

# Cystein-Mutanten der Cu,Zn-Superoxiddismutase und ihre Anwendung in Proteinelektroden für die Detektion von freien Sauerstoffradikalen

Moritz K. Beissenhirtz, Frieder W. Scheller, Maria S. Viezzoli, Fred Lisdat\*

## Zusammenfassung

Das Enzym Superoxiddismutase (SOD) bietet wegen seiner hohen Reaktionsrate und seiner extrem hohen Substratspezifität große Vorteile für eine Anwendung als Superoxidbiosensor. In dieser Arbeit wurden durch molekularbiologische Methoden Mutanten der humanen Cu,Zn-SOD gewonnen, welche ein oder zwei zusätzliche Cystein-Reste enthielten, die eine einfache Immobilisierung des Proteins durch Bindung des Cystein-Schwefels auf Goldelektroden ermöglichten. Sechs solcher Mutanten wurden entworfen, exprimiert, aufgereinigt und elektrochemisch charakterisiert. Alle Mutanten konnten durch einen einfachen Inkubationsschritt auf Goldelektroden gebunden werden und zeigten ein quasi-reversibles elektrochemisches Ansprechen. Für eine Mutante wurde die Anwendung als Superoxidsensor genauer untersucht und für beide Teilreaktionen der Dismutation ein Ansprechen des Sensors auf das Radikal gefunden. Bei Verwendung einer Teilreaktion konnte die Empfindlichkeit herkömmlicher Monoschichtsensoren um etwa eine Größenordnung übertroffen werden

## 1. Einleitung

In den letzten Jahren wurde die Bedeutung freier Radikale in der Entstehung und Entwicklung von Krankheiten wie Krebs [1], Parkinson [2] und Herzleiden [3] intensiv untersucht. Insbesondere aggressive, kurzlebige Sauerstoffverbindungen wie das Superoxidradikal  $O_2^-$  (ein negativ geladener Disauerstoff) spielen eine Schlüsselrolle während der Schädigung des Gewebes, da sie mit allen essentiellen Bestandteilen menschlicher Zellen – DNA, Proteinen und Membransystemen – reagieren können. Aus diesem Grund sind die genaue Bestimmung der Konzentration derartiger Radikale ebenso wie die Quantifizierung der Effizienz von Radikalfängern, sogenannter Antioxidantien, von großer Bedeutung für Pharmazie, Medizin und Lebensmittelindustrie. Die geringen natürlichen Konzentrationen ( $10^{-9}$  bis  $10^{-6}$  mol  $l^{-1}$ ) sowie die Kurzlebigkeit des Superoxidradikals (ms bis s) stellen dabei Herausforderungen für das Messsystem dar.

In der biosensorischen Forschung wurden bereits Proteinelektroden entwickelt, die Elektronenaustauschreaktionen mit dem Radikal eingehen. Insbesondere das Protein Cytochrom c (Cyt.c) wurde erfolgreich auf Goldelektroden immobilisiert [4] und konnte sogar im Tierversuch zur

Bestimmung von Radikalkonzentrationsänderungen im Gewebe von Ratten eingesetzt werden [5]. Cyt.c enthält im aktiven Zentrum ein Eisenatom, welches vom Superoxidradikal reduziert und anschließend an der Elektrode re-oxidiert werden kann, wobei über den dabei fließenden Strom eine Messung der Konzentration des Radikals in Echtzeit ermöglicht wird.

Limitiert wird dieser Ansatz allerdings durch die niedrige Reaktionsgeschwindigkeit des Proteins, welches kein natürlicher Reaktionspartner des Radikals ist, die Möglichkeit der Signalverfälschung durch Reaktionen mit anderen Molekülen, insbesondere  $H_2O_2$ , und der aufwendigen mehrtägigen Präparation der Elektroden.

