

Visualisierung des O₂-Verbrauchs einzelner lebender Zellen mithilfe elektrochemischer Rastermikroskopie: der Einfluss der faradayschen Sondenreaktion**

Michaela Nebel, Stefanie Grützke, Nizam Diab, Albert Schulte und Wolfgang Schuhmann*

Die Atmungsaktivität einer einzelnen lebenden Zelle ist ein Indikator für ihre metabolische Aktivität. Mikroelektroden, die in geringem Abstand zu einer Zelle positioniert werden, ermöglichen die Beobachtung der Atmungsaktivität von Zellen durch Bestimmung der lokalen Sauerstoffkonzentration.^[1]

Obwohl erste Versuche zur Visualisierung des Sauerstoffverbrauchs von einzelnen lebenden Zellen mithilfe elektrochemischer Rastermikroskopie (SECM) bereits 1998 beschrieben wurden,^[2] ist die Detektion der Atmungsaktivität noch immer eine anspruchsvolle Aufgabe, deren Komplexität häufig unterschätzt wird. Die Abmessungen der Zelle führen zu Einschränkungen konventionell ausgeführter SECM-Untersuchungen im Constant-Height-Modus, bei dem die Mikroelektrode in konstanter *z*-Position rasterförmig über die Probe gefahren wird. Probleme bereiten dabei die Überlagerung des Sauerstoffreduktionsstroms durch topographische Effekte sowie die Tatsache, dass SECM-Experimente im Constant-Height-Modus Arbeitsabstände erfordern, die ähnlich zur oder geringer als die Höhe der Zellkörper sind, wodurch das Risiko eines Kontaktes zwischen Sonde und Probe erhöht ist. Ansätze, diese Einschränkungen zu überwinden, sind z. B. die Positionierung der Sonde außerhalb des Abstandes der Feedback-Wechselwirkung,^[2] das Einbetten von Zellen in Kavitäten^[3-5] oder die Subtraktion des Topographiebeitrags nach dem Abtöten der Zellen.^[6] Darüber hinaus ist die Zellstruktur unregelmäßig und führt daher zu Variationen des Sonden-Probe-Abstands während der Son-

denbewegung. Demzufolge sind SECM-Modi, die eine Positionierung der Sonde in konstantem Abstand ermöglichen (Constant-Distance-Modus, cd-Modus), grundsätzlich vorteilhaft. Besonders die Kombination der SECM mit anderen Rastersondenverfahren, wie der Rasterkraftmikroskopie (AFM)^[7] und der Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie (SICM),^[8] sowie scherkraft-^[9] und impedanzbasierte Techniken^[10] sind effiziente Strategien für die Kontrolle des Sonden-Proben-Abstands. Kürzlich wurde von uns ein scherkraftbasierter cd-Modus beschrieben (4D-SF/CD-SECM), der die Datenerfassung in unterschiedlichen, aber konstanten Sonden-Proben-Abständen ermöglicht. Diese Methode ermöglicht die Detektion von vollständigen Diffusionsprofilen am Ort der Generierung oder des Verbrauchs einer redoxaktiven Spezies.^[11]

