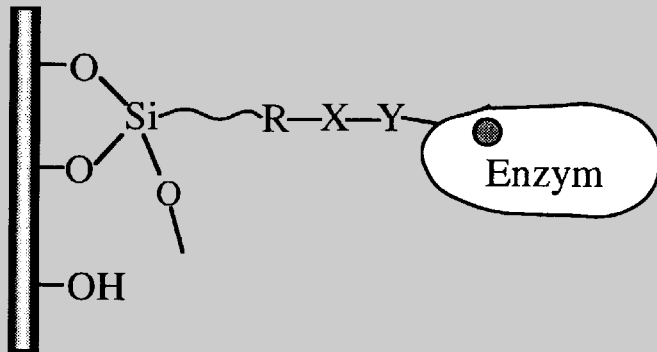
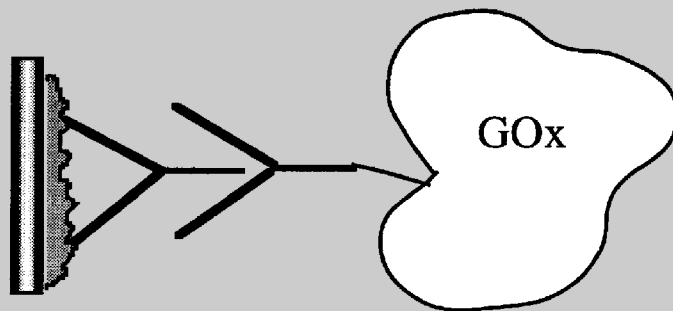


Enzymelektroden lassen sich auf mehrere Arten herstellen:

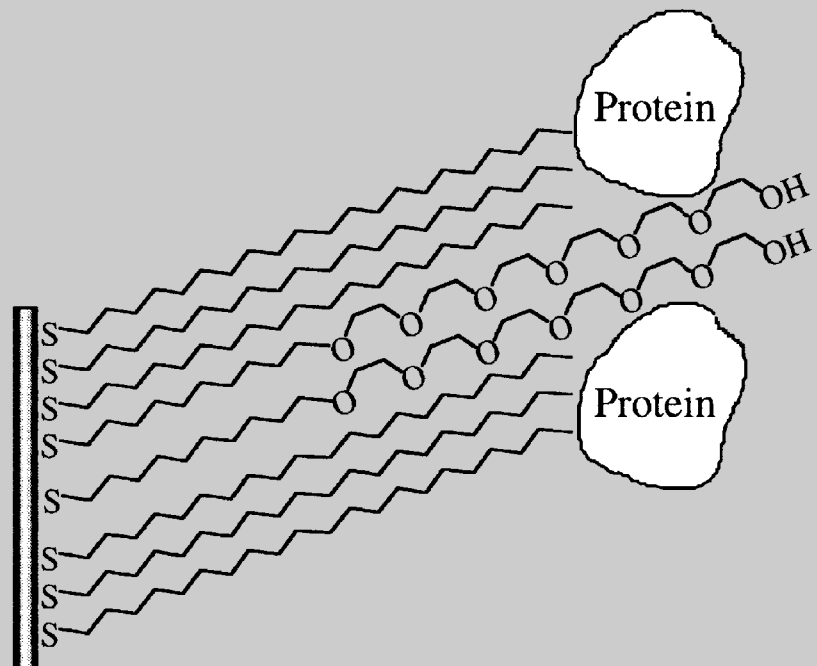


durch Bilden
konvalenter
Bindungen



mit Hilfe von
Affinitätswech-
selwirkungen

durch das Nutzen
von Wechselwirkungen
vom Typ hydrophil/
hydrophob



Redoxproteinschichten auf leitenden Trägern – Systeme für bioelektronische Anwendungen

Itamar Willner* und Eugenii Katz

Die Integration von Redoxenzymen und Elektrodenträgern und die Herstellung eines elektrischen Kontakts zwischen Biokatalysator und Elektrode bilden die Grundlagen von Bioelektronik und Optobioelektronik. Im Folgenden werden der wissenschaftliche Fortschritt beim Aufbau solcher mit einer Enzymschicht in elektrischem Kontakt stehender Elektroden und ihre denkbaren Anwendungen in bioelektronischen Geräten wie amperometrischen Biosensoren, Sensor-Arrays, Logikschaltungen und optischen Speichern erörtert. Des Weiteren werden Methoden zur Immobilisierung von Redoxenzymen auf Elektroden vorgestellt sowie das kovalente Anbinden von Proteinen, der Einsatz supramolekularer Affinitätskomplexe und die Rekonstitution von Apo-Redoxenzymen für das Mikrostrukturieren von Elektroden mit Proteinmono- und -multischichten diskutiert. Der elektrische Kontakt in Enzymelektroden wird durch diffundierende Elektronenvermittler wie Ferrocenderivate, Ferricyanid, Chinone oder

Bipyridiniumionen erreicht. Die kovalente Verknüpfung von Elektronenrelais mit der Enzymelektrode, die Vernetzung von Affinitätskomplexen aus Redoxprotein und als Relais fungierendem Cofaktor, mit dem die Elektrode funktionalisiert ist, oder die Oberflächenrekonstitution von Apoenzymen an derartig funktionalisierten Elektroden liefert bioelektrokatalytische Elektroden. Die Nutzung der funktionalisierten Elektroden als Biosensoren wird vorgestellt, und weitere Anwendungen von elektrisch „verkabelten“ Enzymen als katalytische Grenzflächen in Biobrennstoffzellen werden diskutiert. Des Weiteren werden Methoden zur Mikrostrukturierung von Biomaterialien auf festen Trägern (Musterprägung) behandelt, die für den Aufbau von Sensor-Arrays, selbstkalibrierenden Biosensoren und schaltbaren bioelektronischen Geräten erforderlich ist. Beispielsweise können lichtempfindliche Schichten aus Azid-, Benzophenon- oder Diazinderivaten auf festen Trägern durch eine Maske bestrahlt werden, um Biomaterialien

strukturiert kovalent mit der Oberfläche zu verknüpfen, oder es können nichtkovalente Wechselwirkungen (wie in Affinitätskomplexen zwischen Avidin und photomarkiertem Biotin oder zwischen Antikörper und photoisomerisierbarer Antigenschicht) zur Strukturierung genutzt werden; Muster aus hydrophilen und hydrophoben Domänen lassen sich mit Hilfe der Photolithographie, von Prägeverfahren oder Mikrobearbeitungsmethoden erzeugen. Photoaktivierbare Enzymelektroden dienen als photoschaltbare, optobioelektronische Systeme für die amperometrische Registrierung von Lichtsignalen, eignen sich also als optische Speicher, biomolekulare Verstärker und Logikschaltungen. Erzeugt werden sie durch Anknüpfen photoisomerisierbarer Gruppen an das Protein, durch Rekonstitution von Apoenzymen mit halbsynthetischen, photoisomerisierbaren Cofaktoren oder durch Verwendung photoisomerisierbarer Elektronenrelais.

1. Einleitung

Die Bioelektronik ist ein sich schnell entwickelndes Forschungsgebiet, das Chemie, Biochemie und Physik verbindet.^[1] Hauptmerkmale eines bioelektronischen Bauteils sind die Immobilisierung eines Biomaterials auf einem leitenden

oder halbleitenden Träger und die Umwandlung der biologischen Funktionen, die mit den biologischen Matrices verbunden sind, in elektronische Signale. Als Biomaterialien eignen sich Proteine, d.h. Enzyme,^[2] Rezeptoren,^[2a, 3] Antikörper und Antigene,^[4] Oligonucleotide und DNA-Fragmente^[5] sowie niedermolekulare Moleküle, die Affinitätswechselwirkungen mit anderen Biomaterialien eingehen, darunter Cofaktoren (z.B. NAD(P)⁺,^[6] Biotin^[7]) und Saccharide (Affinitätswechselwirkungen mit Lectinen^[8]). Die biologischen Reaktionen lassen sich vom Trägerelement in verschiedene elektronische Signale umwandeln,^[9a] darunter in elektrische wie Strom,^[9] Spannungsänderungen,^[9a, 10] Kapazi-

[*] Prof. I. Willner, Dr. E. Katz
Institute of Chemistry
Hebrew University of Jerusalem
Jerusalem 91904 (Israel)
Fax: (+972)2-6527715
E-mail: willnea@vms.huji.ac.il

tät^[11] oder Impedanz,^[12] piezoelektrische^[9a, 13] und die von Feldeffekttransistoren (FET)^[14] sowie andere.^[9a, 15]

In den am häufigsten untersuchten Systemen der Bioelektronik dienen Enzyme als bioaktive Grenzfläche. Die elektronische Registrierung von Enzym-Substrat-Wechselwirkungen ist eine allgemein verwendbare analytische Methode zur Detektion des jeweiligen Substrats. Die hohe Spezifität von Enzym-Substrat-Wechselwirkungen und die üblicherweise hohen Umsatzzahlen der Biokatalysatoren ermöglichen die Maßanfertigung von sensitiven und spezifischen Biosensoren auf Enzymbasis.^[16] Durch Aktivierung von Enzymen auf leitenden Oberflächen wird die Anwendung von Biokatalysatoren bei elektrisch gesteuerten Biotransformationen möglich (Elektrobiosynthese).^[17] So wurden photosensitive Enzyme^[18] und Proteine^[19] auf einer Elektrodenoberfläche durch Licht aktiviert und die empfangenen optischen Signale durch den Träger in elektrische umgewandelt. Wegen der hohen Umsatzzahlen der Enzyme ließen sich schwache optische Signale in Form verstärkter elektrischer Signale nachweisen.^[18b] Die Anwendungsmöglichkeiten solcher Systeme in optischen Speichern, optischen Bioschaltungen, elektronischen Schaltelementen und biologischen Strahlungsmessern wurden bereits diskutiert.^[20]

Bioelektronische Systeme, die andere Biogrenzflächen als Basis haben, z.B. DNA-Sensoren oder Immunosensoren, nutzen oftmals Enzyme als Sonden für den Nachweis biologischer Erkennungselemente,^[21] da die hohen Umsatzzahlen die effiziente Registrierung von Wechselwirkungen zwischen den Affinitätspaaren, die die Enzymfunktionen und den elektrischen Kontakt mit dem Elektrodenträger steuern, unter Signalverstärkung ermöglichen.

Der Aufbau eines enzymbasierenden bioelektronischen Systems erfordert die Integration von Biokatalysator und leitendem Träger, so dass die biokatalytische Transformation in ein elektronisches Signal umgewandelt werden kann (Ab-

bildung 1 A). Elektrische Veränderungen am Trägerelement als Folge des biokatalytischen Prozesses, d.h. der Substratabnahme oder der Produktbildung, ermöglichen die elektronische Registrierung des an der Elektrodenoberfläche ablaufenden Prozesses. Spannungsänderungen am leitenden Träger, die aus einer O₂-Abnahme,^[22] NH₃-Bildung oder CO₂-Entwicklung resultieren,^[23] sind beispielsweise elektronische Signale als Reaktion auf die jeweilige biokatalysierte Umwandlung. Bei der Entwicklung von Biosensoren wurde oftmals die amperometrische Detektion von enzymatisch erzeugten Produkten wie H₂O₂ genutzt (Abbildung 1 B).^[24]

Die direkte elektrische Aktivierung von Enzymen und insbesondere von Redoxenzymen ist ein gängiges Verfahren

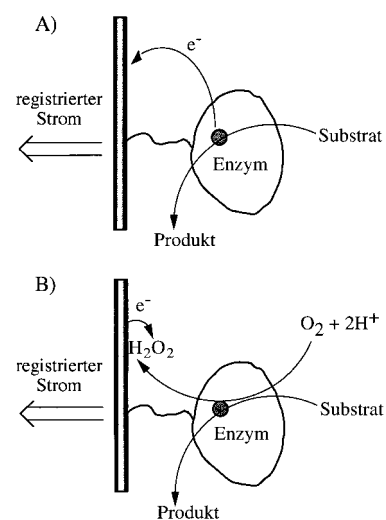


Abbildung 1. Integrierte Enzymelektroden für bioelektronische Anwendungen: A) Bioelektrokatalysierte Oxidation eines Substrats, B) elektrochemische Reduktion von H₂O₂, das bei der biokatalysierten Oxidation eines Substrats mit Sauerstoff gebildet wurde.

Itamar Willner wurde 1947 geboren und promovierte 1978 an der Hebrew University of Jerusalem in Chemie. Nach einem Postdoc-Aufenthalt bei M. Calvin an der University of California in Berkeley von 1978 bis 1981 ging er 1982 an das Institute of Chemistry der Hebrew University of Jerusalem. 1986 wurde er Professor an der Hebrew University. Er wirkt bei mehreren Zeitschriften in den Herausgebergremien und ist Träger des Kolthoff Award und des Max-Planck-Forschungspreises. Seine Forschungsinteressen umfassen lichtinduzierte Elektronentransferprozesse und die künstliche Photosynthese, molekulare Elektronik und Optoelektronik, Bioelektronik und Biosensoren, Optobioelektronik, supramolekulare Chemie, Nanochemie sowie Monoschichten und dünne Filme.



E. Katz



I. Willner

Eugenii Katz wurde 1952 in Moskau geboren und promovierte 1983 am Frumkin Institute of Electrochemistry in Moskau. Bis 1991 arbeitete er als Senior Scientist am Institute of Photosynthesis in Pushchino. 1991 forschte er als Postdoktorand an der Hebrew University of Jerusalem, und 1993 weilte er als Humboldt-Stipendiat an der Technischen Universität München. 1994 trat er in die Arbeitsgruppe von I. Willner als Senior Research Associate ein. Seine Forschungsinteressen umfassen die elektroanalytische Chemie, funktionalisierte Monoschichten, Biosensoren und die Bioelektronik.

zur Stimulation der bioelektrokatalysierten Oxidation (oder Reduktion) der Enzymsubstrate.^[25] Ist der Elektronenaustausch zwischen der Elektrode und dem Redoxenzym schnell, entspricht der resultierende Strom der Geschwindigkeit des Elektronenaustauschs zwischen Substrat und Biokatalysator. Daher spiegelt der Strom die Substratkonzentration im System wider. Die direkte elektrische Kommunikation zwischen Redoxproteinen (besonders Redoxenzymen) und Elektroden ist aber normalerweise gehindert.^[9] In der Elektronentransfertheorie^[26] ist die Geschwindigkeit des Elektronentransfers in einem Donor-Acceptor-Paar durch Gleichung (1) definiert; dabei ist ΔG° die Änderung der Gibbs-Energie, die

$$k_{\text{et}} \propto e^{-\beta(d-d_0)} e^{\frac{-(\Delta G^\circ + \lambda)^2}{4RT\lambda}} \quad (1)$$

durch den Elektronentransfer und die Generierung der Redoxprodukte zustande kommt, λ die Reorganisationsenergie, d_0 der Van-der-Waals-Abstand und d der tatsächliche Abstand zwischen Donor und Acceptor sowie β der elektronische Kopplungskoeffizient. Diese Gleichung macht deutlich, dass vor allem der Abstand zwischen Donor und Acceptor die Elektronentransfargeschwindigkeit bestimmt. Bei den meisten Redoxproteinen (Durchmesser 80–150 Å) sind die Redoxzentren tief im Protein eingebettet und damit elektrisch isoliert, d. h., Redoxenzymen (oder Proteinen), die mit einem Elektroden-Träger ein Donor-Acceptor-Paar bilden, fehlt der elektrische Kontakt mit dem Träger.

Die Bioelektronik braucht aber den elektrischen Kontakt zwischen Biomaterial und Elektrodenoberfläche. Eine Reihe bioelektronischer Geräte basiert auf einem solchen künstlich hergestellten Kontakt. In diesen Systemen werden die Biofunktionen der Proteine elektrochemisch gesteuert und durch den Elektronentransfer stimuliert.^[25] In anderen bioelektronischen Systemen wird die Störung des elektrischen Kontakts zwischen Redoxprotein und leitendem Träger zur Signalgebung genutzt.^[2, 16]

Zur Maßanfertigung bioelektronischer Systeme muss das Biomaterial auf dem festen leitenden Träger aufgebracht und eine geeignete elektronische Verbindung zwischen beiden Teilen hergestellt werden. Mehrere chemische Verfahren wurden zur Verankerung der Biomaterialien genutzt, darunter die Immobilisierung mit Hilfe von Polymeren,^[27] Membranen,^[28] Kohlenstoffpasten^[29] und Sol-Gel-Materialien.^[30] Der elektrische Kontakt mit dem leitenden Träger wurde über Redoxpolymere^[31] oder leitende Polymere hergestellt.^[32] Die Funktionalisierung fester Oberflächen durch Monoschichten aus organischen Verbindungen oder Biomaterialien ist seit mehr als zwei Jahrzehnten Gegenstand umfangreicher Forschungen.^[33] Ziel unserer Übersicht ist es, die chemischen Methoden zur Integration von Biomaterialien und elektronischen Umwandlerelementen zu behandeln; dabei werden wir insbesondere den Aufbau von Mono- und Multischichten aus Redoxenzymen, Redoxproteinen und halbsynthetischen Redoxbiokatalysatoren auf den Trägern erörtern und neueste Fortschritte bei der Integration und elektronischen Kopplung von Redoxproteinen und leitenden Oberflächen behandeln. Ein besonderer Schwerpunkt werden die aktuellen Methoden zur räumlichen Strukturierung von Biomaterial-Oberflächen und zur Erzeugung geordneter Pro-

tein-Nanostrukturen auf festen Trägern sein. Schließlich werden wir den Aufbau von optobioelektronischen Systemen diskutieren und die Aktivierung von Redoxproteinschichten auf Elektroden-Trägern durch Lichteinwirkung vorstellen. Dabei möchten wir die gegenwärtigen und künftigen Anwendungsmöglichkeiten solcher integrierten Systeme aus Proteinen und elektronischen Umwandlerelementen in der Bioelektronik und Optobioelektronik herausstellen. Man kann davon ausgehen, dass der rasche Fortschritt auf diesem Gebiet zu neuartigen Biosensoren, Biobrennstoffzellen und Computersystemen auf Biomaterialbasis sowie Logikschaltungen führen wird.

2. Oberflächenfunktionalisierung von Elektroden zur kovalenten Anknüpfung von Enzymen

Zur kovalenten Verknüpfung von Proteinen mit leitenden oder halbleitenden Trägern werden häufig funktionelle Gruppen an der Oberfläche des Trägers genutzt. Metalloxydmaterialien wie TiO₂ und SnO₂ enthalten Oberflächen-Hydroxygruppen, die für die Ankopplung von organischen Stoffen genutzt werden können.^[34] Bei den Edelmetallen (Au, Pt) konnten solche Oberflächen-Hydroxygruppen durch chemische^[35] oder elektrochemische Vorbehandlung^[36] generiert werden.^[37] Kohlenstoffelektroden tragen je nach chemischer Behandlung unterschiedliche funktionelle Oberflächengruppen (Carboxy-, Carbonylgruppen, Lactone, Hydroxygruppen usw.) zum Anheften von Proteinen.^[38] Um die Dichte von funktionellen Gruppen auf einer Graphitoberfläche zu steuern, wurden ein O₂-Plasma,^[39] starke Oxidationsmittel^[40] und die elektrochemische Oxidation^[41] eingesetzt. Durch Behandlung mit NH₃-Plasma wurden Aminofunktionen auf einer Graphitelektrode eingeführt.^[42] Einige andere Elektrodenmaterialien, z. B. p-InP, wurden durch spezielle chemische Behandlung funktionalisiert.^[43] Im Folgenden werden mehrere Wege zur Aktivierung fester Oberflächen für das kovalente Anknüpfen von Proteinen vorgestellt.

Cyanurchlorid (2,4,6-Trichlortriazin **1**) ist ein vielseitig verwendbares Reagens zur Aktivierung von Oberflächen und zur nachfolgenden Immobilisierung von Enzymen.^[44] Mit Hydroxygruppen funktionalisierte Elektrodenoberflächen wie Glaskohlenstoff, Pyrographit oder Metalloxyde, z. B. SnO₂, In₂O₃, TiO₂, reagieren mit **1** unter Bildung von O-substituierten Mono- und Dichlortriazin-schichten (Abbildung 2). Diese können wegen ihrer verbliebenen Chlor-substituenten mit den Amino- oder Hydroxysubstituenten von Lysin- bzw. Tyrosinresten eines Proteins reagieren. Die resultierende Protein-Monoschicht ist dann mit der Elektrode über eine einzige Verankerungsstelle oder auch über mehrere verbunden. Tabelle 1 gibt eine Zusammenfassung von Enzymen und Proteinen, die mit Triazin als Verbindungselement an Elektroden-Trägern verankert wurden.

Carboxy- oder Aminogruppen, die direkt an den leitenden Träger gebunden sind, können zur kovalenten Anknüpfung komplementärer Amino-Lysinsubstituenten bzw. der Carboxygruppen von Asparagin/Glutaminsäureresten genutzt werden. Beispielsweise führt die Oxidation von Kohlenstoffober-

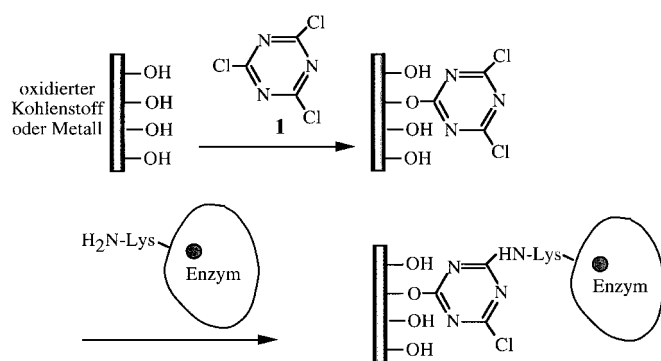


Abbildung 2. Aufbau von Enzymelektroden durch Funktionalisierung des leitenden Trägers mit Cyanurchlorid **1**.

flächen zu Oberflächen-Carboxygruppen,^[38a] die vor der Kupplung an das Protein mit Carbodiimid in aktive Ester,^[51] mit Thionylchlorid in Acylhalogenide^[52] oder mit einem Anhydrid in gemischte Anhydride^[53] umgewandelt werden (Abbildung 3A). Die Dichte der Carbonsäurereste auf der Elektrodenoberfläche ist ein wichtiger Parameter, um die Effektivität der kovalenten Anbindung des Proteins zu steuern. Man nimmt an, dass die Elektrodenoberfläche, die dem Platzbedarf des Proteinmoleküls entspricht, mindestens zehn Carbonsäurereste enthalten muss, um eine effiziente Kupplung des Proteins zu erreichen.^[24b] Ein durchschnittlicher Abstand von ca. 5 Å zwischen den Oberflächen-Carboxygruppen wurde durch deren Markierung und nachfolgende Röntgenstrukturanalyse bestimmt.^[54] Nach dem Abscheiden einer Albumin-Monoschicht auf der Elektrode ließ sich eine größere Menge an Peroxidase als zweite Monoschicht binden.^[55] Dies wurde einer erhöhten Anzahl funktioneller Gruppen, die für die Peroxidase-Kupplung zur Verfügung standen, zugeschrieben. Der Befund, dass sich Enzyme auch ohne Aktivierungsreagentien an Carboxy-funktionalisierte Kohlenstoffoberflächen binden,^[52, 53, 56] wurde darauf zurückgeführt, dass möglicherweise Anhydrideinheiten auf der Kohlenstoffoberfläche vorliegen,

die während der Oxidation des Trägers gebildet wurden.^[38a] Amino-funktionalisierte Graphitelektroden^[43] wurden für die kovalente Anbindung von Enzym-Carboxygruppen verwendet (Abbildung 3B).^[51] Tabelle 2 gibt eine Zusammenfassung von Enzymen, die über Amidbindungen auf Kohlenstoffelektroden immobilisiert wurden.

Durch das Anheften funktionalisierter Alkene oder Alkine an Pt-Oberflächen^[61] oder Kohlenstoffelektroden^[62] wird der Träger für die Sekundärkupplung von organischen Molekülen, insbesondere von Enzymen, aktiviert.^[51] Dazu werden auf der Elektrode an einigen Stellen Radikale erzeugt, die mit den π -Bindungen der Alkene oder Alkine reagieren. Auf diese Art wurden sowohl unterschiedliche Redoxgruppen als auch Enzyme (z. B. Glucose-Oxidase^[51]) auf Pt- und Graphitelektrodenoberflächen immobilisiert. Abbildung 4 zeigt eine

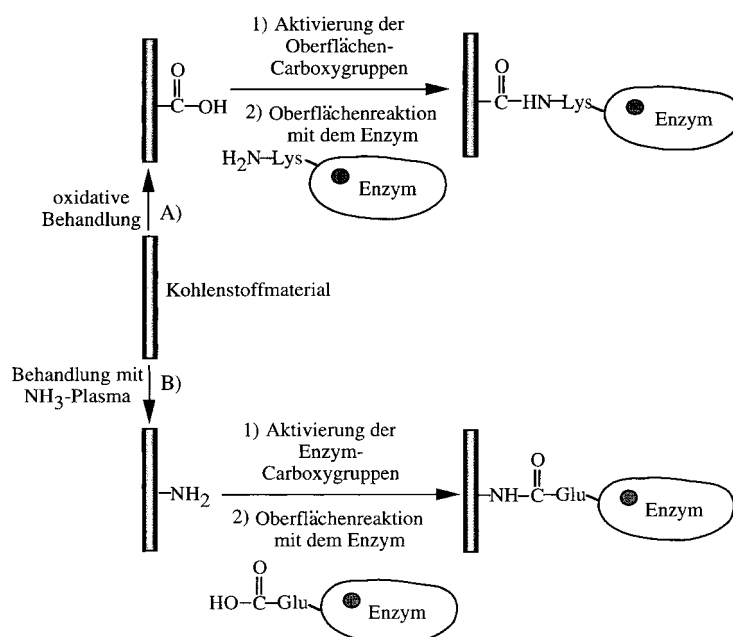


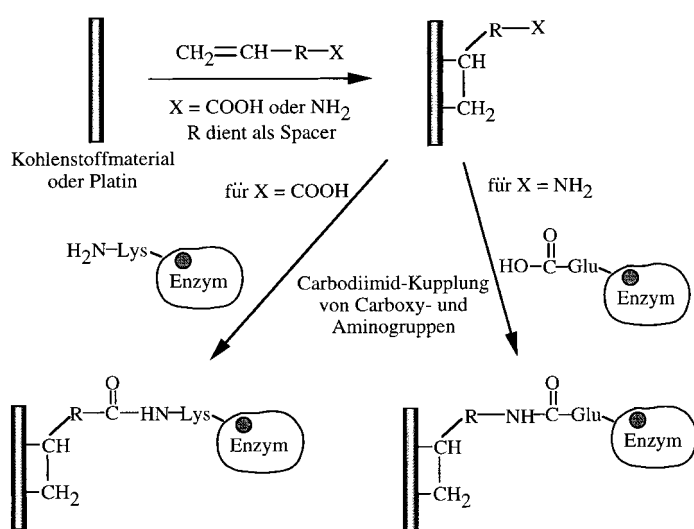
Abbildung 3. Kovalente Verknüpfung von Enzymschichten und Kohlenstoffelektroden mit Hilfe von Amino- und Carboxyfunktionen.

Tabelle 1. Über Cyanurchlorid **1** an Elektrodenoberflächen gebundene Enzyme.

Enzym	Elektrodenmaterial	Enzymbeladung [mol cm ⁻²]	elektrochemische Antwort	Substrat	analysierter Konzentrationsbereich [M]	Antwortzeit [s]	optimaler pH	Elektrodenstabilität	Lit.
Glucose-Oxidase (EC 1.1.3.4) aus <i>Aspergillus niger</i>	Pyrographit	–	amperometrisch	Glucose	$2 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-2}$	25	7.0	20 d	[45a]
	Pyrographit	–	Differentialpuls-voltammetrie	Glucose	–	–	–	–	[45b]
	Pyrographit	–	amperometrisch	Glucose	–	–	–	–	[45c]
L-Aminosäure-Oxidase (EC 1.4.3.2) aus dem <i>Crotalus atrox</i> -Gift	Pyrographit	–	amperometrisch	L-Phenylalanin	$1 \times 10^{-4} - 5 \times 10^{-2}$	25	7.5	30 d	[45a]
	Pyrographit	–	potentiometrisch	L-Phenylalanin, L-Methionin, L-Leucin	$1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-2}$	2–2.5	7.0–7.5	75 d	[46]
alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1) aus <i>E. coli</i>	Glaskohlenstoff	$(1.4 - 9.7) \times 10^{-12}$	amperometrisch, RDE	Catechol-phosphat	$1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-2}$	30	–	–	[47]
α -Chymotrypsin (EC 3.4.21.1)	IrO ₂	–	potentiometrisch, Durchflussinjektion	N-Benzoyl-L-tyrosinethylester	–	12	7.8	–	[48]
Ferritin (Typ 1) aus Pferdemilz	Pyrographit	$(7.7 - 20) \times 10^{-11}$	–	–	–	–	–	–	[49]
Urease (EC 3.5.1.5)	IrO ₂	–	potentiometrisch	Harnstoff	$5 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$	100	7.0	12 d	[50]

Tabelle 2. Über Amidbindungen an Kohlenstoffelektroden gebundene Enzyme.

Enzym	Enzymbeladung [mol cm ⁻²]	elektrochemische Antwort	Substrat	analysierter Konzentrations- bereich [M]	opti- maler pH	Elektro- densta- bilität	Lit.
Glucose-Oxidase (EC 1.1.3.4) aus <i>Aspergillus niger</i>	$(0.4 - 3.5) \times 10^{-12}$	amperometrisch	Glucose	–	4.5–6.0	12–15 d	[24a–c, 41a, 51, 57–59]
Xanthin-Oxidase (EC 1.2.3.2) aus Buttermilch	–	amperometrisch, potentiometrisch	Xanthin	$7 \times 10^{-6} - 6 \times 10^{-6}$	–	7 d	[10, 38b]
Meerrettich-Peroxidase (EC 1.11.1.7)	–	amperometrisch	H ₂ O ₂	–	3.8	10 d	[38b]
Lactoperoxidase (EC 1.11.1.7) aus Kuhmilch	–	amperometrisch	Lactat	–	4.5	10 d	[38b]
α -Chymotrypsin (EC 3.4.21.1) aus der Bauchspeicheldrüse vom Rind	–	–	Acetyl-L-tyrosinethylester	–	–	–	[41a]
Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27) aus dem Skelettmuskel vom Hasen	1.4×10^{-13}	amperometrisch	Lactat	–	6.0–7.5	21 d	[60]

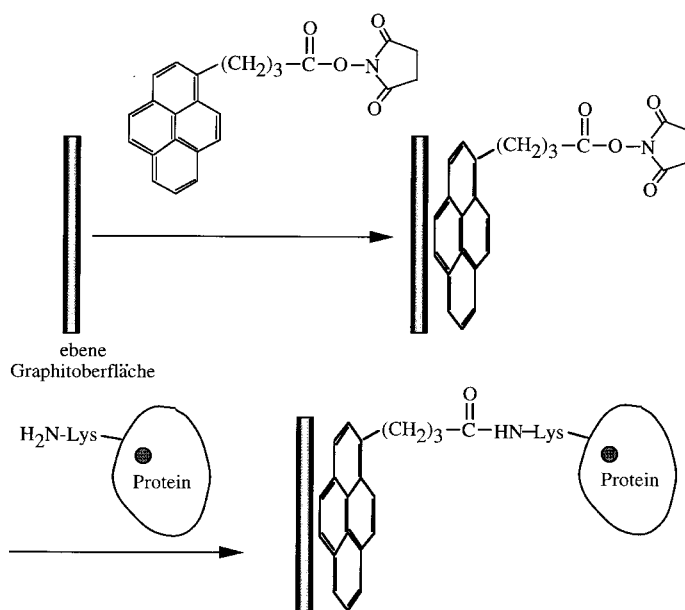
Abbildung 4. Modifizierung von Elektroden mit funktionalisierten π -Adsorbaten zur kovalenten Bindung von Enzymen. R = $(\text{CH}_2)_n$, $n = 0-8$.

solche Immobilisierung durch Primäraktivierung der Oberfläche mit $(\omega - 1)$ -Alkencarbonsäuren oder -aminen und Kupplung des Enzyms an die Basisschicht.^[51]

Die starken π - π -Wechselwirkungen zwischen der hydrophoben Graphitelektrodenoberfläche (stark orientierte Pyrographit-Monokristalle) und polycyclischen aromatischen Systemen macht auch eine stabile Immobilisierung funktionalisierter aromatischer Systeme auf Graphit möglich.^[63] Die funktionalisierten Oberflächen wurden für die kovalente Immobilisierung vieler organischer und bioorganischer Substanzen verwendet (Abbildung 5).^[64]

Alkoxy- und Halogensilan sind reaktive Substanzen zur Derivatisierung von Hydroxy-funktionalisierten Trägern; ihre Hydrolyse durch die Hydroxygruppen führt zu Siloxan-Mono- oder -Multischichten auf den Oberflächen. Für diese Derivatisierung geeignet sind beispielsweise SnO_2 ,^[65] TiO_2 ,^[66] RuO_2 ,^[67] und $\text{In}_x\text{Sn}_{1-x}\text{O}_2$ -Elektroden.^[68] Die Oberfläche von Metallelektroden wie Pt muss vor der Silanierung elektrochemisch zu einer Oxid-Monoschicht oxidiert werden, die über Hydroxygruppen verfügt.^[37] Auch oxidierte Nichtmetallelektroden-Oberflächen (z.B. von Glaskohlenstoffelektroden) wurden erfolgreich silaniert.^[69] Mit funktionalisierten Silanreagentien kann eine Reihe funktioneller Gruppen (meistens Aminogruppen, aber auch Thiol-, Esterfunktionen usw.) auf hydroxylierten Elektrodenoberflächen eingeführt werden. So modifizierte Elektrodenoberflächen wurden zur Immobilisierung zahlreicher organischer und bioorganischer Verbindungen mit elektrochemischen, photochemischen, katalytischen und biokatalytischen Eigenschaften genutzt.^[70] Mehrere Enzyme (Proteine), die mit dieser Methode aufgebracht wurden (Abbildung 6), sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

troden) wurden erfolgreich silaniert.^[69] Mit funktionalisierten Silanreagentien kann eine Reihe funktioneller Gruppen (meistens Aminogruppen, aber auch Thiol-, Esterfunktionen usw.) auf hydroxylierten Elektrodenoberflächen eingeführt werden. So modifizierte Elektrodenoberflächen wurden zur Immobilisierung zahlreicher organischer und bioorganischer Verbindungen mit elektrochemischen, photochemischen, katalytischen und biokatalytischen Eigenschaften genutzt.^[70] Mehrere Enzyme (Proteine), die mit dieser Methode aufgebracht wurden (Abbildung 6), sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Abbildung 5. Funktionalisierung von Graphitelektroden mit polyaromatischen π -Elektronen-Modifikatoren zur Immobilisierung von Proteinen.

Die Selbstorganisation von Monoschichten aus Thiolen^[73] oder Disulfiden^[74] (und weniger häufig Sulfiden,^[75] Thionen,^[76] S-Heterocyclen^[77] sowie Isothiocyanaten^[78]) auf leitenden Trägern, vorwiegend Au,^[79, 80] aber auch Pt,^[81] Ag,^[82] Cu^[82e-g] (und seltener Ir,^[83] Fe,^[84] Hg,^[85] amalgamiertes Pt^[86] usw.), oder auf halbleitenden Materialien wie GaAs^[87] und

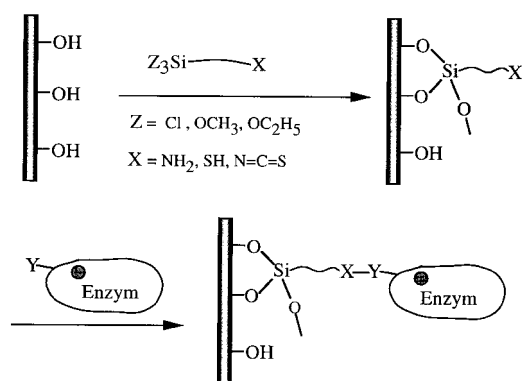
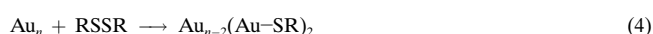
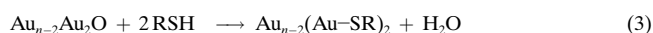
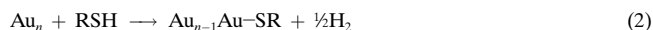


Abbildung 6. Aufbau von funktionalisierten Siloxan-Schichten auf Elektroden zur Immobilisierung von Enzymen. Y ist eine zu X komplementäre funktionelle Gruppe.