Das Protein Superoxiddismutase (SOD) ist das Schlüsselenzym in der zellulären Verteidigung gegen Superoxidradikale [6]. Es enthält in der Regel im aktiven Zentrum ein Kupfer- und ein Zinkion (Cu,Zn-SOD) und zeigt eine sehr hohe Reaktionsrate mit dem Radikal sowie eine beinahe einzigartige Substratspezifität. Auf Grund dieser für die Radikalsensorik bedeutenden Vorteile wurden in den letzten Jahren einige Biosensoren unter Verwendung von SOD entwickelt [7-9]. Nachteilig waren hier potentielle Signalverfälschungen durch notwendige Hilfsschichten für die Proteinanbindung sowie die aufwendige Präparation.

Um diesen Konflikt aufzulösen, wurden in dieser Arbeit durch molekularbiologische Manipulation Mutanten der menschlichen SOD entwickelt, welche ein oder zwei zusätzliche Cystein-Reste (Cys) enthielten. Die Aminosäure Cystein enthält eine endständige Thiolgruppe, welche an Goldoberflächen bindet und somit eine direkte Kopplung des Enzyms auf der Elektrode in einem Ein-Schritt-Verfahren ermöglicht. Die Bindung dieser Mutanten auf der Sensoroberfläche, die Elektrochemie der SOD und die Anwendung als Superoxidsensor wurden untersucht.

## 2. Material und Methoden

Xanthinoxidase aus Kuhmilch (XOD) wurde von Roche (Mannheim, Deutschland) geliefert und durch Zentrifugation (15 min bei 11.000 U/min) und Dialyse zusätzlich gereinigt. Bovine Cu-Zn-SOD, HEPES,  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) und Xanthin wurden von Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Golddraht (>99 % Reinheit, Durchmesser 0,5 mm) wurde von Goodfellow (Cambridge, Großbritannien) gekauft.

Alle zyklolvoltammetrischen Untersuchungen wurden an einem Autolab System (Metrohm, Deutschland) durch-

\* korrespondierender Autor

geführt. Amperometrische Messungen wurden an einem Model 720A Potentiostaten von CHI Instruments (Austin, USA) vorgenommen. Für alle elektrochemischen Untersuchungen wurde eine 1-ml-Messzelle mit einer Ag/AgCl/1 M KCl-Referenzelektrode von Biometra (Göttingen, Deutschland) und einer Platindraht-Gegenelektrode verwendet.

Die molekularbiologischen Methoden sowie die Expression und Reinigung der SOD-Mutanten wurden nach dem bereits etablierten Protokoll zur Arbeit an der humanen Cu,Zn-SOD durchgeführt [10].

Das Gen einer monomeren Form der humanen Cu,Zn-SOD, welches auf einem Plasmid (Variante von pBR322) unter Kontrolle des IPTG-ansprechbaren *Lac*-Promotors zusammen mit einem Selektionsgen für Ampicillin-Resistenz vorlag (CERM, Universität Florenz, Italien), diente als Wildtyp für die Gewinnung der Mutanten. Aminosäuren des Wildtyps, welche gegen ein Cys ausgetauscht werden konnten, wurden durch die Softwareprogramme *RasMol*, *MolMol* und *Prosa II*, ermittelt. Der Austausch der ausgewählten Aminosäuren erfolgte mittels des kommerziellen QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene (La Jolla, USA) nach Vorgaben des Herstellers. Kompetente *E. coli* Bakterien (TOPP1) wurden durch Hitzeschock (90s bei 42°C, danach Inkubation auf Eis) mit dem jeweiligen Plasmid transformiert, über die Ampicillin-Resistenz selektiert und über Nacht in Kulturgefäßen (unter Schütteln bei 37°C) herangezogen. Expression der SOD wurde durch Zugabe von IPTG, einem Lactoseanalogon, zur Wachstumslösung (2XYT-Flüssigmedium) erzielt.

Die periplasmatischen Proteine wurden durch einen osmotischen Schock (40%-ige Saccharoselösung) und nachfolgende Zentrifugations- und Waschschriffe von den übrigen Zellbestandteilen abgetrennt. Durch DEAE-Sepharosesäulenchromatographie und SDS-Gelelektrophorese wurden Fraktionen gewonnen, die fast ausschließlich SOD enthielten.

