

Nanobiomolekulare Multiproteinarchitekturen zur Etablierung von schaltbaren Signalketten auf Elektroden**

Sven C. Feifel,* Andreas Kapp, Roland Ludwig und Fred Lisdat*

Abstract: Aus drei Proteinkomponenten wird eine supramolekulare Proteinarchitektur auf Elektroden aufgebaut. Damit kann eine bidirektionale Elektronentransferkaskade infolge intermolekularen Elektronentransfers etabliert werden. Der supramolekulare Aufbau im Multischichtformat wird durch das Einbetten zweier unterschiedlicher Enzyme (Cellobiosedehydrogenase und Laccase), sowie eines Redoxproteins (Cytochrome c) mittels carboxymodifizierten Siliciumdioxidnanopartikeln realisiert. Das Multiproteinsystem ermöglicht die duale Detektion zweier unterschiedlicher Analyte: Laktose und Sauerstoff. Die Kontrolle der Enzymaktivität – das heißt, das selektive Anschalten der Bioelektrokatalyse – wird durch das angelegte Potential erreicht, da hierdurch der Redoxzustand von Cytochrome c vorgegeben wird. Die beiden bidirektionalen Signalketten arbeiten in einer unseparierten Matrix, ohne dass die Anwesenheit des anderen Biokatalysators störend wirkt.

Biochemische Stoffwechselwege und Signalketten sind durch ihre wirksame Kopplung einzelner Reaktionsschritte gekennzeichnet, die zu einer hoch spezifischen Signaltransduktion führt. Darauf hinaus sind diese komplexen Systeme, in Abhängigkeit von äußeren oder inneren Reizen, z. B. der Anwesenheit einer bestimmten Substanz, in der Lage, zwischen verschiedenen Reaktionsketten umzuschalten. Bezogen auf Redoxreaktionen stellen die Photosynthese und die Atmungskette wichtige Beispiele für Systeme dar, die auf präzisen sequenziellen Reaktionsschritten beruhen.^[1–4] Derartige Stoffwechselwege basieren hauptsächlich auf der Erzeugung von Molekülen für eine nachfolgende Umsetzung, dem Einsatz kleiner „Shuttle“-Moleküle, die mit definierten Komponenten der Signalkette wechselwirken, oder der direkten Reaktion von Proteinkomplexen untereinander. Für die Herstellung künstlicher Signalwege kamen diese effizienten biologischen Prinzipien bereits zur Anwendung.^[5–7] So ist es möglich, Proteinfunktionen mit elektrochemischen Detektionsverfahren zu koppeln, dass Signale in Gegenwart

von einzelnen Substanzen oder bestimmten Molekülklassen erzeugt werden.^[8–10] Diese Konzepte haben nicht nur Bedeutung in der Biosensorforschung,^[11,12] der Entwicklung von Biobrennstoffzellen^[13,14] oder Nachweissystemen auf der Grundlage von „Logic gates“,^[15,16] sondern auch für den Aufbau biohybrider Systeme, welche biologische Funktionen imitieren.

Basierend auf den Entwicklungen der letzten Jahrzehnte in der Proteinelektrochemie wurden erhebliche Fortschritte im Aufbau bioelektronischer Einheiten erzielt. Hierbei ist man nicht nur auf Monoschichtanordnungen von Proteinen auf Elektroden beschränkt.^[17,18] Es wurde auch ein breites Spektrum an unterschiedlichsten Multischichtansätzen unter Einsatz von Polyelektrolyten,^[19,20] biospezifischen Wechselwirkungen,^[21,22] kovalenten Kopplungen,^[23,24] Redoxpolymeren,^[25,26] Nanopartikeln^[27,28] oder „molekularen Drähten“^[29,30] entwickelt. Diese Systeme machen sich sowohl die Vorteile von sequenziellen Reaktionen als auch von mehreren Elektronentransferschritten zu Nutze. Eine spezielle Gruppe nutzt für die Umsetzung von sequenziellen Reaktionen direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen im immobilisierten Zustand auf Elektrodenoberflächen. Diese Entwicklungen beziehen sich hauptsächlich auf Cytochrome c-Multischichtsysteme. Sie gewährleisten einen effizienten Elektronentransfer innerhalb des Schichtsystems,^[31,32] aber auch eine effektive Kopplung mit zahlreichen Biokatalysatoren.^[33–36]

