

Cytochrom-c-Calixaren-Kristalle auf Elektroden: intermolekularer Elektronentransfer zwischen definiert lokalisierten Redoxzentren**

Róise E. McGovern, Sven C. Feifel, Fred Lisdat* und Peter B. Crowley*

Abstract: Die Assemblierung von Redoxproteinen auf Elektrodenoberflächen ist ein entscheidender Schritt für die Entwicklung von biohybriden Systemen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass *p*-sulfonierte Calix[4]aren als „molekularer Klebstoff“ für die Assemblierung und Kristallbildung von Cytochrom c (Cyt c) dient. Hier präsentieren wir die ersten elektrochemischen Daten für Calixaren-Cyt-c-Kristalle im Mikromästab auf SAM-modifizierten Goldelektroden. Die Elektrochemie der Kristalle wurde mittels Zyklovoltammetrie charakterisiert. Hierbei konnten enorme Konzentrationen an elektroaktivem Cyt c nachgewiesen werden. Die erhaltenen Peakströme nahmen linear mit der Quadratwurzel der Vorschubgeschwindigkeit zu. Dadurch war es möglich, die Selbstaustauschrate (k_{ex}) der Cyt-c-Moleküle zu bestimmen. Durch diese Studie kann nachgewiesen werden, dass auch Proteinkristalle eine hohe Elektroaktivität und einen schnellen intermolekularen Elektronentransfer aufweisen können. Es kann erwartet werden, dass diese Beobachtungen auch einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung neuer bioelektronischer Bauelemente haben.

Cytochrom c (13 kDa) ist ein gut charakterisiertes Redoxprotein,^[1–3] das oft für den Aufbau von Biosensoren eingesetzt wurde.^[4–7] Häufig geschah dies durch eine Immobilisierung des kationischen Cyt-c-Moleküls auf Goldelektroden, die zuvor mittels einer selbstorganisierenden Monoschicht, bestehend aus dicht gepackten anionischen Alkanthiolen, modifiziert wurde.^[8,9] Während der Elektronentransfer innerhalb einer Cyt-c-Monoschicht diffusionslos abläuft, ist jedoch eine gewisse Mobilität des Moleküls im adsorbierten Zustand

entscheidend für die Kommunikation mit weiteren Reaktionspartnern bzw. Enzymen.^[10] Hierbei ist zu beachten, dass schon kleine Änderungen der relativen Orientierung der Proteine einen Einfluss auf den Elektronentransfer haben können.^[10–12]

Die in der Regel relativ kleinen Cyt-c-Konzentrationen einer Monoschicht (ca. 10 pmol cm⁻²) können die Empfindlichkeit der elektrochemischen Detektion begrenzen.^[13] Für eine verbesserte Empfindlichkeit sind Aufbauten mit einer deutlich größeren Menge an adressierbarem, elektroaktivem Protein notwendig.^[14–16] Im Zuge dessen wurden heterogene Cyt c-Multischicht-Assemblate auf SAM-modifizierten Elektroden unter Verwendung von anionischen Molekülen und Partikeln wie Polyanilinsulfonsäure (PASA), DNA oder Siliciumdioxid-Nanopartikeln aufgebaut.^[16,17] Durch die Verwendung von PASA (Abbildung 1) konnten bis zu 15 elektroaktive Cyt-c-Multischichten realisiert werden, wobei die elektroaktive Menge an Cyt c als Folge des direkten intermolekularen Elektronentransfers mit steigender Schichtzahl zunahm.^[16]

Proteinkristalle können als Inbegriff für hochkonzentrierte und geordnete Protein-Assemblate mit potenzieller biologischer Relevanz angesehen werden.^[18] Obwohl es derartigen Proteinaufbauten an rotations- und diffusionsgesteuerter Mobilität mangelt, gibt es doch deutliche Hinweise auf einen möglichen Elektronentransfer innerhalb von Redoxproteinkristallen.^[1,19–21] Kenntnisse über den relevanten Abstand zwischen einzelnen Redoxzentren sind für die Beurteilung des intermolekularen Elektronentransferprozesses sehr nützlich, so dass hierfür Proteinkristalle ein exzellentes Modellsystem darstellen. Zu bemerken ist, dass bisher nur eine Veröffentlichung hinsichtlich der direkten elektrochemischen Charakterisierung von Proteinkristallen existiert.^[5] Hierbei