Die Enzymelektroden wurden durch einfache Inkubation sauberer Golddrähte in einer 50-300 µM SOD-Lösung (über Nacht) und anschließender Spülung mit proteinfreiem Puffer hergestellt.

Für die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) wurde ein sauberer SPR-Chip unmodifiziert in das Fließsystem des Biacore 2000 (Biacore AB, Uppsala, Schweden) eingebaut. 200 s lang wurde der Chip mit Puffer gespült. Anschließend wurde eine 100 µM Lösung einer SOD-Mutante bzw. einer Apo-SOD-Mutante für 3h über den Chip geleitet, gefolgt von erneut 15 min Puffer, jeweils mit einer Fließrate von 1µl/min. Die Änderung des Resonanzsignals gegen die Zeit diente als Maß für die Massenlagerung auf der Chipoberfläche.

Für die sensorische Anwendung der SOD-Mutanten wurde *in vitro* ein Enzymsystem zur Erstellung von Superoxid genutzt. Das Enzym Xanthin-Oxidase katalysiert die Umsetzung von Xanthin zu Harnsäure, wobei als ständige Beiprodukte Superoxid und Wasserstoffperoxid anfallen. Es wurden 990 µl Puffer in die Messzelle gegeben und unter konstantem Rühren ein Potential von +220 mV bzw. -130 mV angelegt. Nach Einstellung eines konstanten Hintergrundstroms von wenigen nA wurde 10 µl Xanthin zu einer Endkonzentration von 100 µM in der Zelle hinzupipettiert. Eine anschließende Zugabe von XOD (5 mU/ml

bis 60 mU/ml) startete die radikalproduzierende Reaktion. Nach Erreichen eines stabilen Stromplateaus wurden einige µl einer SOD-Lösung (1-3 mg/ml) hinzugefügt, um Superoxid aus der Lösung zu entfernen. Die Konzentration des Radikals in der Messzelle wurde nach bekanntem Verfahren errechnet und der Sensor so kalibriert [11].

### 3. Ergebnisse

Für die Gewinnung von Proteinmutanten einer monomeren Form der humanen Cu,Zn-SOD wurden zunächst potentielle Mutationsstellen ausgewählt. Zielstellung war hierbei die Einführung von Cysteinresten in das Protein, die dann vorteilhaft für eine direkte Immobilisierung auf Goldoberflächen genutzt werden können (über die Gold-Thiol-Chemisorptionsbindung). Randbedingungen für die Wahl der Mutationsposition waren einerseits die Nähe der mutierten Aminosäure zum aktiven Zentrum sowie andererseits der weitgehende Erhalt der Proteinstruktur. Es wurden sechs Proteinmutanten ausgewählt: drei dieser Mutanten enthielten einen Cysteinrest (Mut1A, Mut1B, Mut2B), drei weitere zwei Cystein-Reste (Mut2A, Mut2B, Mut3B). Abb. 1 zeigt die Position der Mutationsansätze im Modell des Proteins.

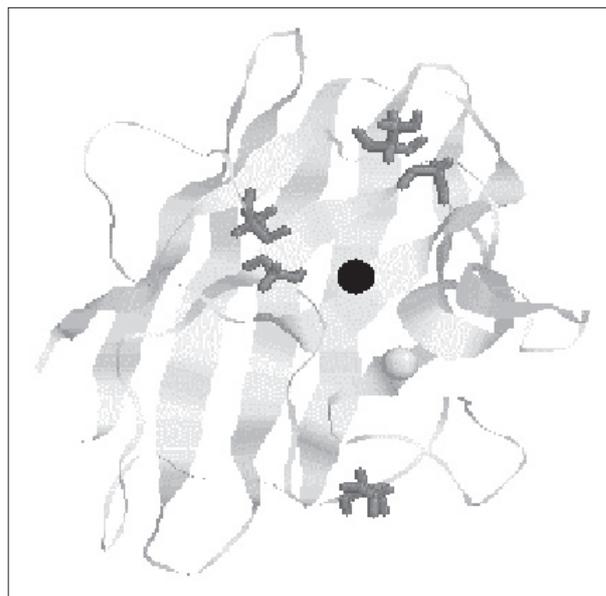
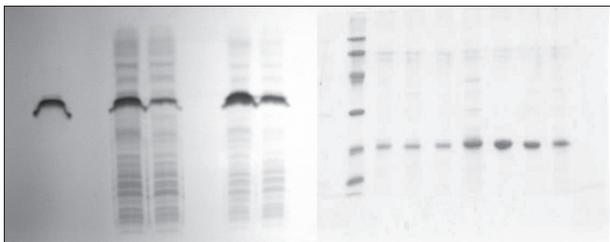