InP^[88] waren Gegenstand umfangreicher Forschungen.^[2, 3, 79, 89] Thiolat-Monoschichten auf Goldoberflächen wurden hinsichtlich ihrer strukturellen Merkmale^[79] und ihrer Bildungsdynamik^[90] eingehend charakterisiert; dazu wurde eine Vielfalt physikalischer Methoden genutzt: XPS (Röntgen-Photoelektronenspektroskopie),^[91] FTIR-Spektroskopie,^[92] Kontaktwinkelverfahren,^[93] Ellipsometrie,^[94] Oberflächenplasmonresonanz,^[95] Messungen mit der Quarzkristall-Mikrowaage,^[96] elektrochemische Methoden,^[97] STM (Rastertunnelmikroskopie),^[98] AFM (Kraftmikroskopie)^[99] und andere.^[100] Die Bildung von Gold-Thiolat-Monoschichten wurde auf die Oxidation der Goldoberfläche durch das Thiol zurückgeführt [Gl. (2)].^[73, 79a] Als alternativer Weg wurde die Reduktion einer Oxidschicht auf der Goldoberfläche vorgeschlagen [Gl. (3)].^[101] Die Bildung von Thiolat-Monoschichten auf Goldoberflächen ausgehend von Disulfiden wurde auf die Reduktion der Disulfidbindung durch die Goldoberfläche zurückgeführt [Gl. (4)].^[74, 79a]



Eine Vielzahl von Redoxverbindungen, z. B. Ferrocene,^[102] N,N'-Dialkyl-4,4'-bipyridiniumionen,^[75b, 103] Chinone,^[81e, 86, 104] Porphyrine und Phthalocyanine,^[86, 105] heterocyclische Farb-

stoffe,^[106] Metallkomplexe,^[107] molekularen Rezeptoren wie Cyclodextrine^[108] und Calixarene,^[75c, 109] supramolekularen Komplexen^[110] sowie sperrigen organischen Molekülen^[111] wie Fulleren (C₆₀)^[111a-c] und Dendrimere^[111d] wurden an Goldträgern über Thiolatbrücken verankert. Mit Thiolat-Monoschichten auf Metall- und Halbleiteroberflächen (GaAs, CdS) wurden Nanostrukturen aus Kolloiden und Clustern erzeugt.^[112] Die Selbstorganisation von Thiolat-Monoschichten auf Goldträgern wurde zur Erzeugung mikroskopischer Muster^[113] und zum Maßschneiden von Grenzflächen mit steuerbaren hydrophoben/hydrophilen Eigenschaften^[114] genutzt. Photoisomerisierbare, über Thiolatbindungen an Goldoberflächen gebundene Monoschichten wurden als Steuerungsoberflächen zur amperometrischen Registrierung optischer Signale genutzt, die von der Monoschichtgrenzfläche empfangen werden.^[115] Zu vielen Aspekten des Aufbaus von Thiolat-Monoschichten gibt es bereits Übersichten.^[2, 3, 79, 89]

Mit Amino- oder Carboxygruppen funktionalisierte Thiolat-Monoschichten auf Goldelektroden wurden kovalent an die komplementäre Carboxy- bzw. Aminogruppe von Glutamin/Asparaginsäure- bzw. Lysinresten in Enzymen und Redoxproteinen gekuppelt (Abbildung 7 A).^[116] Um die Desaktivierung des Enzyms, die beim Binden über einen kurzen Thiolat-Spacer durch seine mögliche Wechselwirkung mit freien Goldbereichen zustande kommt, zu verhindern, wurden Thiolatschichten mit langen Spacern stufenweise auf den Elektrodenträgern aufgebaut.^[117] So führte die Kupplung von Glutardialdehyd an eine Cystamin-Monoschicht auf einer Goldelektrode und die Anbindung der Lysinreste eines Proteins unter Bildung einer Schiff-Base zu einer Protein-Monoschicht mit langem Spacer.^[18c] In ähnlicher Weise ließ sich durch Anknüpfen von Diisothiocyanatostilbendisulfonat an eine Cystamin-Monoschicht und Binden des Proteins Glutathion-Reduktase an die Thiocyanatfunktion eine Enzym-Monoschicht erzeugen, die durch eine Stilbeneinheit von der Elektrodenoberfläche separiert ist.^[118] Tabelle 4 fasst die Proteine zusammen, die auf Goldelektroden als Monoschichten über Thiolatbrücken angebracht wurden. Die Bedeckung der Elektrodenoberfläche durch das Protein wird bei dicht gepackten Schichten durch den Platzbedarf des Proteins gesteuert und bei nicht dicht gepackten durch die Dichte der Subschicht, die mit dem leitenden festen Träger verbunden ist.

Tabelle 3. Über funktionalisierte Silane an Oberflächen kovalent gebundene Enzyme (Proteine).

Enzym/Protein	Elektrodenmaterial	Proteinbeladung [mol cm ⁻²]	elektrochemische Antwort	Substrat	analysierter Konzentrationsbereich	Antwortzeit	optimaler pH	Elektrodenstabilität	Lit.
Glucose-Oxidase (EC 1.1.3.4) aus <i>Aspergillus niger</i>	Pt	–	amperometrisch	Glucose	1–4 mM	40 s	–	9 Monate	[24]
Meerrettich-Peroxidase (EC 1.11.1.7)	SnO ₂	–	amperometrisch	H ₂ O ₂	–	–	–	–	[71]
Acetylcholin-Esterase (EC 3.1.1.7), Zitteraal, Typ VI-S	Pt	–	–	Acetylcholin	–	–	7.2–7.8	–	[72]
photosynthetische Reaktionszentren aus den Bakterien <i>Rhodospirillum rubrum</i> R-26	Pt	1.5 × 10 ⁻¹²	amperometrisch oder potentiometrisch	Licht und reduziertes Cytochrom c	–	3 min	8.0	7 d	[19a–e]

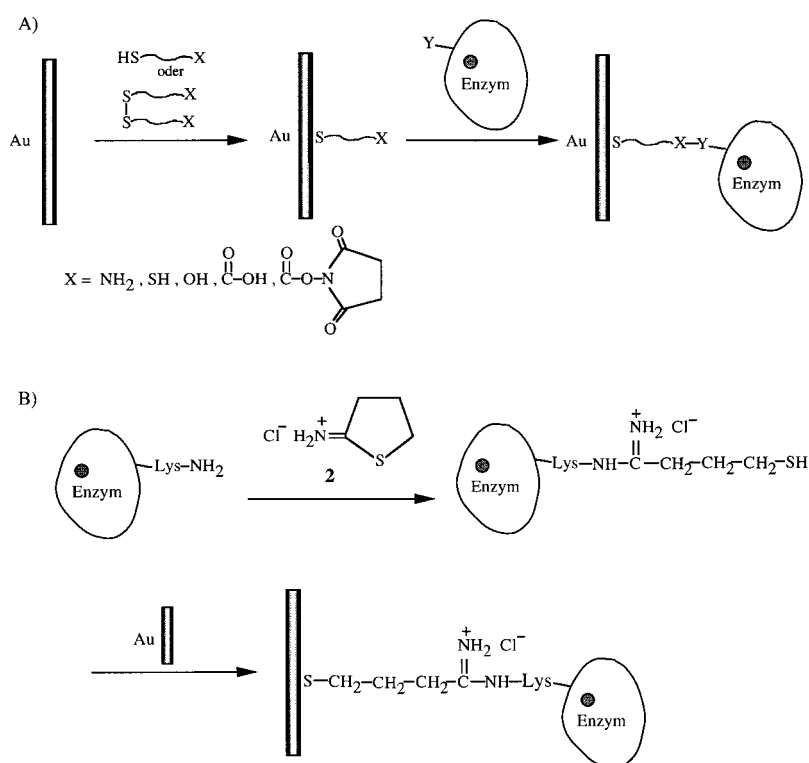


Abbildung 7. A) Aufbau einer funktionalisierten Thiolat-Monoschicht auf einer Gold-elektrode, an die Enzyme kovalent angeknüpft werden. X ist eine funktionelle Gruppe zur Proteinkupplung, Y eine zu X komplementäre funktionelle Gruppe. B) Modifizieren eines Proteins durch Thiol-Funktionalitäten und Anheften an einen Goldträger.

Die direkte Modifizierung von festen Trägern durch Proteine geht meist mit der Denaturierung des Proteins in der ersten Adsorbatschicht einher. Die chemische Modifizierung der zahlreichen Lysinreste von Proteinen durch Thiolgruppen ermöglicht ein selektives Anheften an Goldoberflächen, ohne das Biomaterial zu denaturieren. Die Reaktion der Lysinreste mit dem Traut-Salz **2** führt zu einem Protein mit Thiolketten, das spontan an Goldträger bindet.^[126b] Auf diese Art wurde Katalase funktionalisiert und auf eine Goldelektrode gebracht (Abbildung 7B).

Eine Enzymbasisschicht auf einem leitenden Träger wurde als aktive Grenzfläche für den stufenweisen Aufbau von dreidimensionalen Protein-Multischichten verwendet. Abbildung 8 zeigt eine Methode zum Aufbau eines Multischichten-Netzwerks aus Glucose-Oxidase (GOx) auf einer Goldelektrode über Thiolatbrücken.^[118] Die erste Enzymschicht wird in einer Zweistufensynthese mit 4,4'-Diisothiocyantostilben-2,2'-disulfonsäure **3** und GOx umgesetzt. Die Zahl der Schichten auf der Elektrode wird über die Zahl der Wiederholungsschritte gesteuert. Es konnte gezeigt werden, dass die Oberflächendichte des Enzyms pro Schicht mit ca. $5 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ bis zu einem Netzwerk aus zwölf Schichten fast konstant ist. Ein ähnliches Verfahren wurde zum Aufbau von

Tabelle 4. Über funktionalisierte Thiolat-Monoschichten an Goldelektroden kovalent gebundene Enzyme (Proteine).

Enzym/Protein	Enzym/Protein-beladung [mol cm ⁻²]	elektrochemische Antwort	Substrat	analysierter Konzentrationsbereich	Antwortzeit	optimaler pH	Elektrodenstabilität	Lit.
Glucose-Oxidase (EC 1.1.3.4) aus <i>Aspergillus niger</i>	–	amperometrisch	Glucose	–	–	7.0	–	[18c]
	7.5×10^{-12}	amperometrisch	Glucose	1–20 mM	–	7.3	14 d	[118]
	$(1-4) \times 10^{-11}$	amperometrisch	Glucose	1–25 mM	–	7.0	20 d	[119a,b]
	–	amperometrisch	Glucose	$1 \times 10^{-5} - 6 \times 10^{-3} \text{ M}$	10 s	–	–	[119c]
	–	amperometrisch	Glucose	–	–	–	–	[119e]
Glucose-Dehydrogenase (EC 1.1.99.17) aus <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	–	amperometrisch	Glucose	–	10 s	6.0–9.5	60 d	[120]
Bilirubin-Oxidase (EC 1.3.3.5) aus <i>Myrothecium verrucaria</i>	6×10^{-12}	amperometrisch	Bilirubin	10–120 μM	20 s	8.0	75 d	[121]
Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.40) aus Hühnerleber	4×10^{-12}	amperometrisch	Malat	$1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	–	7.2	–	[122]
Diaphorase (EC 1.6.99) aus <i>Bacillus stearothermophilus</i>	6×10^{-12}	amperometrisch	NADH	$1 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-4} \text{ M}$	–	7.5	–	[123]
Glutathion-Reduktase (EC 1.6.4.2)	2×10^{-11}	–[a]	oxidiertes Glutathion	–	30 min	7.2	–	[116]
Mikroperoxidase 11	$(0.8-2.4) \times 10^{-10}$	amperometrisch	H ₂ O ₂	–	–	7.0	30 d	[125a]
	$(0.8-2.4) \times 10^{-10}$	amperometrisch	organische Peroxide	$5 \times 10^{-5} - 3 \times 10^{-3} \text{ M}$	–	nicht-wässrig	–	[125b]
	$(0.8-2.4) \times 10^{-10}$	amperometrisch	Hämproteine	$5 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	–	7.0	–	[125c]
Katalase (EC 1.11.1.6) aus Rinderleber	–	–[b]	–	–	–	–	–	[126]
Acetylcholin-Esterase (EC 3.1.1.8)	–	amperometrisch	Acetylcholin	8–80 mM	–	7.8	–	[119b]
Cholin-Oxidase (EC 1.1.3.17)	–	amperometrisch	Cholin	10–60 mM	–	7.8	–	[119b]

[a] Spektroskopischer Produktnachweis. [b] Untersuchungen mit der Rastertunnelmikroskopie (STM).

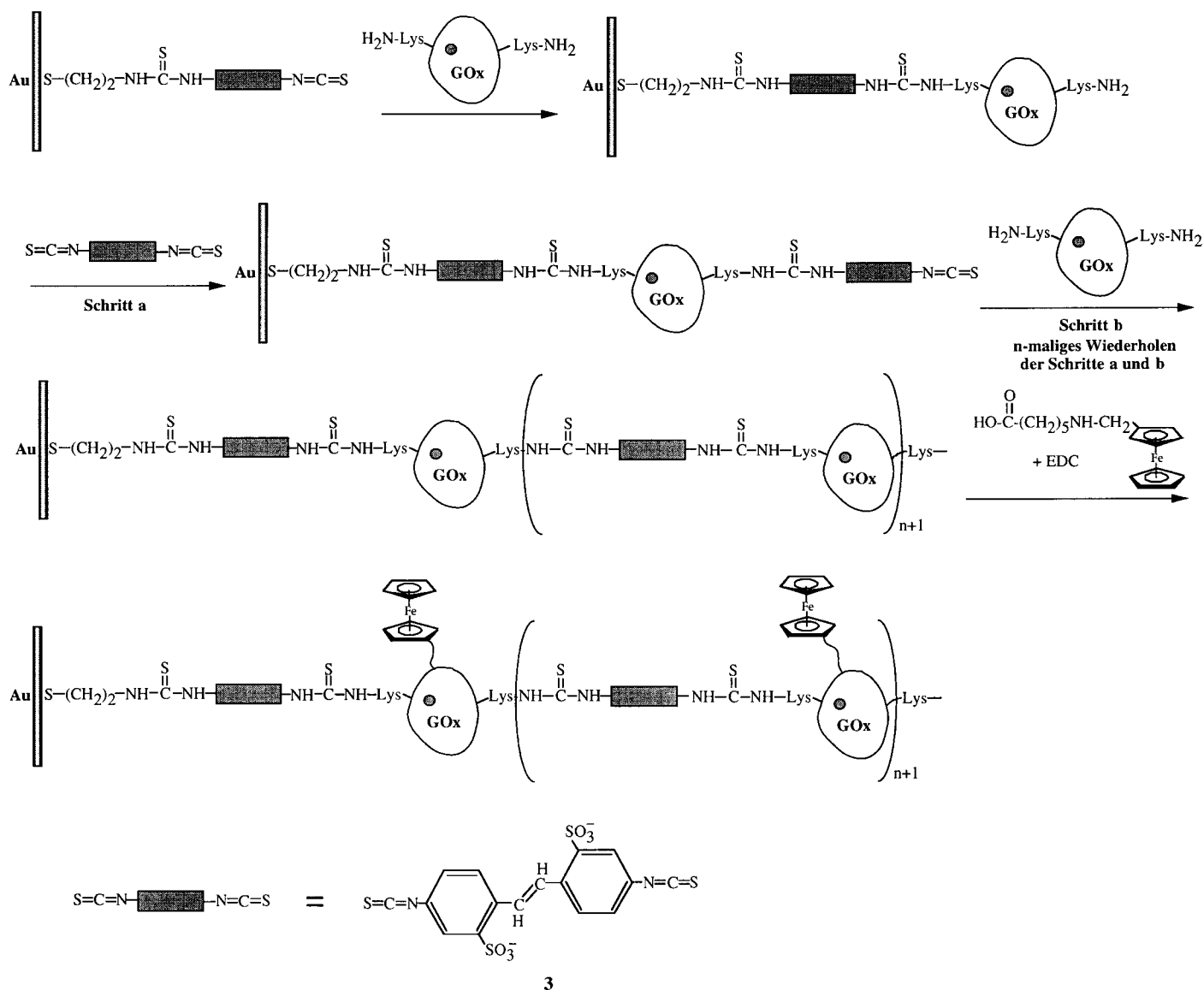


Abbildung 8. Schrittweiser Aufbau vernetzter GOx-Multischichten auf einer Goldelektrode und Herstellung der elektrischen Verbindung.

Elektroden mit Proteinschichten verwendet, die sich in geordneter Weise aus zwei Enzymen zusammensetzen (Abbildung 9).^[119b] Zunächst wurde Cholin-Oxidase in zwei kon-

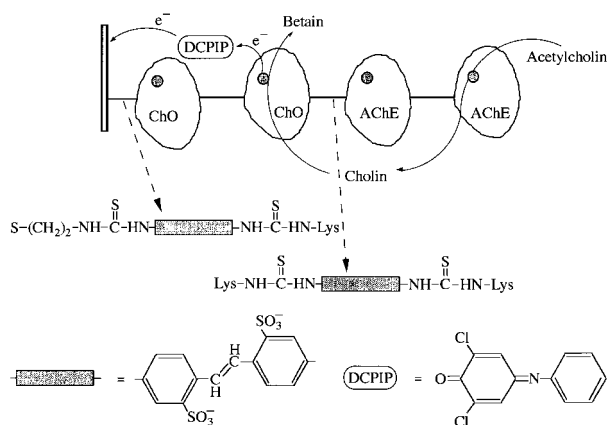


Abbildung 9. Aufbau einer Elektrode mit mehreren organisierten Enzymschichten zum amperometrischen Nachweis von Acetylcholin. ChO = Cholin-Oxidase, AChE = Acetylcholin-Esterase.

sekutiven Proteinschichten angeordnet und anschließend Acetylcholin-Esterase kovalent mit dem Basisenzym in einer weiteren Zweischichtstruktur verknüpft. Auch von anderen mehrschichtigen Enzymnetzwerken auf einer Grundschicht mit Thiolatbrücken wurde berichtet.^[119d, 120] Eine nichtorganisierte Enzymmultischicht aus Glucose-Oxidase wurde durch Vernetzung des Enzyms mit Glutardialdehyd in Gegenwart eines aminofunktionalisierten Elektronenvermittlers auf der an die Elektrode gebundenen Thiolat-Monoschicht erzeugt.^[119d]

3. Herstellung von Enzymelektroden durch chemische Modifizierung von Oberflächen und Proteinen

Der vorangegangene Abschnitt hat sich mit der Natur der chemischen Bindung zwischen den Spacereinheiten der Monoschicht und der Elektrode, die zur Verknüpfung der

Proteine mit dem festen Träger führt, befasst. Die Oberflächenfunktionen, die mit den Trägern oder den Monoschichten auf der Elektrode assoziiert sind, können vielfältig chemisch weiter modifiziert werden, um sie für die kovalente Anbindung von Proteinen vorzubereiten. Analoges gilt für die Proteine.^[126a] In Abbildung 10 sind funktionelle Einheiten aufgeführt, die für die Modifizierung von leitenden Trägern und die Sekundärkupplung von Proteinen verwendet wurden. Die Aminofunktionen der Lysinreste von Proteinen können mit Oberflächen-Carboxygruppen (Abbildung 10a) oder mit Oberflächen-Aldehydfunktionen^[24a,b, 124a] (Abbildung 10b)

verknüpft werden.^[71, 127] Alternativ möglich sind die nucleophile Substitution an Oberflächen, die mit Cyanurchlorid **1** funktionalisiert wurden (Abbildung 10c),^[45–50] die Addition an Isothiocyanatfunktionen (Abbildung 10d)^[116c, 118] und die Michael-Addition an Elektroden-gebundene Chinonfunktionen (Abbildung 10e). Die mit dem letzten Verfahren zugängliche Chinon-Enzym-Monoschicht ist ein Beispiel für eine Enzymschicht, die über eine redoxaktive Komponente mit der Elektrode verbunden ist.^[128] Oberflächen-gebundene aromatische Amine lassen sich in Oberflächen-gebundene Diazonium-Ionen überführen, an die Tyrosin- oder Histidinreste von Proteinen gebunden werden können (Abbildung 10 f).^[127c] Arylazide werden häufig als photoaktivierbare Marker verwendet. Entsprechend führt die photochemische Aktivierung einer Arylazid-Monoschicht zum entsprechenden Nitren, das mit den Aminogruppen von Lysinresten reagiert (Abbildung 10 g).^[129]

Da Proteine häufig viele Lysin- oder Glutaminsäure/Asparaginsäurereste an ihrer Peripherie enthalten, führt ihre Anbindung an feste Träger über diese Gruppen zu einer heterogenen Verknüpfung und Orientierung der Proteinmoleküle. Eine regelmäßige Anordnung von Redoxproteinen auf dem leitenden Träger ist aber für viele bioelektronische Anwendungen unabdingbar, und daher ist die Entwicklung von Verfahren zum spezifischen Binden und Anordnen von Proteinen auf Oberflächen wichtig. Cystein tritt in den meisten Proteinen selten auf. Ein einzelner Cysteinrest an der Proteinperipherie oder ein gentechnisch in das Protein eingefügter Cysteinbaustein ermöglichen eine gezieltere Verknüpfung des Proteins mit der Oberfläche. Durch *p*-Mercuriobenzolat,^[19c] Iodacetamid^[64] oder Maleinimid^[130] funktionalisierte feste Träger wurden zum Aufbau von über Cysteinreste kovalent gebundenen Protein-Monoschichten verwendet (Abbildung 10 h–j). Beispiele sind das photosynthetische Reaktionszentrum von *Rhodobacter sphaeroides* R-26, das an eine Iodacetamid-Monoschicht auf einer pyrolytischen Graphitelektrode gebunden wurde,^[19c] und gentechnisch hergestelltes Cytochrom *b*₅ (in dem Threonin 8 oder Threonin 65 durch Cysteinreste ersetzt wurde), das über Siloxan auf Glas immobilisiert wurde.^[72, 130] Dazu wurde das difunktionelle Reagens *N*-Succinimidyl-3-maleinimidopropionat mit einer Aminosiloxanschicht auf der Glasoberfläche verknüpft und das Cystein-modifizierte Protein in einer nucleophilen Michael-Addition an die Maleinimidstellen gebunden. Ähnlich wurde gentechnisch hergestelltes Myoglobin an einen halogenalkylsilylierten Glasträger gebunden.^[130c] Ein synthetisches De-novo-Protein, das aus 128 Aminosäuren (14 728 Da) besteht und aus einem Bündel von vier Helices aufgebaut ist, ließ sich immobilisieren, indem es über die in ihm vorliegenden flexiblen Gly-Gly-Cys-Einheiten an Oberflächen-Maleinimidgruppen gebunden wurde.^[131] Ein gentechnisch hergestelltes Cytochrom *b*₅ wurde auf einer Elektrode orientiert, indem seine Cystein-Thiolgruppen mit den endständigen Thiolgruppen der Monoschicht zu Disulfidgruppen umgesetzt wurden.^[132] Glycoproteine (z.B. GOx^[133]), in denen Zuckerreste an das Protein gebunden sind, ermöglichen die Bindung an Phenylboronsäure-funktionalisierte Oberflächen über *cis*-Dioleinheiten (Abbildung 10 k).

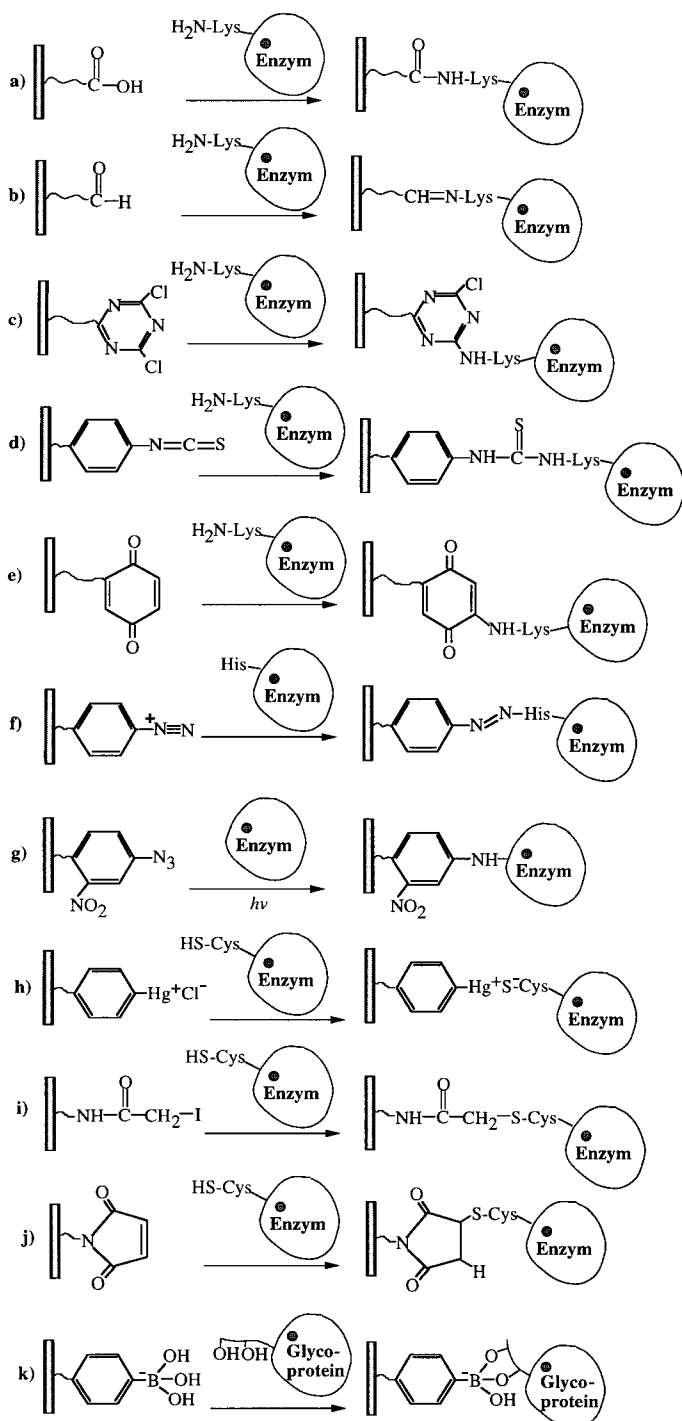


Abbildung 10. a)–k) Durch unterschiedliche Monoschichten für die kovalente Bindung von Enzymen funktionalisierte Elektroden.

Für die gezielte Anordnung und Ausrichtung von Redoxproteinen auf leitenden Trägern wurde das spannungsinduzierte kovalente Anfügen der Proteine vorgeschlagen.^[124a] Eine Glaskohlenstoffelektrode wurde mit einem wasserlöslichen Carbodiimid aktiviert und Cytochrom c unter Spannung an die funktionalisierte Elektrode gekuppelt. Cytochrom c ist an den Stellen positiv geladen, an denen das Häm mit dem Protein verbunden ist und die Elektronen mit maximaler Geschwindigkeit tunneln.^[124b] Wurde das Kuppeln von Cytochrom c an die Elektrode bei Spannungen durchgeführt, die kleiner als das Nullpotential [0.31 V gegenüber der Normalwasserstoffelektrode] waren, erhielt man eine Cytochrom-c-modifizierte Elektrode mit effektivem elektrischem Kontakt. Lag die Spannung dagegen über der des Nullpotentials, entstand eine Hämproteinelektrode ohne direkte elektrische Verbindung. Als Gründe für den besseren elektrischen Kontakt im ersten Fall wurden die Ausrichtung der Monoschicht und die Orientierung des Hämproteins mit der Hämseite zur Elektrode gesehen.

4. Nichtkovalente Kupplung von Proteinen an feste Träger über elektrostatische, hydrophobe und hydrophile Wechselwirkungen

Durch hydrophobe und hydrophile Wechselwirkungen von Enzymen mit membranartigen Schichtsystemen oder elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen Grenzflächen und Proteinen können organisierte, supramolekulare geschichtete Proteingrenzflächen entstehen. Auf Gold-elektroden wurde eine gemischte, selbstorganisierte Monoschicht aus Octadecylthiol und Dodecylthiol aufgebracht. Die kurzkettigen, geladenen Thiolderivate stellen Fehlstellen (oder Taschen) dar, in denen das Enzym Fumarat-Dehydrogenase gebunden werden kann.^[134] In der resultierenden Enzymelektrode besteht ein direkter elektrischer Kontakt zwischen dem redoxaktiven Zentrum und der Elektrodenoberfläche, und die so mögliche bioelektrokatalysierte Reduktion von Fumarat macht die modifizierte Elektrode zu einem amperometrischen Fumaratsensor.

Hydrophobe Membranproteine bauen sich nur in eine auf Oberflächen haftende Lipidschicht ein, wenn eine wässrige Phase die Lipidschicht vom Substrat trennt. Die Übertragung von Lipiden auf hydrophile Oberflächen wurde entweder mit dem Langmuir-Blodgett-Verfahren^[135] oder durch die Fusion von Liposomen^[136] erreicht. So wurde das Membranprotein ATPase in eine Lipidschicht auf einer Goldoberfläche eingebaut, indem ATPase enthaltende Liposomen mit einer funktionalisierten Lipidschicht fusioniert wurden (Abbildung 11):^[137] Zunächst wurde ein Thiol-funktionalisiertes, helicales Oligopeptid auf die Goldoberfläche aufgebracht und danach das Lipid DMPE (Dimyristoylphosphatidylethanolamin) kovalent an das Carbonsäureende des Peptids gebunden. Die resultierende Lipidschicht ließ man mit ATPase enthaltenden Liposomen in Wechselwirkung treten, und eine spontane Fusion der Liposomen mit der Lipidschicht führte zum Einbau von ATPase in die Doppelschicht. Das

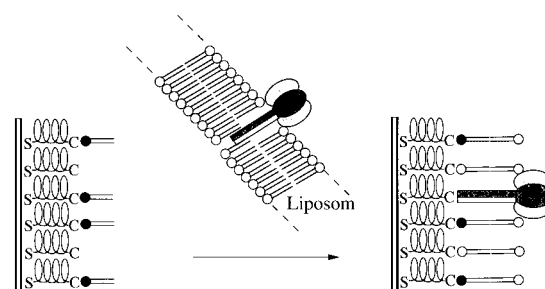


Abbildung 11. Hydrophobe Assoziation von Liposom-gebundener ATPase mit Oberflächen-gebundenen thiolierten, amphiphilen, helicalen Oligopeptiden.

ATPase-Doppelschicht-System wurde als halbsynthetische Protonenpumpe genutzt.

Hydrophobe Proteine wie Fibrinogen, Lysozym, Pyruvat-Kinase oder RNAase wurden an auf Goldoberflächen gebundene Alkylthiolate adsorbiert.^[138] Bei gemischten Monoschichten aus Oligoethylenoxid und Alkylthiolen konnte eine nichtspezifische hydrophobe Adsorption des Proteins verhindert werden, wenn ein genügend hoher Anteil an Ethylenoxid in der Monoschicht vorhanden war.

Durch elektrostatische Wechselwirkungen verbunden mit hydrophiler Adhäsion können Proteine irreversibel auf Monoschichten mit Carbonsäuretermini adsorbiert und angeordnet werden. Beispielsweise wurde Cytochrom c an einer 16-Sulfanylhexadecansäure($\text{HS}(\text{CH}_2)_{15}\text{CO}_2\text{H}$)-Monoschicht auf einer Goldoberfläche adsorbiert,^[139] wobei eine Elektrode mit elektrischem Kontakt zwischen Monoschicht und Träger resultierte. Aus der Geschwindigkeitskonstante für den Elektronentransfer an der Grenzfläche, $k_{\text{et}}^0 = 0.1 \text{ s}^{-1}$, wurde der Abstand zwischen dem Häm-Zentrum von Cytochrom c und der Elektrode auf 31 Å geschätzt.

5. Nichtkovalente Kupplung von Proteinen an Oberflächen über Affinitätswechselwirkungen

Affinitätswechselwirkungen zwischen einem Enzym und seinem Substrat, einem Rezeptorprotein und seinem Erkennungspartner oder in Antigen-Antikörper-Paaren sind häufig durch hohe Assoziationskonstanten der resultierenden Komplexe gekennzeichnet, was zur Konstruktion von Proteinschichten auf festen Trägern genutzt wurde. Da die nativen Rezeptorproteine oft mehr als eine Bindungsstelle für das Substrat aufweisen und Antikörper an Anti-Antikörper gekuppelt werden können, kann man außerdem komplexe Anordnungen von Proteinen maßschneidern, d.h. vor allem Multischichten von Enzymen mit einstellbarer Anordnung und Struktur organisieren.

Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen wurden zum Aufbau von Schichten und Multischichten aus Glucose-Oxidase auf Glaskohlenstoffelektroden genutzt (Abbildung 12).^[4] Dabei wurde eine Glaskohlenstoffelektrode mit Gelatine überzogen, Kaninchen-IgG-Antikörper auf der Gelatine adsorbiert und ein Konjugat aus Glucose-Oxidase und Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpern aus Ziegen mit den an der

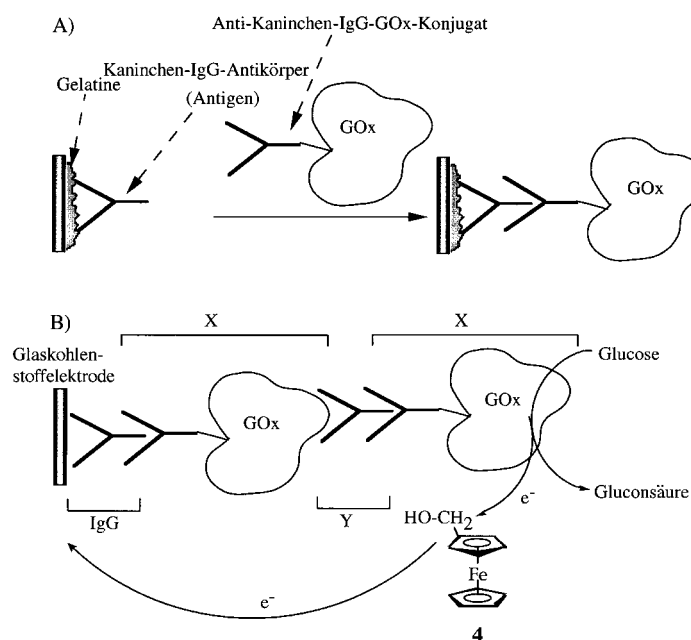


Abbildung 12. Aufbau von Enzymschichten auf Elektroden mit Hilfe nichtkovalenter Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen: A) Assoziation eines Antikörper-Enzym-Konjugats mit einer Elektrode, die eine Antigen-Monoschicht trägt. B) Herstellung einer Elektrode mit Enzym-Multschichten (GOx-Multschichten auf einer Glaskohlenstoffelektrode) mit Hilfe eines Anti-IgG-GOx-Konjugats (X), eines IgG- und eines Anti-GOx-Antikörpers (Y) als Verbindungskomponenten (>). Der elektrische Kontakt in der Enzymelektrode wird durch den diffundierenden Elektronenvermittler Ferrocenylmethanol **4** hergestellt.

Gelatine haftenden Antikörpern verbunden (Abbildung 12 A). Dieses Vorgehen wurde auf die Konstruktion von Enzym-Multschichten auf Elektroden erweitert (Abbildung 12 B): Maus-IgG-Antikörper wurden auf einer mit Gelatine überzogenen Glaskohlenstoffelektrode adsorbiert. Sie dienten als Antigene für das Konjugat X aus einem Anti-Maus-IgG-Antikörper aus Ziegen und Glucose-Oxidase. Ein monoklonaler Anti-GOx-IgG-Antikörper aus der Maus (Y) wurde dann mit der primären GOx-Schicht verknüpft. Durch die wiederholte Interaktion der Elektrode mit X und Y kann eine genau festgelegte Zahl an Schichten auf der Elektrode abgelagert werden. Der elektrische Kontakt zwischen den resultierenden Enzym-Multschichten und der Elektrode wurde mit Ferrocenylmethanol **4** als diffundierendem Elektronenvermittler hergestellt. Die Effektivität der bioelektrokatalysierten Oxidation von Glucose wird durch die Zahl der Schichten auf dem Elektrodenträger gesteuert. Die gemessenen Ströme nehmen mit der Zahl an Enzymschichten zu, was vermuten lässt, dass die Sensitivität der Messelektrode durch die Zahl der aufgetragenen Enzymschichten eingestellt werden kann.

Die Affinitätswechselwirkungen zwischen Biotin und Avidin wurden zum Aufbau von Ein- und Mehrschicht-Enzymelektroden genutzt (Abbildung 13).^[7] Bei der kovalenten Immobilisierung

von Avidin auf einer Glaskohlenstoffelektrode zeigte sich, dass ein langer Spacer für das Erhalten der Affinitätsseigenschaften wichtig ist.^[140] Abbildung 13 A beschreibt den Aufbau einer Monoschicht aus Meerrettich-Peroxidase (HRP) auf einer Kohlenstoffelektrode unter Nutzung von Biotin-Avidin-Affinitätswechselwirkungen.^[7a] Ein zweiter Weg nutzte Polyoxyalkylendiamin (Jeffamin ED-600), das an Carbonsäurereste auf der Kohlenstoffoberfläche als hydrophiler Spacer gebunden und biotinyliert wurde (Abbildung 13 B) und an das dann biotinyliertes HRP mit Hilfe von Avidin als mehrzähligen Liganden für Biotin angelagert wurde. Die resultierende HRP-Monoschichtelektrode stimulierte die bioelektrokatalysierte Reduktion von H_2O_2 und die Oxidation von *ortho*-Hydrobenzochinon. Biotin-Avidin-Wechselwirkungen wurden auch für den Aufbau von Enzym-Mono- und -Multschichten auf anderen leitenden Trägern genutzt.^[7b,c] So wurde Avidin auf einer Pt-Elektrode adsorbiert, biotinylierte Alkohol-Oxidase (AOx) mit der Avidinschicht verknüpft und durch wiederholte Reaktion der Enzymschicht mit Avidin und biotinylierter AOx eine genau bekannte Zahl an Enzymschichten auf der Elektrode aufgebaut. Die Enzymelektrode biokatalysierte die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd [Gl. (5)]. Die amperometrische Antwort der Elektrode als Folge der Oxidation von H_2O_2

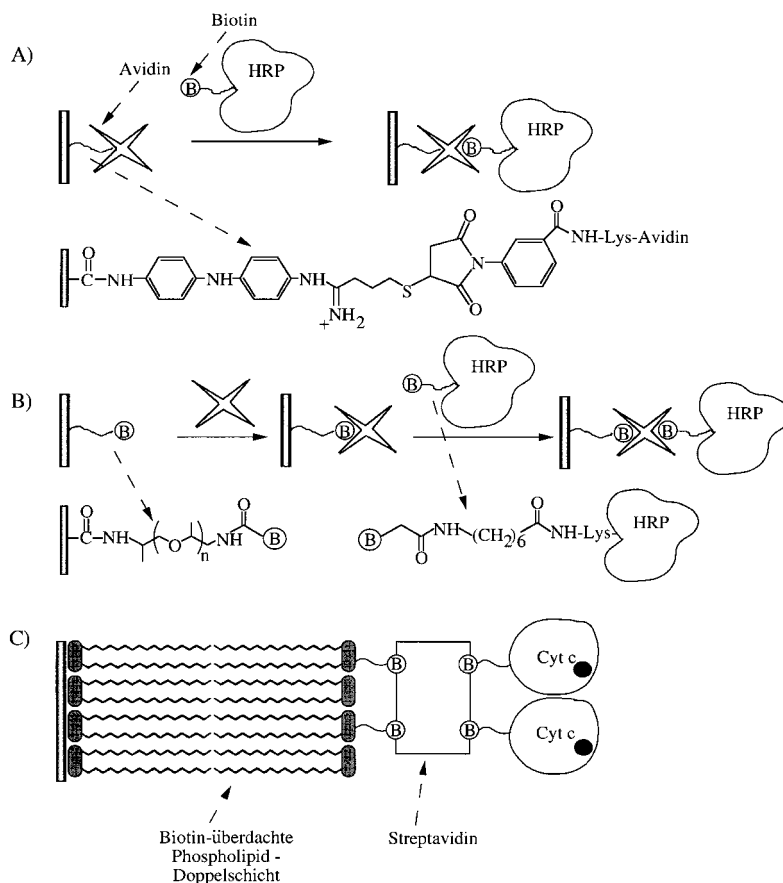
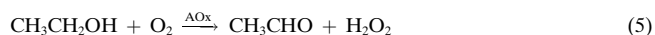
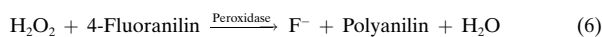


Abbildung 13. Aufbau von Enzymelektroden, die auf Avidin-Biotin-Wechselwirkungen basieren: A) biotinyliertes Enzym und Avidin-Monoschicht-Elektrode, B) biotinyliertes Enzym, Biotin-Monoschicht-Elektrode und Avidin als Vernetzer, C) Anlagerung eines spezifisch durch Biotin funktionalisierten Cytochroms c an eine Biotin-überdachte Phospholipid-Doppelschicht unter Verwendung von Streptavidin als Brücke.

wurde für die quantitative Bestimmung von Ethanol in Blutproben und alkoholischen Getränken im Konzentrationsbereich von 10^{-4} – 10^{-1} mg mL $^{-1}$ genutzt. Die Nachweisempfindlichkeit der Enzymelektrode war von der Zahl der Enzymschichten abhängig.