[*] Dr. R. E. McGovern,^[4] Dr. P. B. Crowley
School of Chemistry, National University of Ireland Galway
University Road, Galway (Irland)
E-Mail: peter.crowley@nuigalway.ie

Dr. S. C. Feifel,^[4] Prof. Dr. F. Lisdat
Biosystemtechnik, Institut für Angewandte Biowissenschaften
Technische Hochschule Wildau (FH)
Hochschulring 1, 15745 Wildau (Deutschland)
E-Mail: flisdat@th-wildau.de

[†] Beide Autoren trugen in gleichem Maße zur Arbeit bei.

[**] Wir bedanken uns für die Förderung durch NUI Galway (Stipendium für R.E.M.), dem Irish Research Council („New-Foundations“-Programm für P.B.C.), der Science Foundation Ireland (10/RFP/BIC2807 für P.B.C.), der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG Li 706/7-1 für F.L. und S.F.) und der European Cooperation in Science and Technology (COST Action TD1003). Und bei P. Kavanagh (NUIG) möchten wir uns für die hilfreichen Diskussionen bedanken.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201500191> zu finden.

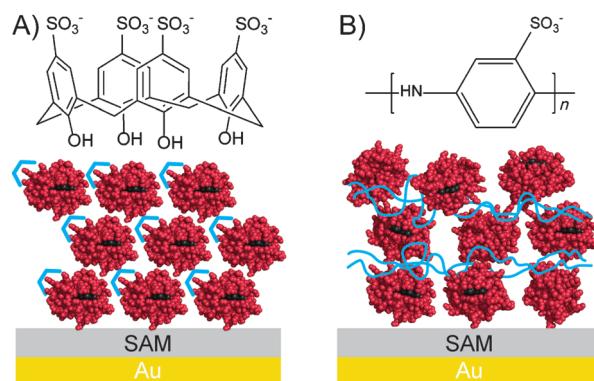


Abbildung 1. Vergleich von A) Cyt-c-sclx4-Kristallen, die eine geordnete Struktur mit definierten Abständen der Häm-Zentren aufweisen, und B) Cyt-c-PASA-Multischichtstrukturen, die eine heterogene Mischung von Protein-Polymer-Kontakten repräsentieren.

handelt es sich um Cyt-c-Kristalle, die in einem Polypyrrol-film immobilisiert wurden, wobei die erhaltenen Zyklovoltammogramme nur dem Bild einer Cyt-c-Monoschicht entsprachen.

p-Sulfonierte-Calix[4]aren (sclx_4) ist eine ringförmige Verbindung, die bereits für die Assemblierung und Kristallisation von Proteinen genutzt wurde (Abbildung 1).^[22,23] Das Calixaren-Molekül hat ähnliche chemische Eigenschaften wie PASA. So steuert die gleichartige Ladungssituation (zwischen dem Polyanion und dem kationischen Cyt c) die Protein-komplexierung bzw. Assemblierung.^[16,22] Der Unterschied zwischen Calixaren-unterstützten Kristallen und PASA-haltigen Multischichten besteht darin, dass die genaue Position jedes einzelnen Proteins in den Kristallen definiert ist, wohingegen die Multischichtanordnung eine Mischung aus heterogenen Protein-Polymer- und Protein-Protein-Kontakten darstellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde Cyt c mit sclx_4 auf Goldelektroden kokristallisiert. Für die elektrochemische Charakterisierung mittels Zyklovoltammetrie war es notwendig, Bedingungen zu identifizieren, die eine ausreichende Stabilität der Kristalle gewährleisten. Die Kristallbedeckung der Elektrodenoberflächen wurde mikroskopisch (Olympus-Software) quantifiziert und mit den elektrochemischen Daten verglichen (Abbildung 2). Für den Elektronentransfer im Kristall ergab sich ein ähnliches Bild wie schon für die Cyt-c-PASA-Multischichtelektroden.^[24] Auf Basis dieser grundlegenden Untersuchungen konnten zum ersten Mal Elektronenselbsttauscheigenschaften von Cyt c in einem Festkörper auf Elektroden gezeigt werden.

