

Molekular Geprägte Polymere als Specifier in Elektrochemischen Sensoren

Frieder W. Scheller¹, Xiaorong Zhang¹, Aysel Oktay², Anne Ettner³, Aysu Yarman^{1,2}

¹Institut für Biochemie und Biologie, Universität Potsdam, Potsdam, Deutschland

²Türkisch Deutsche Universität, Molekulare Biotechnologie, Istanbul, Türkei

³Anne Ettner Pharma Consulting, Wollbach, Deutschland

Kontakt: fschell@uni-potsdam.de, aysu.yarman@tau.edu.tr

Einleitung

Vor fast 100 Jahren entwickelte Otto Warburg den „Optischen Test“ zur Messung der Zellatmung mittels der Anzeige von NADH. Dieses Prinzip der Kopplung einer biologischen Reaktion mit einem physikalischen oder chemischen Signalwandler ist auch die Basis der *enzymatischen Tests, der Enzymelektroden, Immunosensoren und Nukleinsäure Chips* (Tab.1).

Tab. 1: Meilensteine der Bio(mimetischen) Sensorik

	Optische Test	Warburg
1931	Molecularly Imprinted Polymer (MIP)	Polyakov
1962	Enzym-Elektrode	Clarck
1964	Glucose-Teststreifen	Bergmeyer
1970	Kovalente MIPs	Wulff
1975	Monoklonale Antikörper	Milstein, Köhler
1980	Nicht-kovalente MIPs	Mosbach
1983	Glucose-Analysatoren	YSI, Glucometer ZWG
1984	Spiegelmer	Erdmann
1985	Protein-MIPs	Mosbach
1987	Exac Tech	MediSense, Hill
1990	SELEX	Ellington, Szostak, Roberts, Joyce, Turek, Gold
1994	BIACore	Pharmacia, Lundström
1994	DNA-Chip	Affimatrix, Fodor
1994	Cell IP	Vulfson
1996	Next Generation Sequencing	Deamer
1997	Apatzyme	Breaker
1998	High Affinity RNA Sensor	Erdmann
2000	Epitop-MIP	Rachkov, Minura
2003	Virus IP	Dickert
2013	AptaMIP	Spivak
2014	Free Style Libre	Abbott, Heller

MIP
Aptamere
Enzyme
Antikörper
Nukleinsäuren

Zum Ersatz oder auch zur Ergänzung von Antikörpern für niedermolekulare Substanzen wie Antibiotika, Umweltgifte und Pharmaka, aber auch für Proteinbiomarker, Viren und Mikroorganismen in Trennungstechniken, Diagnostik und Therapie, wurden Bindermoleküle auf der Basis von Oligonukleotiden (Aptamere) mittels des SELEX Verfahrens und voll synthetische „Molekular Geprägte (Imprinted) Polymere“ (MIPs) entwickelt. Diese Specifier können ohne Versuchstiere auch für toxische, schwach immunogene und

sogar unbekannte Strukturen hergestellt werden und erreichen zu Antikörpern vergleichbare Affinitäten.

Bereits 1931 hatte der russischen Wissenschaftler Polyakov ein synthetisches Polymer mit „molekularem Gedächtnis“ beschrieben: Die funktionellen Gruppen der Monomeren treten vor der Polymersynthese mit komplementären Funktionalitäten des Templats im „Präpolymerisations-Komplex“ in Wechselwirkung. Diese molekulare Vorlage - das Templat - wird anschließend in das polymere Netzwerk eingebaut [1]. Beim Entfernen des Templats werden Kavitäten gebildet, die vergleichbar zu den Paratopen der Antikörper das Templat bevorzugt binden (Abb.1).

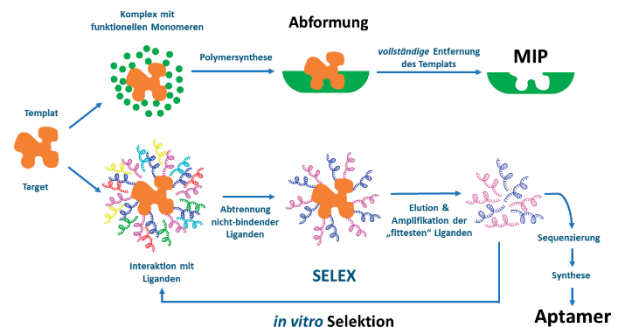


Abb. 1: Schematische Darstellung der Erzeugung von Molekular Geprägten Polymeren (MIPs) im Vergleich mit der Generierung von Aptameren [2].

Im Gegensatz zur Homöopathie, die ebenfalls ein „Gedächtnis“ für ihre „Kügelchen“ beansprucht, wurde für die MIPs die An- oder die Abwesenheit der Targets im Polymer mit physikalischen Methoden belegt. Allerdings ist schwer vorstellbar, wie „Ion Imprinted Polymers“ eine Spezifität besitzen können.