Hier stellen wir ein neues System vor, das eine Schaltung/ einen Aktivitätswechsel zwischen zwei coimmobilisierten Enzymen innerhalb eines schichtweise aufgebauten supramolekularen Netzwerks ermöglicht. Die Kontrolle der Aktivität der Enzyme innerhalb des Systems wird durch das angelegte Potential erzielt.

Diese Form der Signalkette kann durch das Einbetten zweier unterschiedlicher Biokatalysatoren, dem Multikupfer-Enzym Laccase (Lac)^[37] und dem Multidomänen-Enzym Cellobiosedehydrogenase (CDH),^[38] und dem Redoxprotein Cytochrome c (Cyt c) in eine künstliche Matrix bestehend aus carboxymodifizierten Siliciumdioxidnanopartikeln aufgebaut werden (Abbildung 1).

Mit dieser supramolekularen Architektur ist es gelungen, eine bidirektionale Elektronentransferkaskade für den dualen Substratnachweis zu etablieren. Um die Laccase in einen aktiven Zustand zu überführen, ist es notwendig, Elektronen für die Sauerstoffreduktion bereitzustellen. Für eine Aktivierung der CDH wiederum müssen die während der Zuckeroxidation freigesetzten Elektronen gesammelt werden. Cytochrome c übernimmt in diesem System die zentrale Aufgabe eines Elektronendonors/Elektronenakzeptors. Durch Justierung des Redoxzustands von Cyt c ist es im gesamten

[*] Dr. S. C. Feifel, A. Kapp, Prof. Dr. F. Lisdat

Technische Hochschule Wildau (FH), AG Biosystemtechnik
Hochschulring 1, 15745 Wildau (Deutschland)
E-Mail: feifel@th-wildau.de
flisdat@th-wildau.de

Dr. R. Ludwig
Arbeitsgruppe Lebensmittelbiotechnologie
Universität für Bodenkultur Wien
Muthgasse 18, 1190 Wien (Österreich)

[**] Diese Arbeit wurde von der DFG (LI706I7-1) gefördert.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201310437> zu finden.

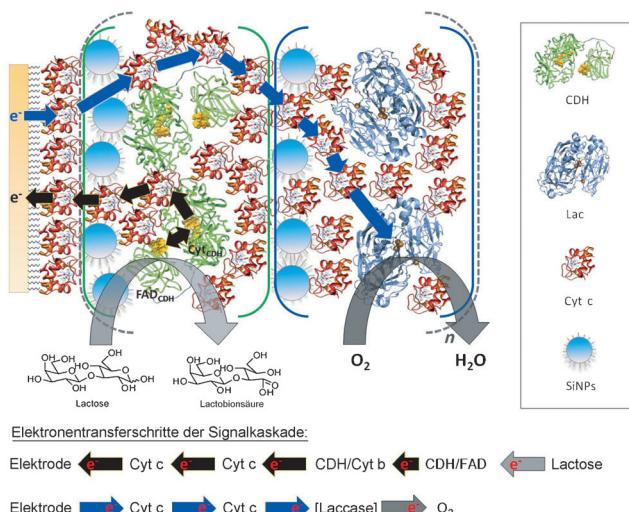


Abbildung 1. Skizze einer $[\text{SiO}_2\text{-NP/CDH-Cyt c/SiO}_2\text{-NP/Lac-Cyt c}]_n$ -Multiproteinarchitektur auf einer Cyt c-Monoschichtelektrode. Die Cyt c-Monoschicht wird auf einer gemischten Thiolschicht (MU/MUA) aufgebaut. Schichtstruktur ($n = 1\text{--}4$ Tetradschichten).