Die Kristallisation und elektrochemische Charakterisierung von Cyt c erfolgte auf planaren Goldelektroden. Hierfür wurden drei unterschiedliche Oberflächen bezüglich der Cyt-c-Kristallisation untersucht: nichtmodifiziertes und SAM-beschichtetes Gold und SAM-modifizierte Goldelektroden mit einer zusätzlichen Cyt-c-Monoschicht. Die Protein- sclx_4 -Kristalle wurden direkt auf den verschiedenen Elektroden mithilfe des Dampfdiffusionsverfahrens gezüchtet (Abbildung S1).^[22] Ein Proteinkristallwachstum konnte auf allen drei Elektrodenoberflächen beobachtet werden. Die ZV-Messungen wurden anfänglich in 5 mm Kaliumphosphat-Puffer (pH 7) durchgeführt. Die auf einer Cyt-c-Monoschicht gewachsenen Kristalle lösten sich während des Transfers von

der Kristallisationslösung in den Messpuffer von der Oberfläche und konnten daher nicht charakterisiert werden. Die Kristalle, welche auf der „nackten“ Goldelektrode gezüchtet wurden, erwiesen sich als stabiler, jedoch wurden keine charakteristischen Redoxsignale erhalten. Ausschließlich die auf der SAM-Oberfläche gezüchteten Kristalle wiesen eine entsprechende Elektroaktivität auf, wobei diese aber während wiederholten Messungen abnahm (Abbildung S2A). Dieser Aktivitätsverlust konnte mit einem Verlust der Kristalle durch Auflösen/Ablösen von der Elektrodenoberfläche korreliert werden, wie anhand der mikroskopischen Untersuchungen nachgewiesen wurde.

Um die Stabilität der Kristalle während der elektrochemischen Untersuchung zu verbessern, wurde eine angepasste Messlösung verwendet, die in der Zusammensetzung nahezu der Kristallisationslösung entsprach^[22] (24 % PEG 4000, 50 mM NaCl, 100 mM MgCl_2 , pH 7.0). Die unter diesen Bedingungen untersuchten SAM-Kristall-Elektroden zeigten ein gänzlich anderes Verhalten (Abbildung S2B). Die elektroaktive Menge auf der Elektrodenoberfläche verhielt sich während der Messung konstant oder nahm sogar noch nach wiederholten Messungen zu. Diese Beobachtung legt zum einen nahe, dass eine ausreichende Kristallstabilität erreicht wurde, und zum anderen, dass mehrere Redoxzyklen notwendig sind, um die gesamte Menge an Cyt c in den Kristallen elektrochemisch anzusprechen. Dies kann dadurch verstanden werden, dass die Oxidation/Reduktion von Cyt c von einer Ionenaufnahme oder -abgabe des Kristalls begleitet wird.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine umfassende elektrochemische Untersuchung durchgeführt. Die SAM-Kristall-Elektroden wurden dabei bei verschiedenen Scanraten ($10\text{--}1000\text{ mV s}^{-1}$) untersucht. Vor den elektrochemischen Messungen wurden Fotos von jeder einzelnen Elektrode (Abbildung 2) aufgenommen und die Oberflächenbedeckung der Elektrode durch die Kristalle bestimmt (Tabelle S1). Zusätzlich wurden auch Bilder von den Kristallelektroden nach den Experimenten aufgenommen, um die Kristallstabilität besser beurteilen zu können.

Die Zyklovoltammogramme der SAM-Kristall-Elektroden zeigten für jede untersuchte Scanrate ein charakteristisches Redoxpaar, was für eine Redoxspezies auf der Elektrodenoberfläche spricht (Abbildung 3).

Das formale Potential (E_f) des Cyt-c- $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -Paares in den Kristallen war bei 100 mV s^{-1} ($E_f = (0.049 \pm 0.006)$ V gegen Ag/AgCl) geringfügig größer als der Potentialwert einer Cyt-c-Monoschicht auf einer Gold-SAM-Elektrode ($E_f = (0.025 \pm 0.005)$ V, Abbildung S3). Die Divergenz zwischen den beiden Systemen weist auf eine geringfügige Änderung in der Umgebung des Proteins im Calixaren-Kristallverbund hin. Das formale Potential (E_f) änderte sich nur geringfügig mit der Scanrate und verhielt sich stabil für die gemessenen Elektroden (Tabelle S2).