Vom Bulk Imprinting zu MIP-Arrays

Nach einer „Lag-Phase“ von fast 40 Jahren seit Polyakovs Erfindung wurden von Wulff und Mosbach wichtige Fortschritte erzielt und der Begriff MIP (Molecularly Imprinted Polymer) kreiert [3,4]. Für die MIP-Synthese werden nur ein bis zu fünf Monomere und u.U. ein Vernetzter (cross-linker) benötigt, während Antikörper aus den 20 Aminosäuren der Proteine aufgebaut sind.

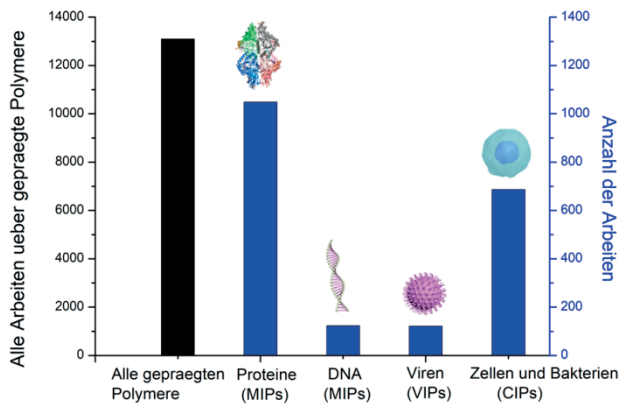


Abb. 2: Anzahl der Publikationen von 1990 bis 2022 über „Geprägte Polymere“ (Quelle: Web of Science)

Zunächst konnten MIPs nur für kleine Moleküle hergestellt werden. Danach gelang die Erweiterung von den MIPs für die Erkennung von Stoffwechselprodukten, Pharmaka, Umwelttoxinen auf MIPs für Biomakromoleküle, Zellen, Viren und synthetische Nanopartikel [5-10]. Zurzeit dominieren noch MIPs für niedermolekulare Analyten in den jährlichen etwa 1.200 Publikationen (Abb.2), aber der Anteil von MIPs für Makromoleküle liegt schon bei über zehn Prozent [11]. Am Anfang der Entwicklung wurden molekular geprägte Polymere durch thermische oder Photopolymerisation von Methacrylsäure-, Vinylimidazol- und Vinylpyridinderivaten als „Bulk-Polymere“ hergestellt. Zum Einsatz in Chromatographiesäulen oder Sensoren müssen die Polymerkörper mechanisch zerkleinert werden. Später wurde die Dicke der Polymerschicht auf die Dimension des Targets reduziert, um die Templat-Entfernung zu verbessern und die Zugänglichkeit der Bindungsstellen zu erhöhen. Dabei werden Makromoleküle nur partiell im Polymer eingebettet. Beim „Oberflächen-Imprinting“ werden selbstorganisierende Monoschichten (*Self-Assembled Monolayers*, SAMs), die spontane „Selbstpolymerisation“ von Dopamin oder Elektropolymerisation direkt auf der Transduktoroberfläche eingesetzt. Die Festphasensynthese wird häufig für das Oberflächen-Imprinting von Proteinen und Nucleinsäuren benutzt [12-15]. Für intakte Zellen hat sich das „Microcontact Imprinting“ bewährt, wobei ein mit dem Templat beladener Stempel auf eine weiche Präpolymerisationsschicht gepresst wird [6].

Nach der Polymersynthese muss das Templat effektiv vom MIP entfernt werden. Dabei soll die Polymerstruktur nicht verändert werden, damit die Funktionalität der Bindungsstellen erhalten bleibt. Beim „template removal“ werden meist mehrere Verfahren kombiniert, z.B. Temperaturerhöhung, Änderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke, Behandlung mit Detergenzien oder organischen Lösungsmitteln.

Gegenwärtig erzielen MIPs Affinitäten gegenüber niedermolekularen Analyten, Biomakromolekülen und Zellen, die mit denen für Antikörper konkurrieren können, was zu dem Begriff *Plastibodies* für MIPs führte. Die Dissoziationskonstanten K_D liegen bei den meisten MIPs im millimolaren bis nanomolaren Konzentrationsbereich. Es werden aber auch MIPs (vor allem für Peptide und Proteine) mit Messbereichen im sub-nanomolaren und sogar attomolaren Bereich beschrieben [16]. Dabei ist aber zu fragen, wie die Bindung des Target-Moleküls an das Polymer zu diesen hohen Affinitäten führen kann.

Imprinten von Substrukturen: Epitope, Tags und Labeln

In Analogie zur Antigen-Antikörper-Wechselwirkung bei der Erkennung von Makromolekülen haben Rachkov und Minura das „Epitopkonzept“ für MIPs hervorgebracht. Das MIP erkennt wie der Antikörper nur eine Substruktur (ein Fragment), aber bindet trotzdem das gesamte Target [17]. Das Prinzip wurde zuerst für das nona-Peptid Oxytocin demonstriert, bei dem das C-terminale Tetrapeptid als Templat diente und das MIP (nach Templat-Entfernung) das Peptidhormon mit vergleichbarer Affinität bindet.