supramolekularen Netzwerk möglich, die Aktivität der beiden Biokatalysatoren einfach an- und auszuschalten. Die beiden Enzyme (CDH und Lac) wurden ausgewählt, da ihre Wechselwirkung mit Cyt c in Lösung bereits nachgewiesen wurde.^[39–41]

Die nanobiomolekulare Architektur ist als schaltbares System für den dualen Nachweis zweier unterschiedlicher Analyte, Laktose und Sauerstoff konzipiert. In diesem Fall fixieren wir die CDH-Cyt c- und Lac-Cyt c-Interprotein elektronentransferreaktionen auf einer Oberfläche und koppeln sie sowohl mit Cyt c-Cyt c-Selbsttauschausreaktionen als auch mit dem direkten Elektronentransfer der Cyt c-Moleküle mit der Elektrode. Um eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Proteinen und den nichtleitenden Siliciumdioxidnanopartikel für den schichtweisen Aufbau zu gewährleisten, wurden letztere mit Carboxyfunktionen versehen.

Die Triproteinarchitekturen bestehend aus Lac, CDH, Cyt c und $\text{SiO}_2\text{-NPs}$ wurden auf einer Cyt c-Monoschichtelektrode mithilfe alternierender Inkubationsschritte in den entsprechenden Lösungen, aus $\text{SiO}_2\text{-NPs}$, sowie Mischungen von Cyt c/CDH und Cyt c/Lac aufgebaut. Die dem System zugrundeliegende Monoschichtelektrode besteht aus einer Goldelektrode, die mit einer gemischten Thiolschicht (Mercaptoundecansäure (MUA) und Mercaptoethanol (MU)) modifiziert wurde und an die Cyt c adsorbiert ist. Die modulare Triproteinarchitektur ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Um eine definierte Anordnung der Proteine zu erreichen, machen wir uns die unterschiedlichen Ladungen der Proteine zu Nutze. Da die CDH und die Lac bei pH 7 eine negative Nettoladung aufweisen und Cyt c eine positive, ist es möglich diese für die Bildung von Präkomplexen bestehend aus Cyt c und CDH bzw. Cyt c und Lac in einer definierten Mischung zu nutzen. Für eine ausreichend starke Wechselwirkung mit den negativ geladenen $\text{SiO}_2\text{-NPs}$ ist jedoch ein Überschuss an Cyt c erforderlich. Die Multischichtformierung mit Cyt c, Lac,

CDH und $\text{SiO}_2\text{-NPs}$ kann mittels Quarzkristallmikrowaage (QCM)-Experimenten auf einer Goldoberfläche bestätigt werden. Anhand der QCM-Experimente kann eine definierte Bindung der Komponenten an die Oberfläche und der Komponenten untereinander gezeigt werden (siehe die Hintergrundinformationen). Per Definition wird das Schichtsystem, das in vier Immobilisierungsschritten erhalten wird ($\text{SiO}_2\text{-NP, CDH/Cyt c, SiO}_2\text{-NP, Lac/Cyt c}$), als Tetradschicht bezeichnet.

Die elektrochemischen Eigenschaften der Triprotein- elektroden $[\text{Cyt c/SiO}_2\text{-NPs/Cyt c-CDH/SiO}_2\text{-NPs/Cyt c-Lac}]_{1\text{--}4}$ sind in cyclovoltammetrischen Messungen (CV) untersucht worden. Für eine erste Einschätzung der Funktionalität ist das elektrochemische Verhalten der Cyt c-Moleküle innerhalb der Proteinarchitekturen bei höheren Scanraten charakterisiert worden. Hierbei zeigt sich, dass die Cyt c-Moleküle innerhalb der nanobiomolekularen Schichtarchitektur elektroaktiv vorliegen (Abbildung 2). Die Menge an adres-