Trotz der Verfügbarkeit solcher Systeme zur Abstandskontrolle bleibt die Detektion der Atmungsaktivität von einzelnen lebenden Zellen mithilfe der SECM anspruchsvoll. Aufgrund des geringen Sauerstoffverbrauchs einer einzelnen Zelle ist es erforderlich, geringe Stromvariationen in Gegenwart eines hohen Hintergrundstroms zu detektieren. Noch wichtiger ist jedoch, dass sich biologische Zellen in einem SECM-Experiment wie eine Flüssig/flüssig-Phasengrenze verhalten.^[12] Es ist bekannt, dass lipophile Redoxmediatoren die Zellmembran überwinden können und sich daher zur Untersuchung der intrazellulären Redoxaktivität eignen.^[13,14] Allerdings können Konzentrationsänderungen in der Nähe der Zellmembran z. B. durch die Sondenreaktion selbst einen lokalen Konzentrationsgradienten induzieren und so zu einem Austausch der Redoxspezies durch Diffusion über die Lipiddoppelschicht führen, wie es ähnlich für den so genannten SECM-Induced-Transfer(SECM-IT)-Modus beschrieben wurde.^[15] Die hohe Löslichkeit von Sauerstoff in Lipiden unterstützt diese transmembranäre Diffusion, und Sauerstoff kann daher die Zellmembran einfach passieren.^[14] Dieser Diffusionsprozess überlagert die Detektion der Zellatmung. Infolgedessen arbeitet die Sonde in der Mehrzahl der durchgeführten Studien, die Variationen in der lokalen Sauerstoffkonzentration zur Bewertung des Zellmetabolismus einsetzen, nicht als passiver Beobachter. Sie greift aktiv in die vorherrschende Sauerstoffkonzentration innerhalb des Spalts zwischen Sonde und Probe ein und führt so zu bisher nicht diskutierten Abbildungsartefakten. Obwohl dieser Effekt in einigen Veröffentlichungen^[14,16,17] beschrieben wird, wird er bei SECM-Untersuchungen der Atmungsaktivität häufig vernachlässigt.

Hier thematisieren wir den Einfluss der Sauerstoffreduktionsgeschwindigkeit an der SECM-Sonde auf die Ab-

[*] Dr. M. Nebel, S. Grützke, Prof. Dr. W. Schuhmann
Lehrstuhl für Analytische Chemie, Elektroanalytik & Sensorik und
Zentrum für Elektrochemie, CES, Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstraße 150, 44780 Bochum (Deutschland)
E-Mail: wolfgang.schuhmann@rub.de

Prof. Dr. N. Diab

Chemistry Department, Faculty of Arts and Sciences,
The Arab American University, P.O. Box 240, Jenin (Palästina)

Prof. Dr. A. Schulte

Biochemistry-Electrochemistry Research Unit, Schools of Chemistry
and Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of
Technology, Nakhon Ratchasima 30000 (Thailand)

[**] Wir danken Dr. Dominik Hollatz, Sven Zielke, und Dr. Christian H. Wetzel (Lehrstuhl für Zellphysiologie, Ruhr-Universität Bochum) für die Bereitstellung der Zellen und Dr. Sonnur Isik-Uppenkamp für ihre Unterstützung zu Beginn dieses Projekts. Diese Arbeit wurde durch die EU und das Land NRW im Rahmen des HighTech.NRW Programms gefördert. M.N. dankt der Research School der Ruhr-Universität Bochum, finanziert durch die Exzellenzinitiative [DFG GSC98/1], für Unterstützung.

bildung der Atmungsaktivität von lebenden Zellen. Wir beschreiben Strategien, um Limitierungen durch eine starke Sondenreaktion zu vermeiden, welche die Anwendung eines Potentialpulsprofils an der Sonde zusammen mit einer zeitabhängigen Datenaufnahme im scherkraftbasierten cd-Modus der SECM enthalten.

Üblicherweise erfolgt die Detektion der lokalen Sauerstoffkonzentration in der Nähe eines Zellkörpers mithilfe einer Variation des Generator-Kollektor-Modus der SECM, in dem die Sonde kontinuierlich auf das Sauerstoffreduktionspotential polarisiert ist. Die Sonde konkurriert mit der atmenden Zelle um den verfügbaren Sauerstoff innerhalb des Spalts zwischen SECM-Sonde und Zelloberfläche. Während des Überquerens des Zellkörpers in einem SECM-Linienscan sollte der Sondenstrom aufgrund der durch die Zellatmung lokal verminderten Sauerstoffkonzentration absinken. Abbildung 1 zeigt ein 4D-SF/CD-SECM-Experiment in dieser Konkurrenzanzordnung an einer HEK293-Zelle. Das Topographiebild wird bei der z -Annäherung im Scherkraftmodus nach automatischem Stopp der Annäherung an jedem Gitterpunkt aufgezeichnet und als Auftragung der gespeicherten

