

Entwicklung eines Aptamer-basierten Lateral Flow Assays zur Detektion eines veterinärdiagnostischen Targets

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Torsten Schüling, M. Sc.

2021

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferentin: Dr. Janina Bahnemann

Tag der Promotion: 28.06.2021

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Thomas Scheper für die Möglichkeit bedanken meine Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis anzufertigen. Es war für mich eine lehrreiche Zeit, aus der ich viele positive Erinnerungen mitnehmen werde.

Für die Übernahme des Korreferats bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. Janina Bahnmann. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Ulrich Krings für den Prüfungsvorsitz.

Bei Dr. Johanna Walter bedanke ich mich für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft während der Promotion. Die vielen anregenden Gespräche und Denkanstöße haben meinen Horizont innerhalb meines Themas deutlich erweitert. Vielen Dank auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit und bei den Publikationen.

Bei Martin Pähler und Martina Weiß möchte ich mich für die unverzichtbare Hilfsbereitschaft in allen Belangen des Institutsalltags bedanken.

Ina, Pia, Marline, Marc und Tobi danke ich für die unvergessliche Zeit im BdgL. Ich hätte mir keinen besseren Büroalltag vorstellen können. Auch die Zeit nach der Arbeit war immer ein Highlight für mich. Vielen Dank dafür.

Bei Lisa und Alina bedanke ich mich für die geniale Zeit im Labor. Ohne Euch wäre die Zeit nicht so schnell vergangen und hätte unendlich weniger Spaß gemacht. Meinen Eltern, meiner Schwester und Freunden außerhalb des TCIs danke ich für deren Unterstützung in allen Lebensbereichen.

Nicht zuletzt danke ich meiner Partnerin Johanna für Ihre Unterstützung, erfolgreichen Aufmunterungen und Liebe während der Promotion.

Kurzfassung

Lateral Flow Assays ermöglichen eine Detektion chemischer Verbindungen auf einfache Art und Weise. Momentan sind z.B. Antigentests zur Detektion einer SARS-CoV-2 Infektion stark nachgefragt. Im Rahmen dieser Dissertation wurde das β -Lactam-Antibiotikum Ampicillin als vielversprechender Analyt für die Entwicklung eines solchen Schnelltests ausgesucht, da Ampicillin intensiv in der Landwirtschaft eingesetzt wird. Dabei können Rückstände auch in der Kuhmilch nachgewiesen werden, weshalb in der EU für viele Antibiotika Grenzwerte festgelegt wurden.

Für die molekulare Erkennung von Ampicillin wurden in dieser Arbeit Aptamere genutzt. Mit Hilfe der Microscale Thermophoresis konnte die Affinität des Aptamers zu Ampicillin bestimmt werden. Für kleine Moleküle wie Ampicillin ist ein kompetitives Assayformat vorteilhaft, weshalb drei Oligonukleotide charakterisiert und in Microarray Experimenten auf ihre Eignung zur Detektion von Ampicillin überprüft wurden. Zur Übersetzung der Aptamerbindung in ein kolorimetrisches Signal wurden Goldnanopartikel verwendet. Nach der Synthese der Partikel fand eine Immobilisierung der Aptamere auf der Partikeloberfläche statt. Neben Elektronenmikroskop Aufnahmen wurden vor allem die UV-Vis-Spektroskopie und die dynamische Lichtstreuung zur Analyse eingesetzt. Zuletzt fand eine Übertragung der Ergebnisse auf das Lateral Flow Assay Format statt.

Schlagwörter: Lateral Flow Assay, Ampicillin, Aptamer, Oligonukleotid, Microarray, Goldnanopartikel

Abstract

Lateral flow assays (LFAs) belong to the group of point-of-care devices and allow detection of chemical compounds, such as toxins or hormones, in a cost-effective, rapid and decentralized manner. As a result, the development of lateral flow assays for all kinds of analytes has increased dramatically in recent years. Currently, for example, antigen tests for the detection of SARS-CoV-2 infection based on a lateral flow assay are in high demand.

