

Untersuchung der Tyrosinase-Expression in nicht-metastatischen und metastatischen Melanomgeweben durch elektrochemische Rastersondenmikroskopie

Tzu-En Lin, Alexandra Bondarenko, Andreas Lesch, Horst Pick, Fernando Cortés-Salazar und Hubert H. Girault*

Abstract: Trotz des enormen Fortschritts, der bei der Diagnose von Melanomen erzielt wurde, bleibt die zuverlässige Erkennung der verschiedenen Malignomstadien eine Herausforderung. Derzeitige Strategien setzen auf die optische Erfassung der Konzentration und räumlichen Verteilung spezifischer Biomarker. Neueste optische Methoden können allerdings durch Interferenzen mit Hintergrundfarben und durch Autofluoreszenz beeinflusst werden. Wir bewältigen diese Defizite hier unter Einsatz der elektrochemischen Rastersondenmikroskopie (SECM), um den prognostischen Indikator Tyrosinase (TyR) in nicht-metastatischen und metastatischen Melanomgeweben mithilfe einer weichen Mikroelektroden-sonde abzubilden. Das elektrochemische Auslesen der TyR-Verteilung wurde durch das Adaptieren eines immunchemischen Verfahrens ermöglicht. Wir zeigen, dass die SECM die erwähnten Beschränkungen optischer Methoden übertreffen kann und bisher nicht gekannte Möglichkeiten für eine verbesserte Diagnose und das Verständnis der räumlichen Verteilung von TyR in verschiedenen Melanomstadien eröffnet.

Das Melanom ist einer der tödlichsten Hauttumore, an dem weltweit pro Jahr über 132 000 Personen erkranken.^[1] Frühe Melanomstadien (Stadien 0, I und II) können geheilt werden. Jedoch sinkt die Überlebensrate drastisch bei metastatischen Melanomen (Stadien III und IV), weil der Krebs bereits in die Lymphknoten und andere Organe eindringt.^[2] Infolgedessen werden chirurgische Behandlungen und ergänzende Therapien angewendet, die eine Immuntherapie oder Chemotherapie mit einschließen können. Zuverlässige Methoden für eine eindeutige Identifizierung von Krebsmetastasen sind daher von großer Bedeutung. Da Melanome und gutartige Muttermale ähnlich aussehen, erschwert dies die einfache Krebserkennung. Die vorherrschende Methode zur Erkennung von Hautkrebs basiert auf dem Nachweis von speziellen

Biomarkern in Biopsiegeweben mittels der Immunhistochemie (IHC) in Kombination mit pathologischen Analysemethoden. Biomarker werden in der IHC üblicherweise durch immunhistologische Nachweise mit funktionalisierten Markermolekülen (z. B. Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) oder Fluoreszenzfarbstoffen) sichtbar gemacht. Allerdings sind optische Methoden in der Praxis oft nur begrenzt möglich und können potentiell zu unsicheren Befunden führen. Melanin z. B. ähnelt farblich dem Chromogen 3,3'-diaminobenzidine (DAB), welches gewöhnlich in der IHC Anwendung findet (Hintergrundinformationen, SI-1).^[3] Außerdem kann die Erkennung einer Fluoreszenzmarkierung durch zelluläre Autofluoreszenz oder Photobleiche erschwert werden.^[4]