Für eine hohe Spezifität sind aber längere Peptide erforderlich, weshalb meist Peptide mit sechs bis fünfzehn Aminosäuren als Templat verwendet werden [18]. Häufig werden N- oder C-terminale Peptide für MIPs zur Bindung von Proteinen, z.B. Cytochrom c, Rinderserumalbumin benutzt. In Analogie zur Bindung von Antikörpern an exponierte nicht-terminale Epitope, wurden MIPs auch für nicht-terminalen Sequenzen erfolgreich synthetisiert, z.B. für die Rezeptorbindungs-Domäne (RBD) von SARS Cov-2 und Troponin T. Dabei ist es überraschend, dass trotz der offensichtlich unterschiedlichen Struktur des „freien“ Peptids und des Epitops im Protein beide an das Peptid-imprintete MIP binden.

Wir verwendeten das am C-Terminus um ein Cystein verlängerte nona-Peptid SKTRAALGVC (SK-Peptid) für ein Epitop-MIP zur Bindung des 69kD-Glycoproteins alpha-Fetoprotein (AFP) [19] und für die RBD von SARS Cov-2 das Peptid GFNCYFP (G-Peptid) als Templat [20]. Die K_D -Werte des Epitop-MIPs für AFP (13,2 nM) und RBD (14,7 nM) sind vergleichbar mit den Werten für die MIPs, die mit dem ganzen Protein als Templat erzeugt wurden (14,5 nM für AFP und 16,8 nM für RBD, Tab. 2). Weiterhin stellten wir fest, dass die Epitop-MIPs eine geringere (unspezifische) Bindung für Humanserum-Albumin (HSA) zeigen. Offensichtlich führen die kleineren Bindungsstellen der Epitop-MIPs zu einer größeren Spezifität als bei den Protein-MIPs. Die vergleichbaren Affinitäten und die niedrigere unspezifische Bindung sowie die niedrigeren Kosten für das Template sind erhebliche Vorteile der Epitop-MIPs gegenüber von Protein-MIPs.

Das Imprinten von Substrukturen wurde erfolgreich auf rekombinante Proteine mit Tags, (z.B. his₆, FLAG- Chery-Strep-Tag), wobei das Tag als Templat dient [21], sowie Farbstoff-Label von Nucleinsäuren, Oberflächenproteinen oder Zuckern von Viren und Zellen erweitert. Das Epitop-Konzept nutzt die Vorteile des Imprinten von kleinen Molekülen wie die höhere Stabilität und den niedrigeren Preis im Vergleich zum Biomakromolekül oder Biopartikel und das leichtere Entfernen des Templats. Weiterhin können durch Verwendung mehrerer Substruktur-Templates „Multi-Analyt“-Sensoren realisiert werden [22].

Random vs. Hierarchische MIP-Synthese

Die Polymerisation eines Gemischs aus Monomeren und Templat ist die einfachste Methode der MIP-Synthese (Abb. 3a). Dabei entstehen Kavitäten mit zufälliger Orientierung und Gestalt (**Random MIPs**). Diese Heterogenität der Bindungsstellen erschwert die Entfernung des Templats und erzeugt Qualitätsprobleme bei der Massenproduktion. Wie Abb. 3b schematisch darstellt, führt die Polymererzeugung um ausgerichtete Templat-Moleküle (**Hierarchische MIPs**)

zu mehr einheitlichen Bindungskavitäten als bei den Random-MIPs.

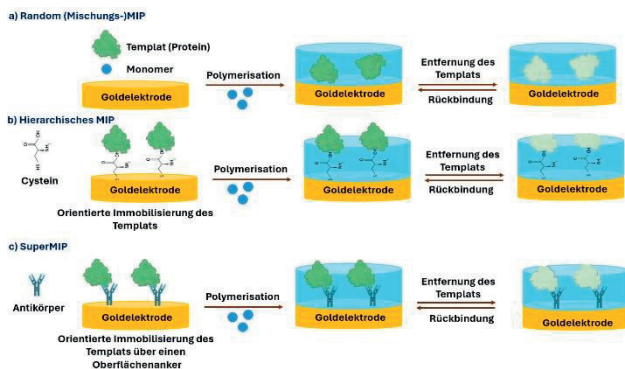


Abb. 3: „Workflow“ der Herstellung der unterschiedlichen Konfigurationen von MIPs

- Polymerisation einer Mischung von Template und funktionellen Polymeren zu **Random MIPs**
- Herstellung von **Hierarchischen MIPs** durch Polymerisation um das orientierte Template und
- bei „**Super-MIPs**“ um das an einen „Oberflächenanker“ (Antikörper, Aptamer, Lektin) gebundene Template.

Die Polymerisation um orientiert fixierte niedermolekulare aber vor allem Makromoleküle führt zu höheren Affinitäten im Vergleich zu Random-MIPs. Diesen Vergleich haben wir an MIPs für das am C-Terminus cys-erweiterte Strep-Tag II (W-H-P-G-F-E-K-C) [23] und das N-terminale Peptide der β -Kette von Hämoglobin (Hb) (CVHLTP) [24] durchgeführt.