In addition to the detection of infections, LFAs are used for monitoring limit values in the field of food control or environmental protection. In this dissertation, ampicillin was selected as a promising analyte. Ampicillin is used extensively in agriculture as a β -lactam antibiotic to provide for the health of farm animals. Antibiotics can also be detected in cow's milk, which is why limits have been set for many antibiotics in the European Union.

In this work, aptamers were used for the molecular detection of ampicillin. The affinity of the aptamer for ampicillin was determined by Microscale thermophoresis. For ampicillin as a small molecule a competitive assay format is advantageous, so three oligonucleotides were characterized and tested in microarray experiments for their suitability to detect ampicillin.

Gold nanoparticles were used to translate the binding between aptamer and ampicillin into a colorimetric signal in the lateral flow assay. After synthesis of the particles, immobilization of the aptamers on the particle surface took place. In addition to scanning electron microscope images of the pure particles, UV-Vis spectroscopy, dynamic light scattering and nanoparticle tracking analysis were mainly used for analysis. Lastly, a transfer of the results from the microarray experiments and gold nanoparticle synthesis to the lateral flow assay format took place.

Keywords: Lateral Flow Assay, Ampicillin, Aptamer, Oligonukleotid, Microarray, Goldnanopartikel

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	i
Kurzfassung	ii
Abkürzungsverzeichnis	viii
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung	3
3 Theorie	4
3.1 Ampicillin als veterinärdiagnostisches Target	4
3.2 Grundlagen der Aptamere	7
3.2.1 Der SELEX-Prozess	8
3.2.2 Konjugation der Aptamere mit Goldnanopartikeln . .	12
3.3 Lateral Flow Assays	12
3.3.1 Das Sample Pad	15
3.3.2 Das Conjugate Pad	15
3.3.3 Die Testmembran	15
3.3.4 Das Absorbent Pad	16
3.3.5 Die Konjugate	16
3.4 Assayvariationen von Aptamer-basierte Lateral Flow Assays .	18
3.4.1 <i>Sandwich</i> -Modus	18
3.4.2 <i>Competitive Replacement</i>	18
3.4.3 <i>Target-Induced Dissociation</i> -Modus	19
4 Ergebnisse und Diskussion	21
4.1 Charakterisierung des Ampicillin Aptamers	22
4.1.1 Bindung des Aptamers an Ampicillin	23

4.1.2	Entwicklung eines kompetitiven Assays zur Detektion von Ampicillin	29
4.1.3	CD-Spektrometrie	36
4.1.4	Immobilisierungsstudien im Microarray-Format	39
4.1.5	Verdrängung des Oligonukleotids im Microarray-Format unter Verwendung verschiedener Spacer	44
4.2	Konjugation von Aptamer an Nanopartikel	53
4.2.1	Chemische Synthese der Goldnanopartikel	53
4.2.2	Optimierung der Konjugation	60
4.3	Entwicklung eines LFAs zur Detektion von Ampicillin	72
4.3.1	Optimierung des LFA-Systems	73
4.3.2	Optimierung des Verhältnisses von Biotin-Oligonukleotid zu Streptavidin	78
5	Zusammenfassung und Ausblick	82
	Literatur	87
6	Anhang	92
7	Material	95
7.1	Geräte und Software	95
7.2	Verwendete Chemikalien	96
7.3	Verbrauchsmaterialien	97
7.4	Lösungen	97
8	Methoden	99
8.1	Allgemeine Informationen	99
8.1.1	Sequenzen verwendeter Nukleinsäuren	99
8.1.2	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	99
8.2	Synthese von Goldnanopartikeln	100
8.2.1	Synthese nach der <i>Seeding Growth</i> -Methode	100
8.2.2	Synthese nach der Frens-Methode	101
8.3	Konjugation von Oligonukleotiden an Goldnanopartikel	101