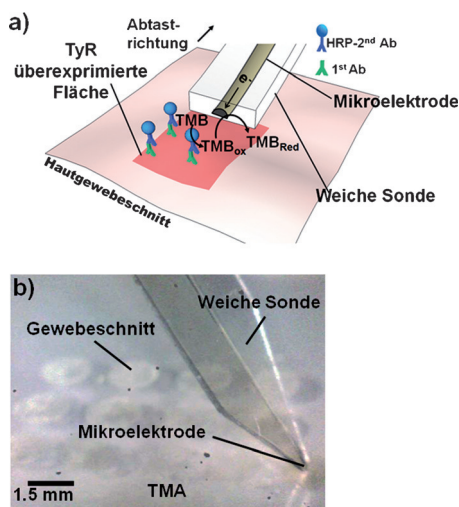
Elektrochemische Methoden können daher eine vielversprechende Alternative darstellen, da sie ausschließlich auf der elektrochemischen Erfassung von redoxaktiven Spezies in Verbindung mit Biomarkern beruhen. Die elektrochemische Rastersondenmikroskopie (SECM, scanning electrochemical microscopy) ist eine Abbildungsmethode der Oberflächenreaktivität mit hoher räumlicher Auflösung und Empfindlichkeit, die zwar zur Untersuchung von Leberzellkulturen,^[5] jedoch bisher selten für Gewebe genutzt worden ist. So sind z. B. die enzymatische Aktivität und Sauerstoffproduktion/verbrauch in Pflanzengeweben und sogenannten Mikrogeweben (micro tissues) aufgezeichnet worden.^[6] Die SECM wurde auch zur Untersuchung des molekularen Transports durch Hautproben hindurch angewendet.^[7] Die lateralen Ausmaße von Gewebeproben können im Quadrat-zentimeterbereich und Höhenunterschiede im kritischen Bereich der SECM-Sonde liegen. Weil die Wechselwirkung zwischen Probe und Sonde vom Arbeitsabstand d abhängt, kann die Interpretation von Messdaten unebener Proben mühselig werden. Ein unkontrollierter d kann beim Rastern nahe am Gewebe zu Zusammenstoßen von Sonde und Probe führen, was zu irreparablen Schäden des Gewebes und zur Kontamination der Sonde führen kann. Ersteres tritt insbesondere ein wenn Mikroelektroden (MEs) benutzt werden, die in einer harten Glasummantelung eingebettet sind.

Hier stellen wir den Einsatz der SECM zum präzisen Abbilden der Tyrosinase(TyR)-Verteilung in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebemikroarrays (TMAs, tissue micro arrays) von Hautbiopsiegeweben vor, die neun Patienten entnommen wurden. TyR ist ein Kupfer enthaltendes Enzym, das die Produktion von Melanin steuert^[8] und als hochselektiver Indikator für die prognostische Diagnose von schwarzem Hautkrebs benutzt werden kann.^[9] Vor

[*] T.-E. Lin, A. Bondarenko, A. Lesch, F. Cortés-Salazar, Prof. H. H. Girault
Laboratoire d'Electrochimie Physique et Analytique, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, EPFL Valais Wallis CH-1951 Sion (Schweiz)
E-Mail: hubert.girault@epfl.ch
H. Pick
Laboratory of Physical Chemistry of Polymers and Membranes, École Polytechnique Fédérale de Lausanne CH-1015 Lausanne (Schweiz)

Hintergrundinformationen und ORCID's der Autoren zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201509397> zu finden.

kurzem wurde dies für Biopsieproben demonstriert, die in einer elektrochemischen Biosensorplattform analysiert wurden.^[10] In dieser Studie wurde zur Aufzeichnung der Melanomstadien eine Immundetektionsstrategie für TyR durch die elektrochemische Erfassung von TMB_{ox} adaptiert, welches das enzymatische Reaktionsprodukt zwischen Tetramethylbenzidin (TMB), H₂O₂ und HRP ist (Schema 1 a).^[11] Weiche ME-Sonden wurden benutzt, die imstande sind, empfindliche Proben mit topographischen Merkmalen in einem sanften, streich-ähnlichen Kontaktmodus und mit einem konstanten d abzurastern (Schema 1 b).^[12] Diese weichen SECM-Sonden wurden zuvor von unserer Gruppe für einen einfachen und kostengünstigen Abstandskontrollmechanismus eingeführt. Alternative Verfahren erfordern die Kombination der SECM mit Abstandskontrollmethoden auf technisch und experimentell anspruchsvollem Niveau.^[5b,13]



Schema 1. a) Prinzip der Immunassay-basierten Detektionsstrategie zur Abbildung der TyR-Verteilung in Gewebeschnitten durch die Benutzung von TMB als redoxaktive Spezies und einer weichen SECM-Sonde. b) Photographische Abbildung einer weichen Sonde wenn diese über ein TMA rastert.