Tab. 2: Dissoziationskonstanten K_D

Template	Analyt	Random/Hierac
CVHLTP	VHLTP	1,4 μ M/64,6nM
CVHLTP	HbA	20,4nM /9,06nM
SKTRAALGVC	TRAALGV	14 μ M
SKTRAALGVC	AFP	13,2nM
AFP	AFP	14,5nM
GFNCYFP	GFNCYFP	57,6nM
GFNCYFP	RBD	14,7nM
RBD	RBD	16,8nM
Cys.Strep-Tag	Strep-Tag	38,4nM/ 3,05nM
Cys-Strep-Tag	Strep-MbH	instab./ 33nM

Die K_D -Werte für das Target Peptid ist beim Hierarchischen Strep-Tag- MIP mit 3,05 nM etwa zehnfach niedriger als beim Random MIP und mehr als zwanzigfach kleiner beim VHLTP-MIP als für Mischungs-MIPs (64,6 nM vs. 1,4 μ M). Weiterhin besitzen beide Hierarchische MIPs höhere Affinitäten für die Ausgangsproteine Strep-Tag Hydrogenase und Hämoglobin. Offensichtlich ist die vorwiegend senkrechte Orientierung der Kavitäten vorteilhaft für die Bindung des Template-Peptids aber auch des Proteins. Dieser Befund ist sehr wichtig für Epitop-MIPs und zeigt die Überlegenheit des Hierarchischen MIP-Konzepts trotz der aufwendigeren Herstellung.

Zum Bündeln der Vorteile von zwei Erkennungselementen wurden MIPs mit Antikörpern, Lektinen und Aptameren zu „**SUPER-MIPs**“ räumlich kombiniert (Abb. 3c). Dabei erfolgt die MIP-Synthese um die an eine Oberfläche gebundenen Komplexe aus Template und Bindermolekül [25,26].

Spivac's Gruppe eröffnete dieses Feld 2013 mit der Entwicklung eines AptaMIPs für Thrombin [25]. Allerdings hat dieses Konzept bisher nur in geringem Umfang zur erwünschten Erhöhung der Affinität geführt und ist in der Präparation deutlich komplizierter als für übliche MIPs. So zeigt ein AptaMIP für PSA nur eine dreifach höhere Affinität als das MIP allein, und bei Cytochrom c sind die Affinitäten fast gleich [26].

MIP-Sensoren und Arrays

Die zerkleinerten Bulk-Polymere oder die MIP-Partikel werden für die Integration des MIP mit dem Signalwandler auf die Sensoroberfläche aufgebracht oder elektroaktive Monomere wie Pyrrol, Phenylendiamin, Thiophen, Phenol, Scopoletin und Aminophenylboronsäure sowie deren Derivate in Gegenwart des Templates direkt auf der Elektrodenoberfläche durch anodische Oxidation polymerisiert. Dafür ist kein Vernetzter erforderlich, und die Elektrosynthese kann auf allen leitfähigen Unterlagen, z.B. Redox-Elektroden und Chips für QCM oder SPR durchgeführt werden. Durch „Spotting“ werden MIP-Arrays für die Multi-Analytmessung effektiv hergestellt [27]. Die Auslese der MIP-Sensoren und Arrays benutzt die gleichen Methoden und Assay-Formate wie Immunosensoren oder DNA-Chips, d.h., Fluoreszenz, SPR, QCM aber vor allem verschiedene voltammetrische Verfahren [6,8,9].

MIP-Sensoren für SARS-CoV-2

Während der weltweiten Corona-Pandemie wurden Immuno-Schnelltests zum Nachweis des Virus das Mittel der Wahl für die Selbst-Testung von Patienten, bevor eine PCR-Bestimmung erfolgte. In dieser Zeit wurden erfolgreich MIP- Sensoren mit (abgetöteten) Viren, dem Spike- oder Nukleokapsidprotein (S- oder N-Protein), der Rezeptorbindungsdomäne (RBD) und Epitope-Peptiden als Template entwickelt [28, 29].

Gemeinsam mit unserem Partner von der *Budapest University of Technology and Economics* (Ungarn) entwickelten wir elektrochemische Sensoren und SPR-Arrays mit Peptiden (z.B. GFNCYFP) aus dem Bindungsareal des Virus an die Gastzelle (Abb. 4) [27]. Dabei wurde das Peptid auf der Goldoberfläche durch das zentrale Cystein chemisorbiert, anschließend das Polymergerüst um das Template durch Elektropolymerisation erzeugt und das Peptid durch anodischen Potentialpulse entfernt. Die (Rück)-Bindung des Peptides, der RBD, des S-Proteins und von „Virus like Particles“ wurde direkt mit Oberflächen-Plasmonresonanz (SPR) (Abb. 4) oder über die Abhängigkeit der Permeabilität des MIP-Nanofilms für Ferricyanid von der Besetzung der Bindungsstellen ausgelesen (Abb. 5).