An eine dünne Schicht von Poly(L-Lysin) (PL) auf Goldoberflächen konnten Proteine spezifisch adsorbiert werden.^[141] Zunächst wurde mit Biotineinheiten funktionalisiertes PL elektrostatisch mit einer Thiolat-Monoschicht aus 11-Sulfanylundecansäure verknüpft. Avidin band dann selektiv an die Biotineinheiten. Oberflächenplasmonresonanz-Messungen und Markierung mit einer Fluoreszenzsonde ergaben eine Oberflächenbedeckung von 4×10^{14} Molekülen pro cm 2 für die Lysinreste und von 3×10^{12} Molekülen pro cm 2 für die Avidinmoleküle. Die Dicke einer Avidin-Monoschicht wurde auf 41 Å geschätzt. Die Affinitätswechselwirkungen in Biotin/Avidin/Enzym-Systemen wurden mit Nanotechnikmethoden wie STM (Rastertunnelmikroskopie) und AFM (Kraftmikroskopie) untersucht und zur Herstellung von Nanostrukturen durch maskenlose Photolithographie genutzt.^[142] Affinitätswechselwirkungen zwischen Glycoproteinen und Lectinen wurden in ähnlicher Weise zur Organisation von Proteinschichten auf festen Trägern genutzt.^[143] Das Glycoprotein Glucose-Oxidase bildet einen Affinitätskomplex mit Concanavalin A. Entsprechend konnte eine vernetzte Glucose-Oxidase/Peroxidase-Monoschicht auf einer Lectinschicht (Concanavalin A), die mit einem fluoridsensitiven Feldeffekttransistor (FET) (Si/SiO $_2$ /Si $_3$ N $_4$ /LaF $_3$ -Schichten) verbunden war, aufgebaut und zum Nachweis von Glucose genutzt werden.^[143a] Die Sauerstoff-vermittelte, biokatalysierte Oxidation von Glucose erzeugt H $_2$ O $_2$, das in Gegenwart von Peroxidase mit *p*-Fluoranilin zu Fluoridionen reagiert [Gl. (6)], die durch das FET-Gerät gemessen werden. Nach Desaktivierung



des Enzyms kann die mit dem FET-Gerät verbundene Sensorfläche durch Wechselwirkung der Sensormatrix mit α -D-Mannopyranose wieder geladen werden. Dieser Zucker besitzt eine starke Affinität gegenüber Concanavalin A, so dass das ursprüngliche Glycoprotein von der Sensorfläche verdrängt wird.

Wechselwirkungen zwischen Biotin und Avidin (oder Streptavidin) wurden zur Anordnung und Orientierung von Redoxproteinen genutzt (Abbildung 13 C).^[143b] Eine Doppelschicht aus 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin-*N*-[biotinyl] und 1,2-Di(*cis*-9-octadecenoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholin wurde auf ein Glassubstrat aufgebracht, und Avidin oder Streptavidin wurde als Vernetzer zur Anordnung des Redoxproteins Cytochrom *c* verwendet. Dazu wurde dieses spezifisch am Cysteinrest 102 mit *N*-[6-(Biotinamido)hexyl]-3-(2-pyridyldithio)propionamid biotinylt. Messungen zum linearen Dichroismus und zur Fluoreszenzanisotropie ließen den Schluss zu, dass Cytochrom *c* mit einem Neigungswinkel von $(41 \pm 11)^\circ$ relativ zur Doppelschichtmatrix angeordnet ist.

Cholin-funktionalisierte Monoschichten auf einer Goldelektrode wiesen eine Affinität zu einem chimären

Protein auf, das durch Fusion der β -Galactosidase- mit der Cholin-Bindungsdomäne gebildet wurde;^[144] das immobilisierte Protein katalysierte die Hydrolyse von (*p*-Aminophenyl)- β -D-galactopyranosid, einem synthetischen Substrat der β -Galactosidase, und das freigesetzte *p*-Aminophenol wurde elektrochemisch detektiert.

Wechselwirkungen zwischen Cofaktor und Protein können zum Anheften von Enzymen an feste Träger genutzt werden. Redox-Cofaktoren wie Flavinadenindinucleotidphosphat (FAD) oder Pyrrolochinolinochinon (PQQ) **5** sind über nichtkovalente Wechselwirkungen fest mit dem Protein verbunden. Andere Redox-Cofaktoren wie Nicotinamadenindinucleotid (NAD $^+$ **6**, siehe Abbildung 15) und Nicotinamadenindinucleotidphosphat (NADP $^+$ **7**, siehe Abbildung 15) arbeiten auf einen Diffusionsweg und bilden temporäre Affinitätskomplexe mit den jeweiligen NAD(P) $^+$ -abhängigen Enzymen, die den Cofaktor-vermittelten Elektronentransfer ermöglichen. Diese Affinitätswechselwirkungen ermöglichen den Aufbau von Redoxenzymelektroden (Abbildung 14 A). Eine Monoschicht aus **5** wurde auf einer Goldoberfläche aufgebaut und kovalent an das Amino-derivatisierte Flavinadenindinucleotid **8** gebunden. Apo-Glu-

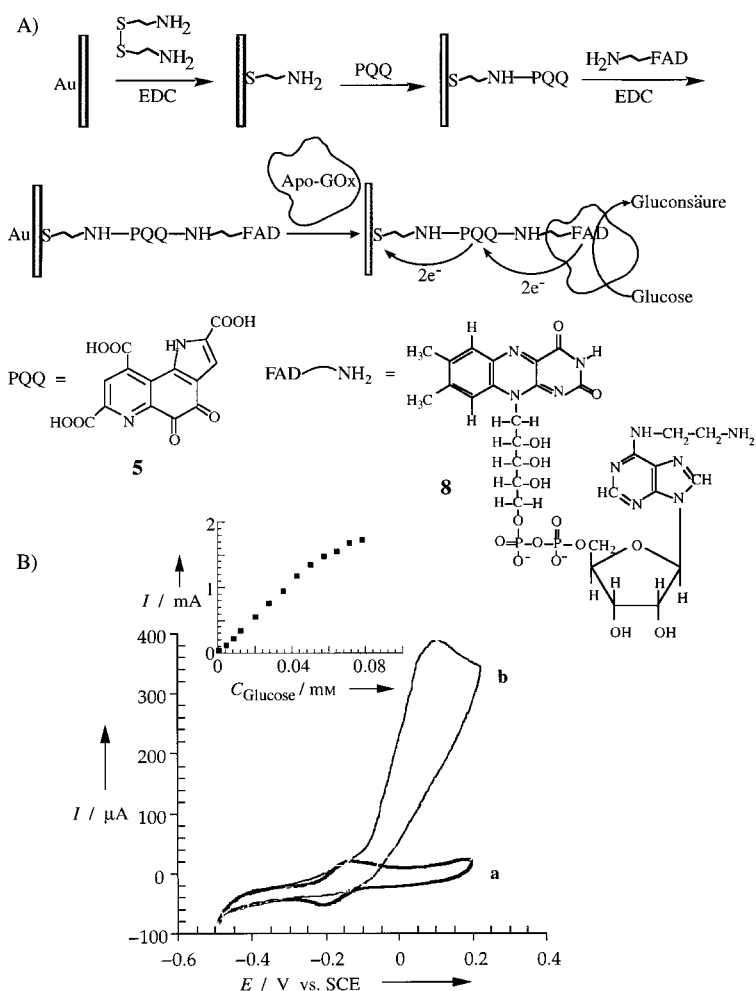


Abbildung 14. A) Rekonstitution von Apo-GOx an einer PQQ-FAD-Monoschicht auf einer Goldelektrode. B) Cyclovoltammogramme der rekonstituierten Glucose-Oxidase a) ohne Glucose, b) mit Glucose (80 mM); 5 mVs $^{-1}$ Abtastgeschwindigkeit. Einschub: amperometrische Antwort (gemessen durch Chronoamperometrie) der Enzymelektrode als Funktion der Glucosekonzentration.

cose-Oxidase (Apo-GOx) ohne FAD-Cofaktor wurde mit dem halbsynthetischen FAD-Cofaktor auf der Elektrode rekonstituiert.^[145] Die PQQ-Schicht vermittelte den Elektronentransfer von der FAD-Einheit auf die Elektrodenoberfläche, und das rekonstituierte Enzym zeigte eine beispiellos hohe bioelektrokatalytische Aktivität bei der Oxidation von Glucose (siehe Abschnitt 8). Analog wurde eine PQQ-Monoschicht auf einer Goldelektrode zur Rekonstitution der PQQ-abhängigen Apo-Glucose-Dehydrogenase eingesetzt.^[2c, 146] Hier wurde die elektrochemische Oxidation von Glucose durch den rekonstituierten Biokatalysator in Gegenwart eines diffundierenden Elektronenvermittlers stimuliert.

Auch Redoxproteine wie Myoglobin wurden auf leitenden Trägern rekonstituiert.^[147] Beispielsweise wurde ein Fe^{III}-Protoporphyrin-IX-Komplex als Monoschicht auf einer Goldelektrode aufgebracht und Apo-Myoglobin mit dieser Häm-Cofaktor-Monoschicht rekonstituiert. Während natürliches Myoglobin wegen der Isolierung des Hämzentrums normalerweise keine elektrische Kommunikation mit Elektrodenträgern zeigt, stand das auf der Oberfläche rekonstituierte Myoglobin in elektrischem Kontakt mit der Elektrode. Das wurde auf die Ausrichtung des Hämzentrums in einer Orientierung, die den Elektronenaustausch mit der Elektrode begünstigt, zurückgeführt.

Im Labor hergestellte Verbindungen, die natürliche Stoffe ersetzen können und Affinitätswechselwirkungen mit Proteinen aufweisen, wurden als Monoschichten auf Elektroden immobilisiert und als „Instruktionsmatrices“ zum Aufbau weiterer Proteinschichten genutzt. Ein Beispiel sind künstliche Farbstoffe, die Affinitätswechselwirkungen mit NAD(P)⁺-abhängigen Enzymen eingehen (z.B. Cibacronblau F3G-A) und als Monoschichten auf Goldelektroden zur Verankerung von NAD⁺-abhängigen Enzymen verwendet wurden.^[148] Die Affinitätskomplexe der farbstoffbeschichteten Enzymmatrices existieren in einer bioaktiven Konfiguration, es fehlt ihnen aber der elektrische Kontakt mit der Elektrode. Die Zugabe eines diffundierenden NAD⁺-Cofaktors löst die biokatalytischen Aktivitäten aus.

6. Vernetzung von durch Affinitätswechselwirkungen stabilisierten Protein(Enzym)-Schichten auf Elektroden

Biokatalytische Elektroden mit elektrischem Kontakt zu NAD⁺-abhängigen Enzymen wurden durch Erzeugung von Affinitätskomplexen aus einer Katalysator/NAD⁺-Monoschicht und dem jeweiligen Enzym erhalten.^[6] Eine PQQ-Monoschicht, die kovalent an ein Amino-funktionalisiertes Nicotinamidadenindinucleotid (**9**) gebunden war, wurde auf einer Goldelektrode aufgebaut. Die so erhaltene funktionalisierte Elektrode bindet NAD⁺-abhängige Enzyme wie Lactat-Dehydrogenase (LDH) oder Alkohol-Dehydrogenase (AlcDH) über Affinitätswechselwirkungen zwischen dem Cofaktor und dem Biokatalysator (Abbildung 15 A). Diese Enzymelektroden elektrokatalysieren die Oxidation des jeweiligen Substrats, Milchsäure bzw. Ethanol. Die bioelektro-

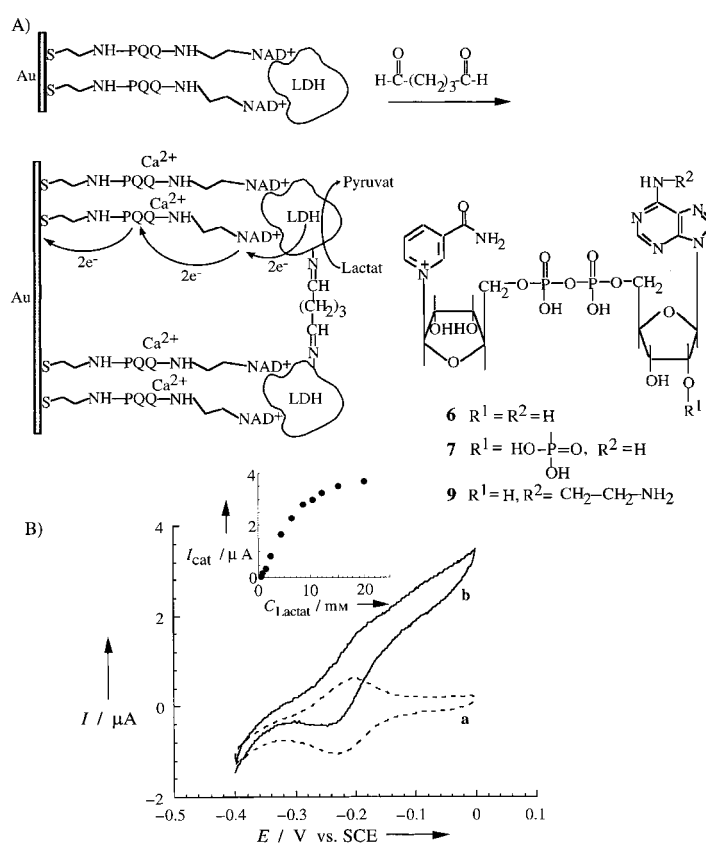


Abbildung 15. A) Aufbau einer integrierten LDH-Monoschicht-Elektrode durch Vernetzung des aus dem Enzym und einer PQQ-NAD⁺-Monoschicht auf einer Goldelektrode gebildeten Affinitätskomplexes. B) Cyclovoltammogramme dieser Elektrode a) ohne Lactat, b) mit Lactat (20 mM); 2 mV s⁻¹ Abtastgeschwindigkeit. Einschub: amperometrische Antwort der integrierten Elektrode als Funktion der Lactatkonzentration.

katalytischen Umwandlungen verlaufen über die biokatalysierte, Substrat-induzierte Bildung von NADH und dessen Oxidation durch das katalytische Zentrum von PQQ. Die Enzymelektrode wies nur eine zeitlich begrenzte Stabilität auf: Etwa 25 % des Biokatalysators wanderten innerhalb von 30 min aus der Monoschicht in die Elektrolytlösung. Erst das Vernetzen der mit der Monoschicht aus PQQ/NAD⁺-Cofaktor assoziierten Enzymschicht mit Glutardialdehyd erzeugte eine stabile, integrierte Cofaktor-Enzym-Elektrode (siehe Abbildung 15 B).

Protein-Protein-Affinitätswechselwirkungen spielen eine große Rolle beim biologischen Elektronentransfer. Cytochrom c vermittelt beispielsweise den Elektronentransfer zu mehreren Redoxenzymen wie Cytochrom-Oxidase, Lactat-Dehydrogenase und einige Kupferenzyme.^[149] Derartige Elektronentransferreaktionen laufen in Protein-Protein-Affinitätskomplexen ab.^[150] Mikropoxidase-11 (MP-11 **10**, siehe Abbildung 16) ist ein Häm enthaltendes Oligopeptid aus elf Aminosäureresten, die die Mikroumgebung des aktiven Zentrums von Cytochrom c bilden.^[151] Es wird durch Spaltung von nativem Cytochrom c mit Trypsin erhalten. Trotz der strukturellen Ähnlichkeiten zwischen MP-11 und Cytochrom c unterscheiden sich die Redoxpotentiale ihrer Hämeinheiten beträchtlich ($E^\circ = -0.40$ V^[125a] bzw. $+0.012$ V (gegenüber SCE)^[149]). MP-11 wurde als Monoschicht auf eine Gold-

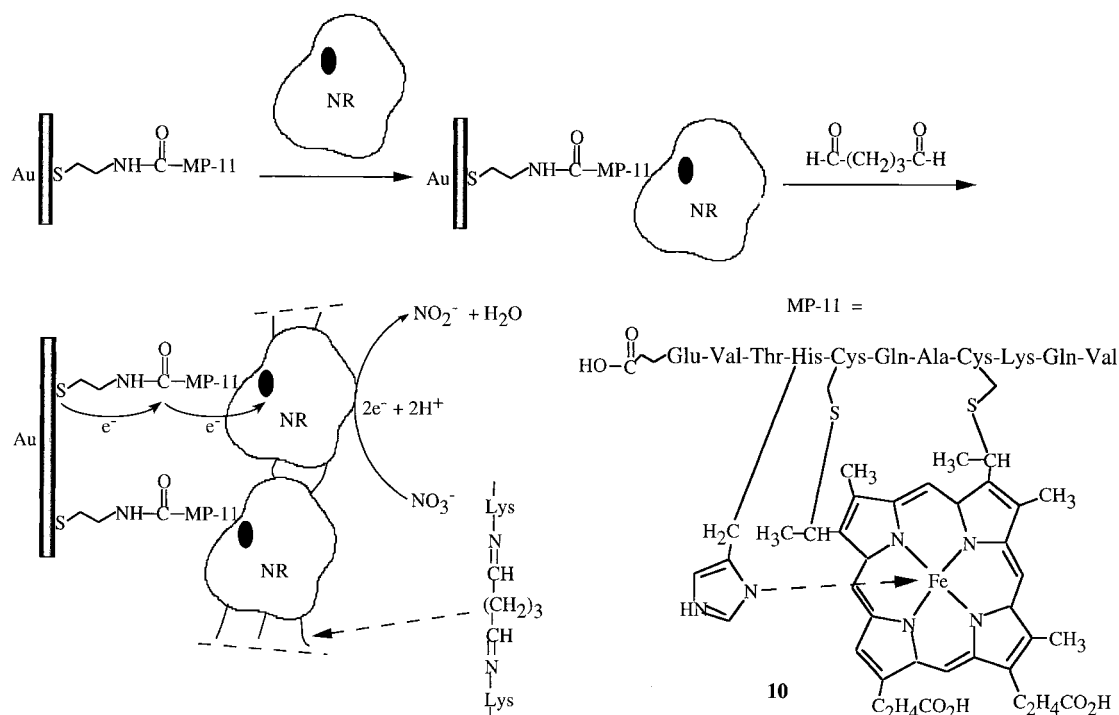


Abbildung 16. Aufbau einer integrierten Nitrat-Messelektrode durch Vernetzung eines Affinitätskomplexes aus MP-11 und Nitrat-Reduktase auf einer Goldelektrode.

elektrode aufgebracht,^[152] und die so funktionalisierte Elektrode stimulierte den Elektronentransfer zu Hämproteinen wie Myoglobin, Hämoglobin und Cytochrom c.^[125c] Dies wurde auf die Bildung von Affinitätskomplexen zwischen den Proteinen und MP-11 an der Elektrodengrenzfläche zurückgeführt. Die Affinitätswechselwirkungen zwischen MP-11 und Hämproteinen oder Cytochrom-abhängigen Enzymen wurden zum Aufbau einer Nitrat-Reduktase-Enzymelektrode genutzt (Abbildung 16).^[152] Die Cytochrom-abhängige Nitrat-Reduktase (NR (E.C. 1.9.6.1), aus *Escherichia coli*) bildete einen Affinitätskomplex mit der MP-11-Monoschicht. Die Vernetzung der Affinitätskomplexschicht mit Glutaraldehyd führte zu einer stabilen Enzymelektrode, die die bioelektrokatalysierte Reduktion von Nitrat zu Nitrit bewirkte. Die bioelektrokatalysierte Umwandlung verlief mit einer Stromausbeute von ca. 85 %, und die Elektrode wurde als amperometrischer Nitratsensor eingesetzt.

Auch mit Cobalt(II)-protoporphyrin IX rekonstituiertes Myoglobin bildete einen Affinitätskomplex mit der MP-11-Monoschichtelektrode (Assoziationskonstante $K_a = 1.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, Geschwindigkeitskonstante für den Elektronentransfer im supramolekularen Komplex: 0.3 s^{-1}).^[153] MP-11 vermittelt die elektrokatalytische Reduktion von Co^{II} -Myoglobin, und das resultierende Cobalthydrid hydriert Alkine, z. B. Acetylendicarbonsäure zu Maleinsäure. Das Vernetzen der Affinitätskomplexe aus Co^{II} -Myoglobin und der MP-11-Monoschicht mit Glutaraldehyd lieferte eine integrierte, stabile, beschichtete Elektrode für die elektrokatalytische Hydrierung von Acetylendicarbonsäure mit einer Stromausbeute von ca. 80 %.

Kürzlich wurden synthetische De-novo-Polypeptide aus vier Helices für die Nachahmung der Cytochrom-b-Funktionen und zur Maßanfertigung von beschichteten, vernetz-

ten, elektrokatalytischen Elektroden verwendet. Ein solches Protein (14728 Da), das in den jeweiligen „A“-Helices vier Histidineinheiten enthält, wurde auf Goldelektroden aufgebracht (Abbildung 17). Anschließend wurden zwei Einheiten Fe^{III} -Protoporphyrin IX pro Proteinbündel rekonstituiert, um eine vektorielle Elektronentransferkaskade zu erreichen.^[131] Die Affinitätskomplexe dieses Proteins mit der Cytochrom-

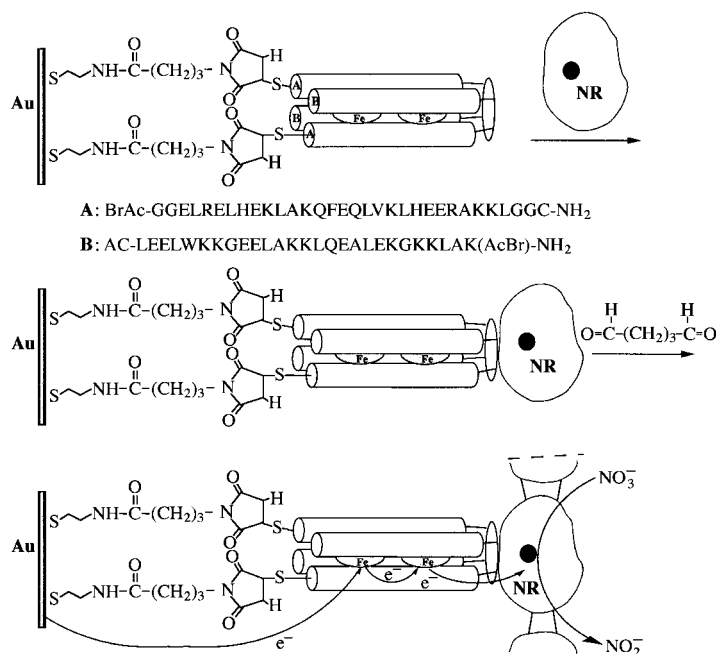


Abbildung 17. Aufbau einer Nitrat-Messelektrode durch Vernetzung eines Affinitätskomplexes aus Nitrat-Reduktase und einem mit Fe^{III} -Protoporphyrin rekonstituierten De-novo-Proteinbündel aus vier Helices.

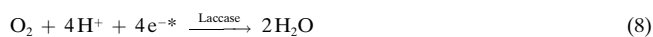
abhängigen Nitrat-Reduktase oder mit Co^{II} -Protoporphyrin-IX-rekonstituiertem Myoglobin^[154] wurden mit Glutardialdehyd vernetzt und lieferten elektrokatalytische Elektroden. Die mit NR hergestellte Elektrode wurde für die elektrokatalysierte Reduktion von NO_3^- zu NO_2^- eingesetzt und diente als amperometrischer NO_3^- -Sensor, die mit Co^{II} -Protoporphyrin-IX-rekonstituiertem Myoglobin hergestellte stimulierte die elektrokatalysierte Hydrierung von Acetylendicarbonsäure zu Maleinsäure.

7. Elektronentransfer in Enzymelektroden

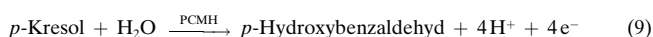
Das Wesentliche jedes Biosensors oder bioelektronischen Gerätes ist die Herstellung einer elektrischen Verbindung zwischen dem Redoxprotein und dem Elektrodenmaterial. Der direkte Elektronentransfer zwischen den aktiven Redoxzentren der Proteine und der Elektrode ist normalerweise gehindert, da das Redoxzentrum sterisch durch die Proteinmatrix isoliert wird (siehe Einleitung). Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass bestimmte Enzyme oder Redoxproteine eine elektrische Kommunikation mit dem Elektrodenmaterial zeigen und dass diese Enzyme biokatalysierte, elektrisch stimulierte Umwandlungen antreiben.^[155] Die direkte Elektroreduktion von H_2O_2 durch Meerrettich-Peroxidase (HRP) konnte gezeigt werden [Gl. (7)],^[156] und



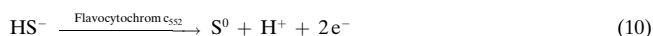
verwandte Häm enthaltende Oxidasen, z. B. Cytochrom-c-Peroxidase,^[157] Lactat-Peroxidase^[158] und Chlorperoxidase,^[159] zeigten einen ähnlichen direkten Elektronenaustausch mit Elektrodenoberflächen. Laccase (eine kupferhaltige Polyphenol-Oxidase) elektrokatalysiert die Reduktion von molekularem Sauerstoff [Gl. (8)].^[160] Hier wird der direkte Elek-



tronentransfer auf die Platzierung des aktiven Redoxzentrums an der Proteinperipherie zurückgeführt. Eine detaillierte kinetische Untersuchung der Peroxidase-katalysierten Reduktion von H_2O_2 ^[161] ergab beispielsweise, dass 42 % der gesamten Enzymmoleküle auf der Elektrode in einer Konfiguration vorliegen, in der das Häm-Redoxzentrum für den Elektronentransfer zugänglich ist. Einige der Enzyme enthalten zwei Redoxzentren; der Elektronentransfer verläuft hier vektoriell von einem peripheren Zentrum zu einem innen gelegenen. *p*-Kresolmethyl-Hydroxylase (PCMH), ein FAD und Häm enthaltendes Redoxenzym, bewirkt die direkte Oxidation von *p*-Kresol zu *p*-Hydroxybenzaldehyd [Gl. (9)].^[162] Ähnlich ist Flavocytochrom c_{552} (Sulfidcyto-

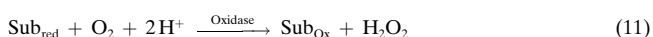


chrom-c-Oxidoreduktase), das FAD und zwei kovalent-verknüpfte Hämgruppen enthält, bei der Oxidation von Sulfid zu Schwefel bioelektrokatalytisch aktiv [Gl. (10)].^[163] Der direkte Elektronentransfer bei diesen Redoxenzymen macht ihre



Anwendung als bioaktive Schnittstellen in amperometrischen Biosensoren möglich. Über die Detektion von *p*-Kresol,^[162] Methylamin^[164] und Fructose^[165] in Gegenwart von *p*-Kresolmethyl-Hydroxylase, Methylamin-Dehydrogenase bzw. Fructose-Dehydrogenase wurde berichtet.

Der direkte elektrische Kontakt bestimmter Enzyme mit den Elektroden kann für die Maßanfertigung bioelektrokatalytischer Sensorsysteme genutzt werden. Eine Vielzahl von Oxidasen nutzt molekularen Sauerstoff als Elektronenacceptor für die Oxidation ihrer Substrate (Sub). Enzyme wie Brenzcatechin-Oxidase, Aminosäure-Oxidase, Glucose-Oxidase, Lactat-Oxidase, Pyruvat-Oxidase, Alkohol-Oxidase, Xanthin-Oxidase und Cholesterin-Oxidase katalysieren die O_2 -Oxidation ihrer Substrate unter Bildung von H_2O_2 [Gl. (11)]. Der direkte Elektronenaustausch zwischen HRP



und Elektroden ermöglicht die Elektroreduktion von H_2O_2 im Spannungsbereich von -0.2 bis 0 V (gegenüber SCE), so dass die Kupplung von HRP mit diesen Oxidasen amperometrische Biosensoren zugänglich macht. Die erzeugte H_2O_2 -Menge ist von der Substratmenge abhängig, und damit ist der resultierende Strom ein quantitatives Maß für das zu analysierende Substrat. Entsprechend wurden amperometrische, auf HRP und einer Oxidase basierende Biosensoren für folgende Zwecke aufgebaut: mit Glucose-Oxidase zur Glucoseanalyse,^[166] mit Alkohol-Oxidase zur Alkoholdetektion,^[167] mit Cholin-Oxidase zur Cholinanalyse^[166a] und mit Aminosäure-Oxidase zur Aminosäurebestimmung.^[168] Als leitendes Material wurden Ruß,^[156] Pyrolysegraphit,^[169] plattinierte Kohlenstoffpartikel^[170] und kolloidales Gold^[171] verwendet, und Kohlenstoffpaste^[172] oder Polypyrrol^[166e, 172a] dienten zum Einschließen der Biokatalysatoren.

Bei Enzymelektroden ohne direkte elektrische Kommunikation zwischen Enzym und Elektrode kann der elektrische Kontakt mit Hilfe synthetischer oder biologisch aktiver Ladungsträger hergestellt werden (vermittelter Elektronentransfer, MET). Dabei kann auf Diffusion zurückgegriffen werden (Abbildung 18 A): Der Elektronenvermittler wird an der Elektrodenoberfläche oxidiert (bei einer oxidativen Bio-transformation) oder reduziert (bei einer reduktiven Bio-transformation) und diffundiert dann in das Protein, wodurch ein Abstand für den Elektronentransfer erreicht wird, der bezüglich des aktiven Redoxzentrums für den MET und der elektrischen Aktivierung des Biokatalysators ausreichend kurz ist. Ferrocenderivate, Ferricyanid, Chinone, *N,N*-Dialkyl-4,4'-bipyridiniumverbindungen und andere elektroaktive molekulare Substrate wurden für den MET und die elektrische Aktivierung von Redoxenzymen eingesetzt.^[9b] Tabelle 5 gibt eine repräsentative Zusammenfassung von bioelektrokatalytischen Umwandlungen, die durch den diffusiven MET stimuliert werden.

Chiroselektiver MET wurde in einer Reihe von Untersuchungen mit diffundierenden, chiralen Elektronenvermittlern behandelt.^[185] So stimulieren die chiralen Verbindungen (*S*)- und (*R*)-*N,N*-Dimethyl-1-ferrocenylethylamin [(*S*)- bzw. (*R*)-Fc] die chiroselektive bioelektrokatalysierte Oxidation von Glucose in Gegenwart von Glucose-Oxidase,^[185a] wobei

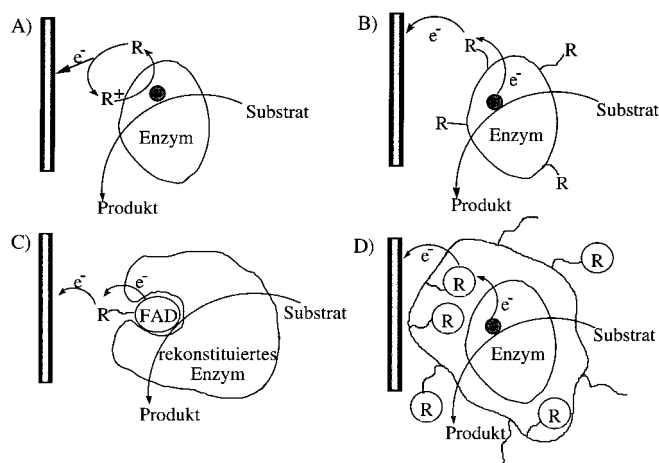


Abbildung 18. Möglichkeiten zur Herstellung des elektrischen Kontakts zwischen Redoxenzym und Elektrode (R ist ein Elektronenrelais): A) Verwendung eines diffundierenden Elektronenvermittlers, B) chemische Modifizierung des Proteins mit Elektronenrelais-Einheiten, C) Rekonstitution eines Apo-Flavoenzyms mit einer synthetischen Elektronenrelais-FAD-Dyade, D) Immobilisierung des Biokatalysators in einem Redoxpolymer.

(*S*)-Fc etwa doppelt so wirksam ist wie (*R*)-Fc. Die kinetische Analyse der beiden Glucose-Oxidationen lässt darauf schließen, dass das Protein über diastereomere Wechselwirkungen eine chirale Diskriminierung der Ein- und Austrittswege des Elektronenvermittlers induziert. Eine chirale Diskriminierung beim MET und bei den nachfolgenden bioelektrokatalysierten Umwandlungen wurde mit einer Reihe von diffundierenden Elektronenvermittlern und Enzymen beobachtet.^[185c, 185d]

Das Konzept der enantioselectiven, elektrischen Verknüpfung von Redoxenzymen mit Elektrodenoberflächen wurde mit dem Aufbau einer Monoschicht aus einem chiralen Elektronenvermittler auf einer Elektrode weiter entwickelt.^[186] Dabei wurde (*S*)- oder (*R*)-2-Methylferrocencarbonsäure als Monoschicht auf einer Goldelektrode eingebracht (Abbildung 19). Die Monoschicht vermittelte die chirale selektive Oxidation von Glucose in Gegenwart von Glucose-Oxidase, wobei das (*S*)-Enantiomer ca. 1.9-mal aktiver war.

Die chemische Modifizierung von Redoxenzymen mit Elektronenrelais-Einheiten ermöglicht den MET und die elektrische „Verkabelung“ von Proteinen^[187] (siehe Abbil-

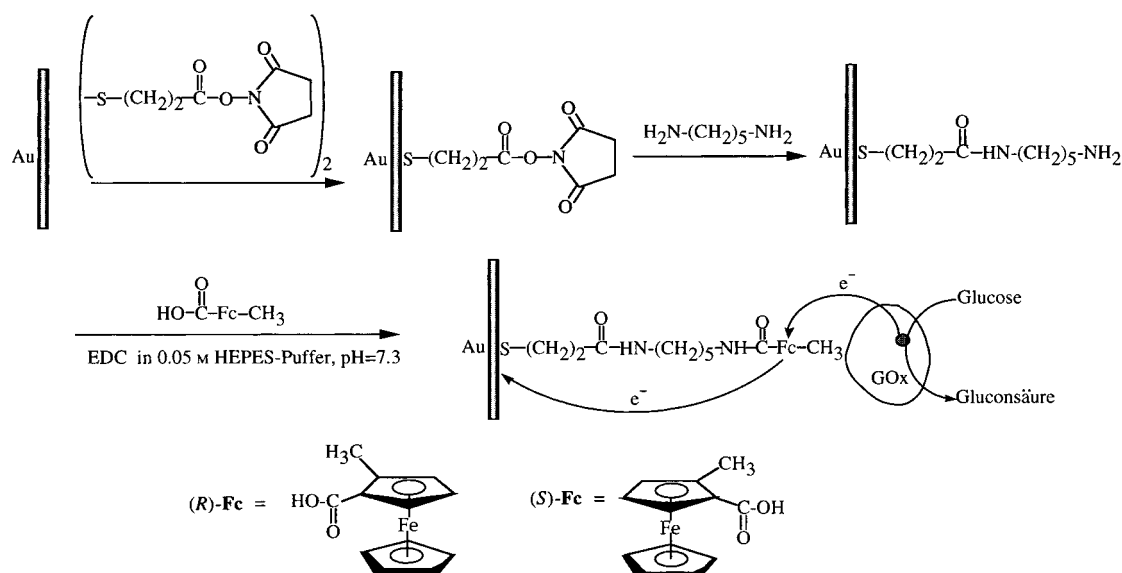


Abbildung 19. Aufbau einer chiralen Ferrocen-Monoschicht auf einer Elektrode.

Tabelle 5. Für immobilisierte Enzyme verwendete diffundierende Elektronenvermittler.

Enzym	Vermittler	Redoxpotential des Vermittlers [mV vs. SCE]	Lit.
Glucose-Oxidase (EC 1.1.3.4) aus <i>Aspergillus niger</i>	1,4-Benzochinon	39	[173]
	1,1-Dimethylferrocen	100	[174]
	Ferrocencarbonsäure	275	[175]
	Phenazinmethosulfat	– 161	[176]
	Tetrathiafulvalen	300	[177]
	Tetracyanochinodimethan	127	[178]
Xanthin-Oxidase (EC 1.2.3.3) aus Buttermilch	[Fe(CN) ₆] ^{4–}	180	[10a]
Cholesterin-Oxidase (EC 1.1.3.6) aus <i>Pseudomonas sp.</i>	Ferrocencarbonsäure	275	[179]
Hydrogenase (Fe/S-Typ)	Dimethylviologen	– 681	[180]
Meerrettich-Peroxidase (EC 1.11.1.7)	[Fe(CN) ₆] ^{4–}	180	[181]
Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.2.3) aus Hefe	[Fe(CN) ₆] ^{4–}	180	[173a]
Glucose-Dehydrogenase (EC 1.1.99.17) aus <i>A. Calcoaceticus</i>	1,1'-Dimethylferrocen	100	[182]
	Phenazinethosulfat	– 172	[183]
NADH-Dehydrogenase (EC 1.6.99) aus <i>Bacillus stearothermophilus</i>	Ferrocenylmethanol	185	[184]
	Ferrocencarbonsäure	275	[184]

dung 18B). Das kovalente Anknüpfen dieser Einheiten an die Proteinperipherie oder an innere Stellen führt zu kurzen Abständen zwischen den Elektronenrelais. Das Springen oder Tunneln von Elektronen von der Peripherie zum aktiven Zentrum oder umgekehrt ermöglicht den Elektronenaustausch zwischen dem Redoxenzym und seiner Umgebung. Glucose-Oxidase beispielsweise wurde kovalent über eine Carbodiimideinheit mit Ferrocen als Elektronenrelais verknüpft.^[187a,b] Auch andere chemische Verfahren wurden verwendet, um Elektronenrelais an die Proteinperipherie zu binden. So wurden Carbonylgruppen, die in Glycoproteinen (z.B. in Glucose-Oxidase) durch Oxidation mit Periodat erzeugt wurden, an Amino-funktionalisiertes Ferrocen unter Bildung von Schiff-Basen gekuppelt,^[187c] und ein Ruthenium-komplex wurde am Rückgrat einer Glucose-Oxidase angebracht, die zuvor mit Pyridineinheiten modifiziert worden war.^[187b] Die zufällig auf dem Protein verteilten Relaiseinheiten stellten den elektrischen Kontakt zwischen dem Enzym und der unmodifizierten Elektrodenoberfläche her. Es wurde gezeigt, dass längere Spacer zwischen Relais und Enzym eine höhere Mobilität zur Folge haben, den Elektronentransferabstand verkürzen und die bioelektrokatalytische Aktivität des Enzyms steigern.^[187c] Das partielle und reversible Entfalten des Enzyms durch Harnstoff während der kovalenten Modifizierung ist ebenfalls wichtig, da dadurch das Anknüpfen des Relais an nahe dem aktiven Zentrum des Enzyms liegende Proteinstellen möglich wird.^[188] Elektronenrelais tragende Enzyme wurden auch an einer Elektrodenoberfläche vernetzt, was eine ungeordnete Multischicht zur Folge hatte,^[119d] und in ein leitendes Polymer auf einem Elektrodenträger eingebaut.^[189] Die immobilisierten Enzyme standen über die Elektronenrelaiseinheiten in elektrischem Kontakt, was die Wanderung der Elektronen durch die Schicht ermöglichte.