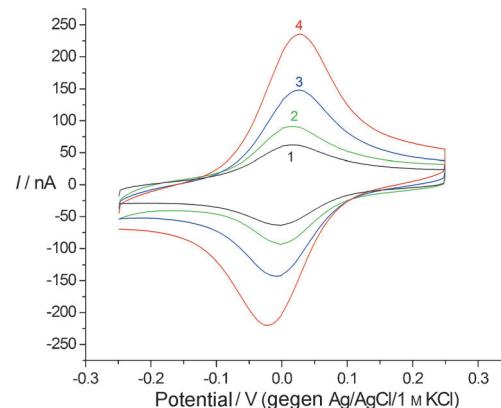


Abbildung 2. Cyclovoltammogramme von Au-MUA/MU-Cyt c-[$\text{SiO}_2\text{-NPs/Cyt c-CDH/SiO}_2\text{-NPs/Cyt c-Lac}]_{1\text{--}4}$ -Tetradschichtelektroden. (Jede Tetradschicht beinhaltet zwei Cyt c-Schichten.) Gemessen wurde bei höheren Scanraten (100 mVs^{-1}) in laktosefreiem Puffer. Gezeigt ist die Zunahme an adressierbarem Cyt c mit zunehmender Zahl an Schichten (pH 7, 5 mM Kaliumphosphatpuffer).

sierbarem Cyt c korreliert direkt mit der Zahl an Aufbauschritten (vier Tetradschichten entsprechen $\Gamma = 79\text{ pmol cm}^{-2}$). Die deutliche Zunahme an elektroaktivem Cyt c beweist den effektiven Cyt c-Cyt c-Elektronenaustausch innerhalb des Systems trotz des Vorliegens zweier unterschiedlicher Biokatalysatoren.

Die Kommunikation der Cyt c-Moleküle in den einzelnen Proteinstapeln bildet jedoch nur eine Grundvoraussetzung für ein funktionsfähiges System bestehend aus drei unterschiedlichen Proteinen, deren Anordnung dazu bestimmt ist, Elektronen untereinander auszutauschen. Um die katalytischen Eigenschaften der CDH innerhalb des modularen Aufbaus zu untersuchen, wurden CV-Messungen bei kleinen Scanraten (3 mVs^{-1}) in einer laktosehaltigen Lösung durchgeführt. Hierbei kann ein deutlicher Oxidationsstrom beginnend ab einem Potential von $-0,05\text{ V}$ gegen Ag/AgCl (Abbildung 3) beobachtet werden.

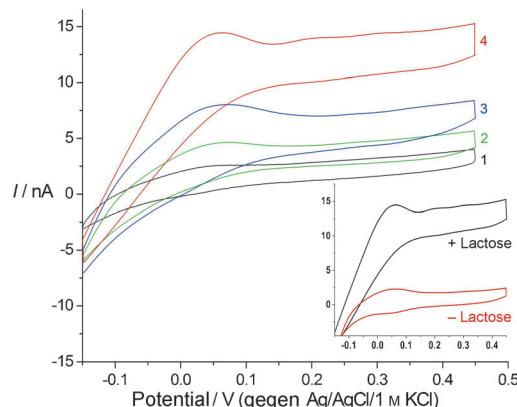


Abbildung 3. Cyclovoltammogramme von Au-MUA/MU-Cyt c-[SiO₂-NPs/Cyt c-CDH/SiO₂-NPs/Cyt c-Lac]_n-Tetraschichtelektroden ($n=1-4$) in Gegenwart von 5 mM Laktose (Scanrate 3 mVs⁻¹, pH 4.5, 20 mM Phosphat-Citrat-Puffer). Einschub: Cyclovoltammogramme einer $n=4$ -Tetraschichtelektrode mit und ohne Laktose.