In Pufferlösung mit einem hohen Überschuss an Human-Serumalbumin (HSA), aber auch in der „Systemlösung“ von kommerziellen Corona-Antigenschnelltests konnten wir die RBD im unteren nanomolaren Konzentrationsbereich mit beiden Methoden anzeigen (Abb. 5) [23]. Allerdings ist die visuelle Auswertung auf der Basis von (rot gefärbten) Goldnanopartikeln einfacher. Deshalb ist der nächste Schritt der Einbau unsers MIP in visuelle Lateral Flow Assays.

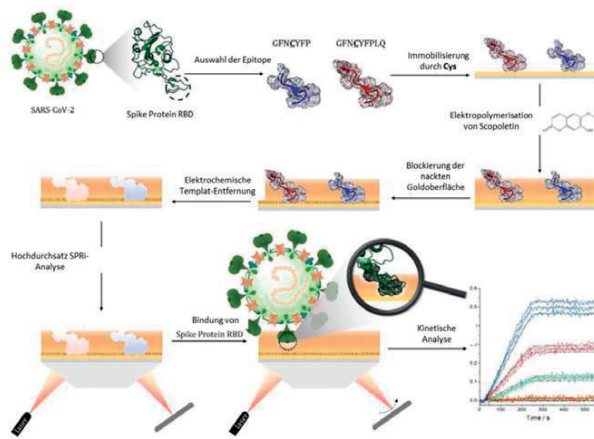


Abb. 4: Schema der Herstellung eines MIP-Arrays mit zwei Epitopen des Spikeproteins und Auslesung der Bindung des Virus über die RBD mit SPR [27].

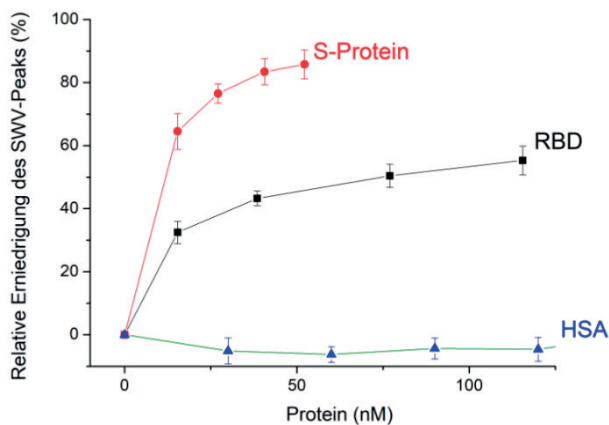


Abb. 5: Konzentrationsabhängigkeit der Bindung der RBD, des Spikeproteins und HSA an das Epitope-MIP [20].

Katalytisch aktive MIPs

MIPs wurden nicht nur für die Bindung eines Analyten, sondern auch als „Mimicry“ von Enzymen und Chaperonen entwickelt. Ein Weg zur Erzeugung von katalytisch aktiven MIPs ist es, ein stabiles Analogon des Übergangszustandes (TSA) der zu katalysierenden Reaktion als Templaten bei der MIP-Synthese einzusetzen [30-32]. Zum Beispiel entwickelten wir ein MIP, das die Hydrolyse von nicht-aktivierten Phenylestern katalysiert [33]. Als Templaten benutzten wir einen Phosphonium-Ester als TSA-Analogon und erzielten eine spezifische Aktivität bei 4-Nitrophenylacetat von 90mU/mg. Ein anderes Konzept basiert auf dem Einbau von „Nano(En)zymen“ in das substrat-imprimierte Polymernetzwerk. Dazu werden Übergangsmetalle wie Fe(III), Cu(II), Zn(II) sowie von deren Komplexe, aber auch katalytische Zentren von Enzymen, z.B. Häm in und Selenocystein in das MIP eingebaut [34-38]. Dabei übernimmt das Polymer die Funktion des Apo-Enzyms und das Nanozym die des katalytischen Zentrums in Enzymen. Bisher erreichen katalytisch aktive MIPs meist nur weniger als ein Prozent im Vergleich zu Enzymen, die die gleiche Reaktion katalysieren. Interessanter Weise gelang es, katalytische MIPs für Reaktionen, z.B. die Diels-Alder-Reaktion zu entwickeln, für die keine Enzyme in der Natur existieren [39].

Kombination von Enzymen mit MIPs

Die Kombination von Enzymen mit MIPs erlaubt die Erweiterung des Analytenspektrums, die Amplifikation des Messsignals und die Vermeidung der Blockierung der Sensoroberfläche von elektrochemischen MIP-Sensoren. Wir demonstrierten diese Kombination für das nicht-steroidale Anti-Estrogen Tamoxifen (TAM) [40] und die analgetischen Pharmaka Paracetamol (PAR) [41] und Aminopyrin (AP) [42]. Das Signal wurde entweder durch direkte anodische Oxidation des Analyten oder das Redox-Gating des Markers Ferrizyanid erzeugt.