Die chemische Modifizierung von Redoxproteinen mit synthetischen Elektronenrelais wird immer von einer partiellen Denaturierung des Biokatalysators begleitet. Eine höhere Beladung des Proteins mit dem Elektronenrelais verbessert den elektrischen Kontakt, da die Elektronentransferabstände verkürzt werden, führt aber auch zu einer stärkeren Desaktivierung des Enzyms. Bei Glucose-Oxidase erwiesen sich 12–13 Ferroceneinheiten pro Molekül als optimal für den MET.^[188] Die Geschwindigkeitskonstante des Elektronentransfers zwischen der FAD-Position des Enzyms und dem nächstgelegenen Elektronenrelais betrug ca. 0.9 s^{-1} , was wesentlich weniger ist als beim Elektronentransfer zum nativen Elektronenacceptor des Enzyms (O_2 , ca. $5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$).^[188] Die Verbesserung

des elektrischen Kontakts zwischen dem aktiven Zentrum des Enzyms und der Elektrode kann man sich auf zwei sich ergänzenden Wegen vorstellen: 1) Modifizierung des Redoxproteins mit Relaiseinheiten an für den MET optimalen Positionen und 2) Ausrichtung des Relais-funktionalisierten Bioelektrokatalysators relativ zur Elektrodenoberfläche.

Über eine neue Methode zur elektrischen Verkabelung von Redoxenzymen, genau gesagt Flavoredoxproteinen, durch Modifizierung des Redoxenzym mit einem Elektronenrelais am Cofaktor und unter Verwendung einer Rekonstitutionsmethode wurde berichtet (siehe Abbildung 18C).^[190] Der native Cofaktor (hier Flavinadenindinucleotidphosphat, FAD) wurde durch einen halbsynthetischen Cofaktor ersetzt, an den ein Elektronenrelais gebunden ist, was einen Biokatalysator mit elektrischem Kontakt zum leitenden Träger lieferte. Der halbsynthetische Cofaktor aus *N*-Ferrocenylmethyl-6-aminohexansäure **11** und N^6 -(2-Aminoethyl)-FAD **8** (Abbildung 20) wurde zur Rekonstitution von Apo-Glucose-Oxidase und Apo-D-Aminosäure-Oxidase genutzt. Die resultierenden rekonstituierten Enzyme standen in direktem elektrischen Kontakt mit den Elektrodenoberflächen und dienten als „Elektroenzyme“ zur elektroinduzierten, biokatalysierten Oxidation von Glucose bzw. D-Alanin.^[190]

Eine weitere Methode, Redoxenzyme in elektrischen Kontakt mit Elektrodenträgern zu bringen, ist der Einschluss des Proteins in Polymere mit Redoxseinheiten oder in leitenden Polymere (siehe Abbildung 18D).^[25, 31c, 191] Die Redoxrelais-

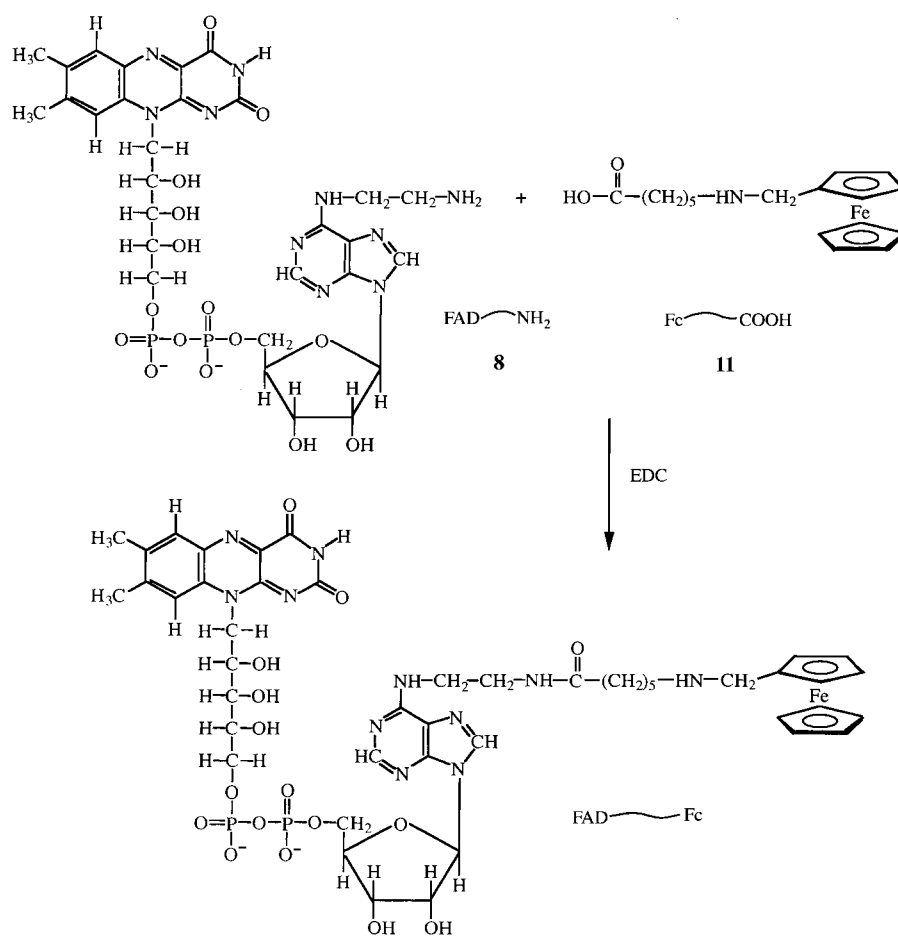


Abbildung 20. Synthese der Ferrocen-FAD-Dyade.

einheiten am Polymer dringen in das Redoxprotein ein und können so für den MET günstige Abstände erreichen. In Einklang damit beeinflusst die Länge des Spacers zwischen Polymer und Relais die Effizienz des MET.^[192] Polylysin wurde über Spacer unterschiedlicher Länge mit *N*-Carboxyalkyl-*N'*-methyl-4,4'-bipyridinium **12** als redoxaktiver Gruppe funktionalisiert (Abbildung 21). Der MET zu Glutathion-Reduktase und die bioelektrokatalysierte Reduktion

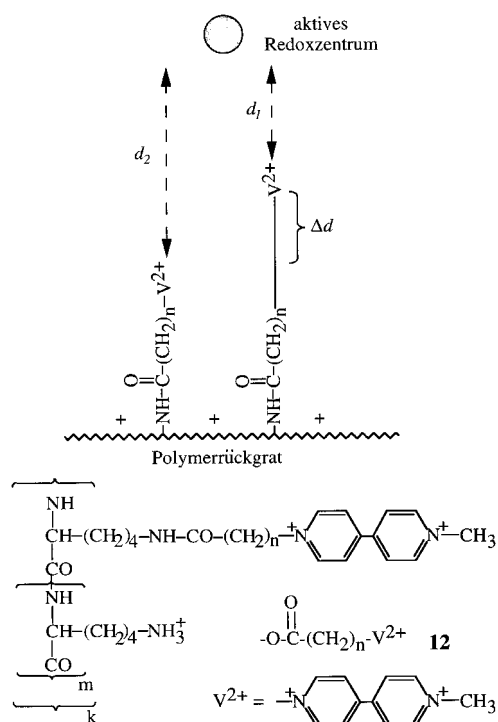


Abbildung 21. Modell zur räumlichen Orientierung eines Redoxzentrums in einem Protein bezüglich eines positiv geladenen Polymers mit redoxaktiven Resten.

von oxidiertem Glutathion (GSSG) wurden als Funktion der Spacerlänge untersucht. Danach ist der MET bei längeren Spacern besser. Die bioelektrokatalysierte Reduktion von GSSG in Gegenwart des Enzyms und des funktionalisierten Polymers wurde auf die Bildung eines Komplexes zwischen dem positiv geladenen Polylysin und der negativ geladenen Glutathion-Reduktase zurückgeführt, wobei längere Spacer kurze Abstände zwischen dem Redoxrelais und dem aktiven Zentrum des Proteins und somit einen effektiveren MET ergeben.

Es gibt viele Beispiele für bioelektrokatalytische Elektroden mit dünnen Filmen aus in Polymeren eingebetteten Enzymen.^[31c] Die amphiphilen Polymere zur komplementären Immobilisierung und elektrischen Verdrahtung der Enzyme basieren meist auf Polypyrrolen,^[193] Polythiophenen,^[31d] Siloxanen,^[29d, 31g] Polyaminen^[31h] oder Copolymeren aus 4-Vinylpyridin und 4-Aminostyrol.^[25] Das Polymermückgrat wurde mit Ferroceneinheiten,^[31g, 193a, 194] Os(bpy)₂-Komplexen^[25] oder Chinonen^[195] modifiziert, um den elektrischen Kontakt zu oxidativen Enzymen, z.B. Glucose-Oxidase, Glutamat-Oxidase und Polyphenol-Oxidase, herzustellen. Für den elektrischen Kontakt zu reduktiven Enzymen wie Nitrat-

Reduktase^[31d, 193c] und Pyridinnucleotid-Oxidoreduktase^[196] dienten Viologene (*N,N'*-Dialkyl-4,4'-bipyridiniumsalze) als Polymersubstituenten.

8. Elektrischer Kontakt von Redoxproteinen an Monoschicht-funktionalisierten Elektroden

Die Funktionalisierung von Elektroden mit elektrochemisch inaktiven, niedermolekularen Verbindungen beeinflusst die elektrische Kommunikation der Redoxproteine oder -enzyme mit den Elektrodenträgern. An Goldelektroden (in einigen Veröffentlichungen waren es auch Platin- oder Silberelektroden), die mit Monoschichten aus verschiedenen beschleunigend wirkenden Gruppen (Promotoren) modifiziert waren, wurde eine reversible elektrochemische Reaktion von Cytochrom c mit einer teilweise frei liegenden Häm-Stelle^[197] beobachtet.^[149c, 198] Normalerweise enthalten diese Promotoren eine schwefelhaltige Gruppe zur Verankerung mit der Oberfläche (Thiol oder Disulfid) und eine organische funktionelle Einheit, die mit dem Cytochrom-c-Rückgrat in Wechselwirkung tritt. Die Promotor-Monoschicht verhindert den direkten Kontakt zwischen Protein und Metallelektrodenoberfläche, und damit das irreversible Entfalten und Denaturieren des Proteins. Die Wechselwirkungen zwischen Promotor und Protein basieren auf Wasserstoffbrückenbindungen und/oder anziehenden elektrostatischen Bindungen, die ein spezifisches Ausrichten des Proteins an der Elektrodenoberfläche zur Folge haben. So ausgerichtet sind die Abstände für den Elektronentransfer ausreichend kurz, um einen effizienten elektrischen Kontakt und elektrochemische Vorgänge zu ermöglichen. Bis(4-pyridyl)disulfid ist der gebräuchlichste Promotor zur Aktivierung der elektrochemischen Grenzflächenreaktionen von Cytochrom c.^[199] Auch andere Thiol- oder Disulfidverbindungen sind effiziente Promotoren.^[200] Aminosäure- und Oligopeptid-Monoschichten wurden sowohl als Promotoren für elektrochemische Grenzflächenreaktionen von Cytochrom c^[201] als auch zur reversiblen elektrochemischen Aktivierung anderer Cytochrome genutzt.^[202] Auch mit anderen Promotoren wie Imidazol,^[203] Thiophen^[204] und Iodid^[205] als Monoschichten auf Gold- oder Silberelektroden werden elektrochemische Umsetzungen mit Cytochrom c erleichtert. Des Weiteren wurde eine Monoschicht aus kolloidalen Goldpartikeln von 12 nm Durchmesser auf einer SnO₂-Elektrode als effizienter Promotor für die elektrochemischen Reaktionen von Cytochrom c identifiziert.^[206] Hierbei spielt die Morphologie der Metallpartikel eine Schlüsselrolle für den Aufbau des elektrischen Kontakts. Ähnlich gelang die Aktivierung der Grenzflächenelektrochemie anderer Redoxproteine und -enzyme wie Ferritin, blaue Kupferproteine, Azurin, Pseudoazurin, Umecyanin, Stellacyanin, Plantacyanin, Plastocyanin und Gurkenascorbat-Oxidase^[207] an Goldelektroden, die mit Monoschichten aus 4-Pyridinthiol (oder anderen Thiol- und Disulfidderivaten) modifiziert waren. Protonierte, Aminosiloxan-modifizierte Indiumoxidelektroden erwiesen sich als effiziente Grenzflächen, um den Elektronentransfer zum negativ geladenen Ferredoxin zu stimulieren.^[208] Diese Promotoren bringen die Proteinmoleküle auf der Elektroden-

oberfläche offenbar in eine Orientierung, die den Elektronentransfer erleichtert.

Redoxaktive, niedermolekulare Oligopeptide mit Redoxgruppen, die aus nativen Biomaterialien abgeleitet sind, könnten einen direkten Elektronenaustausch mit Elektroden ermöglichen. Mikroperoxidase-11 **10** (siehe Abbildung 16) ist ein Häm-Undeca-peptid, das die Mikroumgebung des aktiven Zentrums von Cytochrom c bildet.^[151] Da das aktive Zentrum von MP-11 durch die Oligopeptidkette nicht ausreichend abgeschirmt wird, wurden direkte elektrochemische Reaktionen von MP-11 in wässrigen^[209a] und nichtwässrigen Lösungen^[209b] an unmodifizierten Elektroden beobachtet. MP-11 wurde kovalent mit Amino-^[125a] und Carboxy-funktionalisierten Goldelektroden^[125d] über Carboxy- bzw. Aminogruppen verbunden. Die MP-11-Monoschicht konnte die H₂O₂-Reduktion^[125a] und die Reduktion von organischen Peroxiden in nichtwässrigen Lösungen elektrokatalysieren.^[125b]

Die MP-11-Monoschicht bildet mit Hämproteinen wie Cytochrom c, Myoglobin und Hämoglobin Affinitätskomplexe,^[125c] wobei laut mikrogravimetrischer Analyse die Assoziationskonstante im Fall von Myoglobin $3.9 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ beträgt. Diese Affinitätskomplexe ermöglichen die vermittelte Reduktion der Hämzentren in den Proteinen (Abbildung 22 A). Die MP-11-Monoschicht stimuliert auch den MET zu Cyto-

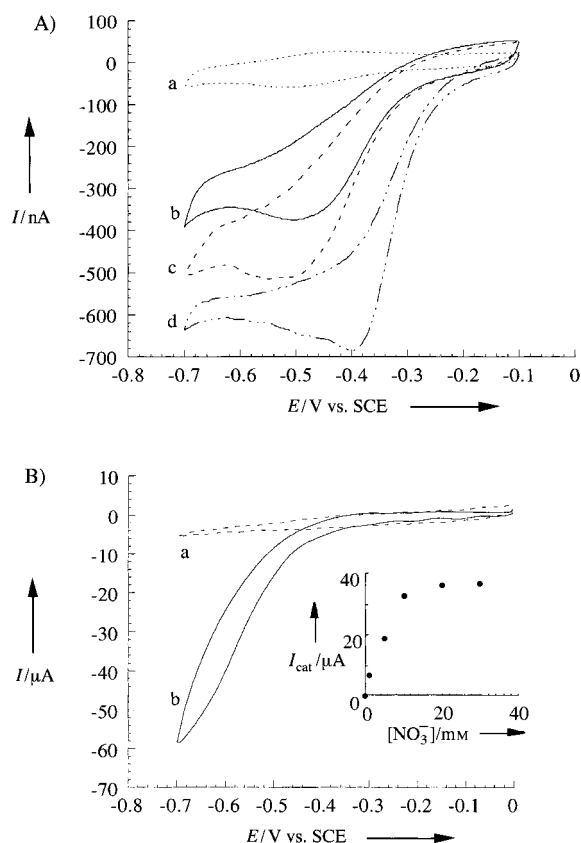


Abbildung 22. A) Cyclovoltammogramme einer MP-11-Monoschicht-Elektrode a) ohne, b)–d) mit Hämprotein: b) Hämoglobin ($6 \times 10^{-5} \text{ M}$), c) Myoglobin ($2 \times 10^{-4} \text{ M}$), d) Cytochrom c ($2 \times 10^{-4} \text{ M}$); 5 mV s^{-1} Abtastgeschwindigkeit. B) Cyclovoltammogramme einer Elektrode mit vernetzter MP-11/NR-Monoschicht: a) ohne Nitrat, b) mit Nitrat (20 mM); 5 mV s^{-1} Abtastgeschwindigkeit. Einschub: amperometrische Antwort der integrierten Elektrode als Funktion der Nitratkonzentration.

chrom-abhängigen Enzymen. Beispielsweise bildet die Monoschicht einen Affinitätskomplex mit der nativen, Cytochrom-*b*₅-abhängigen Nitrat-Reduktase (NR, EC 1.9.6.1, aus *Escherichia coli*),^[152] wobei die Assoziationskonstante laut Messungen mit der Quarzkristall-Mikrowaage $3.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ und die Oberflächenbedeckung etwa $3.8 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$ beträgt. Die Vernetzung der Affinitätskomplexschicht führte zu einer integrierten, stabilen Elektrode (siehe Abbildung 16). Abbildung 22 B zeigt die elektrokatalytischen Ströme, die mit Hilfe der MP-11/NR-beschichteten Elektrode in Gegenwart von Nitrat erzeugt werden. Da die Strommenge eine Funktion der Nitratkonzentration ist (Abbildung 22 B, Einschub), eignet sich die funktionalisierte Elektrode als amperometrischer Biosensor für Nitrat.

Native niedermolekulare Cofaktoren wie PQQ **5** verbinden NAD(P)⁺-abhängige Enzyme und Elektrodenträger elektrisch miteinander. So konnte an eine Cystamin-Monoschicht gebundenes PQQ^[104b, 122] die Elektrooxidation von NAD(P)H vor allem in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen katalysieren.^[210a] Analog wurde eine PQQ-Monoschicht, die kovalent mit Malat-Dehydrogenase (MalDH) verbunden war (Abbildung 23), zur elektrischen Aktivierung des Enzyms genutzt.^[122] Die biokatalysierte Oxidation von Äpfelsäure durch

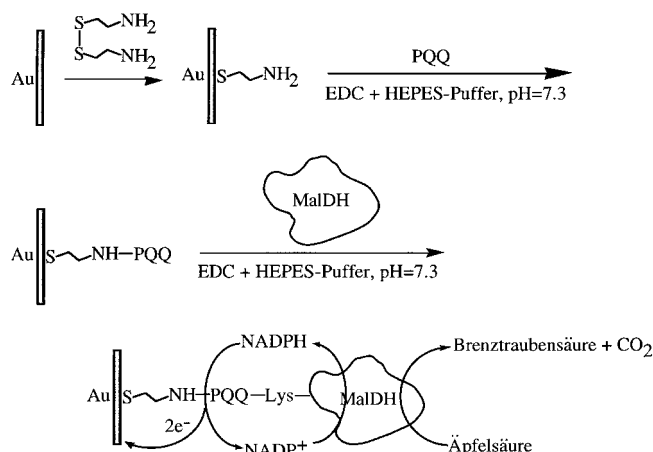


Abbildung 23. Aufbau einer PQQ-MalDH-Monoschichtelektrode und der amperometrischen Nachweis von Äpfelsäure mit NADP⁺ als diffundierendem Cofaktor.

MalDH erzeugt diffundierendes NADPH, das durch den PQQ-Elektrokatalysator oxidiert wird. Die erzeugte Strommenge steht in Bezug zur NADPH- und damit zur Äpfelsäurekonzentration, weshalb die Enzymelektrode Elemente eines amperometrischen Biosensors aufweist. Wegen der hohen Kosten des NAD(P)⁺-Cofaktors, die dessen Nutzung als diffundierende Komponente verhindern, erfordert die Verwendung von NAD(P)⁺-abhängigen Enzymen als bioaktive Stoffe für amperometrische Biosensoren die Integration von Cofaktor und Enzym in einer starren Konfiguration. Die NAD(P)⁺-abhängigen Enzyme arbeiten in der Natur über einen Diffusionsweg, bei dem der oxidierte Cofaktor in das Protein eindringt, die Elektronen (in Form von Hydridionen) aufnimmt und wieder aus der Proteinmatrix diffundiert. Die weitere Oxidation von NAD(P)H durch die Elektrode erfordert einen Katalysator.^[210] Die Affinitätswechselwirkun-

gen zwischen NAD⁺-Cofaktor und Cofaktor-abhängigem Enzym wurden zum Aufbau von integrierten Elektroden mit Cofaktor-Enzym-Beschichtung genutzt, die elektrisch verdrahtet sind.^[6] Der halbsynthetische NAD⁺-Cofaktor **9** wurde kovalent an eine PQQ-Monoschicht gebunden (siehe Abbildung 15A). An diese Monoschicht banden die NAD⁺-abhängigen Enzyme Lactat-Dehydrogenase (LDH) und Alkohol-Dehydrogenase (AlcDH), wobei laut Untersuchungen mit der Quarzkristall-Mikrowaage die Bedeckung mit LDH 3.5×10^{-12} mol cm⁻² betrug. Die Vernetzung der Enzymschicht mit Glutardialdehyd lieferte eine stabile Enzymelektrode, die die Elektrooxidation von Milchsäure stimulierte (siehe Abbildung 15B). Dabei wurde das enzymatisch erzeugte NADH durch PQQ in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen oxidiert. Da die Menge an reduziertem NADH-Cofaktor durch die Lactatmenge gesteuert wird, kann die Elektrode als allgemeines Beispiel für eine Biosensorelektrode mit NAD⁺-abhängigem Enzym dienen.^[6]

Das kovalente Anbinden von Elektronenrelais-einheiten an Enzymelektroden ist eine Methode, um die elektrische Kommunikation zwischen Enzymschichten und Elektroden zu erleichtern und den Biokatalysator zu aktivieren.^[116] Eine Monoschicht aus Glutathion-Reduktase wurde auf einer Goldelektrode über verbrückende Thiolateinheiten aufgebaut (Abbildung 24A)^[116a,b] und mit **12-H** funktionalisiert, wobei die Länge des Spacers systematisch vergrößert wurde. Die Elektroreduktion der Bipyridinium-einheit aktivierte das Enzym zur Reduktion von oxidiertem Glutathion (GSSG), und die Wirksamkeit der GSSG-Reduktion war bei längeren Spacern besser (Abbildung 24B). Das wurde mit den kürzeren Entfernungen zwischen den Elektronenrelaisstellen und dem Redoxzentrum des Enzyms für die Systeme mit langen Spacern erklärt. Um den elektrischen Kontakt zwischen Enzymredoxzentrum und Elektrode zu erreichen, war eine Modifizierung des Proteins mit der Bipyridiniumkomponente in Gegenwart von Harnstoff wichtig (siehe Abschnitt 7).^[116a,b]

Eine Glucose-Oxidase(GOx)-Multischicht (siehe Abbildung 8) wurde in ähnlicher Weise mit dem Carboxyferrocen-derivat **11** modifiziert.^[118] Die elektroaktiven Ferroceneinheiten werden durch die Elektrode oxidiert und oxidieren die Redoxstellen des Enzyms. Die amperometrische Antwort der beschichteten Elektroden wurde durch die Zahl der Proteinschichten gesteuert,^[119b] was vermuten lässt, dass alle Enzymschichten mit der Elektrode über die Ferroceneinheiten in elektrischem Kontakt stehen. Der geschwindigkeitsbestimmende Prozess bei der Oxidation von Glucose ist der Elektronentransfer zwischen dem Substrat und dem aktiven Zentrum. Das führt zu von der Glucosekonzentration abhängigen amperometrischen Antworten der Elektrode und ermöglicht die Anwendung der Enzymelektrode als amperometrischen Glucosebiosensor. Ein ähnlicher GOx-Film, dessen elektrischer Kontakt zur Goldelektrode durch Ferroceneinheiten hergestellt wurde, wurde durch Vernetzung von GOx, 2-Aminoferrocen und einer *p*-Sulfanylanilin-Monoschicht mit Glutardialdehyd aufgebaut.^[17b]

Die Rekonstitution von Apo-GOx auf der PQQ-FAD-Monoschicht (siehe Abbildung 14) ergab eine stabile, bioelektrokatalytisch aktive Schicht^[145] mit einer für bioelektronische Systeme ungewöhnlich hohen Stromdichte: Sie ist

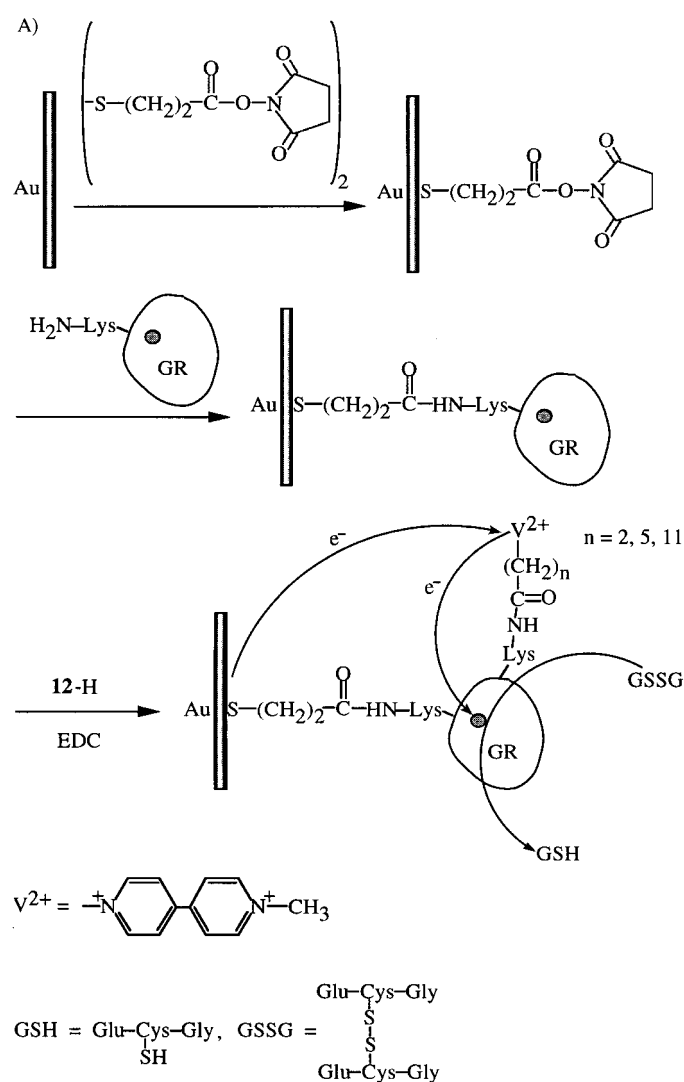


Abbildung 24. A) Aufbau einer Enzymelektrode aus einer Glutathion-Reduktase (GR)-Monoschicht und einem damit in elektrischem Kontakt stehenden Träger. B) Geschwindigkeit der bioelektrokatalysierten Reduktion von oxidiertem Glutathion (GSSG) durch diese Elektrode als Funktion der Kettenlänge der den Kontakt herstellenden Relais-einheiten: a) $n = 2$, b) $n = 5$, c) $n = 11$.

300 $\mu\text{A cm}^{-2}$ bei einer Glucosekonzentration von 80 mM und einer Temperatur von 35°C. Legt man die theoretische Umsatzzahl von GOx bei 35°C in Gegenwart von molekularem Sauerstoff als Elektronenacceptor (ca. 900 s⁻¹^[145])

zugrunde und berechnet damit die Strommenge, die bei einer dicht gepackten GOx-Monoschicht ($2.9 \times 10^{-10} \text{ mole cm}^{-2}$) erzeugt werden sollte, erhält man ungefähr $300 \mu\text{A cm}^{-2}$, was ausgezeichnet mit dem experimentell ermittelten Wert übereinstimmt. Dass der rekonstituierte Biokatalysator den theoretischen Wert für den MET erreicht, führte man auf das Ausrichten des Enzyms auf der Elektrodenoberfläche zurück. Das ausgerichtete Enzym ermöglicht die effektive Oxidation des reduzierten FAD-Cofaktors durch die PQQ-Elektronenrelais-einheit und die Oxidation von Glucose durch MET. Die hohen Stromdichten in diesem System und die Unempfindlichkeit der Enzymelektrode gegenüber Sauerstoff und anderen biologischen Störstoffen führten zu dem Vorschlag, diese funktionalisierten Enzymelektroden zu miniaturisieren, um implantierte, invasive Mikroelektroden zur kontinuierlichen In-vivo-Überwachung des Glucosespiegels im Blut zu erhalten.

9. Auf Biomaterial basierende Elektroden für Biobrennstoffzellen

Eine attraktive Anwendungsmöglichkeit von bioelektrokatalytischen Elektroden sind Biobrennstoffelemente. Eine Biobrennstoffzelle nutzt Biokatalysatoren zur Umwandlung von chemischer in elektrische Energie.^[211] Da viele organische Substrate durch Sauerstoff verbrannt oder unter Energiefreisetzung oxidiert werden, könnte durch die biokatalysierte Oxidation von organischem Material an zwei voneinander getrennten Elektrodengrenzflächen chemische Energie in elektrische Energie umgewandelt werden. In großer Menge vorhandene Rohstoffe wie Methanol und Glucose können genutzt werden, und molekularer Sauerstoff oder H_2O_2 kann als Oxidationsmittel dienen. Die Ausgangsleistung P einer Brennstoffzelle ist das Produkt aus der Zellspannung V_{Zelle} und dem Zellenstrom I_{Zelle} . Die ideale Zellspannung wird durch die Differenz der Formalpotentiale von Brennstoff und Oxidationsmittel bestimmt, doch kinetische Einschränkungen beim Elektronentransfer, Ohmscher Widerstand und Konzentrationsgradienten führen zu irreversiblen Verlusten an Zellspannung. In ähnlicher Weise wird der Zellenstrom durch die Elektrodengröße, die Ionendurchlässigkeit der Membran, die Kathoden- und Anodenraum trennt, den Transport durch sie und insbesondere die Elektronentransfargeschwindigkeiten an den Anoden- und Kathodengrenzflächen festgelegt. Alle diese Parameter beeinflussen die resultierende Ausgangsleistung, und für eine höhere Effizienz der Brennstoffzellen müssen die V_{Zelle} - und I_{Zelle} -Werte optimiert werden.

Die Tatsache, dass mit Biomaterialschichten funktionalisierte Elektroden die Oxidation von Substraten wie Glucose, Methanol und Milchsäure sowie die Reduktion von Substraten wie H_2O_2 katalysieren, ermöglicht den Einsatz dieser Elektroden als Kernelemente von Biobrennstoffzellen. So wurde eine Biobrennstoffzelle konstruiert, die auf der bioelektrokatalytischen Oxidation von Glucose durch H_2O_2 beruht (Abbildung 25 A).^[212a] Eine GOx-Monoschicht, die auf einer Elektrode über die Rekonstitution von Apo-Glucose-Oxidase auf einer PQQ-FAD-Schicht aufgebaut wurde (siehe Abbildung 14 A), wurde als Anode verwendet,

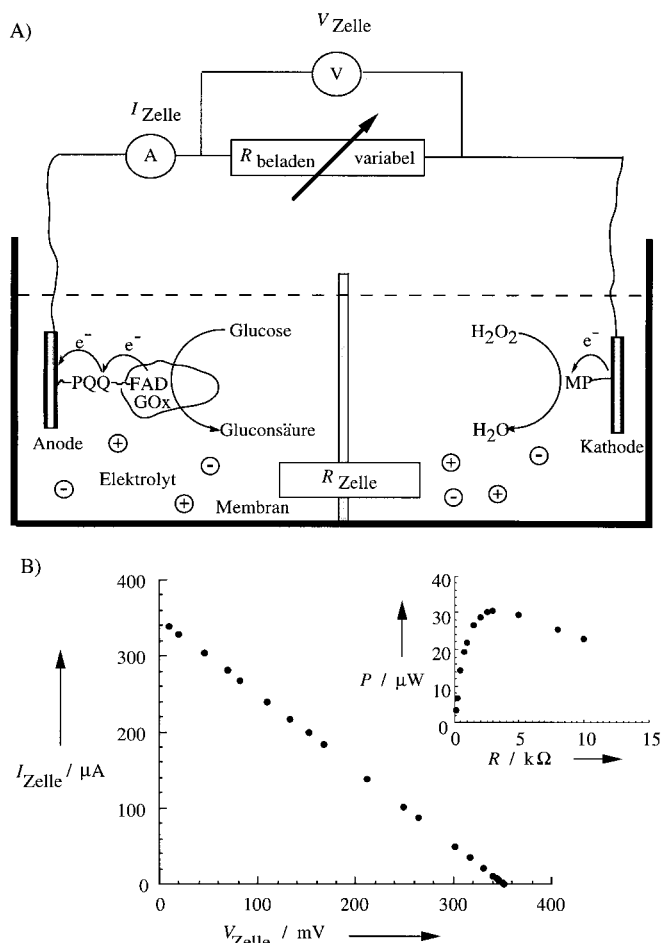


Abbildung 25. A) Schematischer Aufbau einer Biobrennstoffzelle mit Glucose als Brennstoff und H_2O_2 als Oxidationsmittel sowie mit einer Elektrode mit PQQ-FAD und rekonstituiertem GOx als Anode und einer mit MP-11 als Kathode. B) Strom-Spannungs-Verhalten der Biobrennstoffzelle und als Einschub ihre elektrische Leistung P bei unterschiedlichen externen Lasten.

und eine MP-11-funktionalisierte Elektrode diente als Kathode des Systems. Die bioelektrokatalysierte Oxidation von Glucose verläuft an der Anode, während die MP-11-katalysierte Reduktion von H_2O_2 im Kathodenraum erfolgt. Das Strom-Spannungs-Verhalten der Biobrennstoffzelle und ihre Ausgangsleistung bei verschiedenen externen Lasten und optimierten Konzentrationen an Oxidationsmittel und Brennstoff sind in Abbildung 25 B gezeigt. Die maximale Ausgangsleistung betrug $32 \mu\text{W}$ und wurde bei einer externen Last von $3 \text{ k}\Omega$ erreicht (Einschub in Abbildung 25 B). Der Aufbau dieser Zelle kann als Muster für andere Biobrennstoffzellen verwendet werden, und es können andere oxidative Enzyme wie Methanol-Oxidase oder Lactat-Oxidase und die jeweiligen Alkohol- bzw. Milchsäuresubstrate als Brennstoffe eingesetzt werden.

Ein anderer Ansatz, um maßgeschneiderte Biobrennstoffzellen zu erhalten, basiert auf der bioelektrokatalysierten Oxidation von 1,4-Dihyronicotinamid-Cofaktoren. Eine Vielzahl an Substraten, z. B. Alkohole, Hydroxysäuren oder Zucker, wird biokatalytisch von NAD(P)^+ -abhängigen Enzymen oxidiert. Die bioelektrokatalytische Oxidation des resultierenden Dihyronicotinamid-Cofaktors (NAD(P)H) an

der Anode und die gleichzeitige Reduktion des Oxidationsmittels (H_2O_2) an der Kathode könnten einen allgemeinen Aufbau für eine Biobrennstoffzelle ergeben (Abbildung 26 A). Über eine solche Biobrennstoffzelle mit einer PQQ-funktionalisierten Elektrode als Anode und einer MP-11-modifizierten Elektrode als komplementäre Kathode wurde berichtet.^[212b] Die elektrochemische Umwandlung im

stoff einer Biobrennstoffzelle genutzt zu werden. Dabei muss der Cofaktor an der Anodengrenzfläche immobilisiert und mit einem reichlich vorhandenen primären Brennstoff und dem zugehörigen Enzym, z.B. einem Alkohol und der Alkohol-Dehydrogenase, gekuppelt werden, um so in situ den NAD(P)H-Cofaktor zu erzeugen. Der Fortschritt bei der Organisation von integrierten, bioelektrokatalytischen NAD(P)⁺-Elektroden (siehe Abbildung 15) ebnet den Weg zur Anfertigung neuer Enzymelektroden für Biobrennstoffzellen.

