fluoreszenzmikroskopiebilder der Zellen nach 24 h. Das Aktinzytoskelett ist in Rot, der Nukleus in Blau und Vinculin in Grün angefärbt. Maßstab: 50 μm .

Einheiten in MP induzierten einen nicht toxischen und zell-abweisenden Effekt, der durch verringerte Zellausbreitung und Zahl der adhärierten Zellen, aber gleichzeitig auch höhere Viabilität und gemäßigt verbesserte Proliferation als auf unbeschichtetem Titan nachgewiesen wurde. Um die Hypothese des zellabweisenden Effekts zu überprüfen, wurde PEG durch Aminohexansäure-Spacer ersetzt, und tatsächlich wurde ein signifikanter Anstieg der Zellgröße – leicht höher als auf unbeschichtetem Titan – beobachtet (Abbildung S7). Dies bekräftigt die zellabweisenden Eigenschaften von PEG, die selektive Zelladhäsion unterstützen könnten.^[15] Die Konjugation von HBP und RGD an MP führte zu einer schrittweisen Verbesserung der Zelladhäsion (Abbildung 5).

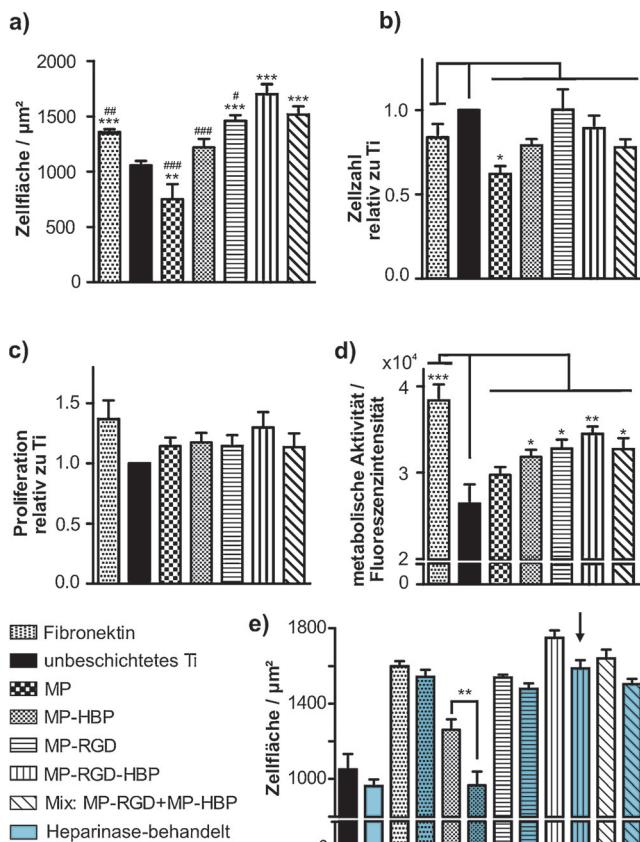


Abbildung 5. a) Durchschnittliche Zellfläche [signifikante Unterschiede zu unbeschichtetem Ti (*) und MP-RGD-HBP (#)] und b) Zellzahl normiert relativ zu unbeschichtetem Ti = 1 nach 6 h Adhäsion; durch Fluoreszenzmikroskopie ermittelt. c) Proliferation (BrdU-Assay) normiert relativ zu unbeschichtetem Ti = 1 und d) Viabilität (metabolische Aktivität durch einen Resazurinassay bestimmt) nach drei Tagen Zelladhäsion. e) Durchschnittliche Zellfläche nach 2 h Adhäsion von unbehandelten und Heparinase-I-behandelten Zellen (blau). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM aus $n \geq 3$ [signifikante Unterschiede wurden durch „one-way ANOVA“ (Newman-Keuls multipler Vergleichstest, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$) bestimmt].

Es konnte gezeigt werden, dass die Immobilisierung von HBP (FHRRRIKA) auf verschiedenen Oberflächen zu einer verbesserten Zelladhäsion führt. Diese wird vermutlich durch die Wechselwirkung zwischen Peptid und Proteoglykanen an der Zelloberfläche vermittelt.^[4a,16] Die hier gezeigten Daten unterstreichen diesen positiven Effekt von HBP, da Zellfläche, -größe und -viabilität gegenüber den entsprechenden Werten für die Plattform MP erhöht wurden. Noch bessere Resultate konnten durch die Beschichtung mit MP-RGD erzielt werden, da ein weiterer Anstieg von Zellfläche, -zahl und -viabilität ermittelt wurde.