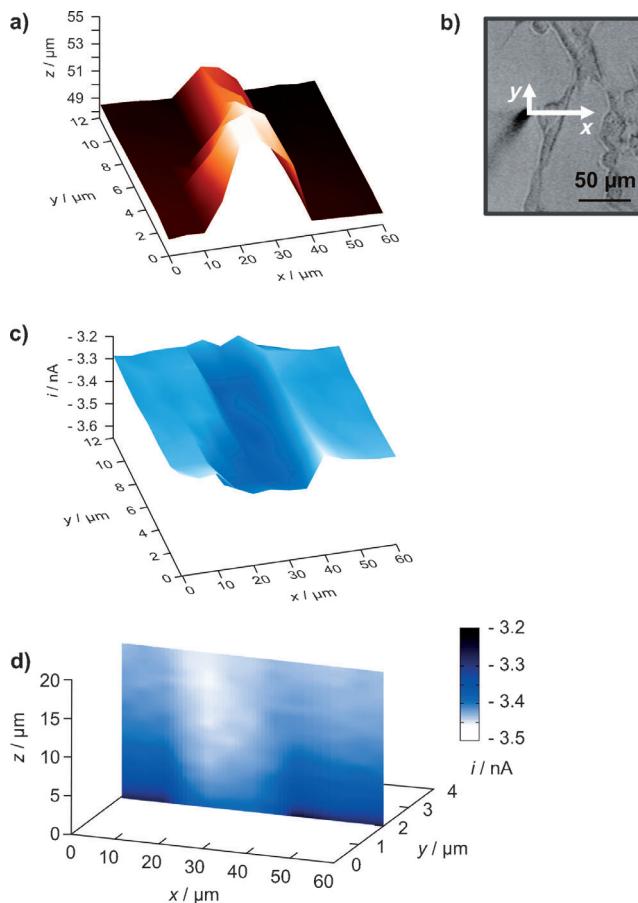


Abbildung 1. Konkurrenzexperiment im 4D-SF/CD-Modus an einer HEK293-Zelle, bei dem die Sonde kontinuierlich auf das Sauerstoffreduktionspotential polarisiert ist. a) Topographiebild, aufgezeichnet nach der scherkraftbasierten Annäherung der Sonde an jedem Gitterpunkt. b) Lichtmikroskopische Aufnahme der untersuchten Zelle sowie der positionierten SECM-Sonde (schwarzer Punkt), aufgezeichnet mit der Kamera des inversen Mikroskops. c) Strombild am Punkt des Scherkraftkontakte ($E_{\text{Sonde}} = -600 \text{ mV}$). d) Visualisierung des Sauerstoffkonzentrationsprofils über dem zentralen Zellkörper (x, z, i -Bild).

z -Position der Sonde dargestellt (Abbildung 1a). Die abgebildete Zelltopographie entspricht der Form und Größe der untersuchten Zelle, wie sie im lichtmikroskopischen Bild des inversen Mikroskops (Abbildung 1b), auf dem das SECM aufgebaut ist, sichtbar ist. Überraschenderweise steigt der Sondenstrom jedoch deutlich an, wenn die Sonde über der Zelle positioniert wird (Abbildung 1c). Da die Sonde an jedem Gitterpunkt in festen Inkrementen von der Oberfläche zurückgezogen wird, kann die Abstandsabhängigkeit des Sondenstroms durch eine x, z, i -Darstellung (elektrochemisches Tomogramm; Abbildung 1d) visualisiert werden.