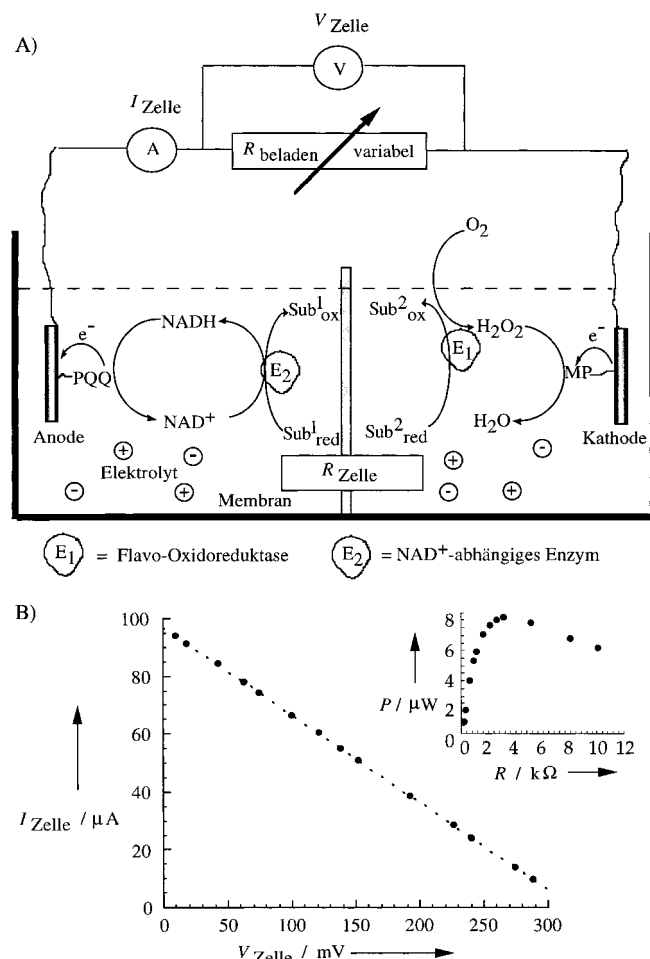


Abbildung 26. A) Schematischer Aufbau einer Biobrennstoffzelle mit NADH als Brennstoff und H_2O_2 als Oxidationsmittel sowie mit einer PQQ-funktionalisierten Elektrode als Anode und einer MP-11-funktionalisierten als Kathode. B) Strom-Spannungs-Verhalten und elektrische Leistung P (Einschub) der Biobrennstoffzelle bei unterschiedlichen externen Lasten.

Anodenraum ist die bioelektrokatalysierte Oxidation von NADH durch die PQQ-funktionalisierte Elektrode, während die MP-11-katalysierte Reduktion von H_2O_2 der komplementäre Prozess an der Kathodengrenzfläche ist. Das Strom-Spannungs-Verhalten der Biobrennstoffzelle und ihre Ausgangsleistung bei verschiedenen externen Lasten sind in Abbildung 26 B gezeigt. Die maximale Ausgangsleistung betrug etwa $8 \mu\text{W}$ und wurde bei einer externen Last von $3 \text{ k}\Omega$ erreicht (Einschub in Abbildung 26 B). Das System stellt zwar das allgemeine Prinzip einer Biobrennstoffzelle mit NAD(P)H-Cofaktoren als Brennstoff dar, doch vor einer praktischen Anwendung muss es weiterentwickelt werden, da NAD(P)⁺-Cofaktoren zu teuer sind, um als primärer Brenn-

10. Strukturierung von Biomaterialien auf Oberflächen im Mikrometermaßstab

Wenn Biomoleküle, insbesondere Enzyme, Antigene, Antikörper und Rezeptoren, in geordneten mikrostrukturierten Anordnungen auf Oberflächen organisiert werden könnten, würde das neue Horizonte für die Anwendungsmöglichkeiten von Biosensoren und bioelektronischen Geräten eröffnen.^[213] Man könnte sich vorstellen, dass mehrere Sensortypen tragende Oberflächen (Sensorbatterien) zur simultanen, adressierbaren Detektion von mehreren Analyten oder zur Analyse der räumlichen Verteilung und von Analytengradienten in Proben maßgefertigt werden könnten. Auch könnten strukturierte Anordnungen aus orts aufgelösten Biomaterialien als selbstkalibrierende Sensorsysteme dienen, bei denen ein Sensorbereich zur Kalibrierung einer zweiten Messschnittstelle verwendet wird. Außerdem könnte man sich die Organisation von strukturierten, geordneten Bereichen von Biomaterialien in Form interagierender Matrices vorstellen, die auf externe physikalische oder chemische Reize antworten. Eine geeignete Anordnung von Enzymen könnte das Analyt-Substrat in eine redoxaktive Spezies überführen, die zu einem Stromfluss im leitenden Träger Anlass gibt. Ähnlich könnte eine chemische Reaktion zwischen zwei Spezies, die durch räumlich getrennte Biokatalysatoren erzeugt wurden, ein Produkt liefern, das ein drittes, räumlich organisiertes, elektroaktives Enzym aktiviert („Gated“-Bioelektronik).

An der Erzeugung von Mikrostrukturen aus leitenden Materialien wird schon seit langem geforscht, was zu gewaltigen Entwicklungen in der Mikroelektronik und Informationsspeicherung geführt hat. Die Lithographie im Mikrometermaßstab unter Verwendung von UV-Strahlen, Elektronenstrahlen und Röntgen-Strahlen ist eine gängige Technik für die Oberflächenstrukturierung.^[214] Die gezielte Ablagerung von Biomaterialien auf bestimmten Oberflächenbereichen und ihre spezifische chemische oder physikalische Verankerung auf diesen Bereichen in biologisch aktiver Form ist eine wissenschaftliche Herausforderung von interdisziplinärem Interesse. Intensiv wurde in den neunziger Jahren an der Strukturierung von Monoschichten^[215a,b] und von funktionalisierten dünnen Filmen auf festen Trägern im Mikrometermaßstab gearbeitet.^[215c,d]

Die Photolithographie^[214] und die Mikrobearbeitung von Monoschichten,^[216] das Mikroprägen von festen Trägern^[215a,b, 217] und das Mikrobesschriften von Oberflächen^[218] wurden häufig zur Erzeugung von strukturierten Monoschich-

ten mit kontrollierter Benetzbarkeit^[216b-d, 219] oder kontrollierten chemischen und elektrischen Eigenschaften verwendet.^[220] Das kontrollierte Ätzen von Metallen^[218] und die selektive Ablagerung von Metallen^[221] ermöglichten die mikroskopische Strukturierung von Oberflächen mit einer Vielzahl von polymeren, organischen, leitenden und anorganischen Stoffen.

Mehrere der Verfahren zur Strukturierung von Oberflächen mit chemischen Funktionalitäten im Mikrometermaßstab wurden zur Anordnung von Biomaterialien eingesetzt. Einige dienen zur Strukturierung von Oligonucleotid-^[213c, 222] oder Antigen-Antikörper-Anordnungen.^[223] In anderen Studien wurden redoxinaktive oder Modellproteine verwendet, um die Strategien zum Aufbau von Proteinstrukturen auf festen Trägern aufzuzeigen.^[224] Auch wenn sich diese Übersicht auf die Nutzung von Redoxproteinen für bioelektronische Anwendungen konzentriert, erlauben wir uns, auf die neuesten Fortschritte bei der Erzeugung von Proteinmustern auf Oberflächen einzugehen. Wir sind überzeugt, dass diese Verfahren eine zentrale Rolle bei der Maßanfertigung künftiger bioelektronischer Systeme mit unterschiedlichen Funktionen spielen werden.

10.1. Strukturierung von Oberflächen mit Biomaterialien durch kovalente Verknüpfung

Die Oberflächenmodifizierung von festen Trägern mit photoaktivierbaren Gruppen ermöglicht die lichtinduzierte Erzeugung von reaktiven Intermediaten, z.B. Radikalen, Carbenen, Nitrenen, die mit Proteinen unter Bildung kovalenter Bindungen reagieren.^[129] Erfolgt die Photoaktivierung durch eine Maske, entsteht nur in den nicht abgedeckten Bereichen reaktives Intermediat, an das das Biomaterial kovalent gebunden werden kann. In Abbildung 27 sind einige photochemischen Wege zur Erzeugung reaktiver Intermediate vorgestellt. Benzophenone werden in Gegenwart einer H-Quelle unter Bildung eines Ketylradikals und des Radikals der H-Quelle photochemisch aktiviert, und die Rekombination der beiden Radikale führt zur einer neuen Bindung; die Photolyse von Aryldiazinen erzeugt Carbene, und deren Insertion in eine C-H-Bindung ermöglicht die Anknüpfung von Proteinen; die Bestrahlung von Arylaziden führt zu einem Arylnitren, das mit C-H-Bindungen unter Bildung eines stabilen Amins reagiert. Entsprechend wurden Si-Chips mit Aminopropyltriethoxy-

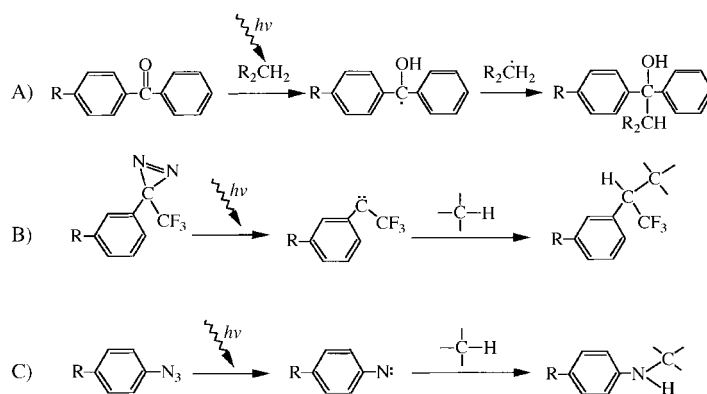


Abbildung 27. Photochemische Erzeugung von A) Benzhydroxylradikalen, B) Carbenen, C) Nitrenen zur kovalenten Bindung an Proteine.

silan silyliert und anschließend mit Benzophenon-4-isothiocyanat **13** oder 3-(*m*-Isothiocyanatophenyl)-3-(trifluormethyl)diazirin **14** zu über Thioharnstoffeinheiten mit dem Träger verbundenen photosensitiven Benzophenon- bzw. Diazirinschichten umgesetzt (Abbildung 28).^[225] Die Photolyse der jeweiligen Monoschichten durch Masken führt zu definierten Bereichen der Ketyl- bzw. Carbenverbindungen, so dass Biomaterialien (Proteine) gezielt an die Si-Oberfläche gebunden werden können. Ein Beispiel für die photochemische Strukturierung von Proteinen auf Polymer-funktionalisierten Oberflächen mit Hilfe von Arylaziden^[226] ist das Abscheiden von Arylazid-funktionalisiertem Rinderserumalbumin (BSA), das aus BSA und *N*-(4-Azidobenzoyloxy)succinimid **15** hergestellt wurde (Abbildung 29A), auf einem Polyvinylalkoholfilm und die Bestrahlung dieser Schicht durch eine Maske. In den bestrahlten Bereichen wurde das

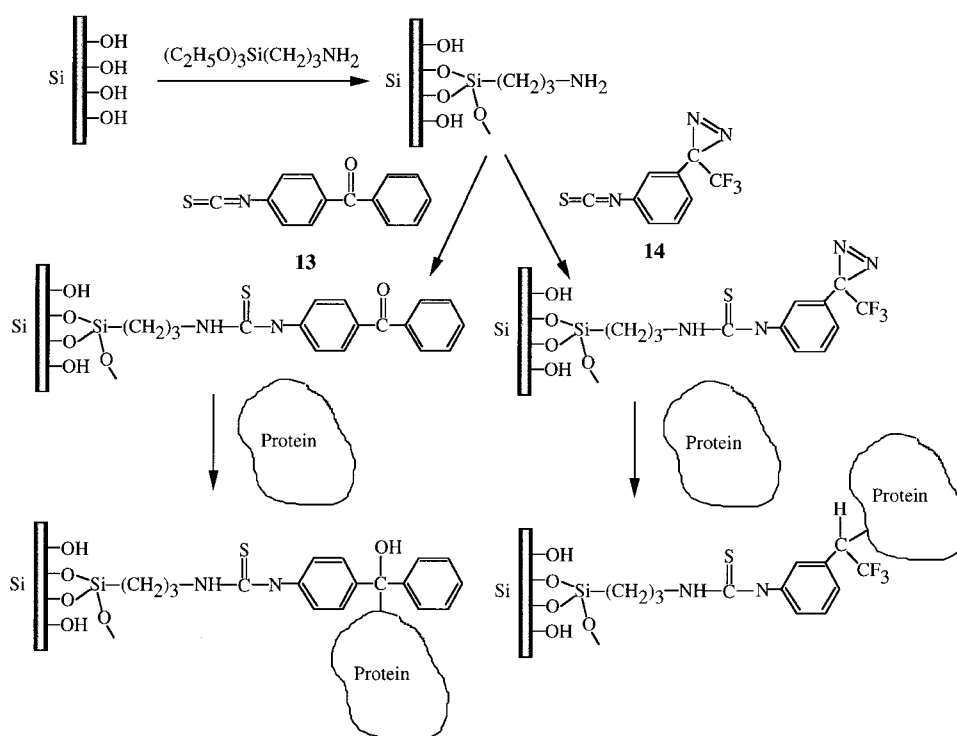


Abbildung 28. Photostimulierte kovalente Anknüpfung von Proteinen an durch eine Benzophenon- oder Diazirinschicht funktionalisierte Träger.

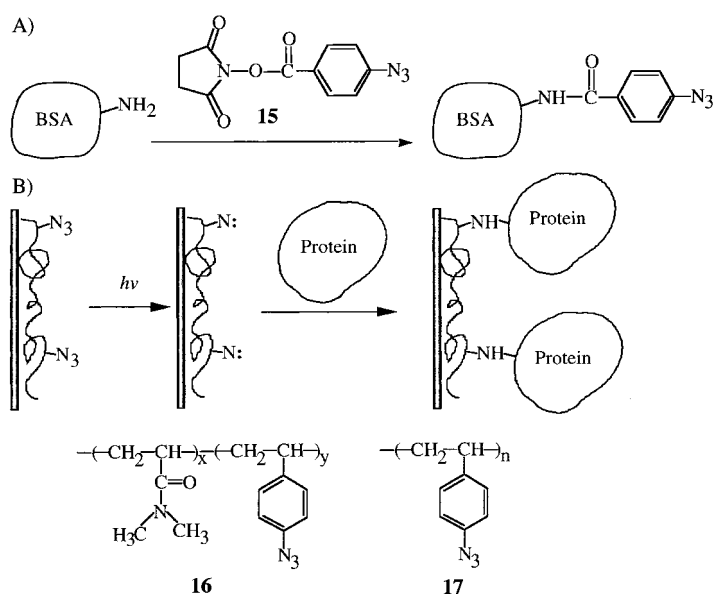


Abbildung 29. A) Herstellung eines durch einen Azidophotomarker funktionalisierten Proteins. B) Photoinduzierte kovalente Bindung eines Protein an einen dünnen, Azido-funktionalisierten Polymerfilm.

Protein mit der Polymerschicht kovalent verknüpft, und das BSA aus den nicht belichteten Bereichen wurde abgewaschen. Ein ähnliches Verfahren nutzte Arylazid-funktionalisierte Polymere als photoaktive Matrices zur kovalenten Anknüpfung des Proteins an die bestrahlten Oberflächenbereiche (Abbildung 29B). Zwei Polymere, z. B. das Copolymer Poly(*N,N*-dimethylacrylamid-*co*-4-azidostyrol) **16** oder Poly(4-azidostyrol) **17**, wurden als dünne Filme auf feste Träger aufgebracht, das Protein wurde auf dem jeweiligen Polymerfilm verteilt, und das System wurde durch eine Maske bestrahlt. Auf ähnliche Weise wurde eine Arylazid-funktionalisierte Schicht, die einen aktiven Ester enthielt, photolithographisch auf einen Polystyrol(PS)-Film abgelagert (Abbildung 30). *N*-(4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorbenzoyloxy)succinimid **18** wurde auf das Polymer aufgebracht. Der Film ergab nach Bestrahlung durch eine Maske ein Muster der reaktiven *N*-Hydroxysuccinimideinheiten, die

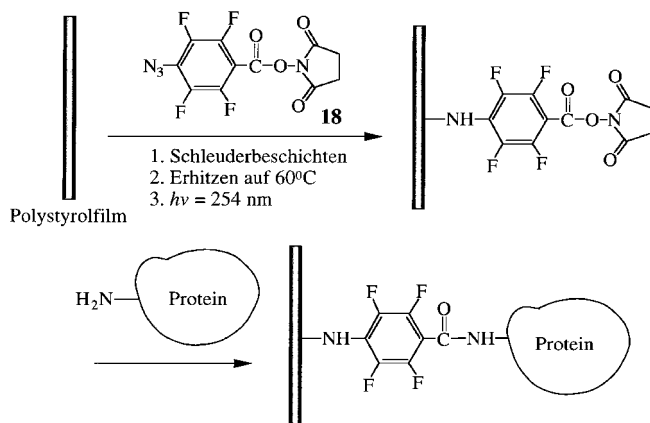


Abbildung 30. Photochemische Musterbildung auf einem Polystyrolfilm durch Bestrahlung eines aktiven, Azido-photomarkierten Ester durch eine Maske. Das Protein bindet anschließend an die durch den aktiven Ester funktionalisierten Bereiche.

nachfolgend mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) oder Avidin verbunden wurden.^[227] Alternativ wurde *N*-(5-Aminopentyl)-biotinamid mit dem „gemusterten“ aktiven Ester umgesetzt und Fluorescein-markiertes Avidin an die Biotindomänen gebunden. Abbildung 31A zeigt das auf einem Glsträger erzeugte Fluorescein-Avidin-Muster. Es sei darauf hingewiesen, dass an das Avidinmuster eine zweite Enzymschicht unter

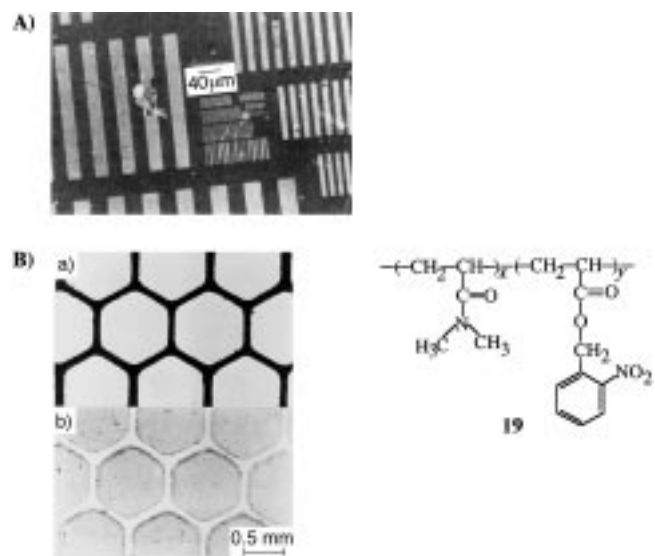


Abbildung 31. A) Mikrographische Aufnahme (aus Lit. [227]) eines Fluorescein-markierten Avidins, das an eine Monoschicht eines aktiven Esters gebunden ist, die durch Bestrahlung von Polystyrol durch eine Maske in Gegenwart des Azido-markierten aktiven Esters strukturiert wurde (siehe Abbildung 30). B) Photolithographische Aktivierung eines Polymerfilms und kovalentes Anknüpfen von BSA an das strukturierte Polymer (**19**). a) Die Struktur der Maske, b) die strukturierte BSA-**19**-Oberfläche nach Bestrahlung des dünnen Films aus **19** auf Glas in Gegenwart von BSA. Das Bild (aus Lit. [226]) wurde nach dem Einfärben der Schicht mit dem entsprechenden Enzym-markierten Antikörper Vectastain ABC-AP (Vector Laboratories, Burlingamen) aufgenommen.

Verwendung biotinylierter Proteine angeknüpft werden kann (siehe Abschnitt 10.2). Das photochemische Entschützen funktioneller Gruppen, die mit Proteinen verbunden werden können, ermöglicht die Mikrostrukturierung von Oberflächen mit Enzymen oder Proteinen. Die *ortho*-Nitrobenzylester-Einheit ist eine der meist untersuchten photosensitiven Schutzgruppen vor allem für Carbonsäuren.^[228] Ein Copolymer, das geschützte Acrylsäure enthält, *co*-Poly-*ortho*-nitrobenzylacrylat-poly-*N,N*-dimethylacrylamid **19**, wurde als aktive Matrix zur Mikrostrukturierung von Proteinschichten verwendet.^[226] Die Bestrahlung der Polymerschicht durch eine Maske führte zur partiellen Entschützung der Acrylsäurerester. Das kovalente Anknüpfen von BSA an die Carbonsäurereste mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid als Kupplungsreagens ergab das in Abbildung 31 B gezeigte Proteinmuster. Diese Methode kann auf die Immobilisierung eines jeden Redoxproteins in einer strukturierten, wohldefinierten Anordnung erweitert werden.

Ein anderer Ansatz ist die „negative Photolithographie“, d. h. die photochemische Desaktivierung funktioneller Gruppen einer Monoschicht zur sekundären, kovalenten Immo-

lisierung von Proteinen.^[223b] Eine silylierte, Sulfanylpropyl-funktionalisierte Oberfläche wurde unter Sauerstoff durch

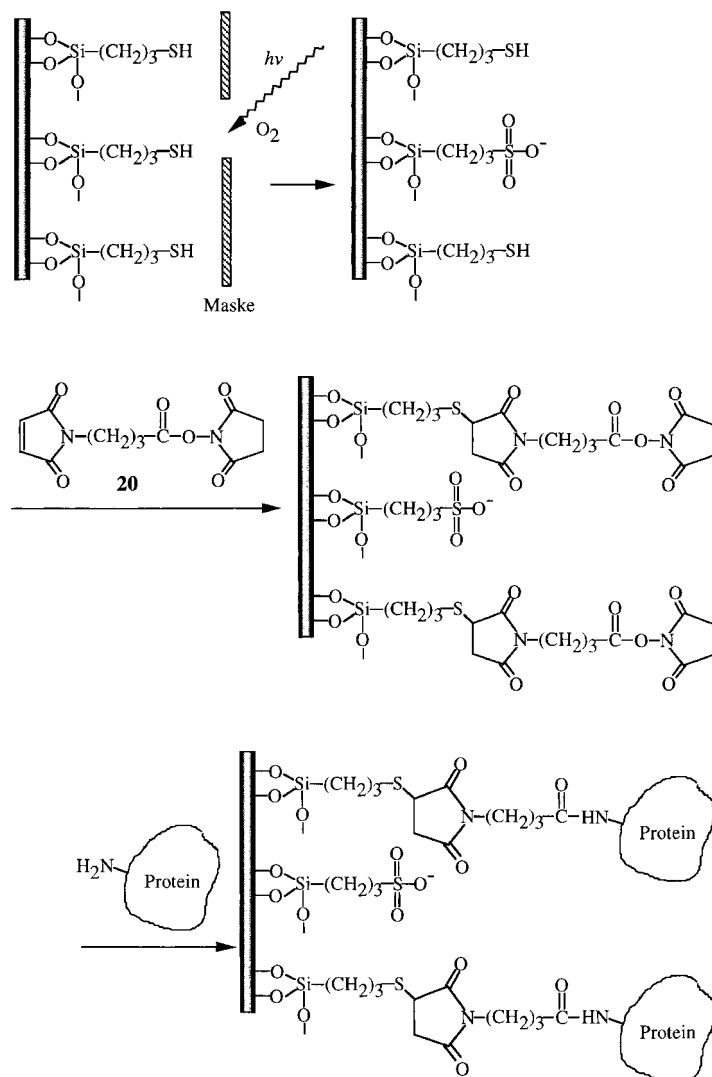


Abbildung 32. Photolithographische Strukturierung einer Thiol-funktionalisierten Oberfläche mit einem Protein durch lichtstimulierte Desaktivierung eines Teils der Oberflächenfunktionalitäten.

eine Maske bestrahlt; dabei wurden die Sulfanylgruppen in den belichteten Bereichen zu Sulfonateinheiten oxidiert. Die resultierende strukturierte Monoschicht wurde mit dem difunktionellen Reagens GMBS **20** umgesetzt, das die kovalente Bindung von Proteinen an die strukturierte Grenzfläche ermöglichte (Abbildung 32). Eine Reihe von Antikörpern, z.B. Anti-Ziegen-IgG aus Kaninchen oder Phycoerythrin, wurde an die strukturierten Grenzflächen gebunden, und Proteinmikrostrukturen mit einer Auflösung von ca. 25 µm wurden nach Maß angefertigt. Zu beachten ist, dass die Strukturierung von Antikörpern auf Oberflächen ein jedes Proteinmuster über die sekundäre, nichtkovalente Assoziation des entsprechend Antigen-markierten Proteins an das Antikörperbasismuster ermöglicht.

10.2. Strukturierung von Oberflächen durch Beschichtung mit Biomaterialien über nichtkovalente Wechselwirkungen

Die Oberflächenstrukturierung durch molekulare Komponenten, die die Bildung von Wirt-Gast-Komplexen mit Biomaterialrezeptoren ermöglichen, ist eine gängige Methode zur Erzeugung von bioaktiven Mikrostrukturen. Der Aufbau von strukturierten Schichten adressierbarer, mehrzähliger Biorezeptoren wie Avidin, Concanavalin A und Antikörpern, die die Assoziation jedes geeignet markierten Biomaterials ermöglichen, ist von besonderem Interesse. Die Affinitätswechselwirkung zwischen Biotin und Avidin wurde zur Erzeugung von Mikromustern von Proteinen und insbesondere von Enzymen genutzt.^[229]

Eine Schicht aus deglycosyliertem Avidin (Avidin D) wurde kovalent mit Gold- oder SiO₂-Oberflächen verknüpft^[229a] und das photoaktive Azid-funktionalisierte Biotin **21** (Photobiotin) über nichtkovalente Wechselwirkungen an die Avidinschicht gebunden (Abbildung 33). Die Bestrahlung der Monoschicht durch eine Maske in Gegenwart eines Proteins liefert Bereiche mit Nitrenbiotin, das mit dem Protein unter Nitren-Insertion reagiert. Indem zwei adressierbare Domänen in Gegenwart von zwei verschiedenen Proteinen, z.B. Kaninchen-IgG und Ratten-IgG, nacheinander durch passende Masken bestrahlt werden, lassen sich die Antikörper auf räumlich genau festgelegten Oberflächenbereichen anordnen. Durch weitere Bestrahlung der resultierenden Protein-funktionalisierten Schicht wurden die unmodifizierten Photobiotine für die Reaktion mit Casein aktiviert, wodurch ein geordneter Verbund aus drei Proteinen entstand. Das Antikörpermuster der resultierenden Oberfläche wurde durch Reaktion mit Rhodamin-markiertem Anti-Ratten-IgG aus Ziegen bzw. Fluorescein-markiertem Anti-Ratten-IgG

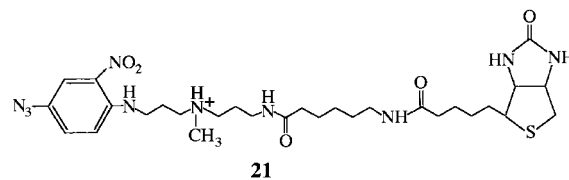
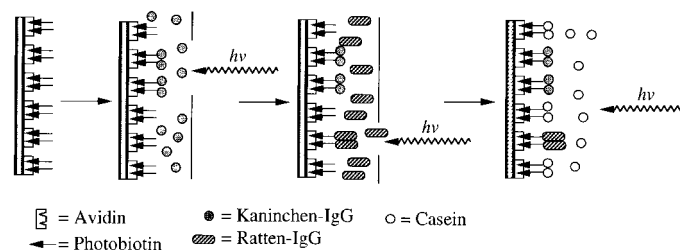


Abbildung 33. Schrittweise photochemische Strukturierung einer Oberfläche mit verschiedenen Proteinen über die gezielte Bestrahlung von Oberflächenbereichen, die mit einer Schicht aus Avidin und photomarkiertem Biotin funktionalisiert wurden.

aus Kaninchen abgebildet. Mit dieser Methode konnten Biomateriallinien mit einer Auflösung von 1,5 µm gezeichnet werden. In einem weiteren Beispiel für die Bildung von Biomaterialmustern auf Polymeren^[229b] wurde Photobiotin

(als Acetatsalz) physikalisch auf einer Nitrocellulosemembran oder einem Polystyrolfilm adsorbiert. Die Bestrahlung durch eine Maske lieferte ein Polymer-gebundenes Biotinmuster. Die Bindung des mehrzähligen Avidins an die Biotinbindungsstellen auf den Polymermatrices ermöglichte die Assoziation von biotinylierter Alkalischer Phosphatase oder biotinylierter HRP.

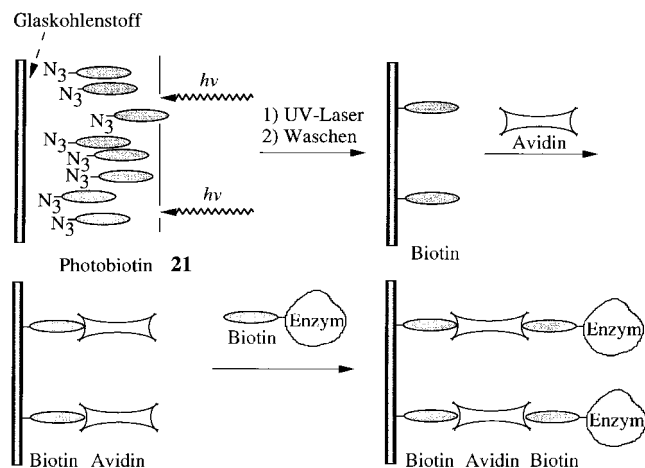


Abbildung 34. Photochemische Strukturierung einer Glaskohlenstoffelektrode mit einer Biotinschicht und einer sekundären Schicht aus Avidin und biotinyliertem Enzym durch Bestrahlung der Oberfläche durch eine Maske in Gegenwart von photomarkiertem Biotin.

Auf ähnliche Weise wurden Enzymmuster auf Glaskohlenstoffoberflächen erzeugt (Abbildung 34).^[142b] Das photosensitive Biotin **21** wurde auf eine Glaskohlenstoffoberfläche gebracht. Das Biotinmuster auf der Oberfläche resultierte in Wirklichkeit aus einem Interferenzmuster des Substrats und nicht aus der Bestrahlung durch eine Maske. Die folgende Wechselwirkung des Biotinmusters mit Avidin ergab das Proteinmuster. Die mikrostrukturierte Avidinschicht konnte bei Verwendung von mit Fluorescein oder Texas Rot markiertem Avidin mittels Fluoreszenzspektroskopie abgebildet werden. Da Avidin vier Liganden binden kann, können in einem zweiten Schritt biotinylierte Enzyme (z. B. Alkalische Phosphatase) an das Avidingrundmuster gebunden werden.

Photoisomerisierbare Antigene wurden zur Maßanfertigung von reversiblen Immunosensoren, die auf lichtgesteuerten Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen beruhen, genutzt.^[230] In einem Photoisomerzustand weist das molekulare Substrat Antigenmerkmale auf, während es im zweiten keine Antigeneigenschaften hat (Abbildung 35 A). Durch die reversible Photoisomerisierung des photoaktiven molekularen Substrats zwischen den zwei Zuständen wurde eine cyclische, lichtinduzierte Assoziation und Dissoziation des Antigen-Antikörper-Komplexes stimuliert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Dinitrospiropyran-Monoschicht auf einer Gold- oder ITO-Elektrode eine photochemisch gesteuerte Bindung und Abspaltung des Dinitrophenyl-Antikörpers (DNP-Ab) eingeht (Abbildung 35 B).^[230] Die Dinitrospiropyran-Monoschicht dient als Antigen für DNP-Ab, wogegen das protonierte Dinitromerocyanin keine Antigenmerkmale aufweist. Dies ermöglichte die photolithographische Strukturie-

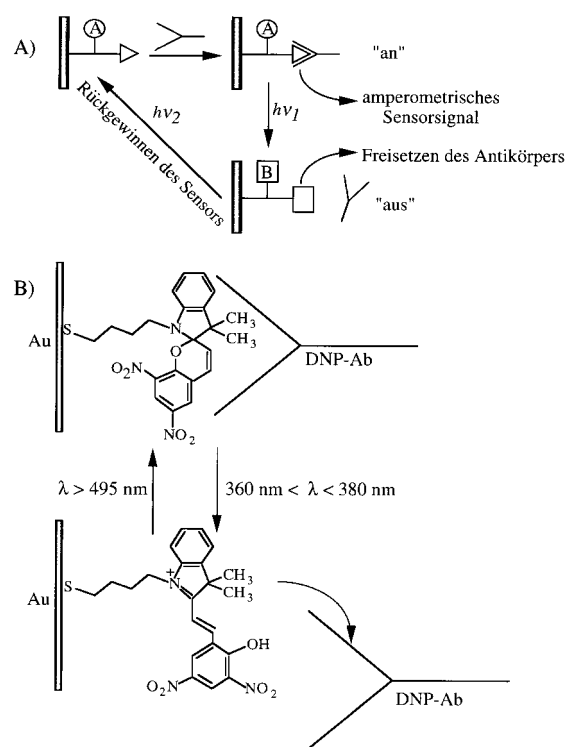


Abbildung 35. A) Lichtgesteuerte Bildung und Dissoziation eines Antikörper-Antigen-Komplexes an bzw. von einer mit photoisomerisierbarem Antigen funktionalisierten Elektrode. Dies ist ein Modell für eine reversible Immunosensor-Elektrode und die lichtinduzierte Regenerierung des Immunosensors. B) Photoinduzierte Bindung und Freisetzung von DNP-Ab an bzw. von einer Elektrode mit einer Monoschicht aus dem Photoisomerenpaar Dinitrospiropyran/protoniertes Dinitromerocyanin.

rung von Oberflächen mit DNP-Ab.^[230b,c, 231] Dazu wurde eine Glasoberfläche mit Aminopropyltriethoxysilan silyliert und das substituierte Dinitrospiropyran **22a** kovalent an die Oberfläche gekuppelt (Abbildung 36 A). Die resultierende Antigen-Monoschicht wurde durch eine Maske bestrahlt, und alle belichteten Domänen wurden in Bereiche mit protoniertem Dinitromerocyanin (MR) ohne Antigenmerkmale umgewandelt. Die resultierende strukturierte Antigenschicht ließ man dann mit DNP-Ab-funktionalisierten Agarosepartikeln in Wechselwirkung treten, wobei die Domänen mit den Dinitrospiropyran-Antigeneinheiten die Antikörper-Agarosepartikel banden. Abbildung 36 B zeigt das Muster der Agarosepartikel, das aus dem Bestrahlen der Dinitrospiropyran-Grundschrift durch ein Gitter folgt. Dieses System ermöglicht im Prinzip die sekundäre Mikrostrukturierung von Oberflächen mit jedem beliebigen Enzym und den Aufbau einer dreidimensionalen Anordnung aus verschiedenen Biomaterialien. So wird sich jedes Dinitrophenyl-funktionalisierte Enzym über nichtkovalente Wechselwirkungen an die DNP-Ab-strukturierte Mikrostruktur binden, da die Agarosekügelchen freie DNP-Ab-Bindungsstellen aufweisen.

Proteine können auch durch das Nutzen passend abgestimmter hydrophiler und hydrophober Wechselwirkungen auf festen Trägern räumlich strukturiert angeordnet werden. Monoschichten aus Thiolen mit Oligoethylenglycol-Enden ($\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$) widersetzen sich der Adsorp-

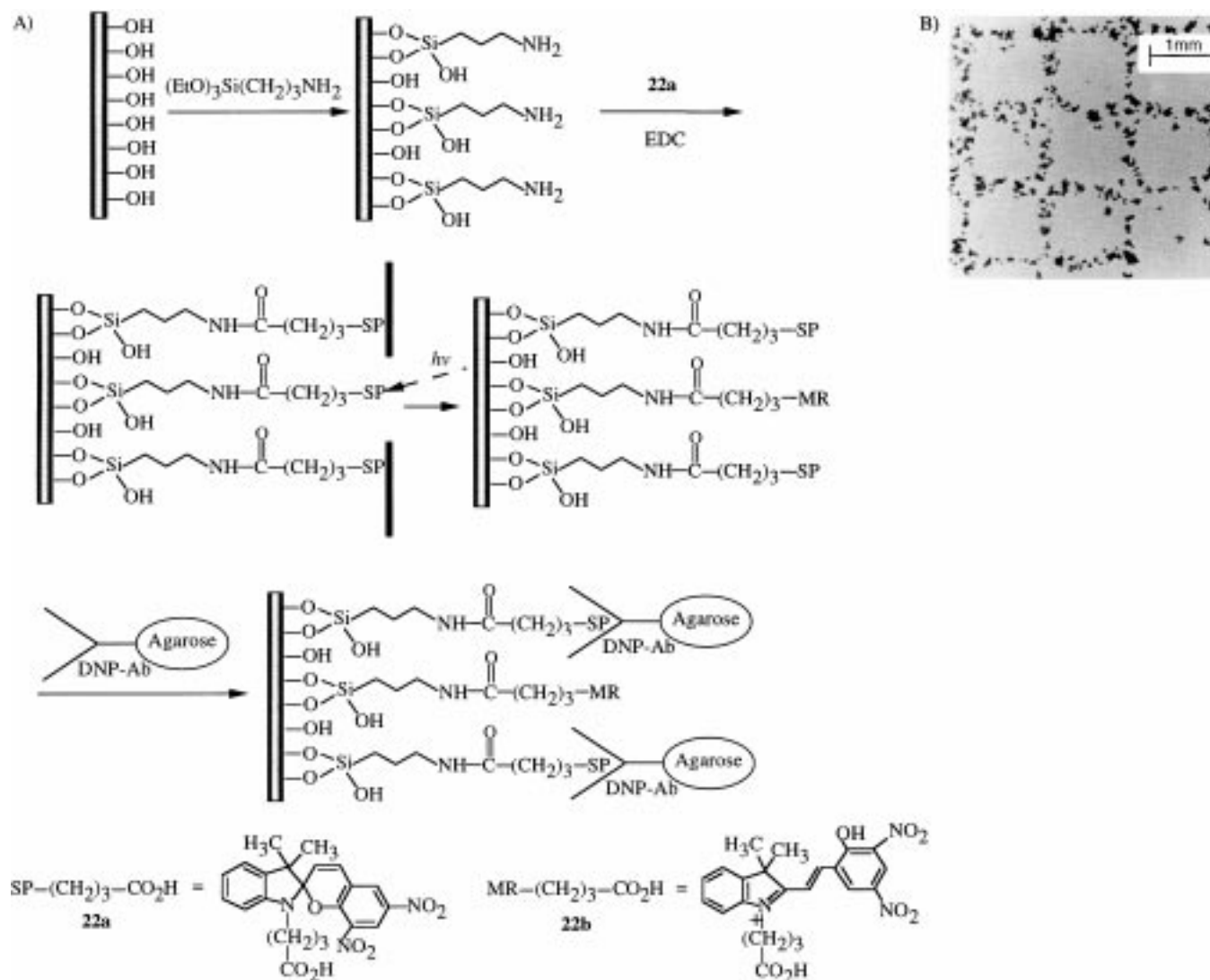


Abbildung 36. A) Aufbau einer photoisomerisierbaren Dinitrospiropyran(SP)-Antigen-Monoschicht auf einem Glaträger, die photolithographische Strukturierung der Monoschicht durch Bestrahlung durch eine Maske und die selektive Bindung von DNP-Ab-funktionalisierten Agarosekügelchen an die strukturierte Oberfläche. B) Ein bei dem in (A) vorgestellten Verfahren erhaltenes Agarosemuster (aus Lit. [231]). Die Partikel sind auf SP-Positionen abgelagert; die freien Positionen befinden sich im MR-Zustand.

tion von Proteinen, wogegen hydrophobe Monoschichten (z.B. $\text{HS}(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$) Proteine wie Avidin, Hexokinase, Pyruvat-Kinase, Ribonuclease A, Lysozym oder Fibrinogen effektiv adsorbieren.^[232] Mehrere Techniken, darunter das Mikroschreiben,^[232c, 233] die Mikrobearbeitung,^[216d] das Prägen^[215b] und die UV-Photolithographie,^[100d] wurden zur Erzeugung von Mustern aus Oligoethylenglycol und Hexadecylthiol genutzt.^[224] Die Adsorption der Proteine an die hydrophoben Bereiche wurde rasterelektronenmikroskopisch (SEM) abgebildet. Die relative Helligkeit einer Fläche im SEM-Bild steht in Beziehung zur Sekundärelektronenemission aus diesem Bereich. Die Proteinassoziation führt nun zu einer Helligkeitsabnahme und kann so detektiert werden.^[215b] Auf einen Goldfilm wurde ein Linienmuster unter Verwendung von $\text{HS}(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ zum Schwärzen gezeichnet, und die Hintergrundoberfläche wurde mit Oligoethylenglycol behandelt.^[232c]

Die Bestrahlung einer Hexadecylthiol-Monoschicht durch eine Maske (UV-Licht, unter Sauerstoff) führt an den bestrahlten Stellen zur Oxidation des Thiolats zum Sulfonat, das von der Oberfläche desorbiert; nach Assoziation von $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$ an die dadurch frei gewordenen Bereiche der Goldoberfläche (Abbildung 37) konnte Pyruvat-Kinase spezifisch an die strukturierten hydrophoben Bereiche adsorbiert werden.^[224] In einem anderen Experiment wurde eine Goldoberfläche mit einem Stempel geprägt, der aus Polydimethylsiloxan geformt und mit dem hydrophoben Thiol funktionalisiert war, um ein Muster aus Hexadecylthiol zu erzeugen; die verbleibende Grundoberfläche wurde mit dem Sulfanyloligoethylenglycol derivatisiert. Die selektive Assoziation von Pyruvat-Kinase an die hydrophoben Domänen führte zum Proteinmuster.^[224]

Auch mit einem Mikrobearbeitungsverfahren^[215a, 216, 218] wurden Pyruvat-Kinase-Muster erzeugt.