Die anodischen und kathodischen Peakströme des Redoxpaars nahmen linear mit der Quadratwurzel der Scanrate zwischen $2\text{--}500\text{ mV s}^{-1}$ zu (Abbildung 3). Ein solches Verhalten kann als Hinweis auf einen Elektronen-„Hopping“-Prozess zwischen definierten Positionen innerhalb des Kristalls verstanden werden. Die Randles-Sevcik-Gleichung^[25]

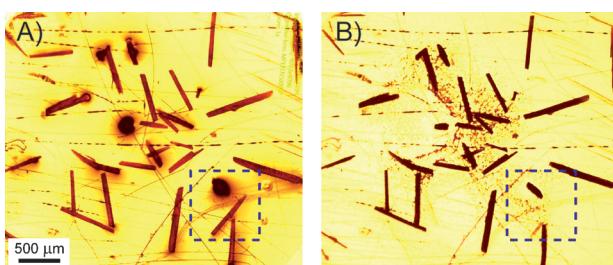


Abbildung 2. Ausschnitt einer SAM-Kristall-Elektrode (A) vor und (B) nach der Scanratenabhängigkeitsuntersuchung. Die hervorgehobene Fläche ist ein Beispiel für Kristallauflösung/-ablösung. Zu beachten ist auch die Farbveränderung, die einen Hinweis auf die Cyt-c-Oxidation liefert (B). Die SAM-Schicht wurde aus Mercaptoundecanol/Mercapto-undecansäure (3:1) hergestellt.

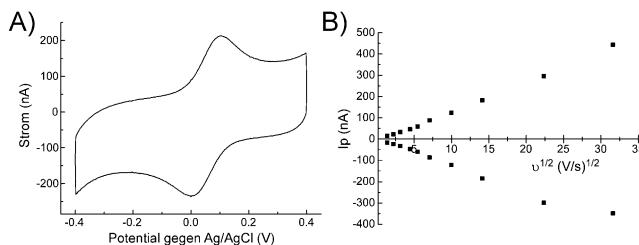


Abbildung 3. A) Zyklovoltammogramm einer SAM-Kristall-Elektrode bei einer Scanrate von 100 mVs^{-1} . Der Messpuffer bestand aus 24% PEG 4000, 50 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, pH 7. B) Auftragung der Peakströme gegen die Quadratwurzel der Scanrate. ^[16, 17, 24]

(siehe die Hintergrundinformationen) wurde angewendet, um den scheinbaren „Diffusions“-Koeffizient zu bestimmen (für den Elektronen-„Hopping“-Prozess zwischen definierten Positionen im Kristall und nicht für die Cyt-c-Diffusion). Dabei ergab sich ein Wertebereich von 10^{-9} – $10^{-10} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$ (basierend auf den Oberflächenbelegungen an Kristallen von 0.1–0.5 % für die unterschiedlichen Elektroden, und einer Cyt-c-Konzentration von 55 mM im Kristall). Diese Werte sind ungefähr zwei Größenordnungen größer als der für eine Cyt-c-Siliciumdioxidnanopartikel-Multischicht bestimmte Diffusionskoeffizient ($5 \times 10^{-12} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$).^[17] Diese Beobachtung legt nahe, dass sich die geordnete Ausrichtung der Häm-Zentren innerhalb des Kristalls günstig für den Elektronen-„Hopping“-Prozess erweist – im Vergleich zu einer heterogenen Multischichtarchitektur mit einer Verteilung der Cyt-c-Orientierungen innerhalb einer Siliciumdioxidnanopartikel-Matrix.

Die größere Peakseparation im Fall der Kristallelektroden (Abbildung 3, Tabelle S2) im Vergleich zu einer Cyt-c-Monoschicht (Abbildung S3) lässt auf einen langsameren Elektronentransfer schließen. Die zunehmende Peakseparation mit steigender Scanrate bei nahezu gleicher Verschiebung der Oxidations- und Reduktions-Peakpotentiale legt eine ähnliche Kinetik für beide Prozesse in den Kristallen nahe. Die Halbpeakbreiten sind auch bei kleinen Scanraten größer als in einem idealen reversiblen System, dies ist jedoch typisch für zahlreiche Proteinelektroden.