Abbildung 1a zeigt lineare SECM-Abtastungen über Hautbiopsieschnitte, die die Melanomstadien II (nicht-metastatisch) und III (metastatisch) und normales Hautgewebe von drei verschiedenen Patienten enthalten. Eine herkömmliche Pt-ME kam im Konstanthöhenmodus zum Einsatz, wobei d in Bezug auf die Glasauflage des TMA ausgerichtet wurde und nicht auf die Gewebeoberfläche (experimentelle Details in SI-2; Abtastbewegungen in SI-3). Im Ergebnis wurde die höchste Expressionsstufe von TyR in Gewebeproben des Stadiums II beobachtet. Eine niedrigere Stufe von TyR wurde in normaler Haut gefunden, in der TyR in moderaten Mengen von Melanozyten produziert wird, die in der unteren Schicht der Epidermis lokalisiert sind. Wie anhand der Abbildung 1a ersichtlich, wurden über dem Gewebeschnitt im Stadium III viel kleinere Ströme gemessen als der Basislinienstrom (definiert als der gehinderte Diffusionsstrom gemessen über dem isolierenden Glassubstrat). Die Diffusion der redoxaktiven Spezies zur ME hin wurde aus-

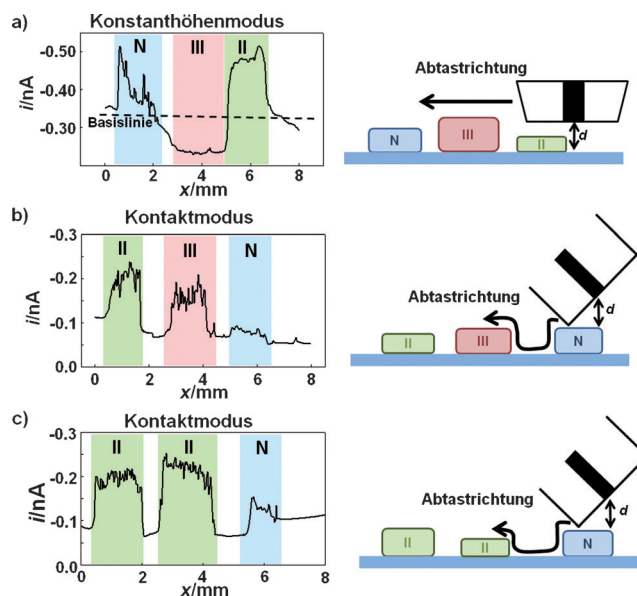


Abbildung 1. a) Lineare SECM-Abtastungen im Konstanthöhenmodus aufgenommen mit einer konventionellen Mikroelektrode und b–c) im Kontaktmodus aufgenommen mit einer weichen SECM-Sonde über einem TMA, das normale Haut- (blau, N) und Melanomgewebeschnitte im Stadium II (grün, II) und Stadium III (rot, III) enthält. Jeder Gewebeschnitt kam von einem anderen Patienten. Die Abbildungen rechts illustrieren schematisch beide Abtastmodi.

gehend vom sehr kleinen d über dem relativ dicken Gewebeschnitt im Stadium III signifikant blockiert. Diese Beobachtung wird durch topographische Messungen der Gewebeproben gestützt, die im hydrierten Zustand in der Messlösung aufgezeichnet wurden (SI-4). Stadium-III-Proben zeigten ein stärkeres Anschwellen und dadurch größere Höhenunterschiede. Das hat zur Folge, dass die korrekte Interpretation der im Konstanthöhenmodus über einem TMA gemessenen Daten eine Herausforderung darstellt. Aus diesem Grund können Gewebeschnitte im Kontaktlosmodus nur sequentiell nach jeweiliger Justierung von d untersucht werden (SI-5). Hinzu kommt, dass das Abtasten im Konstanthöhenmodus über solch große Probenflächen mikroskopisch kleine Kratzer herbeiführen kann oder dass das Gewebematerial durch den mechanischen Kontakt zwischen der ME und dem Gewebe teilweise abgelöst wird (SI-6).