8.3.1	Konjugation mittels pH-Erniedrigung	102
8.3.2	Konjugation mittels <i>Salt-aging</i>	102
8.3.3	Konjugation mittels <i>Freezing</i>	103
8.4	Charakterisierung der Goldnanopartikel	104
8.4.1	UV-Vis Spektrometrie	104
8.4.2	DLS-Messung	105
8.4.3	REM-Aufnahmen	105
8.4.4	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>	106
8.4.5	Gelelektrophorese	106
8.4.6	Bestimmung der Aptamerdichte	107
8.5	Microarrays	107
8.5.1	Immobilisierung von Oligonukleotiden auf Aldehyd- beschichteten Microarrays	107
8.5.2	Hybridisierung von Aptameren mit komplementären Oligonukleotiden auf Microarrays	108
8.5.3	Verdrängung von komplementären Oligonukleotiden mit Ampicillin auf Microarrays	108
8.5.4	Verdrängung von komplementären Oligonukleotiden mit Ampicillin auf Nitrocellulose-Microarrays	109
8.5.5	Analytik und Auswertung der Microarrays	110
8.6	Lateral Flow Assay	110
8.6.1	Herstellung der Lateral Flow Assays	110
	Vorbehandlung des Conjugate Pads	110
	Zusammenbau des Lateral Flow Assays	110
	Auftragung der Testlinie	111
8.6.2	Durchführung des Lateral Flow Assays	111
8.7	Untersuchung der Aptamer-Struktur mittels CD-Spektrometrie	111
8.8	MST	112
8.8.1	Bindungsstudien zwischen Aptamer und Ampicillin .	113
8.8.2	Bindungsstudien zwischen Oligonukleotid und Aptamer	113
8.8.3	Studien zur Reaktion zwischen Aptamer und Ampicil- lin bzw. Oligonukleotid	113

9 Publikationsliste	114
Abbildungsverzeichnis	115
Tabellenverzeichnis	118
10 Lebenslauf	120

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Name
3D	drei-dimensional
ABs	Antikörper
AMP	Ampicillin
AuNP	Goldnanopartikel
C	Celsius
cOligo	komplementäres Oligonukleotid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
HPLC	High-performance liquid chromatography
IR	Infrarot
LOD	Limit of detection
Min	Minute
ml	Milliliter
MST	Microscale Thermoporesis
nm	Nanometer
OTA	Ochratoxin
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
SELEX	Systematic evolution of ligands by exponential enrichment
SPR	surface plasmon resonance
ssDNA	einzelsträngige DNA
T-Jump	Temperatursprung
TID	targeted-induced-dissociation
TISS	target-induced structure switching
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
UV	Ultraviolett

Kapitel 1

Einleitung

“Du bist, was du isst.”

Dieser Satz wird dem deutschen Philosophen Ludwig Feuerbach zugeordnet und soll den immensen Einfluss der Nahrung auf unsere Gesundheit und unser allgemeines Wohlbefinden verdeutlichen. Jeden Tag versorgen wir unseren Körper mit den Nährstoffen, die er zum Leben braucht. Daneben besteht das Essen auch aus Nahrungsbegleitstoffen. Eine Gruppe dieser Stoffe, denen in den letzten Jahren eine große Aufmerksamkeit zu Teil wurde, sind Antibiotika. Durch den intensiven Einsatz in der Landwirtschaft bleiben Rückstände in unseren Lebensmitteln und im Grundwasser zurück. Werden diese über einen längeren Zeitraum in höheren Konzentrationen aufgenommen, können sie einen negativen Einfluss auf die Gesundheit haben. Außerdem können Bakterien Resistenzen gegen Antibiotika entwickeln, wodurch die Behandlung von bakteriellen Infektionen zusätzlich erschwert wird. Daher wurden für nahezu alle Antibiotika, die in der Landwirtschaft zur Erhaltung der Gesundheit von Nutztieren eingesetzt werden, Grenzwerte von den Gesundheitsbehörden festgelegt.