Der beobachtete Anstieg des Sondenstroms repräsentiert die typische Situation, wenn die Triebkraft der Sondenreaktion hoch genug ist, um auf der äußeren Seite der Zellmembran eine lokale Verarmung von Sauerstoff herbeizuführen. Durch die Kompensation dieses Konzentrationsgradienten wird Sauerstoff aus der Zelle extrahiert. Offensichtlich verhält sich die Sonde unter diesen Umständen nicht wie ein passiver Beobachter, und das Abbildungsergebnis wird überwiegend durch die Sondenreaktion bestimmt, mit nur einem geringen Einfluss der eigentlich zu untersuchenden Zellatmung.

Um auszuschließen, dass der beobachtete Stromanstieg durch Ungenauigkeiten der Abstandskontrolle hervorgerufen wird, wurde der Elektrolytlösung während des 4D-SF/CD-SECM-Experiments $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ zugegeben. Als hydrophiler Mediator überquert $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ nicht die Lipiddoppelschicht und kann daher zur Abbildung der Zelltopographie mithilfe des negativen Feedback-Modus eingesetzt werden.^[13, 14] Die gleichzeitige Detektion der beiden Redoxspezies molekularer Sauerstoff und $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ wurde durch die Implementierung eines flexiblen Potentialpulsprofils in das Detektionsschema des 4D-SF/CD-Modus (4D-SF/CD-RC-SECM) erreicht, vergleichbar zur Implementierung des Redoxkompetitions-Modus (RC-Modus) in den kontinuierlichen scherkraftbasierten cd-Modus.^[18] Der topographische Linienscan (Abbildung 2, schwarze Linie) zeigt eine Höhe des Zellkörpers von ca. 9 μm. Während Sauerstoff aus dem Zellkörper extrahiert und so der Reduktionsstrom an der Sonde erhöht wird, wird keine Änderung des Oxidationsstroms von $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ detektiert (graue Linien in Abbildung 2). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Abstandskontrolle zuverlässig arbeitet.

Grundsätzlich können drei Beiträge zum Sondenstrom angenommen werden (Abbildung 3):

- 1) Die Diffusion von Sauerstoff in den Spalt ($O_{2,D}$) wird durch den Sonden-Proben-Abstand d und die Größe der SECM-Sonde (RG-Wert) limitiert. Je kleiner der Arbeitsabstand ist, desto geringer ist der Beitrag der Sauerstoffdiffusion in den Spalt zum Sondenstrom. Allerdings kann für die durchgeführten cd-Experimente angenommen werden, dass an jedem Gitterpunkt und bei jedem Arbeitsabstand ein vergleichbarer Beitrag vorliegt.
- 2) Die lokale Verarmung an Sauerstoff, hervorgerufen durch eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit an der Sonde, führt zu einer Permeation von ($O_{2,P}$) durch die Zellmembran. Dieser Beitrag hängt ausschließlich vom Konzentrationsgradienten zwischen intrazellulären Medium und der Elektrolytlösung in der Nähe der Zellmembran ab und ist

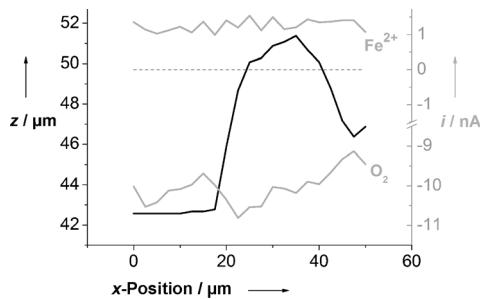


Abbildung 2. Topographischer (schwarz) und elektrochemischer Linienscan (grau) über einer HEK293-Zelle, aufgenommen im Constant-Distance-Modus unter Verwendung eines Potentialpulsprofils mit $E_{\text{Sonde,Basis}} = 500 \text{ mV}$, $E_{\text{Sonde,Puls1}} = 500 \text{ mV}$, $E_{\text{Sonde,Puls2}} = -800 \text{ mV}$ (Werte dargestellt bei $t = 0.5 \text{ s}$ nach Anlegen des Potentials) in einer Lösung mit $1 \text{ mM} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Der Sauerstoffreduktionsstrom steigt über dem Zellkörper an, während der Oxidationsstrom von $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ unverändert bleibt.