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde eine weiche Sonde (Details in SI-2) für das Rastern im Kontaktmodus von Biopsieproben sechs weiterer Patienten verwendet (Abbildungen 1 b,c, SI-3). Es ist erwähnenswert, dass die Gewebeschnitte durch die schwachen Kräfte, die durch die weiche Sonde auf die Probe wirken, während des Abtastens im Kontaktmodus nicht beschädigt wurden (SI-7).^[14] Außerdem wurden alle sechs Gewebeschnitte von unterschiedlichen Personen bereitgestellt, sodass die so erhaltenen Daten die Reproduzierbarkeit des SECM-Verfahrens belegen. Die unterschiedlichen TyR-Abstufungen, d.h. Stadium II > normale Haut, wurden mit großer Gewissheit und Empfindlichkeit erkannt. Das Melanom im Stadium III zeigte über dem gesamten Gewebeschnitt einen leicht niedrigeren TyR-Gehalt als im Stadium II. Es ist bereits aus der Literatur bekannt,

dass die TyR-Verteilung im Gewebe im Stadium III heterogen ist,^[11b] und daraus folgend sind einzelne lineare SECM Abtastungen nicht repräsentativ.

Deshalb wurden SECM-Abbildungen sowohl von normaler Haut als auch von Melanomschnitten der Stadien II und III aufgenommen und mit jeweiligen Gewebestücken verglichen, die mit der konventionellen IHC überprüft wurden (Abbildung 2). Die SECM-Abbildung in Abbil-

schiedene TyR-abhängige Hautkrankheiten hinzudeuten, könnte das vorgestellte SECM-Verfahren weitere Anwendungen zur Filteruntersuchung (screening) bieten. Die Spezifität des hier angewendeten TyR-Immunoassays wurde durch die Protokollanwendung ohne Einsatz primärer Antikörper bestätigt, welches einen nur unbedeutenden Einfluss von unspezifischer Bindung zeigte (SI-8). Die TyR wird in der konventionellen IHC mit einem spezifischen pinken Chromogen markiert (SI-2), und somit ist die Erfassung im Melanomstadium III stark durch Melanin überlagert (Abbildung 2c). Im Gegensatz dazu wird die elektrochemische Erfassung von TyR mithilfe der SECM nicht durch farbliche Hintergrundproben beeinträchtigt (SI-1 und SI-7).

Die Bedeutung des Abbildens der lokalen TyR-Verteilung wird offensichtlich wenn die Ströme an neun repräsentativen Positionen in jedem Gewebeschnitt gemittelt werden, was die globale TyR-Konzentration wiedergibt (Details in SI-9). Im Balkendiagramm in Abbildung 2e zeigt das Melanom im Stadium II den größten gemittelten Strom, gefolgt von der normalen Haut und dem Melanom im Stadium III. Daraus abgeleitet könnten die geringeren Ströme im Melanomstadium III fälschlicherweise als normale Haut interpretiert werden. Dennoch wird anhand der SECM-Abbildung und dem entsprechenden 2D-Diagramm (Abbildung 2f) ersichtlich, dass der geringere gemittelte Strom im Stadium III das Ergebnis der heterogenen TyR-Verteilung ist. Die SECM-Ströme waren lokal größer als im Stadium II. Das SECM-Abbildungsverfahren macht die abnor-

me Verteilung der TyR (hier nicht bezogen auf die basale Schicht der Epidermis) sichtbar und bestätigt die korrekte Erkennung der Melanomgewebeschnitte im Stadium III. Dies zeigt die Limitierung traditioneller Sensoren, die nur die globale Konzentration gewisser Biomarker messen, während gleichzeitig der Vorteil der räumlichen Auflösung demonstriert wird. Die Unterscheidung zwischen den Melanomstadien II und III ist von großer Bedeutung, da dies in drastischer Weise die Wahl der medizinischen Behandlung in Bezug auf Chemo-, Immun- oder TyR-DNA-Impfstofftherapie beeinflusst (SI-10).^[16]