Darüber hinaus wuchsen Zellen auf RGD-haltigen Beschichtungen in einer Fibroblast-ähnlichen Morphologie mit gut ausgebildeten Stressfasern an. Immunfluoreszenzfärbung von Vinculin zeigt die Akkumulierung von linienartigen fokalen Kontakten (in Grün), hauptsächlich an der Zellperipherie (Abbildung 4b). Dies ist essenziell für die Signal- und Mechanotransduktion inner- und außerhalb der Zelle.^[17] Eine Kombination aus HBP und RGD in einem Peptid (MP-RGD-

HBP) resultierte in der höchsten durchschnittlichen Zellfläche, statistisch signifikant zu Ti, Fibronektin, MP, MP-HBP und MP-RGD. Dies lässt eine kooperative Wirkung vermuten. Der additive Effekt zeigte sich weiterhin an einer verbesserten Viabilität und Proliferation, einem gut ausgebildeten Zytoskelett sowie der vermehrten Präsenz von fokalen Kontakten. Dies könnte damit erklärt werden, dass membrangebundene Proteoglykane als Corezeptoren für Integrine wirken, wie bereits für Syndekane beschrieben.^[5] Obwohl demonstriert werden konnte, dass Gemische bioaktiver Moleküle die Zelladhäsion verbessern können, zeigte die randomisierte Anordnung von RGD und FHRRRIKA auf mehreren Oberflächen verschiedene Resultate. Dies könnte auf nicht konsistente Immobilisierungsstärke, Distanz und Verteilung der zellbindenden Moleküle zurückgeführt werden.^[4a,16,18] Die hier beschriebene Strategie resultiert jedoch in einer starken Immobilisierung und in einer benachbarten Präsentation der beiden Zellbindepeptide, die zu einer additiven Verbesserung der Zelladhäsion führten. Weniger Einfluss auf die Adhäsion, Viabilität und Proliferation der Zellen wurde auf einem Gemisch von MP-RGD und MP-HBP ermittelt (Abbildung 5). Dies führt vermutlich zu einer zufälligen Verteilung der zellbindenden Moleküle, was wiederum in irregulären Abständen der Proteoglykane und Integrin-bindenden Bereiche resultiert. Zudem ist anzunehmen, dass in der Mischbeschichtung eine geringere Dichte der zellbindenden Motive als in einem zweifach funktionalisierten Peptid vorliegt. Ähnliche Effekte konnten für PHSRN in Kombination mit RGD gezeigt werden.^[19] Der Fakt, dass Proteine wie Fibronektin oder Vitronektin diese Sequenzen in einem definierten Abstand präsentieren, untermauert zudem die Vorteile des hier beschriebenen, difunktionalisierten Konstrukts.^[20] Additive Effekte von RGD und HBP konnten darüber hinaus auch in Experimenten mit den hier präsentierten Peptiden und einer Osteoblast-ähnlichen Vorläuferzelllinie (MG-63) beobachtet werden. Die Ausbreitung und Viabilität von MG-63-Zellen wurde additiv auf MP-RGD-HBP erhöht (Abbildungen S8 und S9). Um zu testen, ob dieser Effekt spezifisch ist, wurden Heparansulfat-haltige Transmembranproteoglykane mithilfe von Heparinase I abgebaut. Enzymatisch behandelte Zellen zeigten eine verringerte Zellgröße auf allen Oberflächen (Abbildungen 5e und S10). Wie erwartet, konnte jedoch eine weitere Verringerung auf allen HBP-haltigen Beschichtungen beobachtet werden. Heparinase-behandelte Zellen auf MP-RGD-HBP zeigten eine durchschnittliche Zellfläche, die vergleichbar mit der von Zellen auf MP-RGD ist, da der unterstützende Einfluss von HBP gestört ist. Dies lässt auf einen positiven kooperativen Effekt von HBP und RGD schließen. Eine weitere Untersuchung des Abstands zwischen HBP und RGD könnte helfen, den additiven Effekt zu optimieren, da bekannt ist, dass ein bestimmter Abstand zwischen zelladhäsiven Ligan- den wie RGD von großer Bedeutung für eine verbesserte Zelladhäsion ist.^[21]

Die hier gezeigten Daten unterstreichen die Vorteile einer multifunktionalen Beschichtung, die zwei Zellbindepeptide mit starker Oberflächenverankerung in einem Molekül vereint, um Osseointegration von orthopädischen und dentalen Implantaten zu fördern. Diese vielseitige Methode

erleichtert die zelluläre Untersuchung von chemisch gut charakterisierbaren, einfach und doppelt modifizierten Peptidkonstrukten.

Danksagung

Für finanzielle Unterstützung danken wir der DFG (TRR67, A4 und SFB-TR102, B1), der Europäischen Union und dem Freistaat Sachsen sowie der Graduiertenschule BuildMoNa. Wir sind zudem F. Dreher, K. Löbner, M. Tirdä, C. Dammann, R. Müller und R. Reppich-Sacher für technische Unterstützung sowie J. Salbach-Hirsch für Ratschläge dankbar.