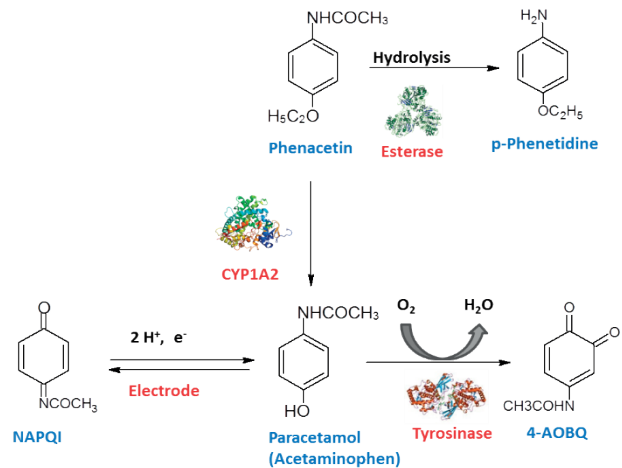


Abb. 6: Schema der enzymatischen und elektrochemischen Umsetzung von Paracetamol (Nachdruck mit Genehmigung aus [41]).

Bei den Sensoren für TAM und PAR führt die anodische Oxidation zu einem kontinuierlichen Abfall des Stromsignals durch die Bildung einer isolierenden Polymerschicht auf der Elektrode. Um diesen Effekt zu vermeiden, wurde die TAM-Lösung mit H₂O₂ in Gegenwart von Peroxidase vorbehandelt, wobei ein Produkt gebildet wird, das bei 0 V an der Elektrode ohne die Bildung der Passivierungsschicht angezeigt werden kann. Analog dazu wurde PAR mit Tyrosinase vorbehandelt, wobei N-Acetyl-p-benzoquinon (4-AOBQ) entsteht, das bei -0,1 V angezeigt werden kann. Dadurch entfallen die Bildung des Polymerfilms und die elektrochemische Interferenz durch Ascorbin- und Harnsäure (AS, US). Weiterhin wurde (das vom Markt genommene) Phenacetin mit einer unspezifischen Esterase zu Phenetidin umgesetzt, das bei +600mV mit dem elektrochemischen MIP-Sensor angezeigt werden kann. Zur Messung von AP brachten wir eine Schicht von Peroxidase oder Mikroperoxidase-11 auf der mit Aminoantipyrin (AAP) imprimierte Polymerschicht auf [42], in der die peroxid-abhängige Umwandlung von AP zu AAP erfolgt. Dabei entsteht ein Intermediat, das an der GCE bei 0 V eine kathodischen Strom generiert. Bei diesem Potential werden weder PAR noch AS und US erfasst. Dieser Enzym/MIP-Sensor erlaubt damit die Messung von AP auch in Gegenwart von AAP ohne Störung durch AS und US. In Analogie zu kompetitiven Immunsensoren wurden Analyt/Enzym-Konjugate auch in MIP-Sensoren zur Signalzeugung erfolgreich angewandt, z.B. für Oxytetracyclin [43]. Allerdings führte die unspezifische Adsorption an dem

MIP-Film zu Problemen. Für Isoproturon wurde unter Einsatz eines GOD-Konjugates mit einem MIP-Sensor durch Elektro-Lumineszenz ein linearer Messbereich von 90 pM bis 5 nM erzielt [44].

Durch elektro-enzymatisches Recycling des Redox-Markers Ferrizyanid gelang es Lian et al. [45], die Empfindlichkeit um den Faktor 8 zu erhöhen und die Nachweisgrenze sogar um 2 Größenordnungen auf 28 nM für einen Kanamycin-Sensor zu verbessern. Dabei wird das an der Elektrode erzeugte Ferrozyanid durch Peroxid in Gegenwart von Peroxidase reoxidiert. Dieses einfache, aber effektive Prinzip ist für die Signalerzeugung bei allen Typen von Affinitätssensoren sehr attraktiv.

Chaperon-analoge“ MIPs

Auch für „Nicht-Sensor-Anwendungen“ wie Stabilisierung, Kristallisation und Rückfaltung von Proteinen gelang es, MIPs zu realisieren. So konnte Takeuchi zeigen, dass ein MIP, das als Template natives Lysozym benutzt, die Rückfaltung des denaturierten Proteins beschleunigt [46], indem es das Gleichgewicht durch Bindung des nativen Proteins verschiebt. Bossi zeigte, dass die oxidative Rückfaltung des reduzierten 25-Aminosäure langen Peptidhormons Hepcidin durch Bindung an ein MIP die Formierung von Disulfidbrücken unterstützt. Diese Reaktion ist vergleichbar mit dem „induced fit“ bei Biopolymeren [47].

Resümee

MIPs erlauben durch die höhere chemische und thermische Stabilität den Einsatz bei erhöhten Temperaturen und in organischen Lösungsmitteln, z.B. in Extrakten. Außerdem ist der Preis im Vergleich zu Antikörpern erheblich niedriger. Trotz dieser offensichtlichen Vorteile haben bisher MIPs nur einen beschränkten kommerziellen Erfolg erzielt. Sie werden bereits in der Chromatographie und Festphasen-Extraktion (SPE) in der Routine eingesetzt. Eine Herausforderung beim Einsatz in „Realproben“ stellt die typische Kreuzreaktivität von zehn Prozent gegenüber Bestandteilen in klinischen Proben wie HSA und IgG dar. Für den Übergang vom Forschungslabor in die Routineanwendung der Messtechnik ist das durchgängige „Engineering“ von MIP-Herstellung bis Standardisierung der Anwendung erforderlich, wie es erfolgreich für die enzymatische Blutzucker-Messung demonstriert wurde.