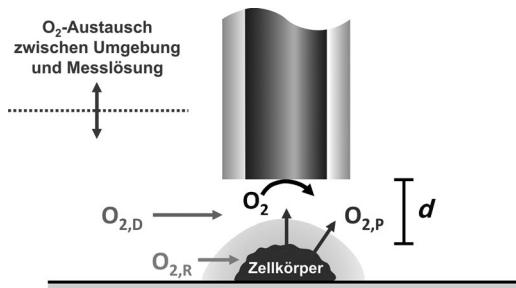


Abbildung 3. Mögliche Sauerstoffquellen, die zum Sondenstrom beitragen können. $O_{2,D}$: O_2 -Diffusion aus der freien Lösung in den Spalt, $O_{2,R}$: O_2 -Verbrauch durch Zellatmung, $O_{2,P}$: O_2 -Permeation durch die Zellmembran.

daher unabhängig von der metabolischen Aktivität der untersuchten Zelle. Die Permeation von Sauerstoff sollte solange beobachtet werden, wie der Konzentrationsgradient besteht und Sauerstoff innerhalb der Lipiddoppelenschicht und dem intrazellulären Medium vorhanden ist.

- 3) Der Anteil des Sauerstoffs, der durch die Atmung der lebenden Zelle verbraucht wird ($O_{2,R}$), ist das Ziel der Untersuchung und ist vermutlich der kleinste Beitrag zum gesamten Sondenstrom.

Der zeitliche Verbrauch an Sauerstoff (Atmungsrate) f einer einzelnen Zelle unterschiedlicher Zelllinien wurde mithilfe globaler Methoden zu 10^{-18} – $10^{-16} \text{ mol s}^{-1}$ bestimmt.^[19] Atmungsgraten, die aus SECM-Untersuchungen abgeleitet wurden, ergaben hingegen Werte von 10^{-16} – $10^{-14} \text{ mol s}^{-1}$.^[3,5,17,20] Der zeitliche Sauerstoffverbrauch einer SECM-Sonde kann über ihren diffusionslimitierten Strom durch $i_{\text{Sonde}} = 4nFDc r$ unter Verwendung des Diffusionskoeffizienten D von Sauerstoff ($2.29 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$)^[21] sowie der Konzentration c von Sauerstoff (0.25 mM)^[22] in Wasser berechnet werden. Unter Annahme der Übertragung von vier Elektronen für die Reduktion von Sauerstoff ergibt sich ein diffusionskontrollierter Strom i_{Sonde} von 4.4 nA für eine Elektrode mit einem Radius von 5 μm . Mit $f_{\text{Sonde}} = i_{\text{Sonde}}/nF$ ^[17] beträgt der zeitliche Sauerstoffverbrauch der Sondenreaktion $1.1 \times 10^{-14} \text{ mol s}^{-1}$. Der Sauerstoffverbrauch einer polarisier-

ten SECM-Sonde ist daher um mehrere Größenordnungen höher als der Konsum von Sauerstoff durch eine einzelne lebende Zelle.

Grundsätzlich können drei Strategien zur Verminderung des Ausmaßes der Sondenreaktion eingesetzt werden: 1) ein geringeres Reduktionspotential an der Sonde, 2) kleine Elektrodengrößen oder 3) kurze Potentialpulse oder cyclische Voltammogramme mit schnellen Potentialvorschubgeschwindigkeiten,^[23,24] um die Ausdehnung des Diffusionsfeldes zu verringern. Die Anwendung eines Potentialpulsprofils in Kombination mit einer zeitabhängigen Datenaufnahme ist in Abbildung 4 gezeigt.