Abb. 1: SDS-Page-Gele verschiedener Proteinaufreinigungsschritte. Rechts: von links: gereinigter Wt als Marker, 4 Präparationen der gewonnenen bakteriellen Proteine. Links: von links: Größenstandard (von unten: 14,4; 20,1; 30; 43; 67; 94 kDa), aufgereinigte Präparation von Mut1A, Mut2A, Mut2B, Mut2C, Wt, Mut1B, Mut1C.

Im Expressionssystem *E. coli* wurden diese sechs Mutanten der Cu,Zn-SOD exprimiert und einer Aufreinigung mittels Säulenchromatographie unterzogen. Abb. 2 zeigt links die überproportional breite Bande der SOD in der Gesamtheit der gewonnenen periplasmatischen Proteine sowie rechts im direkten Vergleich die Reinheit aller Mutanten nach der chromatographischen Aufreinigung. Reinheit (>95 %) und Menge (>100 mg) der so gewonnenen Enzyme waren für die Untersuchung auf Sensorelektroden mehr als ausreichend. Spektroskopische Messungen bewiesen die Aktivität aller Mutanten bei der Zersetzung von Superoxid.

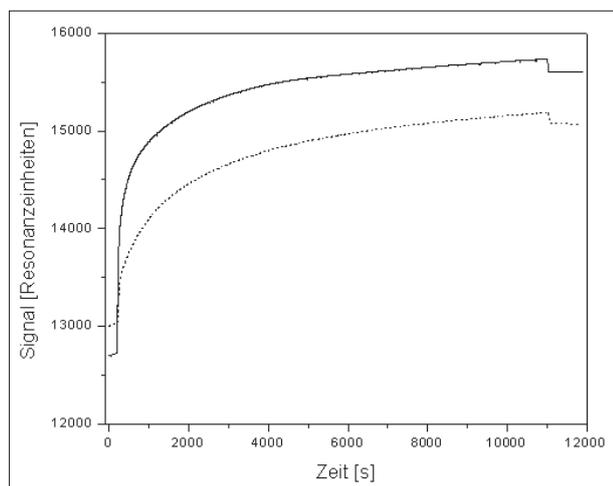
Abb. 2: Strukturmodell der monomeren humanen Cu,Zn-SOD mit Blick auf das Kupfer des aktiven Zentrums (schwarze Kugel). Die zur



Mutation ausgewählten Aminosäuren sind als gitterartige „Sticks“ hervorgehoben dargestellt. (Quelle: 1DSW in der Brookhaven Protein Databank)

Die Bindung der Cys-haltigen Mutanten an Goldoberflächen wurde durch Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (Abb. 3) und Impedanzspektroskopie nachgewiesen. Beide Methoden zeigten beispielhaft eine erfolgreiche Bindung der Mutante Mut1C, sowohl in aktiver Form als auch nach Inaktivierung durch Entfernung des Kupfers. Cystein-freie SOD (Wildtyp) hingegen konnte nach der gleichen Methode nicht immobilisiert werden. Dies zeigt, dass die Bindung der Proteinmoleküle auf der Oberfläche spezifisch über die neu eingefügten Cys-Reste erfolgt.