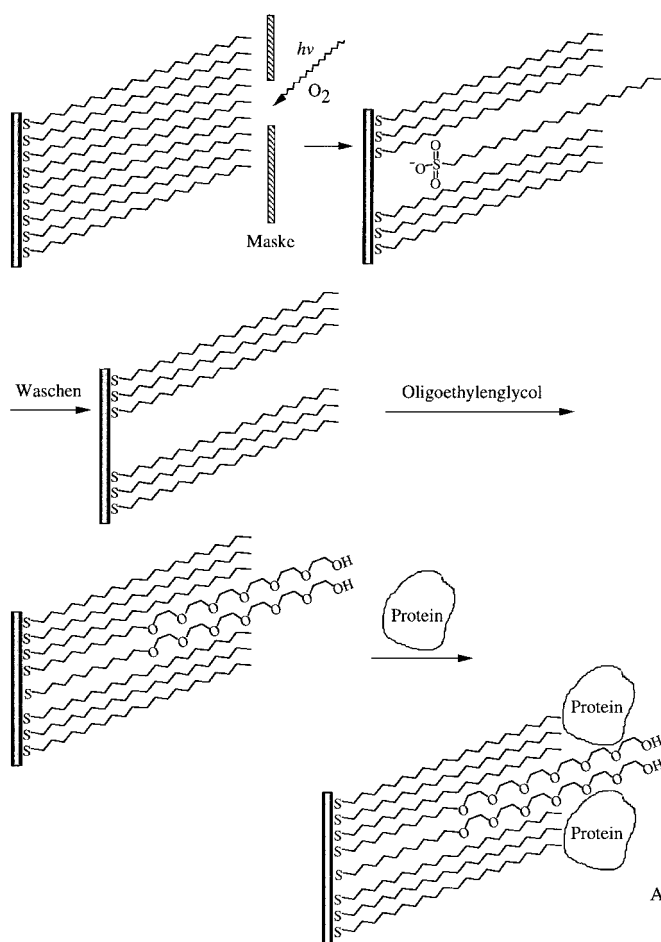


Abbildung 37. Photolithographische, oxidative Desorption einer Thiol-Monoschicht, gefolgt vom Auffüllen der leeren Bereiche mit einem hydrophilen Thiol mit Oligoethylenglycol-Ende zur nichtkovalenten Strukturierung von Proteinen auf einer Oberfläche. Die Alkylketten sind nur angedeutet.

Eine Goldoberfläche wurde mit dem hydrophilen Sulfanyloligoethylenglycol funktionalisiert. Die resultierende Monoschicht wurde mit einer Skalpellklinge eingeritzt, und die aufgekratzten Bereiche wurden mit dem hydrophoben Thiol umgesetzt, an das Pyruvat-Kinase spezifisch assoziiert. Auch andere Proteine wie Fibronectin, Streptavidin und Antikörper wurden an die strukturierte hydrophobe Schicht gebunden. Die Proteine konnten anhand der relativen Intensitäten der SEM-Bilder unterschieden werden: Je größer das Protein ist, desto dunkler ist das Bild.

11. Photoaktivierbare Enzymelektroden für die Optobioelektronik: Umwandlung optischer Signale in amperometrische

Photoaktivierbare Schichten aus Redoxenzymen auf leitenden Trägern ermöglichen die Umwandlung optischer Signale, die an den bioaktiven Grenzflächen registriert werden, in amperometrische.^[20, 234] Abbil-

dung 38 A zeigt, wie eine photoschaltbare Redoxenzym-schicht auf einer Elektrode als optobioelektronisches System für die verstärkende Registrierung optischer Signale genutzt wird. Das Enzym trägt eine photoisomerisierbare Einheit (A), die seine Struktur verzerrt und die bioelektrokatalysierte Oxidation (oder Reduktion) des Substrats verhindert. Durch die Photoisomerisierung von A zu B wird die bioaktive Tertiärstruktur des Enzyms wiederhergestellt. Dies aktiviert die bioelektrokatalytische Reaktion, und die aufgenommene Lichtinformation wird in eine amperometrische Antwort umgewandelt. Da das optische Signal einen elektrokatalytischen Prozess aktiviert, ist der resultierende Strom eine verstärkte Antwort auf das empfangene Lichtsignal. Solche Systeme können als optische Speicher verwendet werden (Schreiben-Lesen-Löschen), wobei das optische Signal das Schreiben darstellt, die elektrokatalytische Reaktion das Lesen und die reversible Photoisomerisierung das Löschen. Analog wurde kürzlich die Nutzung von photoaktivierbaren Redoxenzymen auf Elektroden als Aktinometer, biomolekulare Verstärker für schwache Lichtsignale und Logikschaltungen behandelt.^[115]

Das Enzym Glucose-Oxidase (GOx) wurde chemisch mit photoisomerisierbaren Nitrospiropyranen (23a) modi-

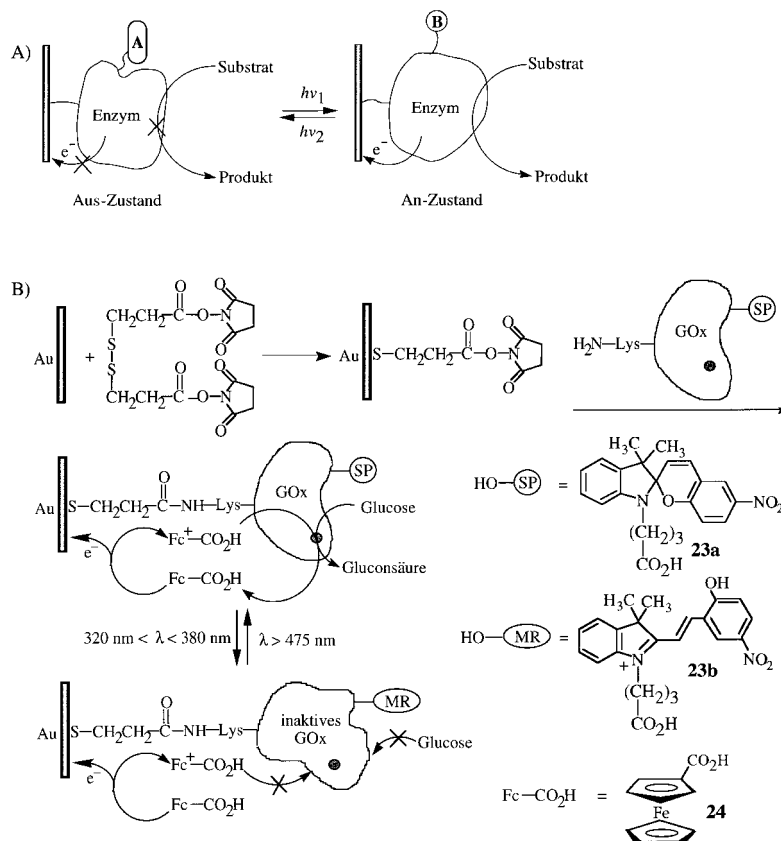


Abbildung 38. A) Aufbau eines optobioelektronischen Systems aus einer photoisomerisierbaren Redoxenzym-schicht und einem Elektrodenträger. B) Aufbau einer Schicht aus mit einem Nitrospiropyranrest verknüpftem GOx auf einer Goldelektrode zur photoschaltbaren bioelektrokatalysierten Oxidation von Glucose. Ferrocen-carbonsäure wird als diffundierender Elektronenvermittler für den elektrischen Kontakt zwischen Redoxenzym und Elektrode eingesetzt.

fiziert und als Monoschicht auf eine Gold-elektrode aufgebracht (Abbildung 38B).^[18a] In Gegenwart des diffundierenden Elektronenvermittlers Ferrocencarbonsäure **24** ist das Nitrospiropyran-funktionalisierte GOx für die Oxidation von Glucose aktiviert, was der aus der Oxidation resultierende hohe elektrokatalytische Strom belegt (Abbildung 39). Die Photoisomerisierung der Monoschicht zum protonierten Mero-cyanin (**23b**) führt zu einer Verzerrung des Proteins und damit zu einer Störung des elektrischen Kontakts. Daraus resultiert eine beträchtlich niedrigere amperometrische Antwort. Wird die Enzym-Monoschicht cyclisch zwischen den beiden Zuständen photoisomerisiert, werden reversible „hohe“ und „niedrige“ amperometrische Antworten erhalten. Mit der photoisomerisierbaren Enzymelektrode konnten optische Signale photoschaltbar in Stromsignale umgewandelt werden (Abbildung 39). Im Auszustand werden die bioelektrokatalytischen Enzymfunktionen aber nicht vollständig blockiert, was auf eine unzureichende Verzerrung der Proteinstruktur durch das kovalente Anfügen der photoisomerisierbaren Einheiten zurückgeführt wurde. Das heißt, das Anfügen photoisomerisierbarer Komponenten an Aminosäurereste weit weg vom Redoxzentrum des Enzyms oder vom

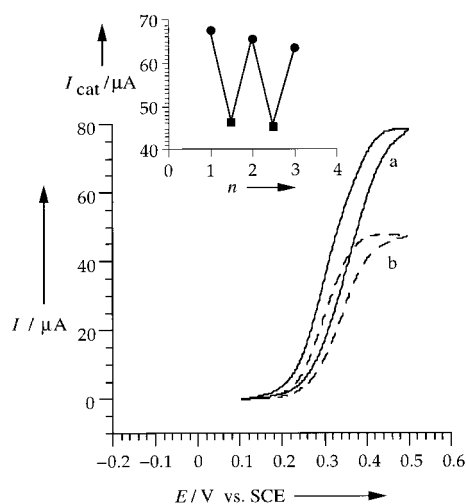


Abbildung 39. Cyclovoltammogramme der photoschaltbaren, bioelektrokatalysierten Oxidation von Glucose ($2,5 \times 10^{-2} \text{ M}$) an der in Abbildung 38B beschriebenen photoisomerisierbaren GOx-Monoschicht-Elektrode (in Gegenwart von $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ **24**) a) in der SP-Form, b) in der MR-Form; 5 mVs^{-1} Abtastgeschwindigkeit. Einschub: Cyclische amperometrische Antworten der Elektrode als Folge der reversiblen lichtinduzierten Isomerisierung der Proteinschicht zwischen der SP- (●) und der MR-Form (■).

Durchtrittskanal des Elektronenvermittlers reicht nicht, um den elektrischen Kontakt zwischen dem Enzym und der Elektrode effektiv zu stören.

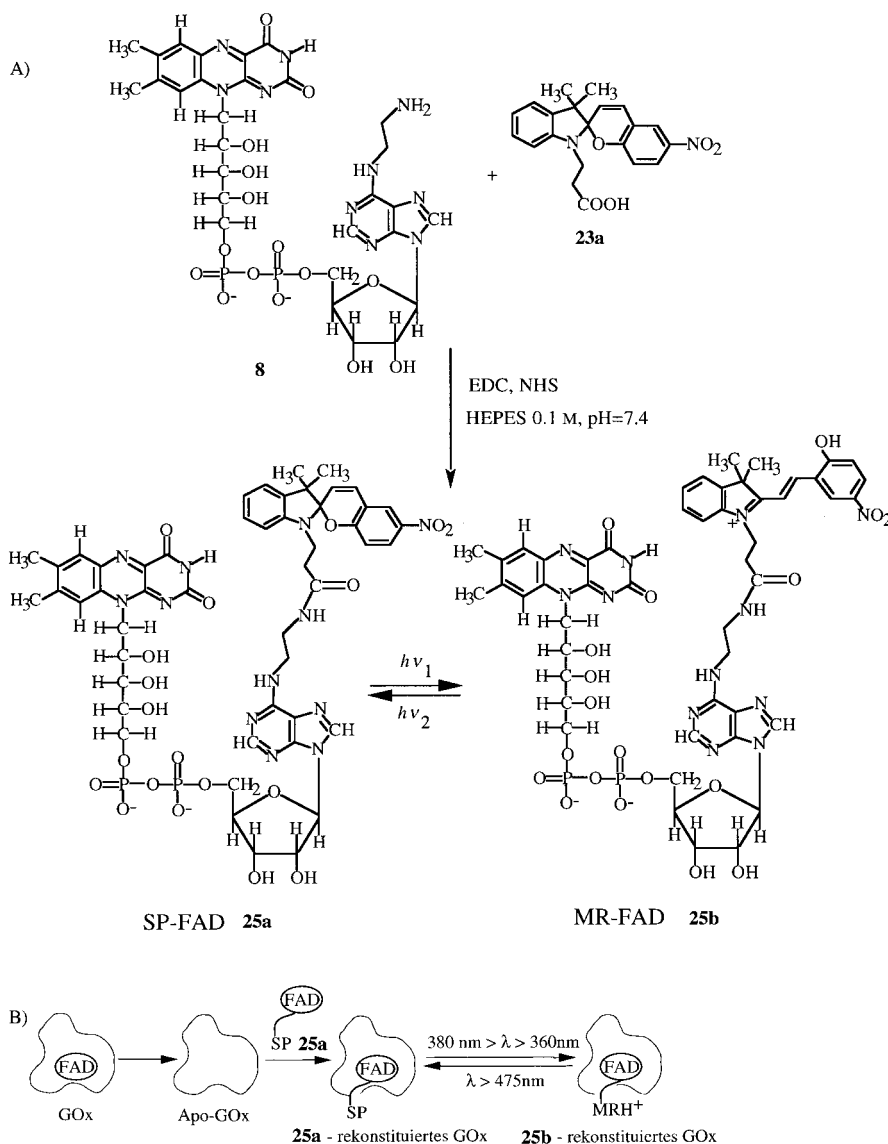


Abbildung 40. A) Synthese eines halbsynthetischen Nitrospiropyran-FAD-Cofaktors. B) Rekonstitution von Apo-GOx mit diesem photoisomerisierbaren Cofaktor.

Durch die Einführung photoisomerisierbarer Einheiten in der Nähe des biokatalytischen Redoxzentrums über einen Rekonstitutionsprozess können die photoschaltbaren Funktionen eines Redoxenzym so verbessert werden, dass vollständige An- und Aus-Zustände erreicht werden (Abbildung 40). Der native FAD-Cofaktor von GOx wurde durch den halbsynthetischen Nitrospiropyran-FAD-Cofaktor **25a** ersetzt^[18d, 235] und dieses rekonstituierte photoisomerisierbare Enzym als Monoschicht auf eine Gold-elektrode aufgebracht. Nun konnte die bioelektrokatalysierte Oxidation von Glucose vollständig an- und ausgeschaltet werden (Abbildung 41): Im SP-Zustand des Enzyms ist der durch **24** vermittelte Elektronentransfer blockiert; durch die Photoisomerisierung der Enzym-Monoschicht zum MR-Zustand wird der Diffusionsweg für den Elektronenvermittler geöffnet und die bioelektrokatalytische Oxidation von Glucose aktiviert (Abbildung 42).

Die partiell photostimulierbaren Eigenschaften von Glucose-Oxidase, die nach dem Zufallsprinzip photoisomerisier-

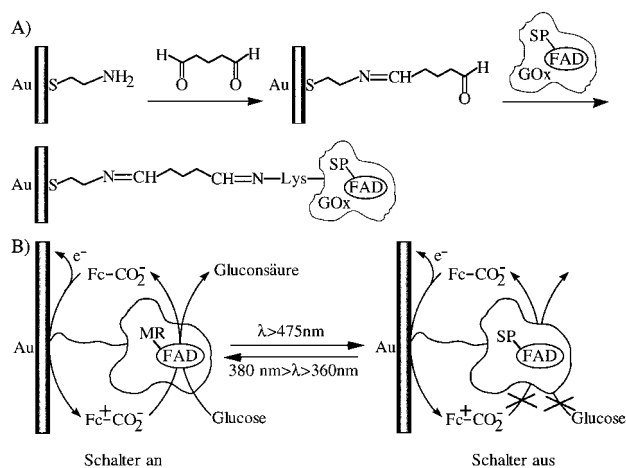


Abbildung 41. A) Aufbau einer photoisomerisierbaren Enzymschicht aus gemäß Abbildung 40 B) rekonstituiertem GOx auf einer Goldelektrode. B) Photoschaltbare bioelektrokatalysierte Oxidation von Glucose an dieser Elektrode in Gegenwart von Ferrocencarbonsäure als diffundierendem Elektronenvermittler.

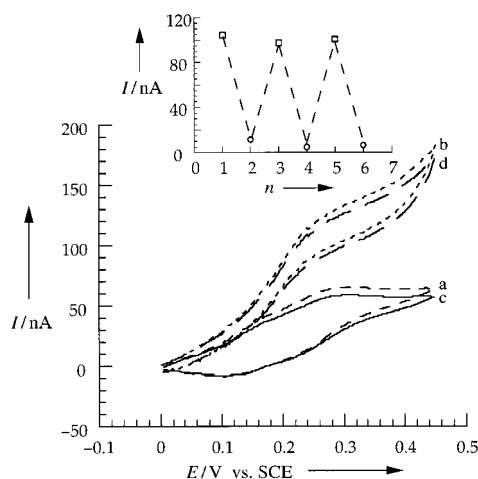


Abbildung 42. Cyclovoltammogramme der photoschaltbaren, bioelektrokatalysierten Oxidation von Glucose an der in Abbildung 41 B) beschriebenen photoisomerisierbaren GOx-Monoschicht-Elektrode a) und c) im SP-Zustand, b) und d) im MR-Zustand. Einschub: Cyclische amperometrische Antworten der Elektrode als Folge der reversiblen lichtinduzierten Isomerisierung der Proteinschicht zwischen MR- (□) und SP-Zustand (○).

bare Gruppen trägt, wurden durch Kupplung an einen Antikörper auch zum Design eines Drei-Zustände-Schalters verwendet (Abbildung 43).^[18c] Dazu wurde mit Dinitrospiropyran-Einheiten modifiziertes GOx als Monoschicht auf eine Goldelektrode aufgebracht und war so für die bioelektrokatalysierte Oxidation von Glucose im SP-Zustand (SP-GOx) mit Ferrocencarbonsäure **24** als Elektronenvermittler aktiviert (angeschaltete Elektrode). Die Photoisomerisierung der Monoschicht zum MR-GOx-Zustand führte zur partiellen Desaktivierung der bioelektrokatalytischen Enzymeigenschaften (partiell ausgeschaltete Elektrode). Die photoisomerisierbaren SP/MR-Einheiten zeigen auch lichtstimulierte Bindungsaffinitäten zum Dinitrophenyl-Antikörper (DNP-Ab) (Abschnitt 10.2). Dabei dient der

SP-Zustand als Antigen für DNP-Ab, während der MR-Zustand keine Antigenmerkmale aufweist. Binden des DNP-Ab an SP-GOx versperrt den Diffusionsweg für den Elektronenvermittler, und der elektrische Kontakt des Enzyms zur Elektrode ist blockiert. Das führt zum vollständigen Ausschalten der Elektrode. Der MR-GOx-Photoisomerzustand der Monoschicht dagegen wird von DNP-Ab nicht beeinflusst. Durch reversible Photoisomerisierung der Enzym-Monoschicht zwischen SP-GOx- und MR-GOx-Zustand in Gegenwart oder in Abwesenheit von DNP-Ab kann somit zwischen den Schaltzuständen An, Aus und partiell An gewechselt werden (Abbildung 44). Dieser Elektrodenaufbau ahmt die Funktionen einer elektronischen Logikschaltung vom UND-Typ nach, da die amperometrische Antwort ausgeschaltet wird, wenn zwei Bedingungen erfüllt sind: Die Monoschicht liegt im SP-GOx-Zustand vor *und* die Monoschicht bildet mit DNP-Ab eine Komplexschicht auf der Elektrode.

Wird der elektrische Kontakt zwischen der Enzymschicht und dem leitenden Träger durch einen diffundierenden Elektronenvermittler hergestellt, ist die Photostimulation der bioelektrokatalytischen Funktionen der Enzymschicht durch einen photoisomerisierbaren Elektronenvermittler möglich (Abbildung 45).^[127b] In einer Photoisomer-Form (SP) stellt der Vermittler den elektrischen Kontakt zwischen der Enzymschicht und dem Elektroden Träger her und aktiviert die bioelektrokatalysierte Umwandlung; in der komplementären Form (MR) ist der Elektronenaustausch zwischen der Biokatalysatorschicht und dem leitenden Träger als Folge von sterischen oder elektrostatischen Barrieren für die Diffusion des Vermittlers in das Protein blockiert. Dies wurde mit zwei photoisomerisierbaren Vermittlern, dem SP-Ferrocen-Derivat **26a** und dem SP-Bipyridinium **27a**, am Beispiel von Glucose-Oxidase (GOx) bzw. Glutathion-Reduktase (GR) gezeigt.^[127b] Vom Enzym GOx wurden fünf Schichten auf eine Goldelektrode aufgebracht, und das SP-Ferrocen **26a** stellte den elektrischen Kontakt zur Elektrodenoberfläche her, was die bioelektrokatalysierte Oxidation von Glucose zur Folge hatte. Das MR-Ferrocen **26b** ist kein Elektronenver-

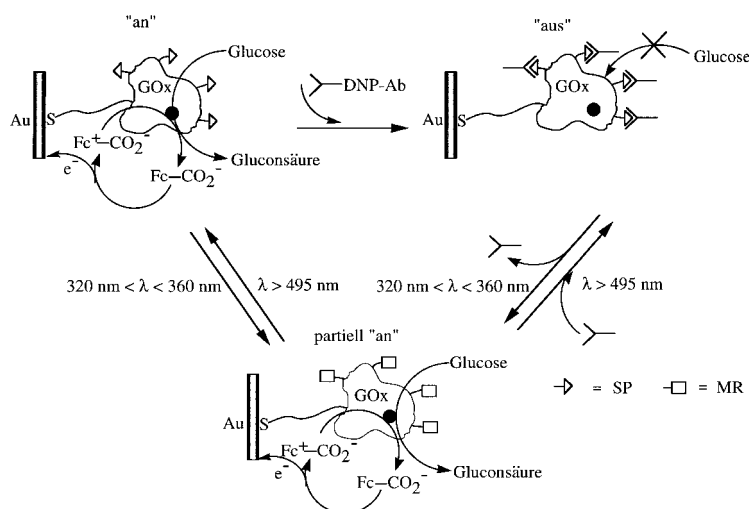


Abbildung 43. Schematische Funktionsweise eines photobiologischen Zweiphasen-schalters, der auf einer SP-GOx-Monoschicht-Elektrode und DNP-Ab basiert.

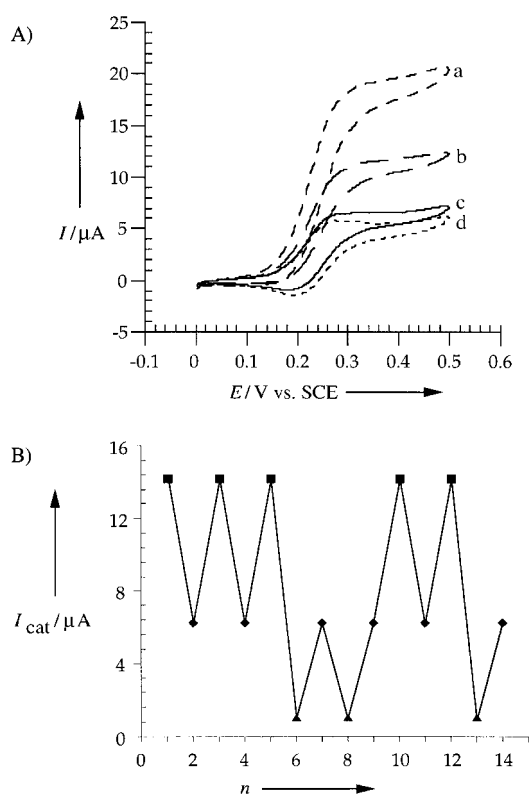


Abbildung 44. A) Cyclovoltammogramme des in Abbildung 43 beschriebenen Zweiphasenschalters ($4 \times 10^{-4} \text{ M}$ **24**) a) im SP-Zustand und in Gegenwart von Glucose ($5 \times 10^{-2} \text{ M}$), b) im MR-Zustand, in Gegenwart von Glucose ($5 \times 10^{-2} \text{ M}$) und sowohl mit (20 mg mL^{-1}) als auch ohne DNP-Ab, c) im SP-Zustand und mit DNP-Ab (20 mg mL^{-1}), d) im SP- oder MR-Zustand und ohne Glucose. B) Cyclische amperometrische Antworten des Zweiphasenschalters als Folge der reversiblen lichtinduzierten Isomerisierung der Proteinschicht zwischen SP- und MR-Zustand in Gegenwart oder bei Abwesenheit von DNP-Ab: ■ SP-GOx-Monoschicht ohne DNP-Ab, ♦ MR-GOx-Monoschicht mit und ohne DNP-Ab, ▲ SP-GOx-Monoschicht mit DNP-Ab.

mittler, und seine Diffusion zum Protein ist sterisch (oder elektrostatisch) gehindert. Über die reversible Photoisomerisierung zwischen **26a** und **26b** wurde die cyclische Aktivierung und Desaktivierung des Enzyms durch Licht induziert. In ähnlicher Weise ermöglichte der photoisomerisierbare SP-Bipyridinium-Vermittler **27a** die photochemische Aktivierung und Desaktivierung einer Glutathion-Reduktase-Schicht auf einer Goldelektrode.

12. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Übersicht wurden die neuesten Fortschritte bei der Organisation von Redoxproteinen als Mono- oder Multischichten auf festen, leitenden Trägern für bioelektronische Anwendungen vorgestellt. Insbesondere wurden die Herstellung eines elektrischen Kontakts zwischen Proteinschicht und Elektrodenträger und die gezielte Anordnung von Proteinen in Form integrierter Mikrostrukturen erörtert. Auch die mögliche Nutzung von mit dem Träger in elektrischem Kontakt stehenden Redoxproteinen als Biosensoren wurde angesprochen. Während üblicherweise die Proteine willkürlich und in nichtorganisierter Weise auf Oberflächen abgelagert wurden, z. B. durch Einschluss oder Immobilisierung in Polymermatrices, ging es uns um die Maßanfertigung von geordneten und definierten Protein-Nanostrukturen. Zu den Kernelementen bei der Integration von Redoxproteinen und elektronischen Umwandlern gehören das physikalische oder chemische Aufbringen des Proteins auf dem festen Träger, das Herstellen eines elektrischen Kontakts zwischen Biomaterial und Umwandler und die Übersetzung der biokatalysierten Umwandlung, die an der Grenzfläche zwischen Biomaterial und Umwandler stattfindet, in ein elektronisches Signal. Proteine können mit Hilfe von kovalenten Bindungen, Affinitätswechselwirkungen oder Wechselwirkungen vom Typ hydrophob/hydrophil als geordnete Mono- und Multischichten auf dem festen Träger aufgebracht werden. Das theoretische Verständnis der Elektronentransferprozesse in Proteinen und die Verfügbarkeit von chemischen und biologischen Methoden zur Modifizierung von Biomaterialien ermöglichten es uns, die elektronische Kopplung zwischen Redoxprotein und Umwandlerelement zu verbessern. Ortsspezifische Modifikationen von Redoxproteinen, die gentechnische Herstellung von Proteinstrukturen und die Oberflächenrekonstitution von Proteinen sind neue und attraktive Methoden zu ihrer Ausrichtung auf Oberflächen. Da ausgerichtete Proteine in effektivem elektrischem Kontakt zu den Elektroden stehen, sollte man sich auf die Erzeugung weiterer struktureller Mutationen in Proteinen konzentrieren. In unserem Bericht stand die elektronische Kopplung von Redoxproteinen und Umwandlerelementen im Vordergrund, doch das Konzept kann man auch zur Organisation von Mono- und Multischichten aus anderen Biomaterialien wie Antigenen, Antikörpern,^[236] Oligonucleotiden (oder DNA)^[5, 237] und Biorezeptoren^[8, 238] nutzen. Die elektronische Kopplung von Antigen-Antikörper-Komplexen mit Elektrodenträgern^[21, 239] und piezoelektrischen Quarzkristallen^[13b, 240] wurde bereits gezeigt. Auch über die elektronische Registrierung der photoschaltbaren Bildung und Dissoziation von Antigen-Antikörper-

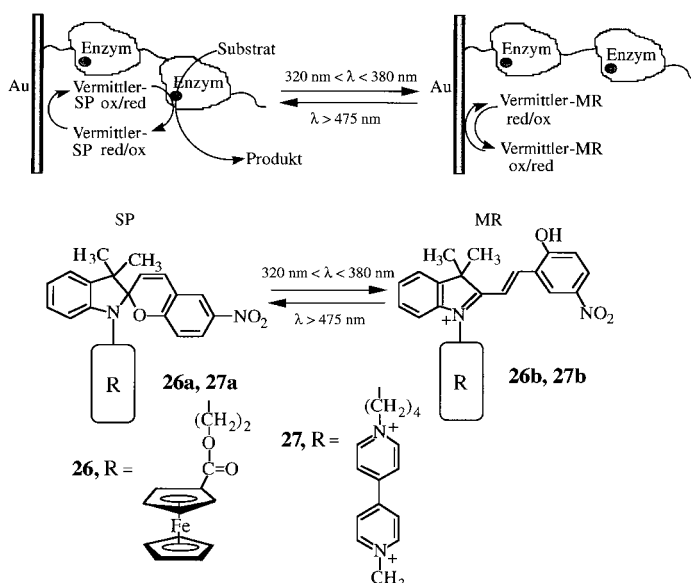


Abbildung 45. Photostimulation von Redoxenzym-Elektroden durch photoisomerisierbare Elektronenvermittler.

per-Komplexen unter Verwendung photoisomerisierbarer Antigen-Monoschichten wurde berichtet.^[230] Des Weiteren wurde die Bildung von Doppelsträngen aus Oligonucleotiden und DNA in Monoschichten elektronisch^[21c, 241] und mikrogravimetrisch^[242] verfolgt. Diese Systeme wurden als bioelektronische Geräte zur Detektion von genetischen Defekten (z. B. Tay-Sachs) vorgeschlagen.^[243] Das anhaltende Interesse an der Entwicklung von Sensoren auf Antigen/Antikörper-Basis (Immunosensoren) und der wachsende Bedarf an sensitiven elektronischen DNA-Sensoren lassen vermuten, dass die Integration von diesen Biomaterialien als Mono- und Multischichten und Umwandlerelementen erweitert und als allgemeine Immobilisierungsstrategie genutzt werden wird.

Ein anderer Aspekt, dem künftig Aufmerksamkeit gewidmet werden muss, ist die Integration von Biomaterial-Monoschichten und anderen Umwandlern, die biologische Ereignisse an der Biogrenzfläche mit elektronischen, photoelektronischen oder optischen Methoden signalisieren können. In diesem Zusammenhang scheinen die Organisation bioaktiver Materialien auf Feldeffekttransistoren,^[14] die Verwendung der Impedanzspektroskopie^[12, 244] und die Oberflächenplasmonresonanz^[245] zur Untersuchung von Biowechselwirkungen an der Monoschichtgrenzfläche attraktiv zu sein.

Die Herstellung des elektrischen Kontakts zwischen Proteinschicht und Elektrode für Messanwendungen und zur Maßanfertigung von optoelektronischen Systemen ist ein bereits ausgereiftes Forschungsgebiet mit solider wissenschaftlicher Basis. Das Konzept zur Integration von Biomaterial-Monoschichten und festen Trägern führt dagegen zu neuen bioelektronischen Anwendungen. Aufgrund des effektiven elektrischen Kontakts von Oberflächen-rekonstituierten Flavoenzym-Monoschichten mit der Elektrode und der Fähigkeit, Elektroden mit elektrokatalytischen Monoschichten aufzubauen, wurden funktionalisierte Elektroden als aktive Bauteile in Biobrennstoffzellen genutzt.^[212]

Die Konzepte zum Aufbau von Monoschichten auf festen Trägern wurden auf die Funktionalisierung von Oberflächen mit Metall- oder Halbleiter-Nanopartikeln erweitert.^[112a,f, 246] Durch geeignetes Design der komplementären Affinitätswechselwirkungen zwischen mit Biomaterial bedeckten Metallpartikeln (z. B. Goldpartikeln) wurden dreidimensionale Überstrukturen aufgebaut.^[246k] Die Organisation von ähnlichen Überstrukturen auf Umwandlerelementen lässt auf neuartige Sensorsysteme hoffen.^[247] Aufgrund der einzigartigen photonischen und elektronischen Merkmale von Nanopartikeln^[248] kann man annehmen, dass die Organisation von Biomaterial/Nanopartikel-Verbundsystemen zu neuartigen optobioelektronischen Systemen wie Photozellen zur effektiven Umwandlung von Licht in elektrische Energie oder optoelektronische Sensoren führen wird. Oligonucleotid-Doppelstränge in Submonolagenbedeckung wurden als Muster für die Auftragung von Nanometalldrähten genutzt.^[249] Das eröffnet neue Wege zur Erzeugung von Nano-Metallnetzwerken mit einer räumlichen Auflösung im Nanometerbereich.

Schließlich hat man bei der Erzeugung von Mustern auf Oberflächen über funktionelle Gruppen oder mit Hilfe von mikro- und nanostrukturierten Biomaterialien in den letzten Jahren beträchtliche Fortschritte erzielt. Das ebnet den Weg

zur Konstruktion paralleler Multisensorsysteme, biosensorischer Bibliotheken und bioelektronischer Systeme, die parallel oder konsekutiv betrieben werden können. Es ist jedoch noch zwingend notwendig, die chemischen Methoden zum spezifischen Adressieren der Zielbereiche auf dem strukturierten Umwandlerelement weiter zu entwickeln. Die photochemische Aktivierung von Nanobereichen^[213b] oder elektrochemische Synthesen an Mikroelektroden^[92d, 97g, 144a,c, 250] könnten einen Einblick in künftige Herausforderungen geben. Die Entwicklung der Rastermikroskopietechniken wie der Kraftmikroskopie (AFM) und der Rastertunnelmikroskopie (STM) ermöglichte die mikroskopische Abbildung von Biomaterialmustern.^[251] Die Möglichkeit, die komplementären Affinitäts-Kraft-Wechselwirkungen von Biomaterialien mittels AFM zu verfolgen, führt nicht nur zu einem Verständnis der molekularen Kräfte, die die makroskopischen bioelektronischen Systeme kennzeichnen,^[252] sondern ermöglicht auch die Mikrostrukturierung mit Hilfe dieser Kräfte.^[98g, 113a,b, 253] Die Möglichkeit, Nanobereiche mit einem optischen Nahfeldrastermikroskop (NSOM, near-field scanning optical microscope) zu beleuchten, öffnet den Weg zur Aktivierung photoschaltbarer, auf Elektroden aufgebracht Biomaterialien zur kompakten Registrierung optischer Signale und zu deren Umwandlung in elektronische Signale.^[254] Sicher ist, dass der Aufbau von Biomaterialschichten auf Umwandlerelementen aufregende Perspektiven an den Grenzen von Chemie, Biologie, Physik, Medizin und Materialwissenschaften bietet.

Für die Unterstützung unserer Untersuchungen zum Aufbau funktionalisierter Biomaterial-beschichteter Elektroden danken wir der Israel Science Foundation, dem israelischen Wissenschaftsministerium, der Szold Foundation, der Hebrew University of Jerusalem, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (Deutschland) und der Savyon Diagnostics Ltd. (Ashdod, Israel).