Literatur

- [1] Polyakov MV: Adsorption properties and structure of silica gel. *Zhur Fiz Khim* 2:799–895, 1931
- [2] Menger MM, Yarman A, Oktay A, et al: Molekularer Abdruck oder Selektion bei der Erzeugung biomimetischer Spezifiker, *BIOspektrum* 29:806–809, 2023
- [3] Wulff G, Sarhan A: Use of Polymers with Enzyme-Analogous Structures for the Resolution of Racemates. *Angew Chemie Int Ed* 11:334–342, 1972
- [4] Arshady R, Mosbach K: Synthesis of substrate selective polymers by host-guest polymerization. *Die Makromol Chemie* 182:687–692, 1981
- [5] Parisi OI, Francomano F, Dattilo M, et al: The Evolution of Molecular Recognition: From Antibodies to Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) as Artificial Counterpart. *J Funct Biomater* 13:12, 2022
- [6] Hayden O, Lieberzeit PA, Blaas D, et al: Artificial antibodies for bioanalyte detection - Sensing viruses and proteins. *Adv Funct Mater* 16:1269–1278, 2006
- [7] Cieplak M, Kutner W: Artificial Biosensors: How Can Molecular Imprinting Mimic Biorecognition? *Trends Biotechnol* 34:922–941, 2016
- [8] Eersels K, Lieberzeit P, Wagner P: A Review on Synthetic Receptors for Bioparticle Detection Created by Surface-Imprinting Techniques From Principles to Applications. *ACS Sensors* 1:1171–1187, 2016
- [9] Nawaz N, Abu Bakar NK, Muhammad Ekramul Mahmud HN, et al: Molecularly imprinted polymer-based DNA biosensors. *Anal Biochem* 630, 2021
- [10] Piletsky S, Canfarotta F, Poma A, et al: Molecularly Imprinted Polymers for Cell Recognition. *Trends Biotechnol* 38:368–387, 2020
- [11] Menger M, Yarman A, Erdössy J, et al: MIPs and Aptamers for Recognition of Proteins in Biomimetic Sensing. *Biosensors* 6:35, 2016
- [12] Sharma PS, Pietrzyk-Le A, D'Souza F, et al: Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing. *Anal Bioanal Chem* 402:3177–3204, 2012
- [13] Erdössy J, Horváth V, Yarman A, et al: Electrosynthesized molecularly imprinted polymers for protein recognition. *TrAC Trends Anal Chem* 79:179–190, 2016
- [14] Scheller FW, Zhang X, Yarman A, et al: Molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensors for biopolymers. *Curr Opin Electrochem* 14:53–59, 2019
- [15] Canfarotta F, Poma A, Guerreiro A, et al: Solid-phase synthesis of molecularly imprinted nanoparticles. *Nat Protoc* 11:443–455, 2016
- [16] Shah NS, Thotathil V, Zaidi SA, et al: Picomolar or beyond Limit of Detection Using Molecularly Imprinted Polymer-Based Electrochemical Sensors: A Review. *Biosensors* 12:1107, 2022
- [17] Rachkov A, Minoura N: Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol* 1544:255–266, 2001
- [18] Settapani J, Karim K, Chauvin A, et al: Theoretical aspects of peptide imprinting: screening of MIP (virtual) binding sites for their interactions with amino acids, di- and tripeptides. *J Chinese Adv Mater Soc* 6:301–310, 2018
- [19] Zhang X, Yarman A, Kovács N, et al: Specific features of epitope-MIPs and whole-protein MIPs as illustrated for AFP and RBD of SARS-CoV-2. *Micromol Chem Acta* 191:242, 2024
- [20] Zhang X, Waffo AT, Yarman A, et al: How an ACE2 mimicking epitope-MIP nanofilm recognizes template-related peptides and the binding domain of SARS-CoV-2. *Nanoscale* 14:18106–18114, 2022