Stichwörter: DOPA · Klick-Chemie · Oberflächenchemie · Peptide · Zelladhäsion

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 4826–4830
Angew. Chem. **2016**, *128*, 4907–4911

- [1] D. Schwartz-Arad, A. Laviv, L. Levin, *Implant Dent.* **2008**, *17*, 200–207.
- [2] a) A. Shekaran, A. J. Garcia, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2011**, *96*, 261–272; b) K. G. Sreejalekshmi, P. D. Nair, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2011**, *96*, 477–491.
- [3] a) R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461–7472; b) J. Auernheimer, D. Zukowski, C. Dahmen, M. Kantlehner, A. Enderle, S. L. Goodman, H. Kessler, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2034–2040.
- [4] a) A. Rezania, K. E. Healy, *Biotechnol. Prog.* **1999**, *9*, 19–32; b) J. R. Klim, L. Li, P. J. Wrighton, M. S. Piekarczyk, L. L. Kiessling, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 989–994.
- [5] M. R. Morgan, M. J. Humphries, M. D. Bass, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 957–969.
- [6] H. Lee, N. F. Scherer, P. B. Messersmith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 12999–13003.
- [7] a) D. S. Hwang, S. B. Sim, H. J. Cha, *Biomaterials* **2007**, *28*, 4039–4046; b) Q. Wei, K. Achazi, H. Liebe, A. Schulz, P. L. M. Noeske, I. Grunwald, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11650–11655; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 11834–11840; c) W. Tang, G. M. Policastro, G. Hua, K. Guo, J. Zhou, C. Wesdemiotis, G. L. Doll, M. L. Becker, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 16357–16367.
- [8] S. Sun, W. Yu, Y. Zhang, F. Zhang, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2013**, *24*, 1079–1091.
- [9] a) Y. Li, M. Qin, Y. Cao, W. Wang, *Langmuir* **2014**, *30*, 4358–4366; b) J. B. Schlenoff, M. Li, H. Ly, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12528–12536.
- [10] R. Hassert, M. Pagel, Z. Ming, T. Häupl, B. Abel, K. Braun, M. Wiessler, A. G. Beck-Sickinger, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 2129–2137.
- [11] C. M. Taylor, C. A. Weir, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1414–1421.
- [12] J. L. Dalsin, B. H. Hu, B. P. Lee, P. B. Messersmith, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4253–4258.
- [13] a) M. Kantlehner, P. Schaffner, D. Finsinger, J. Meyer, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, G. Holzemann, S. L. Goodman, H. Kessler, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 107–114; b) D. Pallarola, A. Bochen, H. Boehm, F. Rechenmacher, T. R. Sobahi, J. P. Spatz, H. Kessler, *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 943–956.
- [14] T. H. Anderson, J. Yu, A. Estrada, M. U. Hammer, J. H. Waite, J. N. Israelachvili, *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 4196–4205.
- [15] E. Wischerhoff, K. Uhlig, A. Lankenau, H. G. Börner, A. Lasczewsky, C. Duschl, J. F. Lutz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5666–5668; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5749–5752.
- [16] a) A. A. Sawyer, K. M. Hennessy, S. L. Bellis, *Biomaterials* **2007**, *28*, 383–392; b) M. Schuler, D. W. Hamilton, T. P. Kunzler, C. M. Sprecher, M. de Wild, D. M. Brunette, M. Textor, S. G. Tosatti, *J. Biomed. Mater. Res. Part B* **2009**, *91*, 517–527.
- [17] W. H. Goldmann, *Cell Biol. Int.* **2012**, *36*, 649–652.
- [18] X. Chen, P. Sevilla, C. Aparicio, *Colloids Surf. B* **2013**, *107*, 189–197.
- [19] C. Mas-Moruno, R. Fraioli, F. Albericio, J. M. Manero, F. J. Gil, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 6525–6536.
- [20] a) B. A. Dalton, C. D. McFarland, P. A. Underwood, J. G. Steele, *J. Cell Sci.* **1995**, *108*, 2083–2092; b) P. Brun, M. Scorzeto, S. Vassanelli, I. Castagliuolo, G. Palu, F. Ghezzo, G. M. Messina, G. Iucci, V. Battaglia, S. Sivolella, A. Bagno, G. Polzonetti, G. Marletta, M. Dettin, *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 6105–6115.
- [21] M. Arnold, E. A. Cavalcanti-Adam, R. Glass, J. Blummel, W. Eck, M. Kantlehner, H. Kessler, J. P. Spatz, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 383–388.

Eingegangen am 20. Dezember 2015
 Online veröffentlicht am 3. März 2016