Die elektroaktive Cyt-c-Menge wurde für jede Elektrode bei unterschiedlichen Scanraten bestimmt, und obwohl nur ein Bruchteil der Elektrodenoberfläche (< 1 %) mit Kristallen in Kontakt war, wurde eine enorme Menge an Cyt c nachgewiesen (Tabelle 1).

Die elektroaktiven Mengen waren abhängig von der Scanrate; bei niedrigeren Geschwindigkeiten war eine deutlich größere Menge an elektroaktivem Protein detektierbar. Zum Beispiel wurde bei einer Scanrate von 1 Vs^{-1} eine durchschnittliche elektroaktive Cyt-c-Menge von $1200 \text{ pmol cm}^{-2}$ nachgewiesen, diese nahm aber noch um das

Tabelle 1: Durchschnittswerte der elektroaktiven Cyt-c-Konzentration (I), des formalen Potentials (E_f) und der Peakseparation (ΔE_p) als Funktion der Scanrate für drei unterschiedliche SAM-Kristall-Elektroden.

$\nu [\text{mVs}^{-1}]$	1000	100	10	2
$I [\text{pmol cm}^{-2}]$	1200	2100	4500	9300
$E_f [\text{V} \text{ gegen Ag/AgCl}]$	0.051	0.049	0.048	0.052
$\Delta E_p [\text{V}]$	0.180	0.090	0.052	0.044

8-fache zu, wenn die Scanrate auf 2 mVs^{-1} verringert wurde, was auf eine Limitierung des Elektronentransfer zwischen den Proteinen im Kristall bei höheren Vorschubgeschwindigkeiten hindeutet. Das System kann nicht vollständig dem schnellen Wechsel des Elektrodenpotentials folgen, da der Strom von vielen Elektronenselbstauschritten zwischen den einzelnen Cyt-c-Häm-Zentren abhängt. Dieses Verhalten ist dem von Cyt-c-Multischichtelektroden sehr ähnlich, denn auch hier ist der Protein-Protein-Elektronentransfer der dominierende Weg innerhalb der Schichtstruktur und zugleich auch der limitierende Faktor bei größeren Scanraten.^[16, 17, 24]

Nach den elektrochemischen Untersuchungen zeigte sich in der mikroskopischen Nachuntersuchung der Elektroden eine teilweise Ablösung/Auflösung der Kristalle (Abbildung 2). Überraschenderweise, wurden für die Elektroden am Ende der Messung zum Teil größere Ströme und somit auch größere Mengen an elektroaktivem Cyt c nachgewiesen (Tabelle S1). Daher treten offensichtlich zwei unterschiedliche Prozesse auf, zum einen die partielle Auflösung der Kristalle und zum anderen eine „Aktivierung“ der Kristalle für die elektrochemischen Prozesse. Ein wichtiger Aspekt ist hierbei aber, dass die Kristallauflösung/-ablösung während der Experimente nicht ausgeprägt auftrat. Die „Aktivierung“ kann mit dem starken Eintritt von Elektronen in den Kristall während der voltammetrischen Analyse verstanden werden (bzw. Austritt); dieser muss von einer Reorganisation der Gegenionen begleitet werden (für die Aufrechterhaltung der Elektroneutralität).

In Anbetracht der beobachteten Kristallauflösung war es aber erforderlich nachzuweisen, dass die entsprechenden Redoxpeaks den Cyt-c-Molekülen in den Kristallen zuzuordnen sind und nicht dem vom Kristall abgelösten Proteinanteil. Um diesem Problem nachzugehen, wurde eine zuvor vermessene SAM-Kristall-Elektrode aus der elektrochemischen Messzelle entfernt und mit einer reinen SAM-Elektrode (ohne Cyt c) ersetzt, ohne die Pufferlösung in der Zelle zu wechseln. In der nachfolgenden Messung konnten nur minimale Redoxsignale für gelöstes Cyt c im Zyklovoltammogramm nachgewiesen werden (Abbildung S5). Dies wiederum bestätigt eindeutig, dass die Cyt-c-Moleküle in den Kristallen die Hauptursache für die enorme Redoxaktivität sind.