- [21] Gómez-Arribas LN, Urraca JL, Benito-Penia E, et al: Tag-specific affinity purification of recombinant proteins by using molecularly imprinted polymers. *Anal Chem* 91:4100–4106, 2019
- [22] Wang S, Zhang L, Zeng J, et al: Multi-templates molecularly imprinted polymers for simultaneous recognition of multiple targets: From academy to application. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 166:117173, 2023
- [23] Yarman A, Waffo AF, Katz S, et al: A Strep-tag Imprinted Polymer Platform for Heterogenous Bio (electro) catalysis. *Angew Chemie Int Ed e202408979*, 2024
- [24] Casert G, Zhang X, Yarman A, et al: Insights in Electrosynthesis, Target Binding, and Stability of Peptide-Imprinted Polymer Nanofilms. *Electrochim. Acta* 381:138236, 2021
- [25] Bai W, Gariano NA, Spivak DA: Macromolecular amplification of binding response in superaptamer hydrogels. *J Am Chem Soc* 135, 6977–6984, 2013
- [26] Ali GK, Omer KM: Molecular imprinted polymer combined with aptamer (MIP-aptamer) as a hybrid dual recognition element for bio (chemical) sensing applications. *Review. Talanta* 236:122878, 2022
- [27] Bognár Z, Supala E, Yarman A, et al: Peptide epitope-imprinted polymer microarrays for selective protein recognition. Application for SARS-CoV-2 RBD protein. *Chem Sci* 13:1263–1269, 2022
- [28] Ratautaite V, Boguzaitė R, Brazys E, et al: Molecularly imprinted polypyrrole based sensor for the detection of SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Electrochim Acta* 403:139581, 2022
- [29] MIP Diagnostics Technical Brief SARS-CIV-2 na noMIP 2021.
- [30] Robinson DK, Mosbach K: Molecular imprinting of a transition state analogue leads to a polymer exhibiting esterolytic activity. *J Chem Soc Chem Commun* 969-970, 1989
- [31] Liu J, Wulff G: Molecularly Imprinted Polymers with Strong Carboxypeptidase A-Like Activity: Combination of an Amidinium Function with a Zinc-Ion Binding Site in Transition-State Imprinted Cavities. *Angewandte Chemie International Edition* 43, 1287–1290, 2004
- [32] Tian R, Li Y, Xu J, et al: Recent development in the design of artificial enzymes through molecular imprinting technology. *J Mater Chem B* 10:6590-6606, 2022
- [33] Lettau K, Warsinke A, Katterle M, et al: A bifunctional molecularly imprinted polymer (MIP): analysis of binding and catalysis by a thermistor. *Angew Chem Int Ed* 45:6986-6990, 2006
- [34] Lakshmi D, Bossi A, Whitcombe MJ, et al: Electrochemical sensor for catechol and dopamine based on a catalytic molecularly imprinted polymer-conducting polymer hybrid recognition element. *Anal Chem* 81:3576–3584, 2009
- [35] Zhang J, Lei J, Ju H, et al: Electrochemical sensor based on chlorohemin modified molecularly imprinted microgel for determination of 2, 4-dichlorophenol. *Anal Chim Acta* 786:16–21, 2013
- [36] Karrat A, Amine A: Bioinspired synergy strategy based on the integration of nanozyme into a molecularly imprinted polymer for improved enzyme catalytic mimicry and selective biosensing. *Biosens Bioelectron* 266:116723, 2024
- [37] Huang X, Yin Y, Liu Y, et al: Incorporation of glutathione peroxidase active site into polymer based on imprinting strategy. *Biosens Bioelectron* 25:657–660, 2009
- [38] Tian R, Li Y, Xu J, et al: Recent development in the design of artificial enzymes through molecular imprinting technology. *J Mater Chem B* 10:6590–6606, 2022
- [39] Kirsch N, Hedin-Dahlström J, Henschel H, et al: Molecularly imprinted polymer catalysis of a Diels-Alder reaction. *J Mol Catal B Enzym* 58:110–117, 2009
- [40] Yarman A, Scheller FW: The first electrochemical MIP sensor for tamoxifen. *Sensors* 14:7647-7654, 2014
- [41] Yarman A, Scheller FW: MIP-esterase/tyrosinase combinations for paracetamol and phenacetin. *Electroanalysis* 28:2222–2227, 2016
- [42] Yarman A, Scheller FW: Coupling biocatalysis with molecular imprinting in a biomimetic sensor. *Angew Chemie Int Ed* 125:11521–11525, 2013
- [43] Li J, Jiang F, Wei X. Molecularly imprinted sensor based on an enzyme amplifier for ultratrace oxytetracycline determination. *Anal Chem* 82:6074–6078, 2010
- [44] Li S, Tao H, Li J: Molecularly imprinted electrochemical luminescence sensor based on enzymatic amplification for ultratrace isoproturon determination. *Electroanal* 24:1664-16670, 2012
- [45] Lian W, Liu S, Wang L, et al: A novel strategy to improve the sensitivity of antibiotics determination based on bioelectrocatalysis at molecularly imprinted polymer film electrodes. *Biosens Bioelectron* 73:214–220, 2015
- [46] Haruki M, Konnai Y, Shimada A, et al: Molecularly Imprinted Polymer-Assisted Refolding of Lysozyme. *Biotechnol Prog* 23:1254-1257, 2007
- [47] Cenci L, Guella G, Andreetto E, et al: Guided folding takes a start from the molecular imprinting of structured epitopes. *Nanoscale* 8:15665-15670, 2016

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Exzellenzclusters “UniSysCat” unter Deutschlands Exzellenz Strategie-EXC2008-390540038 und vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, 01DH20018) gefördert.