Abb. 3: Sensogramm der Immobilisierung von Mut1C (blau) und Apo-Mut1C (rot) auf der Goldoberfläche eines SPR Chips. (Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie,  $v = 1 \mu\text{l}/\text{min}$ )



Zur weiteren Untersuchung wurden Goldelektroden gleichfalls durch einfache Inkubation über Nacht mit den Proteinmutanten modifiziert. Abb. 4 zeigt die Zyklovoltammogramme der so gewonnenen Proteinelektroden und demonstriert die elektrochemische Ansprechbarkeit aller sechs immobilisierten Mutanten. Zum Vergleich wurden auch die Kupfer-freie Form der Mut1C (apo-SOD) sowie der Cystein-freie Wildtyp der SOD untersucht. Für keines der

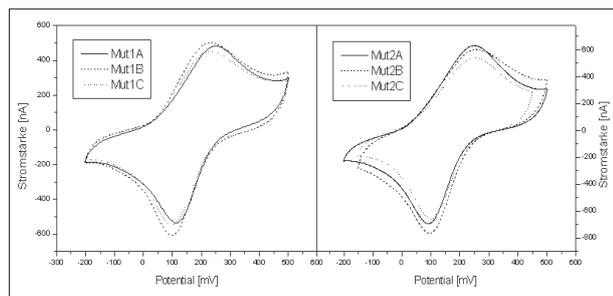


Abb. 4: Zyklische Voltammogramme der SOD-Mutanten. Links: Einzelmutanten (1 Cys-Rest), rechts: Doppelmutanten (2 Cys-Reste). (Puffer: 50 mM HEPES pH 7,5; Scanrate 100mV/s)

beiden Systeme wurde ein elektrochemisches Ansprechen gefunden. Dies unterstreicht noch einmal die Notwendigkeit der eingeführten Cysteinreste für die Proteinimmobilisierung und ordnet die gefundene elektrochemische Umwandlung eindeutig dem aktiven Kupferzentrum des Enzyms zu.

Im Vergleich der einzelnen Mutanten wurden weder in der Proteinmenge auf der Oberfläche noch im formalen Redoxpotential signifikante Unterschiede festgestellt. Die genaue Lage der eingefügten Cysteine verändert also die Orientierung des Proteins zur Elektrodenoberfläche nur geringfügig. Durch eine Variation der Scanrate wurde die Elektronentransfergeschwindigkeitskonstante  $k_s$  bestimmt [12]. Tabelle 1 fasst die bestimmten elektrochemischen Parameter aller untersuchten Proteinmutanten zusammen und vergleicht sie mit den Daten des Wildtyps, der konventionell über eine sogenannte Promotorschicht auf der Goldoberfläche aufgebracht wurde.

Mutante	Formales Potential [mV vs. Ag/AgCl]	$k_s$ [ $\text{s}^{-1}$ ]
Mut1A	$158 \pm 5$	$7,8 \pm 1,7$
Mut1B	$146 \pm 9$	$9,4 \pm 1,5$
Mut1C	$146 \pm 6$	$6,4 \pm 2,7$
Mut2A	$154 \pm 6$	$7,3 \pm 2,1$
Mut2B	$149 \pm 4$	$10,5 \pm 4,1$
Mut2C	$151 \pm 3$	$5,8 \pm 1,3$
Wildtyp	$94 \pm 5$	$6,4 \pm 0,8$