Redoxprozesse in Proteinkristallen konnte anhand verschiedener spektroskopischer Methoden schon beobachtet werden. Hierbei wurde gezeigt, dass ein Elektronentransfer auftritt, wenn die entsprechenden Kofaktoren sich in einer geeigneten Position zueinander befinden.^[19–21] In der vorliegenden Studie haben wir die Elektroaktivität der Cyt-c-sclx₄-Kristalle in Bezug zu den möglichen Häm-Häm-Entfernung in der Kristallstruktur gesetzt. Da die Wachstumsbedingungen der Cyt-c-sclx₄-Kristalle auf den Elektroden denen der für die Röntgen-Kristallstrukturuntersuchung verwendeten entsprachen, wurde von einer identischen Ausrichtung der elektroaktiven Cyt-c-Moleküle wie in der aufgeklärten Kristallstruktur ausgegangen (PDB: 4n0k, 1 Å Auflösung). Die Proteinstrukturen im Kristall wurden mittels P2₁2₁2₁-Symmetrieeoperationen auf die asymmetrische Einheit bezogen (Abbildung 4).^[22] Interessanterweise enthält die Kris-

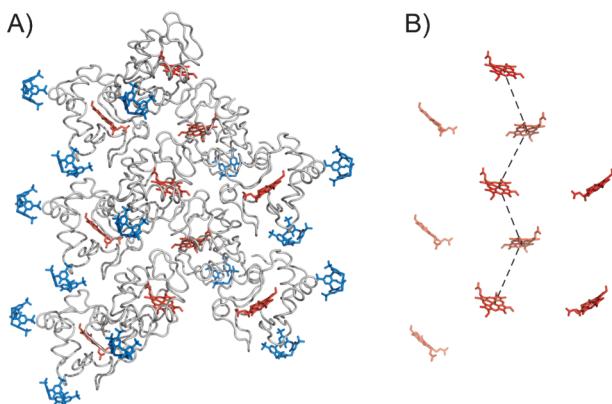


Abbildung 4. A) Cyt-c-Anordnung in einem Calixaren-gestützten Kristall^[23] (PDB: 4n0k). Cyt-c ist als Molekül in grau mit dem Häm in rot und das Calixaren sclx₄ als blaue Bänder dargestellt. Der Kristall ist mit der langen Achse parallel zur Elektrodenebene ausgerichtet. B) Der kürzeste Abstand zwischen den Fe-Zentren (23.7 Å) wird durch die gestrichelte Linie angedeutet.

tallstruktur Ketten von Cyt-c-Molekülen, die „face-to-face“ orientiert sind, mit einem Fe-Fe-Abstand von 23.7 Å. Dieser Abstand ist mit dem nach der Marcus-Theorie postulierten Abstand für den Elektronentransfer < 25 Å^[1] übereinstimmend. Alle weiteren Fe-Fe-Abstände in der Kristallstruktur waren > 30 Å.

Auf Grundlage des möglichen Elektronentransfers zwischen definierten Häm-Zentren und des mithilfe der Randles-Sevcik-Gleichung bestimmten Diffusionskoeffizient (für das Elektronen-„Hopping“) nutzten wir eine abgewandelte Dahms-Ruff-Gleichung (siehe die Hintergrundinformationen), um die Selbstaustauschrate (k_{ex}) zwischen den definierten Positionen der Cyt-c-Moleküle im Kristall abzuschätzen. Die berechneten Werte lagen im Bereich von 10^5 – $10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$, was nochmals die enorme Effizienz des Elektronentransports innerhalb der Kristallformation unterstreicht.

Abschließend kann festgehalten werden, dass sehr große elektroaktive Cyt-c-Mengen in den Kristallen nachgewiesen werden konnten, und dies obwohl nur ein geringer Bruchteil der Kristalle mit der Elektrodenoberfläche (< 1%) in Kontakt waren. Dies spricht für einen Elektronentransport durch aufeinanderfolgende Proteinschichten im Kristall. Es wurden auch Ähnlichkeiten im elektrochemischen Verhalten zwischen dem der Kristalle und dem von Multischicht-Architekturen identifiziert.^[16,17] Die elektroaktive Cyt-c-Menge in den Kristallen war abhängig von der Scanrate, was darauf hindeutet, dass der intermolekulare Elektronentransfer bei höheren Vorschubgeschwindigkeiten limitierend wirkt.^[14,16] Die über die Elektrode adressierbaren Cyt-c-Konzentrationen waren Größenordnungen höher als die zuvor für Cyt-c-Multischichtelektroden bestimmten.^[16,24] Diese Beobachtung ist nachvollziehbar, wenn man die größere Schichtdicke der Kristalle im Vergleich zu den Multischichtarchitekturen berücksichtigt.