Eingegangen am 16. Juli 1998 [A 290]

veränderte Fassung am 19. April 1999

Übersetzt von Dr. Karin Gumbiowski, Wallenhorst

- [1] a) W. Göpel, P. Heiduschka, *Biosens. Bioelectron.* **1994**, *9*, III–XIII; b) W. Göpel, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, 35–59.
- [2] a) W. Göpel, P. Heiduschka, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, 853–883; b) M. Mrksich, G. M. Whitesides, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, *25*, 55–78; c) H.-L. Schmidt, W. Schuhmann, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 127–135.
- [3] C.-J. Zhong, M. D. Porter, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 709A–715A.
- [4] a) C. Bourdillon, C. Demaille, J. Gueris, J. Moiroux, J.-M. Savéant, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12264–12269; b) C. Bourdillon, C. Demaille, J. Moiroux, J.-M. Savéant, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10328–10329; c) C. Bourdillon, C. Demaille, J. Moiroux, J.-M. Savéant, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 529–535.
- [5] M. Yang, M. E. McGovern, M. Thompson, *Anal. Chim. Acta* **1997**, *346*, 259–275.
- [6] A. Bardea, E. Katz, A. F. Bückmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9114–9119.
- [7] a) P. Pantano, T. H. Morton, W. G. Kuhr, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1832–1833; b) T. Hoshi, H. Takeshita, J. Anzai, T. Osa, *Anal. Sci.* **1995**, *11*, 311–312; c) X. Du, J. Anzai, T. Osa, R. Motohashi, *Electroanalysis* **1996**, *8*, 813–816; d) Q. Chen, Y. Kobayashi, H. Takeshita, T. Hoshi, J. Anzai, *Electroanalysis* **1998**, *10*, 94–97; e) J.

- Anzai, H. Takeshita, Y. Kobayashi, T. Osa, T. Hoshi, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 811–817.
- [8] I. Willner, S. Rubin, Y. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4937–4938.
- [9] a) R. S. Sethi, *Biosens. Bioelectron.* **1994**, *9*, 243–264; b) P. N. Bartlett, P. Tebbutt, R. C. Whitaker, *Prog. React. Kinet.* **1991**, *16*, 55–155.
- [10] a) R. M. Ianniello, T. J. Lindsay, A. M. Yacynych, *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 1980–1984; b) A. L. Ghindilis, I. N. Kurochkin, *Biosens. Bioelectron.* **1994**, *9*, 353–357.
- [11] a) H. S. Bresler, M. J. Lenkevich, J. F. Murdock, Jr., A. L. Newman, R. O. Robbin in *Biosensor Design and Application (ACS Symp. Ser.* **1992**, *511*, 89–104); b) V. M. Mirsky, C. Krause, K. D. Heckmann, *Thin Solid Films* **1996**, *284*, 939–941; c) C. Krause, V. M. Mirsky, K. D. Heckmann, *Langmuir* **1996**, *12*, 6059–6064.
- [12] a) D. Athey, M. Ball, C. J. McNeil, R. D. Armstrong, *Electroanalysis* **1995**, *7*, 270–273; b) T. M. Nahir, E. F. Bowden, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *410*, 9–15.
- [13] a) M. Lion-Dagan, I. Ben-Dov, I. Willner, *Colloids Surf. B* **1997**, *8*, 251–260; b) I. Ben-Dov, I. Willner, E. Zisman, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3506–3512; c) A. Bardea, A. Dagan, I. Ben-Dov, B. Amit, I. Willner, *Chem. Commun.* **1998**, 839–840.
- [14] a) F. Sevilla III, T. Kullick, T. Scheper, *Biosens. Bioelectron.* **1994**, *9*, 275–281; b) A. N. Reshetilov, M. V. Donova, D. V. Dovbnya, A. M. Boronin, T. D. Leathers, R. V. Greene, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 401–408; c) N. Kazanskaya, A. Kukhtin, M. Manenkova, A. N. Reshetilov, L. Yarysheva, O. Arzhakova, A. Volynskii, N. Bakeyev, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 253–261.
- [15] a) S. M. Amador, J. M. Pachence, R. Fischetti, J. P. McCauley, Jr., A. B. Smith, J. K. Blasic, *Langmuir* **1993**, *9*, 812–817; b) D. Hobara, K. Niki, C. Zhou, G. Chumanov, T. M. Cotton, *Colloids Surf. A* **1994**, *93*, 241–250; c) B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundström, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, I–IX; d) C. E. Jordan, R. M. Corn, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1449–1456.
- [16] a) E. Katz, V. Heleg-Shabtai, B. Willner, I. Willner, A. F. Bückmann, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1997**, *42*, 95–104; b) I. Willner, E. Katz, B. Willner, R. Blonder, V. Heleg-Shabtai, A. F. Bückmann, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 337–356; c) U. J. Krull, M. S. Heimlich, K. M. R. Kallury, P. A. E. Piuñno, J. D. Brennan, R. S. Brown, D. P. Nikolelis, *Can. J. Chem.* **1995**, *73*, 1239–1250.
- [17] a) J. M. Laval, J. Moiroux, C. Bourdillon, *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *38*, 788–796; b) S. Kuwabata, R. Tsuda, H. Yoneyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5437–5443; c) R. Yuan, S. Kuwabata, H. Yoneyama, *Chem. Lett.* **1996**, 137–138.
- [18] a) M. Lion-Dagan, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7913–7914; b) I. Willner, M. Lion-Dagan, S. Marx-Tibbon, E. Katz, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6581–6592; c) I. Willner, M. Lion-Dagan, E. Katz, *Chem. Commun.* **1996**, 623–624; d) I. Willner, R. Blonder, E. Katz, A. Stocker, A. F. Bückmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5310–5311.
- [19] a) E. Katz, A. Y. Shkuropatov, O. I. Vagabova, V. A. Shuvalov, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *976*, 121–128; b) E. Katz, A. Y. Shkuropatov, V. A. Shuvalov, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1990**, *23*, 239–247; c) A. A. Solov'ev, E. Katz, V. A. Shuvalov, Y. E. Erokhin, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1991**, *26*, 29–41.
- [20] I. Willner, *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 347–356.
- [21] a) R. Blonder, E. Katz, Y. Cohen, N. Itzhak, A. Riklin, I. Willner, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3151–3157; b) A. L. Ghindilis, P. Atanasov, M. Wilkins, E. Wilkins, *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, 113–131; c) T. Ihara, M. Nakayama, M. Murata, K. Nakano, M. Maeda, *Chem. Commun.* **1997**, 1609–1610.
- [22] A. L. Ghindilis, A. Makower, F. W. Scheller, *Anal. Methods Instrum.* **1995**, *2*, 129–132.
- [23] J.-M. Kauffman, G. G. Guilbault in *Biosensor Principles and Applications* (Hrsg.: J. Blum, P. R. Coulet), Marcel Dekker, New York, **1991**, Kapitel 4, S. 63–82.
- [24] a) C. Bourdillon, J. P. Bourgeois, D. Thomas, *Biotechnol. Bioeng.* **1979**, *21*, 1877–1879; b) C. Bourdillon, J. P. Bourgeois, D. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 4231–4235; c) H. J. Wieck, C. Shea, A. M. Yacynych, *Anal. Chim. Acta* **1982**, *142*, 277–279; d) G. Urban, G. Jobst, F. Kohl, A. Jachimowicz, F. Olcaytug, O. Tilado, P. Goiser, G. Nauer, F. Pittner, T. Schalkhammer, E. Mann-Buxbaum, *Biosens. Bioelectron.* **1991**, *6*, 555–562; e) J. P. Lowry, K. McAteer, S. E. Atrash, R. D. O'Neill, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2483–2484.
- [25] A. Heller, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 3579–3587.
- [26] a) R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 265–322; b) *Electron Transfer in Inorganic, Organic and Biological Systems (Adv. Chem. Ser.* **1991**, 228).
- [27] A. Curulli, I. Carelli, O. Trischitta, G. Palleschi, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 1043–1055.
- [28] F. W. Scheller, F. Schubert, B. Neumann, D. Pfeiffer, R. Hintsche, I. Dransfeld, U. Wollenberger, R. Renneberg, A. Warsinke, G. Johansson, M. Skoog, X. Yang, V. Bogdanovskaya, A. Bückmann, S. Y. Zaitsev, *Biosens. Bioelectron.* **1991**, *6*, 245–253.
- [29] a) S. A. Wring, J. P. Hart, *Analyst* **1992**, *117*, 1215–1229; b) J. M. Dicks, W. J. Aston, G. Davis, A. P. F. Turner, *Anal. Chim. Acta* **1986**, *182*, 103–112; c) I. Rosen-Margalit, J. Rishpon, *Biosens. Bioelectron.* **1993**, *8*, 315–323; d) L. Gorton, H. I. Karan, P. D. Hall, T. Inagaki, Y. Okamoto, T. A. Skotheim, *Anal. Chim. Acta* **1990**, *228*, 23–30.
- [30] a) D. Avnir, S. Braun, O. Lev, M. Ottolenghi, *Chem. Mater.* **1994**, *6*, 1605–1614; b) V. Glezer, O. Lev, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2533–2534.
- [31] a) B. A. Gregg, A. Heller, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 5970–5975; b) E. J. Calvo, R. Etchenique, C. Danilowicz, L. Diaz, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 4186–4193; c) S. Cosnier, *Electroanalysis* **1997**, *9*, 894–902; d) I. Willner, E. Katz, N. Lapidot, P. Bäuerle, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1992**, *29*, 29–45; e) S.-Y. Liu, C.-F. Li, D.-D. Zhang, Y. Zhang, Z.-H. Mo, Q. Cai, A.-R. Zhu, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *364*, 31–36; f) P. D. Hale, T. Inagaki, H. I. Karan, Y. Okamoto, T. A. Skotheim, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3482–3484; g) E. J. Calvo, C. Danilowicz, L. Diaz, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *369*, 279–282; h) G. Arai, M. Masuda, I. Yasumori, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, *67*, 2962–2966.
- [32] a) S. B. Adeloju, G. G. Wallace, *Analyst* **1996**, *121*, 699–703; b) S. A. Emr, A. M. Yacynych, *Electroanalysis* **1995**, *7*, 913–923; c) C. G. J. Koopal, R. J. M. Nolte, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1994**, *33*, 45–53.
- [33] J. D. Swalen, D. L. Allara, J. D. Andrade, E. A. Chandross, S. Caroff, J. Israelshvili, T. J. McCarthy, R. Murray, R. F. Pease, J. F. Rabolt, K. J. Wynne, H. Yu, *Langmuir* **1987**, *3*, 932–950.
- [34] a) D. J. C. Yates, *J. Phys. Chem.* **1961**, *65*, 746–753; b) E. W. Thornton, P. G. Harrison, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **1975**, *461*–472; c) H. O. Finklea, R. Vithanage, *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 3621–3626.
- [35] a) C. Widrig, M. Majda, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 754–760; b) A. Proctor, J. F. Castner, L. B. Wingard, Jr., D. M. Hercules, *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 1644–1649.
- [36] a) H. Angerstein-Kozłowska, B. E. Conway, W. B. A. Sharp, *J. Electroanal. Chem.* **1973**, *43*, 9–36; b) L. D. Burke, M. B. C. Roche, *J. Electroanal. Chem.* **1984**, *164*, 315–334; c) J. Facci, R. W. Murray, *J. Electroanal. Chem.* **1980**, *112*, 221–229.
- [37] J. R. Lenhard, R. W. Murray, *J. Electroanal. Chem.* **1977**, *78*, 195–201.
- [38] a) M. R. Tarasevich, *Electrochemistry of Carbon Materials*, Nauka, Moscow, **1984**; b) V. J. Razumas, J. J. Jasaitis, J. J. Kulys, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1984**, *12*, 297–322; c) B. R. Puri in *Chemistry and Physics of Carbon*, Vol. 6 (Hrsg.: P. L. Walker, Jr.), Marcel Dekker, New York, **1970**.
- [39] a) B. F. Watkins, J. R. Behling, E. Kariv, L. L. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3549–3550; b) B. E. Firth, L. L. Miller, M. Mitani, T. Rogers, J. Lennox, R. W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 8271–8272; c) C. P. Jester, R. D. Rocklin, R. W. Murray, *J. Electrochem. Soc.* **1980**, *127*, 1979–1985; d) K. J. Stutts, R. M. Wrighton, *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 1576–1579.
- [40] a) R. Larsson, L. Y. Johansson, L. Jonsson, *J. Appl. Electrochem.* **1981**, *11*, 489–492; b) H. Gomathi, G. P. Rao, *J. Electroanal. Chem.* **1985**, *190*, 85–94.
- [41] a) J. A. Osborn, R. M. Ianniello, H. J. Wieck, T. F. Decker, S. L. Gordon, A. M. Yacynych, *Biotechnol. Bioeng.* **1982**, *24*, 1653–1669; b) I. Rosen, J. Rishpon, *J. Electroanal. Chem.* **1989**, *258*, 27–39.
- [42] a) J. F. Evans, T. Kuwana, *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 358–365; b) N. Oyama, A. P. Brown, F. C. Anson, *J. Electroanal. Chem.* **1978**, *87*, 435–441; c) N. Oyama, F. C. Anson, *J. Electroanal. Chem.* **1978**, *88*, 289–297.

- [43] K. A. Daube, D. J. Harrison, T. E. Mallouk, A. J. Ricco, S. Chao, M. S. Wrighton, W. A. Hendrickson, A. J. Drube, *J. Photochem.* **1985**, 29, 71–88.
- [44] a) A. W. C. Lin, P. Yeh, A. M. Yacynych, T. Kuwana, *J. Electroanal. Chem.* **1977**, 84, 411–419; b) A. M. Yacynych, T. Kuwana, *Anal. Chem.* **1978**, 50, 640–645; c) R. M. Ianniello, H. J. Wieck, A. M. Yacynych, *Anal. Chem.* **1983**, 55, 2067–2070.
- [45] a) R. M. Ianniello, A. M. Yacynych, *Anal. Chem.* **1981**, 53, 2090–2095; b) R. M. Ianniello, T. J. Lindsay, A. M. Yacynych, *Anal. Chem.* **1982**, 54, 1098–1101; c) G. Jonsson, L. Gorton, *Biosensors* **1985**, 1, 355–368.
- [46] R. M. Ianniello, A. M. Yacynych, *Anal. Chim. Acta* **1981**, 131, 123–132.
- [47] V. J. Razumas, J. J. Jasaitis, J. J. Kulys, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1983**, 10, 427–439.
- [48] J. A. Osborn, A. M. Yacynych, D. C. Roberts, *Anal. Chim. Acta* **1986**, 183, 287–292.
- [49] R. F. Antrim, A. M. Yacynych, H. J. Wieck, G. W. Lutter, *Analyst* **1988**, 113, 341–344.
- [50] R. M. Ianniello, A. M. Yacynych, *Anal. Chim. Acta* **1983**, 146, 249–253.
- [51] R. A. Kamin, G. S. Wilson, *Anal. Chem.* **1980**, 52, 1198–1205.
- [52] C. A. Koval, F. C. Anson, *Anal. Chem.* **1978**, 50, 223–229.
- [53] R. D. Rocklin, R. W. Murray, *J. Electroanal. Chem.* **1979**, 100, 271–282.
- [54] M. Umana, D. R. Rolison, R. Nowak, P. Daum, R. W. Murray, *Surface Sci.* **1980**, 101, 295–309.
- [55] M. H. Smit, A. E. G. Cass, *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2429–2436.
- [56] N. Oyama, K. B. Yap, F. C. Anson, *J. Electroanal. Chem.* **1979**, 100, 233–246.
- [57] C. Bourdillon, V. Thomas, D. Thomas, *Enzym Microbiol. Technol.* **1982**, 4, 175–180.
- [58] a) W. Schuhmann, R. Lammert, B. Uhe, H.-L. Schmidt, *Sens. Actuators B* **1990**, 1, 537–541; b) W. Schuhmann, H. Wohlschlag, R. Lammert, H.-L. Schmidt, U. Löffler, H.-D. Wiemhofer, W. Göpel, *Sens. Actuators B* **1990**, 1, 571–575.
- [59] P. Bianco, J. Haladjian, C. Bourdillon, *J. Electroanal. Chem.* **1990**, 283, 151–163.
- [60] J. M. Laval, C. Bourdillon, *J. Electroanal. Chem.* **1983**, 152, 125–141.
- [61] a) R. F. Lane, A. T. Hubbard, *J. Phys. Chem.* **1973**, 77, 1401–1410; b) R. F. Lane, A. T. Hubbard, *J. Phys. Chem.* **1973**, 77, 1411–1421; c) M. Sharp, M. Petersson, K. Edstrom, *J. Electroanal. Chem.* **1979**, 95, 123–130; d) J. T. Hupp, M. J. Weaver, *J. Electrochem. Soc.* **1984**, 131, 619–622.
- [62] a) S. Mazur, T. Matusinovic, K. Cammann, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 3888–3890; b) R. Nowak, F. A. Schultz, M. Umana, H. D. Abruña, R. W. Murray, *J. Electroanal. Chem.* **1978**, 94, 219–225; c) G. Jonsson, L. Gorton, L. Pettersson, *Electroanalysis* **1989**, 1, 49–55; d) E. Katz, *J. Electroanal. Chem.* **1993**, 361, 109–144.
- [63] a) A. P. Brown, F. C. Anson, *J. Electroanal. Chem.* **1977**, 83, 203–206; b) H. Jaegfeldt, A. Torstensson, L. Gorton, G. Johansson, *Anal. Chem.* **1981**, 53, 1979–1982.
- [64] E. Katz, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, 365, 157–164.
- [65] a) I. Haller, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 8050–8055; b) E. Katz, A. Y. Shkuropatov, B. D. Sviridov, V. A. Shuvalov, O. I. Vagabova, *Zhurn. Fiz. Khim.* **1986**, 60, 1312–1314.
- [66] H. O. Finklea, H. Abruña, R. W. Murray, *Adv. Chem. Ser.* **1980**, 184, 253–268.
- [67] P. R. Moses, R. W. Murray, *J. Electroanal. Chem.* **1977**, 77, 393–399.
- [68] C. Zou, M. S. Wrighton, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 7578–7584.
- [69] C. M. Elliott, R. W. Murray, *Anal. Chem.* **1976**, 48, 1247–1254.
- [70] a) W. J. Albery, A. J. Hillman, *Annu. Rep. Prog. Chem. Sect. C* **1981**, 78, 377–437; b) R. W. Murray in *Electroanalytical Chemistry*, Vol. 13 (Hrsg.: A. J. Bard), Marcel Dekker, New York, **1984**, S. 191–368; c) R. W. Murray, *Acc. Chem. Res.* **1980**, 13, 135–141; d) M. S. Wrighton, *Science* **1986**, 231, 32–37; e) H. D. Abruña, *Coord. Chem. Rev.* **1988**, 86, 135–189.
- [71] S. Yoshida, H. Kanno, T. Watanabe, *Anal. Sci.* **1995**, 11, 251–256.
- [72] S. K. Bhatia, M. J. Cooney, L. C. Shriver-Lake, T. L. Fare, F. S. Ligler, *Sens. Actuators B* **1991**, 3, 311–317.
- [73] C. D. Bain, E. B. Troughton, Y.-T. Tao, J. Eval, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 321–335.
- [74] R. G. Nuzzo, F. A. Fusco, D. L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 2358–2368.
- [75] a) E. B. Troughton, C. D. Bain, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo, D. L. Allara, M. D. Porter, *Langmuir* **1988**, 4, 365–385; b) E. Katz, N. Itzhak, I. Willner, *J. Electroanal. Chem.* **1992**, 336, 357–362; c) M. W. J. Beulen, B.-H. Huisman, P. A. van der Heijden, C. F. J. M. van Veggel, M. G. Simons, E. M. E. F. Biemond, P. J. de Lange, D. N. Reinhoudt, *Langmuir* **1996**, 12, 6170–6172.
- [76] A. J. Arduengo, J. R. Moran, J. Rodriguez-Parada, M. D. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6153–6154.
- [77] J. Y. Gui, D. A. Stern, F. Lu, A. T. Hubbard, *J. Electroanal. Chem.* **1991**, 305, 37–55.
- [78] D. Datta, H. A. O. Hill, H. Nakayama, *J. Electroanal. Chem.* **1991**, 297, 309–314.
- [79] a) H. A. Finklea in *Electroanalytical Chemistry*, Vol. 19 (Hrsg.: A. J. Bard, I. Rubinstein), Marcel Dekker, New York, **1996**, S. 109–335; b) E. Delamar, B. Michel, H. A. Biebuyck, C. Gerber, *Adv. Mater.* **1996**, 8, 719–729; c) A. Ulman, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 1533–1554.
- [80] a) C. D. Bain, J. Evall, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 7155–7164; b) R. G. Nuzzo, B. R. Zegarski, L. H. Dubois, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 733–740; c) R. G. Nuzzo, L. H. Dubois, D. L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 558–569.
- [81] a) J. J. Hickman, C. Zou, D. Ofer, P. D. Harvey, M. S. Wrighton, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 7271–7272; b) J. J. Hickman, P. E. Laibinis, D. I. Auerbach, C. Zou, T. J. Gardner, G. M. Whitesides, M. S. Wrighton, *Langmuir* **1992**, 8, 357–359; c) M. P. Soriaga, E. Binamira-Soriaga, A. T. Hubbard, J. B. Benziger, K.-W. P. Pang, *Inorg. Chem.* **1985**, 24, 65–73; d) J. L. Stickney, M. P. Soriaga, A. T. Hubbard, S. E. Anderson, *J. Electroanal. Chem.* **1981**, 125, 73–88; e) E. Katz, A. A. Solov'ev, *J. Electroanal. Chem.* **1990**, 291, 171–186.
- [82] a) M. M. Walczak, C. Chung, S. M. Stole, C. A. Widrig, M. D. Porter, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 2370–2378; b) I. Taniguchi, M. Iseki, H. Yamaguchi, K. Yasukouchi, *J. Electroanal. Chem.* **1984**, 175, 341–348; c) L. S. Pinheiro, M. L. A. Temperini, *J. Electroanal. Chem.* **1990**, 295, 169–181; d) P. Fenter, P. Eisenberger, J. Li, N. Camillone, S. Bernasek, G. Scoles, T. A. Ramanarayanan, K. S. Liang, *Langmuir* **1991**, 7, 2013–2016; e) P. E. Laibinis, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1990–1995; f) P. E. Laibinis, G. M. Whitesides, D. L. Allara, Y.-T. Tao, A. N. Parikh, R. G. Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7152–7167; g) P. E. Laibinis, C. D. Bain, G. M. Whitesides, *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 7017–7021.
- [83] M. E. Bothwell, M. P. Soriaga, *J. Electroanal. Chem.* **1990**, 295, 123–129.
- [84] B. Reynders, M. Stratmann, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1991**, 341, 406–407.
- [85] a) T. T.-T. Li, M. J. Weaver, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 6107–6108; b) T. T.-T. Li, M. J. Weaver, *J. Electroanal. Chem.* **1985**, 188, 121–129; c) M. J. Weaver, T. T.-T. Li, *J. Phys. Chem.* **1986**, 90, 3823–3829.
- [86] E. Katz, V. V. Borovkov, R. P. Evstigneeva, *J. Electroanal. Chem.* **1992**, 326, 197–212.
- [87] C. W. Sheen, J.-X. Shi, J. Martensson, A. N. Parikh, D. L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1514–1515.
- [88] Y. Gu, Z. Lin, R. A. Butera, V. S. Smentkowski, D. H. Waldeck, *Langmuir* **1995**, 11, 1849–1851.
- [89] a) A. R. Bishop, R. G. Nuzzo, *Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.* **1996**, 1, 127–136; b) D. L. Allara, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, 10, 771–783; c) D. Mandler, I. Turyan, *Electroanalysis* **1996**, 8, 207–213.
- [90] a) N. Mohri, M. Inoue, Y. Arai, K. Yoshikawa, *Langmuir* **1995**, 11, 1612–1616; b) J. B. Schlenoff, M. Li, H. Ly, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 12528–12536; c) L. Sun, R. C. Thomas, R. M. Crooks, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 8550–8552; d) R. C. Thomas, L. Sun, R. M. Crooks, *Langmuir* **1991**, 7, 620–622; e) Z. Zhang, T. L. Beck, J. T. Young, F. J. Boerio, *Langmuir* **1996**, 12, 1227–1234.
- [91] a) T. L. Freeman, S. D. Evans, A. Ulman, *Langmuir* **1995**, 11, 4411–4417; b) S. V. Atre, B. Liedberg, D. L. Allara, *Langmuir* **1995**, 11, 3882–3893; c) C. G. Worley, R. W. Linton, E. T. Samulski, *Langmuir* **1995**, 11, 3805–3810; d) K. de Weldige, M. Rohwerder, E. Vago, H. Viefhaus, M. Stratmann, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1995**, 353, 329–332; e) D. G. Castner, K. Hinds, D. W. Grainger, *Langmuir* **1996**, 12, 5083–5086.
- [92] a) M. G. Samant, K. Kunimatsu, R. Viswanathan, H. Seki, G. Pacchioni, P. S. Bargar, M. R. Philpott, *Langmuir* **1991**, 7, 1261–

- 1268; b) S. D. Evans, E. Urankar, A. Ulman, N. Ferris, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4121–4131; c) H. C. Yang, D. L. Dermody, C. Xu, A. J. Ricco, R. M. Crooks, *Langmuir* **1996**, *12*, 726–735; d) Y. Sato, S. Ye, T. Haba, K. Uosaki, *Langmuir* **1996**, *12*, 2726–2736; e) B. L. Frey, R. M. Corn, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3187–3193; f) R. V. Duevel, R. M. Corn, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 337–342; g) I. T. Bae, M. Sandifer, Y. W. Lee, D. A. Tryk, C. N. Sukenik, D. A. Scherson, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4508–4513.
- [93] a) R. A. Drawhorn, N. L. Abbott, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 16511–16515; b) S. E. Creager, J. Clarke, *Langmuir* **1994**, *10*, 3675–3683; c) P. E. Laibinis, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 5097–5105; d) P. E. Laibinis, M. A. Fox, J. P. Folkers, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1991**, *7*, 3167–3173; e) S. D. Evans, R. Sharma, A. Ulman, *Langmuir* **1991**, *7*, 156–161; f) C. D. Bain, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5897–5898; g) C. D. Bain, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 522–528; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 506–512; h) C. D. Bain, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6560–6561; i) C. D. Bain, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3665–3666; j) C. D. Bain, G. M. Whitesides, *Science* **1988**, *240*, 62–63.
- [94] a) B. Leidberg, P. Tengvall, *Langmuir* **1995**, *11*, 3821–3827; b) J. P. Folkers, P. E. Laibinis, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1992**, *8*, 1330–1341; c) M. D. Porter, T. B. Bright, D. L. Allara, C. E. D. Chidsey, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3559–3568.
- [95] a) R. F. Debono, G. D. Loucks, D. D. Manna, U. J. Krull, *Can. J. Chem.* **1996**, *74*, 677–688; b) K. A. Peterlinz, R. Georgiadis, *Langmuir* **1996**, *12*, 4731–4740; c) T. T. Ehler, N. Malmberg, K. Carron, B. P. Sullivan, L. J. Noe, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 3174–3180; d) G. B. Sigal, M. Mrksich, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1997**, *13*, 2749–2755; e) T. T. Ehler, N. Malmberg, L. J. Noe, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 1268–1272.
- [96] a) W. Pan, C. J. Durning, N. J. Turro, *Langmuir* **1996**, *12*, 4469–4473; b) Y. J. Lee, C. Jeon, W. Paik, K. Kim, *Langmuir* **1996**, *12*, 5830–5837.
- [97] a) J. A. M. Sondag-Huethorst, L. G. J. Fokkink, *Langmuir* **1995**, *11*, 2237–2241; b) K. Sinniah, J. Cheng, S. Terrettaz, J. E. Reutt-Robey, C. J. Miller, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 14500–14505; c) W. R. Everett, I. Fritsch-Faules, *Anal. Chim. Acta* **1995**, *307*, 253–268; d) W. R. Fawcett, M. Fedurco, Z. Kováčová, *Langmuir* **1994**, *10*, 2403–2408; e) J. A. M. Sondag-Huethorst, L. G. J. Fokkink, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *367*, 49–57; f) A. Badia, R. Back, B. Lennox, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2429–2431; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2332–2335; g) D.-F. Yang, C. P. Wilde, M. Morin, *Langmuir* **1996**, *12*, 6570–6577; h) C. E. D. Chidsey, D. N. Loiacono, *Langmuir* **1990**, *6*, 682–691; i) E. Katz, I. Willner, *Langmuir* **1997**, *13*, 3364–3373.
- [98] a) W. Li, J. A. Virtanen, R. M. Penner, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11751–11755; b) S. J. Stranick, A. N. Parikh, Y.-T. Tao, D. L. Allara, P. S. Weiss, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 7636–7646; c) Y.-T. Kim, R. L. McCarley, A. J. Bard, *Langmuir* **1993**, *9*, 1941–1944; d) L. Sun, R. M. Crooks, *Langmuir* **1993**, *9*, 1951–1954; e) R. L. McCarley, D. J. Dunaway, R. J. Willicut, *Langmuir* **1993**, *9*, 2775–2777; f) Y.-T. Kim, A. J. Bard, *Langmuir* **1992**, *8*, 1096–1102; g) I. Touzov, C. B. Gorman, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 5263–5276; h) R. Heinz, J. P. Rabe, *Langmuir* **1995**, *11*, 506–511; i) R. J. Willicut, R. L. McCarley, *Anal. Chim. Acta* **1995**, *307*, 269–276.
- [99] a) C. A. Alves, E. L. Smith, M. D. Porter, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1222–1227; b) J. T. Woodward, D. K. Schwartz, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7861–7862; c) M. Jaschke, H. Schönherr, H. Wolf, H.-J. Butt, E. Bamberg, M. K. Besocke, H. Ringsdorf, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 2290–2301; d) J.-B. D. Green, M. T. McDermott, M. D. Porter, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 13342–13345; e) K. Tamada, M. Hara, H. Sasabe, W. Knoll, *Langmuir* **1997**, *13*, 1558–1566; f) T. Han, J. M. Williams, T. P. Beebe, Jr., *Anal. Chim. Acta* **1995**, *307*, 365–376; g) W. B. Caldwell, D. J. Campbell, K. Chen, B. R. Herr, C. A. Mirkin, A. Malik, M. K. Durbin, P. Dutta, K. G. Huang, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6071–6082; h) C. A. McDermott, M. T. McDermott, J.-B. Green, M. D. Porter, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 13257–13267.
- [100] a) L. Strong, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1988**, *4*, 546–558; b) B. Hagenhoff, A. Benninghoven, J. Spinke, M. Liley, W. Knoll, *Langmuir* **1993**, *9*, 1622–1624; c) J. Huang, J. C. Hemminger, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3342–3343; d) J. Li, J. Huang, R. T. McIver, Jr., J. C. Hemminger, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2428–2432; e) M. G. Samant, C. A. Brown, J. G. Gordon II, *Langmuir* **1991**, *7*, 437–439; f) N. Camillone III, T. Y. B. Leung, P. Schwartz, P. Eisenberger, G. Scoles, *Langmuir* **1996**, *12*, 2737–2746; g) S. Mouradian, C. M. Nelson, L. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8639–8645; h) T. D. McCarley, R. L. McCarley, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 130–136; i) S. D. Evans, A. Ulman, *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *170*, 462–466; j) A.-S. Duwez, S. D. Paolo, J. Ghijsen, J. Riga, M. Deleuze, J. Delhalle, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 884–890.
- [101] H. Ron, I. Rubinstein, *Langmuir* **1994**, *10*, 4566–4573.
- [102] a) S. E. Creager, G. K. Rowe, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *370*, 203–211; b) T. Ohtsuka, Y. Sato, K. Uosaki, *Langmuir* **1994**, *10*, 3658–3662; c) G. K. Rowe, S. E. Creager, *Langmuir* **1994**, *10*, 1186–1192; d) L. Tender, M. T. Carter, R. W. Murray, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3173–3181; e) K. Weber, S. E. Creager, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3164–3172; f) K. Shimazu, I. Yagi, Y. Sato, K. Uosaki, *Langmuir* **1992**, *8*, 1385–1387; g) D. D. Popenoe, R. S. Deinhammer, M. D. Porter, *Langmuir* **1992**, *8*, 2521–2530; h) J. Redepenning, J. M. Flood, *Langmuir* **1996**, *12*, 508–512; i) J. N. Richardson, S. R. Peck, L. S. Curtin, L. M. Tender, R. H. Terrill, M. T. Carter, R. W. Murray, G. K. Rowe, S. E. Creager, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 766–772; j) W. R. Everett, T. L. Welch, L. Reed, I. Fritsch-Faules, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 292–298; k) S. R. Peck, L. S. Curtin, L. M. Tender, M. T. Carter, R. H. Terrill, R. W. Murray, J. P. Collman, W. A. Little, H. M. Duan, C. Dong, A. M. Hermann, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1121–1126; l) M. T. Carter, G. K. Rowe, J. N. Richardson, L. M. Tender, R. H. Terrill, R. W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2896–2899; m) L. A. Hockett, S. E. Creager, *Langmuir* **1995**, *11*, 2318–2321; n) J. F. Smalley, S. W. Feldberg, C. E. D. Chidsey, M. R. Linford, M. D. Newton, Y.-P. Liu, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 13141–13149; o) D. M. Collard, M. A. Fox, *Langmuir* **1991**, *7*, 1192–1197; p) C. E. D. Chidsey, C. R. Bertozzi, T. M. Putvinski, A. M. Mujsce, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4301–4306; q) H. C. DeLong, J. J. Donohue, D. A. Buttry, *Langmuir* **1991**, *7*, 2196–2202; r) S. E. Creager, G. K. Rose, *Anal. Chim. Acta* **1991**, *246*, 233–239; s) K. Uosaki, Y. Sato, H. Kita, *Langmuir* **1991**, *7*, 1510–1514.
- [103] a) E. Katz, N. Itzhak, I. Willner, *Langmuir* **1993**, *9*, 1392–1396; b) X. Tang, T. W. Schneider, D. A. Buttry, *Langmuir* **1994**, *10*, 2235–2240; c) X. Tang, T. W. Schneider, J. W. Walker, D. A. Buttry, *Langmuir* **1996**, *12*, 5921–5933; d) S. Yamada, H. Kohrog, T. Matsuo, *Chem. Lett.* **1995**, 639–640; e) K. A. B. Lee, *Langmuir* **1990**, *6*, 709–712; f) H. C. DeLong, D. A. Buttry, *Langmuir* **1990**, *6*, 1319–1322.
- [104] a) E. Katz, H.-L. Schmidt, *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *360*, 337–342; b) E. Katz, D. D. Schlereth, H.-L. Schmidt, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *367*, 59–70; c) E. Katz, H.-L. Schmidt, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *368*, 87–94; d) L. Zhang, T. Lu, G. W. Gokel, A. E. Kaifer, *Langmuir* **1993**, *9*, 786–791; e) J. J. Hickman, D. Ofer, P. E. Laibinis, G. M. Whitesides, M. S. Wrighton, *Science* **1991**, *252*, 688–691; f) J. Lukkari, K. Kleemola, M. Meretoja, J. Kankare, *Chem. Commun.* **1997**, 1099–1100.
- [105] a) J. E. Hutchison, T. A. Postlethwaite, R. W. Murray, *Langmuir* **1993**, *9*, 3277–3283; b) T. Akiyama, H. Imahori, Y. Sakata, *Chem. Lett.* **1994**, 1447–1450; c) J. Zak, H. Yuan, M. Ho, L. K. Woo, M. D. Porter, *Langmuir* **1993**, *9*, 2772–2774; d) T. R. E. Simpson, M. J. Cook, M. C. Petty, S. C. Thorpe, D. A. Russell, *Analyst* **1996**, *121*, 1501–1505; e) T. A. Postlethwaite, J. E. Hutchison, K. W. Hathcock, R. W. Murray, *Langmuir* **1995**, *11*, 4109–4116; f) T. R. E. Simpson, D. J. Revell, M. J. Cook, D. A. Russell, *Langmuir* **1997**, *13*, 460–464; g) K. Uosaki, T. Kondo, X.-Q. Zhang, M. Yanagida, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8367–8368; h) S. Yamada, Y. Koide, T. Matsuo, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *426*, 23–26.
- [106] a) H.-Y. Chen, D.-M. Zhou, J.-J. Xu, H.-Q. Fang, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *422*, 21–25; b) D. D. Schlereth, E. Katz, H.-L. Schmidt, *Electroanalysis* **1995**, *7*, 46–54; c) D. D. Schlereth, E. Katz, H.-L. Schmidt, *Electroanalysis* **1994**, *6*, 725–734; d) C. Ruan, F. Yang, C. Lei, J. Deng, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 1721–1725.
- [107] a) J. Redepenning, H. M. Tunison, H. O. Finklea, *Langmuir* **1993**, *9*, 1404–1407; b) H. O. Finklea, D. D. Hanshaw, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3173–3181; c) M. Maskus, H. D. Abbruña, *Langmuir* **1996**, *12*, 4455–4462; d) H. O. Finklea, L. Liu, M. S. Ravenscroft, S. Punturi, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 18852–18858.