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die SECM an Hautbiopsiegewebe von mehreren Melanompatienten die genaue Aufzeichnung der TyR-Expression und Verteilung in verschiedenen Melanomstadien ermöglicht. Ein Immunassay fand dabei zur Unterscheidung der Melanomstadien II und III mithilfe einer weichen SECM-Sonde für das sanfte Streichen von empfindlichen Gewebeproben im Kontaktmodus Anwendung. Die Veränderung der homogenen TyR-Verteilung im Stadium II hin zu einer heterogenen im Stadium III

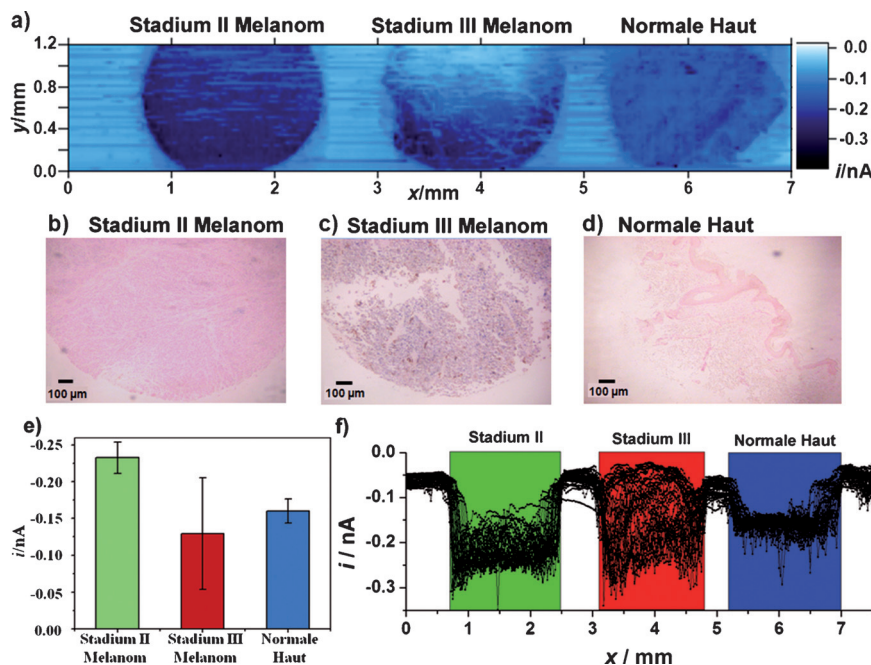


Abbildung 2. a) SECM-Kontaktmodusabbildung der Melanomstadien II und III sowie von normalem Hautgewebe nach Immunfärbung der TyR. b–d) Photographien der Gewebestücke nach der IHC. Ähnliche, aber verschiedene Gewebeproben wurden in (a) bzw. (b–d) benutzt. TyR wurde pink eingefärbt. e) Gemittelte Ströme der normalen Haut sowie von Melanomen im Stadium II und Stadium III. Neun Stromwerte wurden von jedem Gewebeschnitt extrahiert und gemittelt. f) 2D-Diagramm aller linearen Abtastungen der SECM-Messungen in Abbildung 2a.

Abbildung 2a weist deutlich auf die homogene Überexpression von TyR im Stadium II und die heterogene Verteilung im Melanomstadium III hin. Tumore tendieren dazu, verschiedene Mechanismen der Immununterdrückung zu entwickeln, um der Entdeckung und Beseitigung durch das Immunsystem zu entgehen.^[15] Verdeckung oder Mutation von Tumorantigenen sind mögliche Strategien, mit denen der Tumor der Erkennung durch das Immunsystem entgeht, sie führen zur Tumorpheriferation und Metastasenbildung. TyR wird als ein tumorassoziiertes Antigen durch das Immunsystem erkannt, und der graduelle Rückgang der TyR begünstigt die Nichterkennung des Tumors. Die TyR-Verteilung im Melanomstadium III ist als direkte Folge heterogenen und der Gehalt leicht vermindert, was durch die von uns gezeigten Daten bestätigt wird. In normalem Hautgewebe ist der TyR-Gehalt zur Basalschicht der Epidermis hin, in der normale Melanozyten lokalisiert sind, leicht erhöht. Diese beobachtete Polarität der TyR-Verteilung stimmt mit anderen Berichten aus der Literatur überein.^[11b] Da Verteilungsmuster der TyR anders als die hier gezeigten dafür bekannt sind, auf ver-