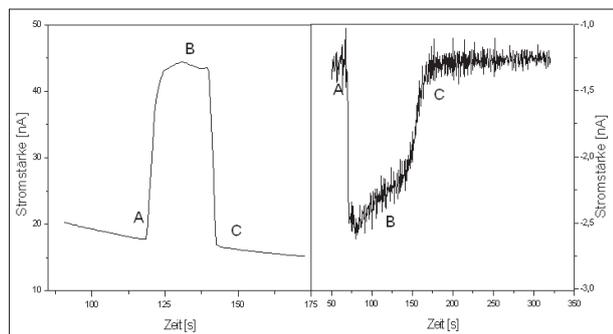
Tabelle 1

Auffällig ist die positive Verschiebung des formalen Redoxpotentials bei den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Derartige Veränderungen in der Lage des formalen Potentials können sowohl den Veränderungen in der Kupferumgebung durch die Mutation als auch der Immobilisierung des Proteins zugeschrieben werden [13, 14]. Die Geschwindigkeit des Elektronentransfers wurde durch die direkte SOD Immobilisierung auf der Goldelektrode im Vergleich zur Nutzung einer zusätzlichen Promotorschicht nur unwesentlich erhöht. Die Verringerung des Abstandes des Kupferzentrums zur Elektrode ist offensichtlich nur gering und/oder andere Faktoren bestimmen hier die Geschwindigkeit des heterogenen Elektronentransfers. Die relativ große Halbpeakbreite von  $\sim 160$  mV im Vergleich zum ideal reversiblen System ( $90$  mV/z) weist auf eine Verteilung von Redoxzuständen auf der Elektrodenoberfläche hin. Dies ist nicht untypisch für Proteinelektroden, jedoch ist die Breite der Verteilung ein mögliches Indiz für stärker heterogene Wechselwirkungen der direkt immobilisierten Proteinmutanten mit der Goldoberfläche. Oxidation und Reduktion des aktiven Zentrums der gewonnenen Proteine sind jedoch rückführbar, und so kann der Elektronentransfer der immobilisierten SOD Mutanten als quasi-reversibel bezeichnet werden.

Die Charakteristika der Protein-modifizierten Elektroden erlauben in summa eine Anwendung als Superoxidsensorelektrode. Ein weiterer Vorteil gegenüber Cyt.c basierten Elektroden ist dabei die SOD-katalysierte Dismutation des Radikals: SOD kann sowohl die Oxidation ( $\text{O}_2^-$  zu  $\text{O}_2$ ) als auch die Reduktion des Radikals ( $\text{O}_2^-$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) katalysieren

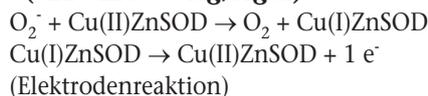
und bietet somit zwei verschiedene Möglichkeiten des Einsatzes einer SOD-Elektrode.

Abb. 5: Amperometrische Radikalmessung mit Mut1C bei +220 mV (links) und -130 mV (rechts). A: Beginn der Radikalgenerierung. B: Plateau bei konstanter Superoxidkonzentration. C: Entfernung des Radikals aus der Lösung.

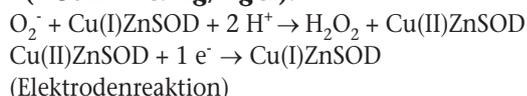


Die Radikalmessungen wurden amperometrisch bei einem konstanten Potential (+220 mV für die Oxidation bzw. -130 mV für die Reduktion des Radikals) über den Zeitraum einiger Minuten durchgeführt. Nach dem Erreichen einer stabilen Basislinie in Abwesenheit von Superoxidradikalen wurde durch ein Enzymsystem (Hypoxanthinoxidation durch Xanthinoxidase) eine konstante Superoxidkonzentration in der Messzelle erzeugt [11]. Abb. 5 zeigt den Stromfluss über die Elektrode in beiden Potentialfenstern für eine Mut1C-Elektrode. Bei +220 mV stieg der Strom nach Beginn der Radikalproduktion steil an (a) und erreichte einen Plateauwert (b) entsprechend der konstanten Superoxidkonzentration, bis die Zugabe einer SOD-Lösung in die Zelle (c) alle Radikale aus der Zelle entfernte und dadurch bedingt auch das Sensorsignal wieder auf den Ausgangswert sank. Bei -130 mV erfolgte das gleiche unter umgekehrten Vorzeichen: Die Superoxidproduktion führte zu einem Reduktionsstrom, der durch Radikalentfernung wieder bis auf den Ausgangswert verringert wurde. Dieses Verhalten ist in Übereinstimmung mit den Erwartungen. Im positiven Potentialbereich wird das Protein vom Radikal reduziert und durch die Elektrode wieder re-oxidiert, wobei Elektronen vom Protein auf die Messelektrode übergehen, was als Oxidationsstromfluss registriert wird. Im negativen Potentialfenster findet der entgegengesetzte Prozess statt. Folgende Gleichungen sollen die Teilprozesse an den Proteinelektroden noch einmal verdeutlichen:

#### I Nutzung der Oxidase-Aktivität des Enzyms (+220 mV vs. Ag/AgCl):



#### II Nutzung der Reduktase-Aktivität des Enzyms (-130mV vs. Ag/AgCl):

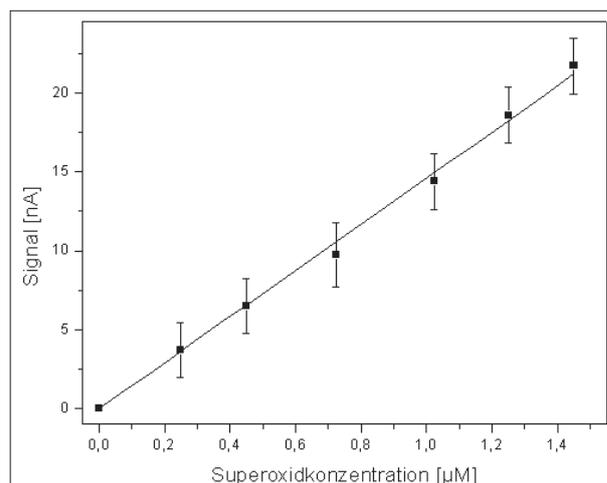


Somit zeigen diese Untersuchungen, dass beide Teilschritte der Dismutationsreaktion im Sensorsystem stattfinden und zur spezifischen Detektion des Radikals genutzt werden können. Die komplette Signalauslöschung durch

die Zugabe einer SOD-Lösung beweist, dass das Signal ausschließlich vom Superoxid herrührt und nicht durch andere Einflüsse bedingt ist. Die Messkurven zeigen darüber hinaus auch, dass die Proteinelektroden schnell auf Konzentrationsänderungen in der Lösung reagieren können und sie somit grundsätzlich zur on-line Radikalbestimmung einsetzbar sind.

Bei gleicher Superoxidkonzentration ist das Nettosignal bei einem Elektrodenpotential von +220 mV deutlich höher als bei -130 mV, weshalb der Sensor in diesem Potentialfenster kalibriert wurde. Dabei wurde das Sensorsignal bei verschiedenen bekannten Radikalkonzentrationen aufgenommen und die Empfindlichkeit der Elektrode mit  $0,23 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  bestimmt (siehe Abb. 6). Dieser Wert übertrifft die Empfindlichkeit bisheriger Cyt.c basierter Elektroden um etwa eine Größenordnung. Damit konnte der erwartete Vorteil der Nutzung eines Erkennungselementes mit einer höheren Reaktionsgeschwindigkeit mit dem Superoxidradikal (SOD) im Verhältnis zu dem oft genutzten Redoxprotein Cytochrom c bestätigt werden.

Abb. 6: Sensorsignal von Mut1C bei +220 mV in Abhängigkeit von der Radikalkonzentration. Fehlerbalken resultieren von unabhängigen Messungen von je 3 Elektroden.



## 4. Zusammenfassung

Sechs Mutanten der monomeren humanen Cu,-Zn-SOD mit ein oder zwei zusätzlichen Cys-Resten wurden durch Computersimulation entworfen und nach molekularbiologischer Methodik in E. coli Bakterien exprimiert. Alle Mutanten konnten mit ausreichender Reinheit und unter Verbleib der Aktivität aufgereinigt werden. Die erfolgreiche Bindung auf Goldoberflächen wurde durch optische und elektrochemische Methoden nachgewiesen, wobei der Cys-freie Wildtyp keine Bindung zeigte, was die Spezifität der SOD-Immobilisierung über die eingeführten Cysteinreste zeigt.

Goldelektroden, die mit den gewonnenen Mutanten modifiziert wurden, zeigten ein quasi-reversibles elektrochemisches Ansprechen. Der Redoxprozess konnte dem aktiven Kupferzentrum zugeordnet werden. Die elektrochemischen Charakteristika der verschiedenen Mutanten Elektroden unterschied sich nur geringfügig, während im

Vergleich zum Cys-freien Wildtyp das formale Redoxpotential signifikant zu positiven Werten verschoben war.