- [108] a) P. He, J. Ye, Y. Fang, I. Suzuki, T. Osa, *Electroanalysis* **1997**, *9*, 68–73; b) H. Yamamoto, Y. Maeda, H. Kitano, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 6855–6860; c) M. Lahav, K. T. Ranjit, E. Katz, I. Willner, *Chem. Commun.* **1997**, 259–260; d) M. Lahav, K. T. Ranjit, E. Katz, I. Willner, *Isr. J. Chem.* **1997**, *37*, 185–195.
- [109] H. Schönherr, G. J. Vancso, B.-H. Huisman, F. C. J. M. van Veggel, D. N. Reinhoudt, *Langmuir* **1997**, *13*, 1567–1570.
- [110] a) T. Lu, L. Zhang, G. W. Gokel, A. E. Kaifer, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2542–2543; b) K. T. Ranjit, S. Marx-Tibbon, I. Ben-Dov, I. Willner, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 90–93; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 147–150; c) K. T. Ranjit, S. Marx-Tibbon, I. Ben-Dov, B. Willner, I. Willner, *Isr. J. Chem.* **1997**, *36*, 407–419.
- [111] a) W. B. Caldwell, K. Chen, C. A. Mirkin, S. J. Babinec, *Langmuir* **1993**, *9*, 1945–1947; b) X. Shi, W. B. Caldwell, K. Chen, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11598–11599; c) T. Akiyama, H. Imahori, A. Ajawakom, Y. Sakata, *Chem. Lett.* **1996**, 907–908; d) H. Tokuhisa, R. M. Crooks, *Langmuir* **1997**, *13*, 5608–5612.
- [112] a) F. C. Meldrum, J. Flath, W. Knoll, *Langmuir* **1997**, *13*, 2033–2049; b) M. Miyake, H. Matsumoto, M. Nishizawa, T. Sakata, H. Mori, S. Kuwabata, H. Yoneyama, *Langmuir* **1997**, *13*, 742–746; c) H. Fan, G. P. López, *Langmuir* **1997**, *13*, 119–121; d) A. Badia, L. Cuccia, L. Demers, F. Morin, R. B. Lennox, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2682–2692; e) C. Demaille, M. Brust, M. Tsionsky, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2323–2328; f) A. Doron, E. Katz, I. Willner, *Langmuir* **1995**, *11*, 1313–1317; g) S. Ogawa, K. Hu, F.-R. Fan, A. J. Bard, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 5701–5711.
- [113] a) G. Bar, S. Rubin, A. N. Parikh, B. I. Swanson, T. A. Zawodzinski, Jr., M.-H. Whangbo, *Langmuir* **1997**, *13*, 373–377; b) S. Xu, G. Liu, *Langmuir* **1997**, *13*, 127–129; c) S. Akari, D. Horn, H. Keller, W. Schrepp, *Adv. Mater.* **1995**, *7*, 549–551; d) J. L. Wilbur, H. A. Biebuyck, J. C. MacDonald, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1995**, *11*, 825–831.
- [114] a) M. Nishizawa, T. Sunagawa, H. Yoneyama, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *436*, 213–218; b) L. Yan, C. Mazzolin, A. Terfort, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1997**, *13*, 6704–6712; c) S. Imabayashi, D. Hobara, T. Kakiuchi, W. Knoll, *Langmuir* **1997**, *13*, 4502–4504.
- [115] a) C.-X. Zhao, J. Zhang, Z.-F. Liu, *Chem. Lett.* **1997**, 473–474; b) R. Wang, T. Iyoda, D. A. Tryk, K. Hashimoto, A. Fujishima, *Langmuir* **1997**, *13*, 4644–4651; c) E. Katz, M. Lion-Dagan, I. Willner, *J. Electroanal. Chem.* **1995**, *382*, 25–31; d) E. Katz, I. Willner, *Electroanalysis* **1995**, *7*, 417–419; e) M. Lion-Dagan, E. Katz, I. Willner, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2741–2742; f) S. Marx-Tibbon, I. Ben-Dov, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4717–4718; g) A. Doron, E. Katz, M. Portnoy, I. Willner, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1626–1628; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1535–1537; h) A. Doron, M. Portnoy, M. Lion-Dagan, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8937–8944; i) E. Katz, B. Willner, I. Willner, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 703–719; j) A. Doron, E. Katz, G. Tao, I. Willner, *Langmuir* **1997**, *13*, 1783–1790; k) K. Morigaki, Z.-F. Liu, K. Hashimoto, A. Fujishima, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 14771–14777; l) I. Willner, A. Doron, E. Katz, *J. Phys. Org. Chem.* **1998**, *11*, 546–560.
- [116] a) I. Willner, E. Katz, A. Riklin, R. Kasher, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10965–10966; b) I. Willner, N. Lapidot, A. Riklin, R. Kasher, E. Zahavy, E. Katz, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1428–1441; c) E. Katz, A. Riklin, I. Willner, *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *354*, 129–144.
- [117] I. Willner, E. Katz, B. Willner, *Electroanalysis* **1997**, *9*, 965–977.
- [118] I. Willner, A. Riklin, B. Shoham, D. Rivenzon, E. Katz, *Adv. Mater.* **1993**, *5*, 912–915.
- [119] a) Y. Kajiya, T. Okamoto, H. Yoneyama, *Chem. Lett.* **1993**, 2107–2110; b) A. Riklin, I. Willner, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4118–4126; c) S. E. Creager, K. G. Olsen, *Anal. Chim. Acta* **1995**, *307*, 277–289; d) S. Kuwabata, T. Okamoto, Y. Kajiya, H. Yoneyama, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1684–1690; e) M. A. McRipley, R. A. Linsenmeier, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *414*, 235–246.
- [120] W. Jin, F. Bier, U. Wollenberger, F. Scheller, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, 823–829.
- [121] B. Shoham, Y. Migron, A. Riklin, I. Willner, B. Tartakovsky, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, 341–352.
- [122] I. Willner, A. Riklin, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1535–1539.
- [123] T. Sawaguchi, T. Matsue, I. Uchida, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1992**, *29*, 127–133.
- [124] a) B. A. Kuznetsov, N. A. Byzova, G. P. Shumakovich, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *371*, 85–92; b) W. H. Koppenol, C. A. J. Vroonland, R. Brams, *Biochem. Biophys. Acta* **1978**, *503*, 499–508.
- [125] a) T. Lötzbeier, W. Schuhmann, E. Katz, J. Falter, H.-L. Schmidt, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *377*, 291–294; b) A. N. J. Moore, E. Katz, I. Willner, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *417*, 189–192; c) A. Narvaez, E. Dominguez, I. Katakis, E. Katz, K. T. Ranjit, I. Ben-Dov, I. Willner, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *430*, 217–233; d) L. Jiang, A. Glidle, C. J. McNeil, J. M. Cooper, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 1143–1155.
- [126] a) G. J. Leggett, C. J. Roberts, P. M. Williams, M. C. Davies, D. E. Jackson, S. J. B. Tendler, *Langmuir* **1993**, *9*, 2356–2362; b) G. J. Leggett, M. C. Davies, D. E. Jackson, C. J. Roberts, S. J. B. Tendler, P. M. Williams, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 8852–8854; c) M.-C. Parker, M. C. Davies, S. J. B. Tendler, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 16155–16161.
- [127] a) F. R. Shu, G. S. Wilson, *Anal. Chem.* **1976**, *48*, 1679–1686; b) M. Lion-Dagan, S. Marx-Tibbon, E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1730–1733; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1604–1606; c) R. A. Williams, H. W. Blanch, *Biosens. Bioelectron.* **1994**, *9*, 159–167.
- [128] E. Mann-Buxbaum, F. Pittner, T. Schalkhammer, A. Jachimowicz, G. Jobst, F. Olcaytug, G. Urban, *Sens. Actuators B* **1990**, *1*, 518–522.
- [129] T. Miyasaka, K. Koyama, T. Watanabe, *Chem. Lett.* **1990**, 627–630.
- [130] a) H.-G. Hong, P. W. Bohn, S. G. Sligar, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1635–1638; b) H.-G. Hong, M. Jiang, S. G. Sligar, P. W. Bohn, *Langmuir* **1994**, *10*, 153–158; c) M. A. Firestone, M. L. Shank, S. G. Sligar, P. W. Bohn, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9033–9041.
- [131] E. Katz, V. Heleg-Shabtai, I. Willner, H. K. Rau, W. Haehnel, *Angew. Chem.* **1998**, *112*, 3443–3447; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3253–3256.
- [132] P. S. Stayton, J. M. Olinger, S. T. Wollman, E. M. Thurman, P. W. Bohn, S. G. Sligar in *Synthetic Microstructures in Biological Research* (Hrsg.: J. M. Schnur, M. Peckerar), Plenum, New York, **1992**, S. 163–170.
- [133] K. Narasimhan, L. B. Wingard, Jr., *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 2984–2987.
- [134] K. T. Kinnear, H. G. Monbouquette, *Langmuir* **1993**, *9*, 2255–2257.
- [135] G. Puu, I. Gustafson, P.-A. Ohlsson, G. Olofsson, A. Sellström in *Progress in Membrane Technology* (Hrsg.: J. C. Gomes-Fernandez, D. Chapman, L. Racker), Birkhäuser, Basel, **1991**, S. 279–290.
- [136] M. Kühner, R. Tampe, E. Sackmann, *Biophys. J.* **1994**, *67*, 217–226.
- [137] R. Naumann, A. Jonczyk, R. Kopp, J. Esch, H. Ringsdorf, W. Knoll, P. Gräber, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2168–2171; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2056–2058.
- [138] K. L. Prime, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10714–10721.
- [139] M. J. Tarlov, E. F. Bowden, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1847–1849.
- [140] U. R. Achtnich, L. X. Tiefenauer, R. Y. Andres, *Biosens. Bioelectron.* **1992**, *7*, 279–290.
- [141] B. L. Frey, C. E. Jordan, S. Kornguth, R. M. Corn, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4452–4457.
- [142] a) W. Knoll, G. Pirwitz, K. Tamada, A. Offenhäusser, M. Hara, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *438*, 199–205; b) N. Dontha, W. B. Nowall, W. G. Kuhr, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2619–2625.
- [143] a) R. Köneke, C. Menzel, R. Ulber, K. Schügerl, T. Scheper, M. Saleemuddin, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 1229–1236; b) P. L. Edmiston, S. S. Saavedra, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1665–1671.
- [144] J. Madoz, B. A. Kuznetsov, F. J. Medrano, J. L. Garcia, V. M. Fernandez, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1043–1051.
- [145] I. Willner, V. Heleg-Shabtai, R. Blonder, E. Katz, G. Tao, A. F. Bückmann, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10321–10322.
- [146] E. Katz, D. D. Schlereth, H.-L. Schmidt, A. J. J. Olsthoorn, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *368*, 165–171.
- [147] L.-H. Guo, G. McLendon, H. Razafitrimo, Y. Gao, *J. Mater. Chem.* **1996**, *6*, 369–374.
- [148] a) D. D. Schlereth, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *425*, 77–85; b) D. D. Schlereth, R. P. H. Kooyman, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *431*, 285–295; c) L. Bertilsson, H.-J. Butt, G. Nelles, D. D. Schlereth, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 839–852; d) D. D. Schlereth, R. P. H. Kooyman, *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *444*, 231–240.
- [149] a) H. A. O. Hill, N. J. Walton, I. J. Higgins, *FEBS Lett.* **1981**, *126*, 282–284; b) A. E. G. Cass, G. Davis, H. A. O. Hill,

- D. J. Nancarrow, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 828, 51–57; c) F. A. Armstrong, H. A. O. Hill, N. J. Walton, *Q. Rev. Biophys.* **1986**, 18, 261–322; d) W. Jin, U. Wollenberger, F. F. Bier, A. Makower, F. W. Scheller, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1996**, 39, 221–225.
- [150] M. Brunori, *Biosens. Bioelectron.* **1994**, 9, 633–636.
- [151] a) P. A. Adams in *Peroxidases in Chemistry and Biology*, Vol. 2 (Hrsg.: J. Everse, K. E. Everse), CRC Press, Boston, **1991**, Kapitel 7, S. 171–200; b) G. Ranghino, G. Antonini, P. Fantucci, *Isr. J. Chem.* **1994**, 34, 239–244.
- [152] F. Patolsky, E. Katz, V. Heleg-Shabtai, I. Willner, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 1068–1073.
- [153] a) V. Heleg-Shabtai, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8121–8122; b) V. Heleg-Shabtai, E. Katz, S. Levi, I. Willner, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1997**, 2645–2651.
- [154] I. Willner, E. Katz, V. Heleg-Shabtai, W. Haehnel, H. K. Rau, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6455–6468.
- [155] Übersicht: A. L. Ghindilis, P. Atanasov, E. Wilkins, *Electroanalysis* **1997**, 9, 661–674.
- [156] A. I. Yaropolov, V. Malovik, S. D. Varfolomeev, I. V. Berezin, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1979**, 249, 1399–1401.
- [157] a) F. A. Armstrong, A. M. Lannon, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 7211–7212; b) F. A. Armstrong, A. M. Bond, F. N. Büchi, A. Hamnett, H. A. O. Hill, A. M. Lannon, O. C. Lettington, C. G. Zoski, *Analyst* **1993**, 118, 973–978; c) M. S. Mondal, H. A. Fuller, F. A. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 263–264.
- [158] E. Csöregi, G. Jönsson-Pettersson, L. Gorton, *J. Biotechnol.* **1993**, 30, 315–320.
- [159] T. Ruzgas, L. Gorton, J. Emneus, E. Csöregi, G. Marko-Varga, *Anal. Proc.* **1995**, 32, 207–208.
- [160] I. V. Berezin, V. A. Bogdanovskaya, S. D. Varfolomeev, M. R. Tarasevich, A. I. Yaropolov, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1978**, 240, 615–618.
- [161] a) „Bioelectrochemistry“: M. R. Tarasevich in *Comprehensive Treatise of Electrochemistry*, Vol. 10 (Hrsg.: S. Srinivasan, Y. A. Chizmadzhev, J. O. M. Bockris, B. E. Conway, E. Yeager), Plenum, New York, **1985**, S. 275–301; b) T. Ruzgas, L. Gorton, J. Emneus, G. Marko-Varga, *J. Electroanal. Chem.* **1995**, 391, 41–49.
- [162] L.-H. Guo, H. A. O. Hill, G. A. Lawrance, G. S. Sanghera, D. J. Hopper, *J. Electroanal. Chem.* **1989**, 266, 379–396.
- [163] L.-H. Guo, H. A. O. Hill, D. J. Hopper, G. A. Lawrance, G. S. Sanghera, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 1958–1963.
- [164] A. L. Burrows, H. A. O. Hill, T. A. Leese, W. S. McIntire, H. Nakayama, G. S. Sanghera, *Eur. J. Biochem.* **1991**, 199, 73–78.
- [165] T. Ikeda, F. Matsushita, M. Senda, *Biosens. Bioelectron.* **1991**, 6, 299–304.
- [166] a) J. J. Kulys, R. D. Schmid, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1990**, 24, 305–311; b) U. Wollenberger, V. Bogdanovskaya, S. Bobrin, F. Scheller, M. Tarasevich, *Anal. Lett.* **1990**, 23, 1795–1808; c) L. Gorton, G. Bremle, E. Csöregi, G. Jönsson-Pettersson, B. Persson, *Anal. Chim. Acta* **1991**, 249, 43–54; d) T. Tatsuma, T. Watanabe, T. Watanabe, *J. Electroanal. Chem.* **1993**, 356, 245–253; e) T. Tatsuma, T. Watanabe, T. Watanabe, *Sens. Actuators B* **1993**, 13–14, 752–753.
- [167] a) T. A. Buttler, K. Johansson, L. Gorton, G. A. Marko-Varga, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2628–2636; b) G. Marko-Varga, K. Johansson, L. Gorton, *J. Chromatogr.* **1994**, 660, 153–167.
- [168] V. Kacaniklic, K. Johansson, G. Marko-Varga, L. Gorton, G. Jönsson-Pettersson, E. Csöregi, *Electroanalysis* **1994**, 6, 381–390.
- [169] R. M. Paddock, E. F. Bowden, *J. Electroanal. Chem.* **1989**, 260, 487–494.
- [170] M. F. Cardosi, *Electroanalysis* **1994**, 6, 89–95.
- [171] J. Zhao, R. Henkens, J. Stonehuerner, J. P. O'Daly, A. L. Crumbliss, *J. Electroanal. Chem.* **1992**, 327, 109–119.
- [172] a) U. Wollenberger, J. Wang, M. Ozsoz, E. Gonzalez-Romero, F. Scheller, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1991**, 26, 287–296; b) I. C. Popescu, G. Zetterburg, L. Gorton, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, 10, 443–461.
- [173] a) D. L. Williams, A. P. Doig, Jr., A. Korosi, *Anal. Chem.* **1970**, 42, 118–121; b) P. Janada, J. Weber, *J. Electroanal. Chem.* **1991**, 300, 119–124.
- [174] a) A. E. G. Cass, G. Davis, G. D. Francis, H. A. O. Hill, W. J. Aston, I. J. Higgins, E. V. Plotkin, L. D. L. Scott, A. P. F. Turner, *Anal. Chem.* **1984**, 56, 667–671; b) A. E. G. Cass, G. Davis, H. A. O. Hill, I. J. Higgins, E. V. Plotkin, A. P. F. Turner, W. J. Aston in *Charge and Field Effects in Biosystems* (Hrsg.: M. J. Allen, P. N. R. Usherwood), Abacus, **1984**, S. 475–484; c) G. Davis, H. A. O. Hill, I. J. Higgins, A. P. F. Turner in *Implantable Sensors for Closed Loop Prosthetic Systems* (Hrsg.: W. H. Ko), Futura, New York, **1985**, S. 189–195; d) G. Davis, M. J. Green, H. A. O. Hill, *Enzym. Microb. Technol.* **1986**, 8, 1203–1208; e) S. L. Brooks, R. E. Ashby, A. P. F. Turner, M. R. Calder, D. J. Clarke, *Biosensors* **1987/1988**, 3, 45–51; f) J. M. Dicks, S. Hattori, I. Karube, A. P. F. Turner, T. Yokozaawa, *Ann. Biol. Clin.* **1989**, 47, 607–619.
- [175] C. Iwakura, Y. Kajiya, H. Yoneyama, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 1019–1020.
- [176] N. C. Foulds, C. R. Lowe, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **1986**, 82, 1259–1264.
- [177] A. P. F. Turner, S. P. Hendry, M. F. Cardosi, *Biosensors, Instrumentation and Processing, The World Biotech. Rep.*, Vol. 1, Online Publications, Pinner, **1987**, S. 125–137.
- [178] S. P. Hendry, A. P. F. Turner, *Horm. Metab. Res. Suppl. Ser.* **1988**, 20, 37–40.
- [179] Y. Kajiya, R. Tsuda, H. Yoneyama, *J. Electroanal. Chem.* **1991**, 301, 155–161.
- [180] a) M. R. Tarasevich, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1979**, 6, 587–597; b) H. A. O. Hill, I. J. Higgins, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **1981**, 302, 267–273.
- [181] J. J. Kulys, R. A. Vidzuaite, *Anal. Lett.* **1983**, 16, 197–207.
- [182] E. J. D'Costa, I. J. Higgins, A. P. F. Turner, *Biosensors* **1986**, 2, 71–87.
- [183] W. H. Muller, S. J. Churchouse, P. M. Vadgama, *Analyst* **1985**, 110, 925–928.
- [184] T. Matsue, N. Kasai, M. Narumi, M. Nishizawa, H. Yamada, I. Uchida, *J. Electroanal. Chem.* **1991**, 300, 111–118.
- [185] a) S. Marx-Tibbon, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9925–9926; b) P. Alzari, N. Anicet, C. Bourdillon, J. Moiroux, J.-M. Savéant, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 6788–6789; c) S. J. Sadeghi, G. Gilardi, G. Nicolosi, A. E. G. Cass, *Chem. Commun.* **1997**, 517–518; d) A. D. Ryabov, Y. N. Firsova, V. N. Gozal, E. S. Ryabova, A. N. Shevelkova, L. T. Troitskaya, T. V. Demeschik, V. I. Sokolov, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 806–813.
- [186] G. Tao, E. Katz, I. Willner, *Chem. Commun.* **1997**, 2073–2074.
- [187] a) Y. Degani, A. Heller, *J. Phys. Chem.* **1987**, 91, 1285–1289; b) Y. Degani, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 2615–2620; c) W. Schuhmann, T. J. Ohara, H.-L. Schmidt, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 1394–1397; d) P. N. Bartlett, R. G. Whitaker, M. J. Green, J. Frew, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 1603–1604.
- [188] A. Badia, R. Carlini, A. Fernandez, F. Battaglini, S. R. Mikkelsen, A. M. English, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7053–7060.
- [189] W. Schuhmann, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, 10, 181–193.
- [190] A. Riklin, E. Katz, I. Willner, A. Stoker, A. F. Bückmann, *Nature* **1995**, 376, 672–675.
- [191] I. Willner, B. Willner, *React. Polym.* **1994**, 22, 267–279.
- [192] I. Willner, R. Kasher, E. Zahavy, N. Lapidot, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10963–10965.
- [193] a) N. C. Foulds, C. R. Lowe, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 2473–2478; b) W. Schuhmann, C. Kranz, J. Huber, H. Wohlschläger, *Synth. Met.* **1993**, 61, 31–35; c) S. Cosnier, C. Innocent, Y. Jouanneau, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 3198–3201; d) S. Cosnier, L. Allien, L. Coche-Guérente, C. Innocent, P. Labbé, P. Mailley, *Sens. Mater.* **1996**, 8, 169–177.
- [194] a) P. D. Hale, L. I. Boguslavsky, T. Inazaki, H. I. Karan, H. S. Lee, T. A. Skotheim, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 677–682; b) T. Inagaki, H. S. Lee, P. D. Hale, T. A. Skotheim, Y. Okamoto, *Macromolecules* **1989**, 22, 4641–4643; c) T. Inagaki, H. S. Lee, T. A. Skotheim, Y. Okamoto, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 1181–1183; d) P. D. Hale, T. Inagaki, H. S. Lee, H. I. Karan, Y. Okamoto, T. A. Skotheim, *Anal. Chim. Acta* **1990**, 228, 31–37.
- [195] a) T. Kaku, H. I. Karan, Y. Okamoto, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1231–1235; b) M. G. Loughram, J. M. Hall, A. P. F. Turner, *Electroanalysis* **1996**, 8, 870–875.
- [196] S. Cosnier, K. Le Lous, *Talanta* **1996**, 43, 331–337.
- [197] A. Ehrenberg, H. Theorell, *Acta Chem. Scand.* **1955**, 9, 1193–1205.

- [198] a) F. A. Armstrong, H. A. O. Hill, N. J. Walton, *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 407–413; b) J. E. Frew, H. A. O. Hill, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *172*, 261–269.
- [199] a) I. Taniguchi, K. Toyosawa, H. Yamaguchi, K. Yasukouchi, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982**, 1032–1033; b) I. Taniguchi, S. Yoshimoto, K. Nishiyama, *Chem. Lett.* **1997**, 353–354; c) B. D. Lamp, D. Hobara, M. D. Porter, K. Niki, T. M. Cotton, *Langmuir* **1997**, *13*, 736–741; d) H. A. O. Hill, D. J. Page, N. J. Walton, *J. Electroanal. Chem.* **1987**, *217*, 141–158; e) Y. Xie, S. Dong, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1992**, *29*, 71–79.
- [200] P. M. Allen, H. A. O. Hill, N. J. Walton, *J. Electroanal. Chem.* **1984**, *178*, 69–86.
- [201] a) Z.-X. Huang, M. Feng, Y.-H. Wang, J. Cui, D.-S. Zou, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *416*, 31–40; b) R. Santucci, A. Faraoni, L. Campanella, G. Tranchida, M. Brunori, *Biochem. J.* **1991**, *273*, 783–786.
- [202] S. Bagby, P. D. Barker, K. DiGleria, H. A. O. Hill, V. J. Lowe, *Biochem. Soc. Trans.* **1988**, *16*, 958–959.
- [203] G. Li, H. Chen, D. Zhu, *Anal. Chim. Acta* **1996**, *319*, 275–276.
- [204] X. Qu, T. Lu, S. Dong, C. Zhou, T. M. Cotton, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1994**, *34*, 153–156.
- [205] T. Lu, X. Yu, S. Dong, C. Zhou, S. Ye, T. M. Cotton, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *369*, 79–86.
- [206] K. R. Brown, A. P. Fox, M. J. Natan, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1154–1157.
- [207] a) T. Sakurai, F. Nose, *Chem. Lett.* **1995**, 1075–1076; b) T. Sakurai, F. Nose, T. Fujiki, S. Suzuki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, *69*, 2855–2862; c) T. Sakurai, *Chem. Lett.* **1996**, 481–482; d) T. D. Martin, S. A. Monheit, R. J. Niichel, S. C. Peterson, C. H. Campbell, D. C. Zapien, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *420*, 279–290.
- [208] K. Nishiyama, H. Ishida, I. Taniguchi, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *373*, 255–258.
- [209] a) R. Santucci, H. Reinhard, M. Brunori, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8536–8537; b) P. A. Mabrouk, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 189–191.
- [210] a) E. Katz, T. Lötzbeyer, D. D. Schlereth, W. Schuhmann, H.-L. Schmidt, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *373*, 189–200; b) M. J. Lobo, A. J. Miranda, P. Tuñón, *Electroanalysis* **1997**, *9*, 191–201; c) I. Katakis, E. Domínguez, *Mikrochim. Acta* **1997**, *126*, 11–32; d) E. Lorenzo, F. Pariente, L. Hernández, F. Tobalina, M. Darder, Q. Wu, M. Maskus, H. D. Abruña, *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, 319–332.
- [211] a) G. Prentice, *CHEMTECH* **1984**, *14*, 684–701; b) „Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production“: G. Tayhas, R. Palmore, G. M. Whitesides, *ACS Symp. Ser.* **1994**, *566*, 271–290; c) K. Kordesch, *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 902–907; d) C. Van Dijk, C. Laane, C. Veeger, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1985**, *104*, 245–249.
- [212] a) I. Willner, E. Katz, F. Patolsky, A. F. Bückmann, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 1817–1822; b) I. Willner, G. Arad, E. Katz, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1998**, *44*, 209–214.
- [213] a) S. Britland, E. Perez-Arnaud, P. Clark, B. McGinn, P. Connolly, G. Moores, *Biotechnol. Prog.* **1992**, *8*, 155–160; b) S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767–773.
- [214] a) S. K. Bhatia, J. J. Hickman, F. S. Ligler, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4432–4433; b) M. N. Wybourne, J. C. Wu, M. Yan, S. X. Cai, J. F. W. Keana, *J. Vac. Sci. Technol. B* **1993**, *11*, 2210–2213; c) C. S. Dulcey, J. H. Georger, V. Krauthamer, D. A. Stenger, T. L. Fare, J. M. Calvert, *Science* **1991**, *252*, 551–554; d) J. M. Calvert, J. H. Georger, M. C. Peckerar, P. E. Pehrsson, J. M. Schnur, P. E. Schoen, *Thin Solid Films* **1992**, *211*, 359–363; e) W. J. Dressick, J. M. Calvert, *Jpn. J. Appl. Phys.* **1993**, *32*, 5829–5893.
- [215] a) A. Kumar, N. L. Abbott, E. Kim, N. A. Biebuyck, G. M. Whitesides, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 219–226; b) R. Singhvi, A. Kumar, G. P. Lopez, G. N. Stephanopoulos, D. I. C. Wang, G. M. Whitesides, D. E. Ingber, *Science* **1994**, *264*, 696–698; c) W. J. Dressick, C. S. Dulcey, J. H. Georger, Jr., J. M. Calvert, *Chem. Mater.* **1993**, *5*, 148–150; d) J. M. Calvert, *J. Vac. Sci. Technol. B* **1993**, *11*, 2155–2163.
- [216] a) N. L. Abbott, A. Kumar, G. M. Whitesides, *Chem. Mater.* **1994**, *6*, 596–602; b) N. L. Abbott, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1994**, *10*, 1493–1497; c) N. L. Abbott, G. M. Whitesides, L. M. Racz, J. Szekely, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 290–294; d) N. L. Abbott, J. P. Folkers, G. M. Whitesides, *Science* **1992**, *257*, 1380–1382.
- [217] a) J. L. Wilbur, E. Kim, Y. Xia, G. M. Whitesides, *Adv. Mater.* **1995**, *7*, 649–652; b) Y. Xia, E. Kim, M. Mrksich, G. M. Whitesides, *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 601–603; c) E. Kim, A. Kumar, G. M. Whitesides, *J. Electrochem. Soc.* **1995**, *142*, 628–633; d) N. L. Jeon, R. G. Nuzzo, Y. Xia, M. Mrksich, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1995**, *11*, 3024–3026; e) C. B. Gorman, H. A. Biebuyck, G. M. Whitesides, *Chem. Mater.* **1995**, *7*, 252–254; f) C. D. James, R. C. Davis, L. Kam, H. G. Craighead, M. Issacson, J. N. Turner, W. Shain, *Langmuir* **1998**, *14*, 741–744; g) A. Bernard, E. Delamarche, H. Schmid, B. Michel, H. R. Bosshard, H. A. Biebuyck, *Langmuir* **1998**, *14*, 2225–2229.
- [218] A. Kumar, H. A. Biebuyck, N. L. Abbott, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9188–9189.
- [219] A. Kumar, G. M. Whitesides, *Science* **1994**, *263*, 60–62.
- [220] a) A. Kumar, H. A. Biebuyck, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1994**, *10*, 1498–1511; b) A. Kumar, G. M. Whitesides, *Appl. Phys. Lett.* **1993**, *63*, 2002–2004.
- [221] P. C. Hidber, P. F. Nealey, W. Helbig, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1996**, *12*, 5209–5215.
- [222] A. C. Pease, D. Solas, E. J. Sullivan, M. T. Cronin, C. P. Homes, S. P. A. Fodor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 5022–5026.
- [223] a) L. F. Rozsnyai, D. R. Benson, S. P. A. Fodor, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 801–803; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 759–761; b) S. K. Bhatia, J. L. Teixeira, M. Anderson, L. C. Shriver-Lake, J. M. Calvert, J. H. Georger, J. J. Hickman, C. S. Dulcey, P. E. Schoen, F. S. Ligler, *Anal. Biochem.* **1993**, *208*, 197–205.
- [224] G. P. López, H. A. Biebuyck, R. Härter, A. Kumar, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10774–10781.
- [225] G. Sundarababu, H. Gao, H. Sigrist, *Photochem. Photobiol.* **1995**, *61*, 540–544.
- [226] T. Matsuda, T. Sugawara, *Langmuir* **1995**, *11*, 2267–2271.
- [227] M. Yan, S. X. Cai, M. N. Wybourne, J. F. W. Keana, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 814–816.
- [228] a) V. N. R. Pillai, *Synthesis* **1980**, 1–26; b) R. W. Binkley in *Synthetic Organic Photochemistry* (Hrsg.: W. M. Horspool), Plenum, New York, **1984**, S. 375–423.
- [229] a) D. J. Pritchard, H. Morgan, J. M. Cooper, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 84–86; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 91–93; b) M. Hengsakul, A. E. G. Cass, *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 249–254.
- [230] a) I. Willner, R. Blonder, A. Dagan, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9365–9366; b) I. Willner, B. Willner, *Adv. Mater.* **1995**, *7*, 587–589; c) R. Blonder, I. Ben-Dov, A. Dagan, I. Willner, E. Zisman, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 627–644.
- [231] I. Willner, R. Blonder, *Thin Solid Films* **1995**, *266*, 254–257.
- [232] a) C. Pale-Grosmange, E. S. Simon, K. L. Prime, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 12–20; b) K. L. Prime, G. M. Whitesides, *Science* **1991**, *252*, 1164–1167; c) G. P. López, M. W. Albers, S. L. Schreiber, R. Carroll, E. Peralta, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5877–5878.
- [233] a) G. P. López, H. A. Biebuyck, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1993**, *9*, 1513–1516; b) G. P. López, H. A. Biebuyck, D. C. Frisbie, G. M. Whitesides, *Science* **1993**, *260*, 647–649.
- [234] a) I. Willner, S. Rubin, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 419; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 367–385; b) I. Willner, B. Willner, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1997**, *42*, 43–57; c) I. Willner, S. Rubin, *React. Polym.* **1993**, *21*, 177–186.
- [235] R. Blonder, E. Katz, I. Willner, V. Wray, A. F. Bückmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11747–11757.
- [236] a) P. Skládal, *Electroanalysis* **1997**, *9*, 737–745; b) B. Lu, M. R. Smyth, R. O’Kennedy, *Analyst* **1996**, *121*, 29R–32R; c) S.-C. Huang, K. D. Caldwell, J.-N. Lin, H.-K. Wang, J. N. Herron, *Langmuir* **1996**, *12*, 4292–4298.
- [237] G. Wallraff, J. Labadie, P. Brock, R. DiPietro, T. Nguyen, T. Huynh, W. Hinsberg, G. McGall, *CHEMTECH* **1997**, 22–32.
- [238] Y. Cohen, S. Levi, S. Rubin, I. Willner, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *417*, 65–75.
- [239] a) L. X. Tiefenauer, S. Kossek, C. Padeste, P. Thiébaud, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 213–223; b) A. L. Ghindilis, O. V. Skorobogat’ko, V. P. Gavrilova, A. I. Yarpolov, *Biosens. Bioelectron.* **1992**, *7*, 301–304; c) E. Katz, I. Willner, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *418*, 67–72.

- [240] a) A. A. Suleiman, G. G. Guilbault, *Analyst* **1994**, *119*, 2279–2282; b) G. G. Guilbault, B. Hock, R. Schmid, *Biosens. Bioelectron.* **1992**, *7*, 411–419; c) C. Köblinger, S. Drost, F. Abert, H. Wolf, S. Koch, P. Woias, *Biosens. Bioelectron.* **1992**, *7*, 397–404; d) C. R. Suri, M. Raj, G. C. Mishra, *Biosens. Bioelectron.* **1994**, *9*, 325–332; e) J. Horáček, P. Skládal, *Anal. Chim. Acta* **1997**, *347*, 43–50; f) C. R. Suri, G. C. Mishra, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 1199–1205; g) H. O. Ghourchian, N. Kamo, *Anal. Chim. Acta* **1995**, *300*, 99–105; h) J. L. N. Harteveld, M. S. Nieuwenhuizen, E. R. J. Wils, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 661–667.
- [241] a) I. Moser, T. Schalkhammer, F. Pittner, G. Urban, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 729–737; b) J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, N. Dontha, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 587–599; c) J. Li, G. Cheng, S. Dong, *Electroanalysis* **1997**, *9*, 834–837.
- [242] a) J. Wang, P. E. Nielsen, M. Jiang, X. Cai, J. R. Fernandes, D. H. Grant, M. Ozsoz, A. Beglieter, M. Mowat, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 5200–5202; b) C. Nicolini, V. Erokhin, P. Facci, G. A. Ross, P. Paschkevitch, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 613–618; c) F. Caruso, E. Rodda, D. N. Furiang, K. Niikura, Y. Okahata, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2043–2049; d) Y. Okahata, M. Kawase, K. Niikura, F. Ohtake, H. Furusawa, Y. Ebara, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 1288–1296.
- [243] A. Bardea, A. Dagan, I. Ben-Dov, B. Amit, I. Willner, *Chem. Commun.* **1998**, 839–840.
- [244] F. Patolsky, B. Filanovsky, E. Katz, I. Willner, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 10359–10367.
- [245] a) S. Toyama, Y. Ikariyama, *Chem. Lett.* **1997**, 1083–1084; b) A. J. Thiel, A. G. Frutos, C. E. Jordan, R. M. Corn, L. M. Smith, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4948–4956; c) C. E. Jordan, A. G. Frutos, A. J. Thiel, R. M. Corn, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4939–4947; d) E. Kaganer, R. Pogreb, D. Davidov, I. Willner, *Langmuir* **1999**, *15*, 3920–3923.
- [246] a) S. Rubin, G. Bar, T. N. Taylor, R. W. Cutts, T. A. Zawodzinski, Jr., *J. Vac. Sci. Technol. A* **1996**, *14*, 1870–1876; b) T. Sato, D. Brown, B. F. G. Johnson, *Chem. Commun.* **1997**, 1007–1008; c) K. C. Grabar, K. J. Allison, B. E. Baker, R. M. Bright, K. R. Brown, R. G. Freeman, A. P. Fox, C. D. Keating, M. D. Musick, M. J. Natan, *Langmuir* **1996**, *12*, 2353–2361; d) S. E. Gilbert, O. Cavalleri, K. Kern, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 12123–12130; e) M. Gao, X. Zhang, B. Yang, J. Shen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2229–2230; f) M. Brust, R. Etchenique, E. J. Calvo, G. J. Gordillo, *Chem. Commun.* **1996**, 1949–1950; g) D. Bethell, M. Brust, D. J. Schiffrin, C. Kiely, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *409*, 137–143; h) S. Yabuki, F. Mizutani, *Electroanalysis* **1997**, *9*, 23–25; i) S. Peschel, G. Schmid, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1568–1569; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1442–1443; j) J. H. Fendler, F. C. Meldrum, *Adv. Mater.* **1995**, *7*, 607–632; k) R. Blonder, L. Sheeney, I. Willner, *Chem. Commun.* **1998**, 1393–1394; l) R. G. Freeman, K. C. Grabar, K. J. Allison, R. M. Bright, J. A. Davis, A. P. Guthrie, M. B. Hommer, M. A. Jackson, P. C. Smith, D. G. Walter, M. J. Natan, *Science* **1995**, *267*, 1629–1632; m) K. C. Grabar, P. C. Smith, M. D. Musick, J. A. Davis, D. G. Walter, M. A. Jackson, A. P. Guthrie, M. J. Natan, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1148–1153; n) K. C. Grabar, R. G. Freeman, M. B. Hommer, M. J. Natan, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 735–743; o) M. D. Musick, C. D. Keating, M. H. Keefe, M. J. Natan, *Chem. Mater.* **1997**, *9*, 1499–1501; p) S. J. Green, J. J. Stokes, M. J. Hostetler, J. Pietron, R. W. Murray, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 2663–2668.
- [247] a) C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, *382*, 607–609; b) A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Willson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, Jr., P. G. Schultz, *Nature* **1996**, *382*, 609–611; c) R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin, *Science* **1997**, *277*, 1078–1081; d) J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1959–1964.
- [248] A. P. Alivisatos, *Science* **1996**, *271*, 933–937.
- [249] E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Nature* **1998**, *391*, 775–778.
- [250] a) J. J. Calvente, Z. Kováčová, M. D. Saez, R. Andreu, W. R. Fawcett, *Langmuir* **1996**, *12*, 5696–5803; b) M. M. Walczak, D. D. Popenoe, R. S. Deihammer, B. D. Lamp, C. Chung, M. D. Porter, *Langmuir* **1991**, *7*, 2687–2693; c) D.-F. Yang, M. Morin, *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *441*, 173–181; d) C.-J. Zhong, J. Zak, M. D. Porter, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *421*, 9–13.
- [251] a) S. Kossek, C. Padeste, L. X. Tiefenauer, H. Siegenthaler, *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, 31–43; b) E. P. Friis, J. E. G. Andersen, L. L. Madsen, P. Møller, J. Ulstrup, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *431*, 35–38; c) M. Quinto, A. Ciancio, P. G. Zmabonin, *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *448*, 51–59.
- [252] W. R. Bowen, N. Hilal, R. W. Lovitt, C. J. Wright, *J. Colloid Interf. Sci.* **1998**, *197*, 348–352.
- [253] a) P. Avouris, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 95–102; b) M. Jaschke, H.-J. Butt, *Langmuir* **1995**, *11*, 1061–1064; c) J. Wang, J. R. Kenseth, V. W. Jones, J.-B. D. Green, M. T. McDermott, M. D. Porter, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12796–12799.
- [254] P. K. Wei, J. H. Hsu, B. R. Hsieh, W. S. Fann, *Adv. Mater.* **1996**, *8*, 573–576.