Dieser katalytische Oxidationsstrom resultiert aus der Laktoseumsetzung durch die CDH-Moleküle. Da die Katalyse nur im Potentialbereich der Cyt c-Umwandlung auftritt, kann die Reaktionskaskade wie folgt beschrieben werden: Zuerst erfolgt die katalytische Oxidation der Laktose an der FAD-Domäne der CDH, die hierdurch aufgenommenen Elektronen werden wiederum an die Hämgruppe der Cyt b-Domäne der CDH über intramolekularen Elektronentransfer weitergegeben und von dort mittels intermolekularer Elektronentransferschritte über Cyt b-Cyt c und Cyt c-Cyt c zur Elektrode transportiert (Abbildung 1). Zusätzlich zeigen Kontrollexperimente, dass im Fall, wenn ausschließlich Cyt c immobilisiert wird, kein katalytischer Strom durch die Zugabe von Laktose beobachtet werden kann.

Weiterführend sollte die Effizienz der Signalkette beurteilt werden. Dafür wurde die katalytische Reaktion in Abhängigkeit der Zahl an immobilisierten Schichten untersucht. Zu diesem Zweck wurden Elektroden mit einer unterschiedlichen Zahl an [Cyt c/SiO₂-NPs/Cyt c-CDH/SiO₂-NPs/Cyt c-Lac]_n-Tetraschichten aufgebaut und mittels CV bei pH 4.5 untersucht. Anhand der CV-Daten kann gezeigt werden, dass sich mit zunehmender Zahl an Tetraschichten auch der katalytische Strom nahezu linear erhöht (Tabelle 1).

Tabelle 1: Katalytische Ströme und Cyt c-Konzentrationen der Triproteinarchitekturen in 1–4 Tetraschichten.

Duale Enzym-elektrode	Zahl an Tetraschichten	Cyt c-Konz. ^[a] [pmol cm ⁻²]	kat. Strom [nA] ^[b] Lac ^[c]	CDH ^[d]
CDH-Lac	1	21 ± 2	-26 ± 1	4 ± 1
CDH-Lac	2	40 ± 3	-45 ± 2	6 ± 1
CDH-Lac	3	63 ± 3	-70 ± 6	9 ± 2
CDH-Lac	4	79 ± 8	-110 ± 11	15 ± 2

[a] Die Cyt c-Konzentrationen wurden anhand der Peakfläche im CV bei einer Scanrate von 100 mVs⁻¹ berechnet. [b] Die katalytischen Ströme wurden nach Zugabe von 5 mM Laktose (CDH, bei positiver Polarisierung) oder in luftgesättigtem Puffer (Lac, bei negativer Polarisierung) bei einer Scanrate von 3 mVs⁻¹ bestimmt. [c] Bei -200 mV. [d] Bei +450 mV.

Für Tetraschichtelektroden mit $n=4$ ist eine vierfache Steigerung des katalytischen Stroms im direkten Vergleich zu einer Tetraschicht ($n=1$) beobachtet worden. Den Nachweis für einen effizienten Elektronentransfer innerhalb der Architektur liefern hierbei die offensichtliche Zunahme des katalytischen Stroms sowie der Menge an elektroaktivem Cyt c mit zunehmender Zahl an abgeschiedenen Triprotein-schichten. Die erhaltenen Daten implizieren auch, dass die CDH- und Cyt c-Moleküle in den verschiedenen Proteininsta-peln innerhalb der Multischichtanordnung in elektrischem Kontakt mit der Elektrode stehen. Infolge der Laktosediffusion in das Multischichtsystem hinein führt dies zu einer kaskadenartigen Erhöhung der Umsatzaktivität.

Während die Laccase für den Aufbau des nanobiomolekularen Systems coimmobilisiert wurde, kann die Aktivität der Laccase nicht im gleichen Potentialbereich erfasst werden wie für CDH, sodass diese bei negativeren Potentialen untersucht wurde. Infolge des Wechsels zu negativeren Potentialen kann in den CV-Experimenten ein signifikanter Reduktionsstrom aufgrund der Sauerstoffreduktion durch die Lac beobachtet werden (Abbildung 4). Der katalytische