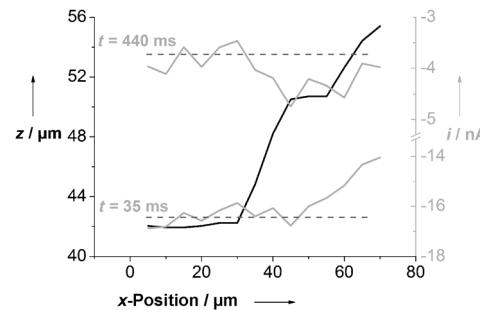


Abbildung 4. SECM-Linienscan über eine HEK293-Zelle. Topographischer (schwarz) und elektrochemischer Linienscan zu unterschiedlichen Zeiten nach Anlegen des Sauerstoffkompetitionsulses an die Sonde (grau). Pulsprofil: $E_{\text{Sonde,Basis}} = 500 \text{ mV}$, $E_{\text{Sonde,Puls1}} = 500 \text{ mV}$, $t_{\text{puls1}} = 1 \text{ s}$, $E_{\text{Sonde,Puls2}} = -350 \text{ mV}$, $t_{\text{puls2}} = 0.5 \text{ s}$. Zu Beginn der Stromdetektion ($t = 35 \text{ ms}$) ist es möglich, die Atmungskaktivität der Zelle zu detektieren, während bei längeren Pulsdauern ($t = 440 \text{ ms}$) der transmembranäre Sauerstofftransport beobachtet wird.

Die schwarze Linie repräsentiert die Topographie ausgehend von einer Sondenposition über dem Boden der Petrischale in Richtung der untersuchten Zelle. Der Sondenstrom ist zu zwei Zeitpunkten nach Anlegen des Sauerstoffreduktionspotentials, bei dem Sonde und Zelle um den Sauerstoff innerhalb des Spalts konkurrieren, dargestellt (graue Linien in Abbildung 4). Kurz nach Anlegen des Sauerstoffreduktionspotentials wird eine Stromabnahme beobachtet, die einer durch die Zellatmung verringerten Sauerstoffkonzentration entspricht. Zu späteren Pulszeiten wird hingegen ein Anstieg des Sauerstoffreduktionsstroms detektiert, der das Auftreten der transmembranären Diffusion von Sauerstoff belegt. Durch den Einsatz des vorgeschlagenen Potentialpulsmodus kann die Rolle der Sonde bei SECM-Abbildungen der Zellatmung analysiert und der Zeitpunkt der Datenaufnahme mit dem besten Kontrast ausgewählt werden (Abbildung 5).

Die Implementierung eines flexiblen Potentialpulsprofils mit einer zeitabhängigen Datenaufnahme in den 4D-SF/CD-Modus ermöglichte die Charakterisierung des Einflusses der Sondenreaktion auf die Sauerstoffkonzentration innerhalb des Spalts zwischen der SECM-Sonde und einer lebenden Zelle. Mithilfe der 4D-SF/CD-RC-SECM war die Untersuchung der Zellatmung auch ohne die Kenntnis z. B. des exakten Zeitpunkts der Datenaufnahme oder des idealen Arbeitsabstands möglich, und das optimale Bild kann nach dem jeweiligen Experiment ausgewählt werden.