In einem biosensorischen Ansatz konnten beide Teilreaktionen der Dismutation des Radikals zur Signalgewinnung genutzt werden, wobei die Proteinelektrode im positiven Potentialbereich eine deutlich höhere Empfindlichkeit aufwies, welche im Vergleich zu herkömmlichen Cyt.c-Monoschichtelektroden um etwa den Faktor zehn höher ausfiel.

Somit wurde ein neues Biosensorsystem vorgestellt, das neben der signifikant besseren Sensitivität auch den Vorteil einer extrem einfachen und daher auch kostengünstigen einstufigen Sensorenherstellung besitzt. Dieses neue System kann daher zur genaueren Untersuchung der radikalbedingten Vorgänge im Körper und der Entwicklung neuer therapeutischer, antioxidativer Verbindungen eingesetzt werden.

## Literatur

- [1] Kovacic, P.; Jacintho, J. D. *Current Medicinal Chemistry* 2001, 8, 773-796.
- [2] Liang, L. P.; Patel, M. *Journal of Neurochemistry* 2004, 90, 1076-1084.
- [3] Mak, S.; Newton, G. E. *Chest* 2001, 120, 2035-2046.
- [4] Lisdat, F.; Ge, B.; Ehrentreich-Forster, E.; Reszka, R.; Scheller, F. W. *Analytical Chemistry* 1999, 71, 1359-1365.
- [5] Buttemeyer, R.; Philipp, A. W.; Mall, J. W.; Ge, B. X.; Scheller, F. W.; Lisdat, F. *Microsurgery* 2002, 22, 108-113.
- [6] McCord, J. M.; Fridovich, I. J. *Biol. Chem.* 1969, 244, 6049-6055.
- [7] Ge, B.; Scheller, F. W.; Lisdat, F. *Biosensors & Bioelectronics* 2003, 18, 295-302.
- [8] Tian, Y.; Mao, L.; Okajima, T.; Ohsaka, T. *Analytical Chemistry* 2002, 74, 2428-2434.
- [9] Ohsaka, T.; Tian, Y.; Shioda, M.; Kasahara, S.; Okajima, T. *Chemical Communications* 2002, 990-991.
- [10] Getzoff, E. D.; Cabelli, D. E.; Fisher, C. L.; Parge, H. E.; Viezzoli, M. S.; Banci, L.; Hallewell, R. A. *Nature* 1992, 358, 347-351.
- [11] Ge, B.; Lisdat, F. *Analytica Chimica Acta* 2002, 454, 53-64.
- [12] Laviron, E. In *J. Electroanal. Chem.*, 1978; Vol. 101, pp 19-28.
- [13] Tarlov, M. J.; Bowden, E. F. *Journal of the American Chemical Society* 1991, 113, 1847-1849.
- [14] Taniguchi, I.; Toyosawa, K.; Yamaguchi, H.; Yasukouchi, K. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* 1982, 1032-1033.

## Autoren

Dr. rer. nat. Moritz K. Beissenhirtz

Hebrew University of Jerusalem  
The Institute of Chemistry  
91904 Jerusalem, Israel  
Tel. +972 2 6585272  
beissenhirtz@gmail.com

**Prof. Dr. rer. nat. habil. Frieder W. Scheller**  
Universität Potsdam  
Institut für Biochemie und Biologie  
Analytische Biochemie  
Karl-Liebknecht-Str. 24-25, H. 25  
14476 Golm  
fshell@rz.uni-potsdam.de

**Dr. rer. nat. Maria S. Viezzoli**  
CERM, University of Florence  
Via Sacconi 6  
50019 Sesto Fiorentino, Italien

**Prof. Dr. rer. nat. habil. Fred Lisdat**  
Technische Fachhochschule Wildau  
Biosystems Technology  
Tel. +49 3375 508-456  
flisdat@igw.tfh-wildau.de