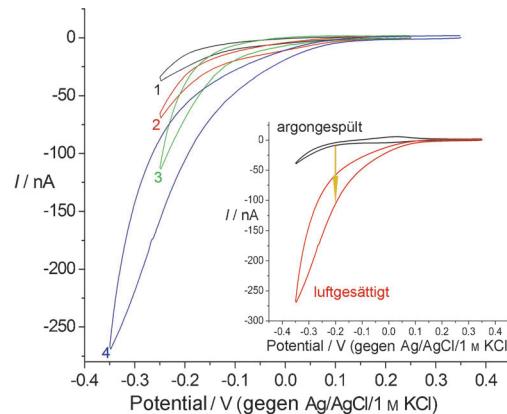


Abbildung 4. Cyclovoltammogramme von Au-MUA/MU-Cyt c-[SiO₂-NPs/Cyt c-CDH/SiO₂-NPs/Cyt c-Lac]_n-Elektroden ($n=1-4$), gemessen in luftgesättigtem Puffer (Scanrate 3 mVs⁻¹, pH 4.5, 20 mM Phosphat-Citrat-Puffer). Einschub: Cyclovoltammogramme einer $n=4$ -Tetraschichtelektrode in luftgesättigtem und argongespültem Puffer.

Strom resultiert aus der Reduktion von Cyt c, welcher durch die nachfolgende Oxidation von Cyt c mittels benachbarter Laccasemoleküle noch verstärkt wird. Die erhaltene Sauerstoffreduktion im Potentialbereich der Cyt c-Umwandlung verifiziert die postulierte Funktionalität der schaltbaren Proteinarchitektur. Somit kann eine zweite Signalkette postuliert werden: Diese geht von der Elektrode aus, an welcher Cyt c reduziert wird und die Elektronen anschließend infolge von Cyt c-Cyt c-Interproteinelektronentransfer auf das T1-Zentrum der Laccase und von dort auf das dreikernige Kupferzentrum übertragen werden, an welchem die Elektronen dann schließlich für die Reduktion von molekularen Sauerstoff zu Wasser genutzt werden (Abbildung 1).

Um den Einfluss der Zahl an immobilisierten Laccaseschichten auf den katalytischen Reduktionsstrom zu beurteilen, wurde der katalytische Strom bei -200 mV gegen Ag/

AgCl in luftgesättigtem Puffer für Elektroden mit unterschiedlicher Schichtzahl bestimmt (Abbildung 4). Aus den Cyclovoltammogrammen kann geschlossen werden, dass der Reduktionsstrom mit der Zahl an Tetrachichten ansteigt. Dies legt wiederum nahe, dass infolge der zunehmenden Zahl an katalytischen Zentren (Menge an Laccase) auch die bioelektrokatalytische Umwandlung von Sauerstoff gesteigert wird. Die Schlussfolgerung wird zusätzlich durch die Zunahme des als Elektronen-„Shuttle“ für beide Enzyme wirkenden, elektroaktiven Cytochrome c unterstützt (Abbildung 2).

Um den Einfluss der Substratkonzentration auf die proteinbasierte Signalkette zu untersuchen, wurden die Proteinelektroden bei verschiedenen Laktose- (für die CDH) und Sauerstoffkonzentrationen (für die Lac) mit CV analysiert (siehe die Hintergrundinformationen). Die Daten zeigen sowohl eine lineare Abhängigkeit des Reduktionsstroms von der O₂-Konzentration (0–100 % Luftsättigung) als auch eine nahezu lineare Abhängigkeit des Oxidationsstroms bezogen auf den Laktosegehalt in Lösung (0.02–1.0 mM) bei einer Scanrate von 3 mV s⁻¹. Somit ist das duale Enzymsystem in der Lage, den erhöhten Sauerstoff- und Laktosekonzentrationen zu folgen. Diese Beobachtung legt nahe, dass der Gesamtstrom innerhalb der Triproteinarchitektur zumindest im untersuchten Konzentrationsbereich eher durch die katalytische Reduktion (Lac) oder Oxidation (CDH) an den Enzymen begrenzt wird als durch die Reaktionen zwischen den Enzymen und Cyt c, Cyt c und Cyt c oder zwischen Cyt c und der Elektrode.