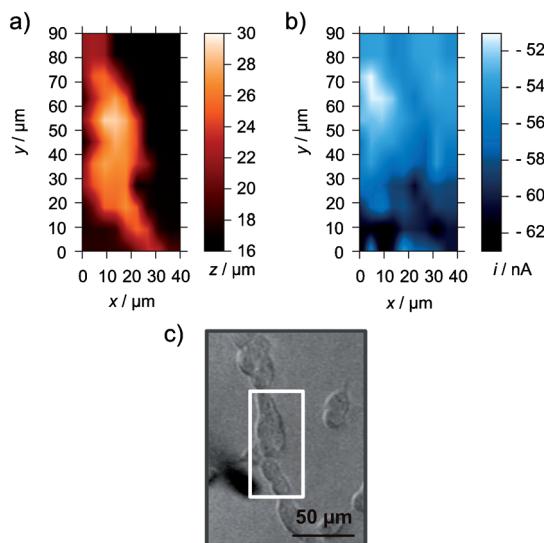


Abbildung 5. Visualisierung der Atmungsaktivität von HEK293-Zellen mithilfe von 4D-SF/CD-RC-SECM. a) Topographiebild; b) Strombild am Punkt des Scherkraftkontakte (Pulsprofil: $E_{\text{Sonde,Basis}} = 500 \text{ mV}$, $E_{\text{Sonde,Puls1}} = 500 \text{ mV}$, $t_{\text{Puls1}} = 0.2 \text{ s}$, $E_{\text{Sonde,Puls2}} = -350 \text{ mV}$, $t_{\text{Puls2}} = 0.5 \text{ s}$; Zeitpunkt der dargestellten Stromwerte: $t = 15 \text{ ms}$); c) lichtmikroskopische Aufnahme der untersuchten Zellen.

Experimentelles

Humane embryonische Nierenzellen (HEK293) wurden in einem modifizierten Dulbecco's Eagle Medium, das fötales Kälberserum (10%), nicht-essentielle Aminosäuren (1%) und eine Mischung aus Penicillin und Streptomycin (1%) enthält, nach Standardvorschriften kultiviert. Die Zellen wurden auf Plastik-Petrishalen ($\varnothing 35 \text{ mm}$) bei 37°C in einer Atmosphäre, die 5% CO_2 enthält, ausgesät. Vor einem SECM-Experiment wurde das Medium entfernt und durch eine angewärmte extrazelluläre Lösung ersetzt (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 und 10 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES), pH 7.3).

Polymer-isolierte Carbonfaserelektroden ($\varnothing 7\text{--}9 \mu\text{m}$) wurden als schwingungsfähige Scheibenelektroden für alle SECM-Experimente verwendet. Sie wurden entsprechend früher publizierter Vorschriften hergestellt.^[25,26] Ein kathodischer Elektrodepositionsslack (EDP, ClearClad HSR401 von LVH coatings) wurde für die Isolierung der Spitze verwendet, wobei die Abscheidung des löslichen Polymers durch 1-minütiges Anlegen eines Potentials von 6 V zwischen der Carbonfaserkathode und einer ringförmigen Pt-Gegenelektrode erreicht wurde. Nachfolgend wurde das Polymer in einem Ofen 20 min bei 180°C hitzebehandelt. Die Deposition des EDP wurde für eine Dauer von 30 s, gefolgt von einer zweiten Hitzebehandlung, wiederholt. Die aktive Scheibenoberfläche der Carbonfaserelektrode wurde mit einer dünnen Schicht Platin modifiziert, das aus einer Lösung von 2 mM $\text{H}_2[\text{PtCl}_6]$ (Merck) mithilfe cyclischer Voltammetrie (300 mV bis -500 mV , Spannungsvorschubgeschwindigkeit: 100 mV s^{-1} , 3 Zyklen) abgeschieden wurde.

Alle SECM-Experimente wurden mit einem speziell konzipierten SECM für die Untersuchung von Zellen (Bio-SECM) durchgeführt.^[26] Die optische Scherkraftdetektion sowie die kürzlich beschriebene 4D-SF/CD-SECM^[11] wurden genutzt. Eine Änderung des Scherkraftsignals von 5–10% des Signals der Mikroelektrode im Volumen des Elektrolyten wurde als Stoppkriterium für die z -Annäherung definiert. Eine Ag/AgCl(3 M KCl)-Elektrode wurde als Referenzelektrode für alle Messungen verwendet.