wurde deutlich sichtbar gemacht, und im Vergleich mit der IHC wird das SECM-Konzept nicht durch die Anwesenheit optisch überlagernder Spezies wie Melanin beeinträchtigt. Daraus folgend könnte das SECM-Abbildungsverfahren der TyR möglicherweise direkt oder als ergänzende prognostische Technik zur Diagnose von metastatischen und nicht-metastatischen Melanomstufen eingeführt werden. Weiche ME-Arrays werden die Analyseverfahren beschleunigen, um auch Krebsgewebelbibliotheken von klinisch relevanten Mengen zu überprüfen.^[14b,17] Des Weiteren könnte die Integration von mikrofluidischen Kanälen in die weiche Sonde die weiterführende Kontrolle der Mikroumgebung um die Zellen herum für die gleichzeitige elektrochemische, Fluoreszenz- und Massenspektrometrieerfassung ermöglichen.^[18]

Danksagung

T.-E.L. dankt dem taiwanischen Bildungsministerium (MOE, Ministry of Education) für das 2013 MOE Technologies Incubation Stipendium und Dr. Chi-Lin Li (National Taiwan University) für die Unterstützung bei der Anfertigung von Schema 1 a. Dem SNF (Schweiz) und dem UEFISCDI (Rumänien) wird für die Unterstützung innerhalb des Projekts Nr. IZERZO_142236/1 gedankt.

Stichwörter: Elektrochemische Rastersondenmikroskopie · Gewebeschnitte · Melanome · Tyrosinase · Weiche Sonden

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3813–3816
Angew. Chem. **2016**, *128*, 3878–3881