Da die beiden Enzyme und das Redoxprotein unterschiedliche Funktionen innerhalb der Schichtarchitektur haben, sollten die relativen Mengen an CDH, Lac und Cyt c in den entsprechenden Schichten einen signifikanten Einfluss auf die Sauerstoffreduktion und die Laktoseoxidation ausüben. Der postulierte Einfluss macht sich bemerkbar, wenn das Cyt c/CDH-Verhältnis von 20:1 auf 10:1 verringert wird. Hierbei konnte eine deutliche Abnahme des Oxidationsstroms beobachtet werden. Obwohl die Zahl an Reaktionsschritten (größere Menge an CDH) für Laktose erhöht ist, kommt es zu einer begrenzten Elektronenweitergabe, was eine Aktivitätsminderung zufolge hat. Bei zu hohen CDH-Konzentrationen scheint die Elektronenübertragung zur Elektrode gestört zu sein. Ein ähnliches Verhalten konnte auch für das Cyt c/Lac-Verhältnis (< 20:1) bezogen auf die katalytische Reaktion beobachtet werden.

Zusammenfassend ist es uns gelungen, eine schichtartige nanobiomolekulare Proteinarchitektur mit zwei funktionalen Signalketten auf der Basis von Protein-Protein-Wechselwirkungen auf Elektroden zu entwickeln. Für den strukturellen Aufbau wurden CDH, Lac und das Redoxprotein Cytochrome c mithilfe von geladenen Siliciumdioxidnanopartikeln schichtweise immobilisiert. Innerhalb des gestapelten Triproteinystems sind zwei Enzyme über Cytochrome c in einem immobilisierten Zustand effizient mit der Elektrode kontaktiert. Da die Aktivität der Enzyme durch die Bereitstellung/ den Entzug der Elektronen kontrolliert wird, kann der Redoxzustand von Cytochrome c dafür genutzt werden, die Aktivität der beiden Biokatalysatoren an- und auszuschalten. Aufgrund des effektiven Elektronenaustauschs innerhalb des gesamten modularen Schichtaufbaus können Laccase und

Cellobiosedehydrogenase – obwohl sie sich in verschiedenen Abständen zur Elektrode befinden – kontaktiert werden. Des Weiteren arbeiten die schaltbaren Reaktionskaskaden der Lac und CDH in einer unseparierten Matrix, ohne dass die Anwesenheit des anderen Biokatalysators stört. Innerhalb des modularen Multischichtsystems agiert Cyt c auf Basis von intermolekularem Elektronentransfer als bidirektionaler molekularer Draht. Es ist zu erwarten, dass dieser Ansatz einen Beitrag für die Weiterentwicklung von Multiplex-Proteinelektroden und -Biosensoren leistet. Zusätzlich stellt dieses System einen deutlichen Fortschritt im biomimetischen Nachbau biologischer Elektronentransferkaskaden dar.

Eingegangen am 2. Dezember 2013,
veränderte Fassung am 17. Januar 2014
Online veröffentlicht am 11. April 2014

Stichwörter: Cellobiosedehydrogenase · Interprotein-Elektronentransfer · Künstliche Signalketten · Laccase · Nanopartikel