Zusätzlich zu den großen Proteinkonzentrationen, kann ein Vorteil der Kristallsysteme darin gesehen werden, dass die genauen Positionen und Orientierungen der Redoxzentren bekannt sind. „Molekulare Klebstoffe“ für die Kristallisati-

on^[22,23] und Assemblierung von Proteinen stellen eine neue Methode zur Herstellung geordneter Proteinarchitekturen auf Elektroden dar. Dieser Ansatz könnte der Entwicklung von neuen Generationen bioelektronischer Bauelemente Vorschub leisten, aber auch der Aufklärung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen und der Nachahmung von Elektronentransferprozessen in der Natur dienen.

Stichwörter: Calixarene · Häm-Proteine · Kristallwachstum · Molekularer Klebstoff · Redoxchemie

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 6356–6359
Angew. Chem. **2015**, *127*, 6454–6457

- [1] H. B. Gray, J. R. Winkler, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2010**, *1797*, 1563.
- [2] A. N. Volkov, J. A. R. Worrall, E. Holtzmann, M. Ubbink, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 18945.
- [3] C. Lange, C. Hunte, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 2800.
- [4] E. Katz, A. F. Bückmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10752.
- [5] F. Acosta, D. Eid, L. Marin-Gracia, B. A. Frontana-Uribe, A. Moreno, *Cryst. Growth Des.* **2007**, *7*, 2187.
- [6] R. Dronov, D. G. Kurth, H. Möhwald, F. W. Scheller, F. Lisdat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3000; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3042.
- [7] S. C. Feifel, R. Ludwig, L. Gorton, F. Lisdat, *Langmuir* **2012**, *28*, 9189.
- [8] M. J. Tarlov, E. F. Bowden, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1847.
- [9] S. Song, R. A. Clark, E. F. Bowden, M. J. Tarlov, *J. Phys. Chem. B* **1993**, *97*, 6564.
- [10] W. Jin, U. Wollenberger, E. Krägel, W.-H. Schnuck, F. W. Scheller, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *433*, 135.
- [11] A. Avila, B. W. Gregory, K. Niki, T. M. Cotton, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 2759.
- [12] A. Kranich, H. K. Ly, P. Hildebrandt, D. H. Murgida, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9844.
- [13] B. Ge, F. Lisdat, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *454*, 53.
- [14] F. Wegerich, P. Turano, M. Allegrozzi, H. Möhwald, F. Lisdat, *Langmuir* **2011**, *27*, 4202.
- [15] Y. Lvov, Z. Lu, J. B. Schenkman, X. Zu, J. F. Rusling, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4073.
- [16] M. K. Beissenhirtz, F. W. Scheller, F. Lisdat, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4665.
- [17] S. C. Feifel, F. Lisdat, *J. Nanotechnol.* **2011**, *9*, 59.
- [18] P. B. Crowley, P. M. Matias, H. Mi, S. J. Firbank, M. J. Banfield, C. Dennison, *Biochemistry* **2008**, *47*, 6583.
- [19] B. R. Crane, A. J. Di Bilio, J. R. Winkler, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11623.
- [20] S. A. Kang, B. R. Crane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15465.
- [21] C. Cavalieri, N. Bierman, M. D. Vlasie, O. Einsle, A. Merli, D. Ferrari, G. L. Rossi, M. Ubbink, *Biochemistry* **2008**, *47*, 6560.
- [22] R. E. McGovern, H. Fernandes, A. R. Khan, N. P. Power, P. B. Crowley, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 527.
- [23] R. E. McGovern, A. A. McCarthy, P. B. Crowley, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 10412.
- [24] M. K. Beissenhirtz, F. W. Scheller, W. F. M. Stöcklein, D. G. Kurth, H. Möhwald, F. Lisdat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4357; *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4457.
- [25] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, Wiley-VCH, New York, 1980.

Eingegangen am 8. Januar 2015
Online veröffentlicht am 1. April 2015