Eingegangen am 6. Februar 2013
Online veröffentlicht am 29. April 2013

Stichwörter: Elektrochemie · Rastersondenverfahren · Sauerstoff · Zellatmung · Zellen

- [1] a) R. N. Adams, *Anal. Chem.* **1976**, *48*, 1128A; b) R. M. Wightman, D. O. Wipf, *Electroanal. Chem.* **1989**, *15*, 267–353; c) S. C. Land, D. M. Porterfield, R. H. Sanger, P. J. S. Smith, *J. Exp. Biol.* **1999**, *202*, 211–218.
- [2] T. Yasukawa, Y. Kondo, I. Uchida, T. Matsue, *Chem. Lett.* **1998**, 767–768.
- [3] H. Shiku, T. Shiraishi, H. Ohya, T. Matsue, H. Abe, H. Hoshi, M. Kobayashi, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3751–3758.
- [4] a) H. Shiku, T. Shiraishi, S. Aoyagi, Y. Utsumi, M. Matsudaira, H. Abe, H. Hoshi, S. Kasai, H. Ohya, T. Matsue, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *522*, 51–58; b) Y. S. Torisawa, T. Kaya, Y. Takii, D. Oyamatsu, M. Nishizawa, T. Matsue, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2154–2158.
- [5] Y. Torisawa, H. Shiku, T. Yasukawa, M. Nishizawa, T. Matsue, *Sens. Actuators B* **2005**, *108*, 654–659.
- [6] L. L. Zhu, N. Gao, X. L. Zhang, W. R. Jin, *Talanta* **2008**, *77*, 804–808.
- [7] J. V. Macpherson, P. R. Unwin, A. C. Hillier, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6445–6452.
- [8] D. J. Comstock, J. W. Elam, M. J. Pellin, M. C. Hersam, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1270–1276.
- [9] a) M. Ludwig, C. Kranz, W. Schuhmann, H. E. Gaub, *Rev. Sci. Instrum.* **1995**, *66*, 2857–2860; b) B. Ballesteros Katemann, A. Schulte, W. Schuhmann, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2025–2033; c) P. I. James, L. F. Garfias-Mesias, P. J. Moyer, W. H. Smyrl, *J. Electrochem. Soc.* **1998**, *145*, L64–L66.
- [10] M. A. Alpuche-Aviles, D. O. Wipf, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4873–4881.
- [11] M. Nebel, K. Eckhard, T. Erichsen, A. Schulte, W. Schuhmann, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 7842–7848.
- [12] S. Amemiya, J. D. Guo, H. Xiong, D. A. Gross, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 458–471.
- [13] B. Liu, S. Rotenberg, M. V. Mirkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9855–9860.
- [14] B. Liu, W. Cheng, S. A. Rotenberg, M. V. Mirkin, *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *500*, 590–597.
- [15] A. L. Barker, J. V. Macpherson, C. J. Slevin, P. R. Unwin, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 1586–1598.
- [16] a) Y. Takahashi, A. I. Shevchuk, P. Novak, Y. Murakami, H. Shiku, Y. E. Korchev, T. Matsue, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10118–10126; b) K. Nagamine, Y. Takahashi, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, *Electroanalysis* **2011**, *23*, 1168–1174.
- [17] Y. Takahashi, Y. Hirano, T. Yasukawa, H. Shiku, H. Yamada, T. Matsue, *Langmuir* **2006**, *22*, 10299–10306.
- [18] A. Schulte, M. Nebel, W. Schuhmann, *Methods Enzymol.* **2012**, *504*, 237–254.
- [19] P.-A. Ruffieux, U. von Stockar, I. W. Marison, *J. Biotechnol.* **1998**, *63*, 85–95.
- [20] M. Nishizawa, K. Takoh, T. Matsue, *Langmuir* **2002**, *18*, 3645–3649.
- [21] D. Pletcher, S. Sotiropoulos, *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *356*, 109–119.
- [22] E. S. Smotkin, F. T. Moy, W. Z. Plachy, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1991**, *1061*, 33–38.
- [23] D. S. Schrock, J. E. Baur, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7053–7061.
- [24] K. L. Adams, M. Puchades, A. G. Ewing, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1*, 329–355.
- [25] A. Schulte, R. H. Chow, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3054–3058.
- [26] L. P. Bauermann, W. Schuhmann, A. Schulte, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 4003–4008.