- [1] J. F. Turrens, *J. Physiol.* **2003**, *552*, 335.
- [2] A. N. Glazer, A. Melis, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1987**, *38*, 11.
- [3] G. W. Brudvig, R. H. Crabtree, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 4586.
- [4] P. S. Brookes, A. L. Levonen, S. Shiva, P. Sarti, V. M. Darley-Usmar, *Free Radicals Biol. Med.* **2002**, *33*, 755.
- [5] I. Willner, E. Katz, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1230; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1180.
- [6] T. Ikeda, K. Kano, *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *92*, 9.
- [7] C. Bourdillon, C. Demaille, J. Moiroux, J.-M. Saveant, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 529.
- [8] E. E. Ferapontova, T. Ruzgas, L. Stoica, A. Christenson, J. Tkac, A. I. Yaropolov, L. Gorton, *Perspect. Bioanal.*, Bd. 1, Elsevier, Dordrecht, **2005**, S. 517.
- [9] J. F. Rusling, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 363.
- [10] C. J. McNeil, D. Athey, W. O. Ho, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, 75.
- [11] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, E. Reimhult, *Sensors* **2008**, *8*, 1400.
- [12] F. Lisdat, R. Dronov, H. Möhwald, F. W. Scheller, D. G. Kurth, *Chem. Commun.* **2009**, 274.
- [13] D. P. Hickey, F. Giroud, D. W. Schmidtke, D. T. Glatzhofer, S. D. Minteer, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2729.
- [14] M. J. Moehlenbrock, T. K. Tobi, L. N. Pelster, S. D. Minteer, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 561.
- [15] O. Zavalov, V. Bocharova, V. Privman, E. Katz, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 9683.
- [16] J. Wang, E. Katz, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 1591.
- [17] I. Taniguchi, S. Yoshimoto, K. Nishiyama, *Chem. Lett.* **1997**, 353.
- [18] B. Ge, F. Lisdat, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *454*, 53.
- [19] N. Jessel, F. Atalar, P. Lavalle, J. Mutterer, G. Decher, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. Ogier, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 692.
- [20] F. Mizutani, Y. Sato, S. Yabuki, Y. Hirata, *Chem. Lett.* **1996**, *25*, 251.
- [21] C. Bourdillon, C. Demaille, J. Moiroux, J.-M. Saveant, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10328.
- [22] J. Anzai, H. Takeshita, Y. Kobayashi, T. Osa, T. Hoshi, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 811.
- [23] I. Willner, A. Riklin, B. Shoham, D. Rivenzon, E. Katz, *Adv. Mater.* **1993**, *5*, 912.
- [24] W. Jin, F. Bier, U. Wollenberger, F. W. Scheller, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, 823.

- [25] C. Demaille, J. Moiroux, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 9903.
- [26] S. F. Hou, K. S. Yang, H. Q. Fang, H. Y. Chen, *Talanta* **1998**, *47*, 561.
- [27] H. Y. Liu, J. F. Rusling, N. F. Hu, *Langmuir* **2004**, *20*, 10700.
- [28] Y. Zhang, H. Lu, N. Hu, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 10464.
- [29] I. Willner, V. Heleg-Shabtai, R. Blonder, E. Katz, G. Tao, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10321.
- [30] F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2165; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2113.
- [31] M. K. Beissenhirtz, F. W. Scheller, W. F. M. Stöcklein, D. G. Kurth, H. Möhwald, F. Lisdat, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4457; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4357.
- [32] S. C. Feifel, F. Lisdat, *J. Nanobiotechnol.* **2011**, *9*, 59.
- [33] R. Dronov, D. G. Kurth, H. Möhwald, F. W. Scheller, F. Lisdat, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3042; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3000.
- [34] S. C. Feifel, R. Ludwig, L. Gorton, F. Lisdat, *Langmuir* **2012**, *28*, 9189.
- [35] R. Spricigo, R. Dronov, F. Lisdat, S. Leimkühler, F. W. Scheller, U. Wollenberger, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 225.
- [36] F. Wegerich, P. Turano, M. Allegrozzi, H. Möhwald, F. Lisdat, *Langmuir* **2011**, *27*, 4202.
- [37] S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A. I. Yaropolov, J. W. Whittaker, L. Gorton, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2517.
- [38] L. Stoica, T. Ruzgas, R. Ludwig, D. Haltrich, L. Gorton, *Langmuir* **2006**, *22*, 10801.
- [39] V. Fridman, U. Wollenberger, V. Bogdanovskaya, F. Lisdat, T. Ruzgas, A. Lindgren, L. Gorton, F. W. Scheller, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 63.
- [40] M. J. Tarlov, E. F. Bowden, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1847.
- [41] W. Jin, U. Wollenberger, F. Bier, A. Makover, F. W. Scheller, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1996**, *39*, 221.