- [1] J.-S. Taylor, *Science* **2015**, *347*, 824.
 [2] a) V. Gray-Schopfer, C. Wellbrock, R. Marais, *Nature* **2007**, *445*, 851–857; b) B. E. G. Rothberg, M. B. Bracken, D. L. Rimm, *J. Natl. Cancer Inst.* **2009**, *101*, 452–474.
 [3] a) M. N. Bobrow, K. J. Shaughnessy, G. J. Litt, *J. Immunol. Methods* **1991**, *137*, 103–112; b) C. Cao, S. J. Sim, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1874–1880; c) S. Zhang, J. Yang, J. Lin, *Bioelectrochemistry* **2008**, *72*, 47–52.
 [4] M. Monici, *Biotechnol. Annu. Rev.* **2005**, *11*, 227–256.
 [5] a) B. Liu, S. A. Rotenberg, M. V. Mirkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9855–9860; b) Y. Takahashi, A. I. Shevchuk, P. Novak, B. Babakinejad, J. Macpherson, P. R. Unwin, H. Shiku, J. Gorelik, D. Klenerman, Y. E. Korchev, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 11540–11545; c) M. Nebel, S. Grützke, N. Diab, A. Schulte, W. Schuhmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6335–6338; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6460–6463; d) S. Rapino, R. Marcu, A. Bigi, A. Soldà, M. Marcaccio, F. Paolucci, P. G. Pelicci, M. Giorgio, *Electrochim. Acta* **2015**, *179*, 65–73.
 [6] a) L. Gac, A. Sridhar, H. L. D. Boer, A. V. D. Berg, *PLoS One* **2014**, *9*, e93618; b) A. Sridhar, A. V. D. Berg, S. Le, *Electroanalysis* **2014**, *26*, 1881–1885; c) R. Zhu, S. M. Macfie, Z. Ding, *J. Exp. Bot.* **2005**, *56*, 2831–2838; d) M. Tsionsky, Z. G. Cardon, A. J. Bard, R. B. Jackson, *Plant Physiol.* **1997**, *113*, 895–901; e) H. Zhou, H. Shiku, S. Kasai, H. Noda, T. Matsue, H. Ohya-Nishiguchi, H. Kamada, *Bioelectrochemistry* **2001**, *54*, 151–156.
 [7] a) B. D. Bath, R. D. Lee, H. S. White, E. R. Scott, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 1047–1058; b) E. R. Scott, H. S. White, J. B. Phipps, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1537–1545.
 [8] a) L. Xiao, K. Matsubayashi, N. Miwa, *Arch. Dermatol. Res.* **2007**, *299*, 245–257; b) V. J. Hearing, K. Tsukamoto, *FASEB J.* **1991**, *5*, 2902–2909.
 [9] G. E. Orchard, *Histochem. J.* **2000**, *32*, 475–481.
 [10] M. Mossberg, S. Vernick, R. Ortenberg, G. Markel, Y. Shacham-Diamand, J. Rishpon, *Electroanalysis* **2014**, *26*, 1671–1675.
 [11] a) J. L. Boyle, H. M. Haupt, J. B. Stern, H. A. B. Mulhaupt, *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2002**, *126*, 816–822; b) G. F. L. Hofbauer, J. Kamarashev, R. Geertsen, R. Böni, R. Dummer, *J. Cutaneous Pathol.* **1998**, *25*, 204–209; c) M. Urosevic, B. Braun, J. Willers, G. Burg, R. Dummer, *Exp. Dermatol.* **2005**, *14*, 491–497; d) T.-E. Lin, F. Cortés-Salazar, A. Lesch, L. Qiao, A. Bondarenko, H. H. Girault, *Electrochim. Acta* **2015**, *179*, 57–64.
 [12] a) F. Cortés-Salazar, M. Träuble, F. Li, J.-M. Busnel, A.-L. Gassner, M. Hojeij, G. Wittstock, H. H. Girault, *Anal. Biochem.* **2009**, *381*, 6889–6896; b) A. Lesch, D. Momotenko, F. Cortés-Salazar, F. Roelfs, H. H. Girault, G. Wittstock, *Electrochim. Acta* **2013**, *110*, 30–41.
 [13] a) J. V. Macpherson, P. R. Unwin, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 276–285; b) B. B. Katemann, A. Schulte, W. Schuhmann, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2025–2033; c) T. H. Treutler, G. Wittstock, *Electrochim. Acta* **2003**, *48*, 2923–2932; d) A. G. Güell, N. Ebejer, M. E. Snowden, J. V. Macpherson, P. R. Unwin, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7258–7261; e) C. Kranz, G. Friedbacher, B. Mizaikoff, A. Lugstein, J. Smoliner, E. Bertagnolli, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2491–2500.
 [14] a) A. Lesch, D. Momotenko, F. Cortés-Salazar, I. Wirth, U. M. Tefashe, F. Meiners, B. Vaske, H. H. Girault, G. Wittstock, *J. Electroanal. Chem.* **2012**, *666*, 52–61; b) A. Lesch, B. Vaske, F. Meiners, D. Momotenko, F. Cortés-Salazar, H. H. Girault, G. Wittstock, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10413–10416; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10559–10563.
 [15] a) P. Alexander, *Cancer Res.* **1974**, *34*, 2077–2082; b) F. H. Igney, P. H. Kramer, *J. Leukocyte Biol.* **2002**, *71*, 907–920.
 [16] J. Yan, C. Tingey, R. Lyde, T. C. Gorham, D. K. Choo, A. Muthumani, D. Myles, L. P. Weiner, K. A. Kraynyak, E. L. Reuschel, T. H. Finkel, J. J. Kim, N. Y. Sardesai, K. E. Ugen, K. Muthumani, D. B. Weiner, *Cancer Gene Ther.* **2014**, *21*, 507–517.
 [17] F. Cortés-Salazar, D. Momotenko, H. H. Girault, A. Lesch, G. Wittstock, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1493–1499.
 [18] a) A. Bondarenko, F. Cortés-Salazar, M. Gheorghiu, S. Gáspár, D. Momotenko, L. Stanica, A. Lesch, E. Gheorghiu, H. H. Girault, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 4479–4486; b) D. Momotenko, F. Cortés-Salazar, A. Lesch, G. Wittstock, H. H. Girault, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 5275–5282.

Eingegangen am 8. Oktober 2015,
 veränderte Fassung am 2. Dezember 2015
 Online veröffentlicht am 5. Februar 2016