Eine Kontrolle dieser Grenzwerte stellt eine wichtige Aufgabe des Staates dar. Dabei erfolgen Laboruntersuchungen der Nahrungsmittel mit Hilfe moderner analytischer Verfahren, wie der HPLC (*high-pressure liquid chromatography*). Der Vorteil der HPLC liegt in der enormen Sensitivität und der Detektion vieler Stoffe in einem einzigen Lauf. Ein Nachteil sind die hohen Kosten für das Laborequipment und Personal. Als Ergänzung zur HPLC werden daher Diagnostiksysteme entwickelt, die häufig als *point-*

of-care (POC)-Assays bezeichnet werden. Diese besitzen den Vorteil einer erhöhten Testflexibilität durch eine dezentrale Vor-Ort-Testung. Es besteht damit die Möglichkeit, Nahrungsmittel innerhalb einer Produktionskette in kürzester Zeit auf unerwünschte Begleitstoffe zu testen. Ein Beispiel ist die Überprüfung auf Antibiotika Rückstände in Kuhmilch. Diese Kuhmilch könnte direkt auf dem Bauernhof getestet werden, noch bevor sie den verarbeitenden Betrieb erreicht.

Ohne eine Auftrennung der Nahrungsinhaltsstoffe durch die HPLC wird für die quantitative oder qualitative Bestimmung einzelner Komponenten, wie Antibiotika, ein Detektionsmolekül benötigt, das diese Komponente erkennt und so einen spezifischen Nachweis ermöglicht. Es gibt verschiedene Molekülklassen, die eine Bindung zu chemischen Molekülen eingehen und daher für die molekulare Erkennung eingesetzt werden. Darunter fallen *molecularly imprinted polymers* (MIPs), Antikörper und Aptamere. Eine vielversprechende Möglichkeit bieten Aptamere. Bestehend aus einzelsträngigen Nukleinsäuresequenzen können sie einzigartige 3D-Strukturen annehmen und weisen dadurch starke, selektive Bindungen zu anderen Molekülen auf. Aptamere ermöglichen damit eine Detektion auch bei geringen Konzentrationen, was sie zu geeigneten Kandidaten für den Einsatz in der Lebensmittelkontrolle macht.

Kapitel 2

Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Aptamer-basierten Lateral Flow Assays (LFA). Dabei dient das β -Laktam Antibiotikum Ampicillin als relevantes Target. Für die Entwicklung eines LFAs sollen im ersten Schritt potentielle Aptamere sowie deren Affinität zum Zielmolekül charakterisiert werden. Dazu wird die Affinität des Aptamers zum Target mittels *Microscale Thermophoresis* untersucht.

Aufgrund der geringen Größe von Ampicillin soll ein kompetitives Assay-format zur Detektion verwendet werden. Hier dient die Hybridisierung des Aptamers zu einem komplementären Oligonukleotid als Konkurrenzreaktion zur Targetbindung. Daher sollen unterschiedliche Oligonukleotid Sequenzen auf ihre Eignung zur Detektion von Ampicillin mit Hilfe der *Microscale Thermophoresis* sowie im Microarray Format getestet werden. Im Microarray Format soll dabei eine Detektion von Ampicillin in relevanten Konzentrationsbereichen durchgeführt werden.

Um die Bindung des Aptamers zu Ampicillin in ein kolorimetrisches Signal umzusetzen, sollen Goldnanopartikel verwendet werden. Diese werden synthetisiert und anschließend mit dem Aptamer konjugiert. Dabei sollen verschiedene Methoden der Konjugation getestet und optimiert werden.

Im dritten Abschnitt wird aus den in den vorigen Abschnitten entwickelten Komponenten ein LFA konstruiert. Mit dem Ziel einen LFA zur Detektion von Ampicillin zu entwickeln, wird hier die Immobilisierung des Oligonukleotids auf der Testlinie des LFAs optimiert.

Kapitel 3

Theorie

3.1 Ampicillin als veterinärdiagnostisches Target

Für die vorliegende Arbeit wurde Ampicillin als Target gewählt. Ampicillin gehört zur Gruppe der β -lactam Antibiotika, die zu den am häufigsten verwendeten Antibiotika in der Medizin sowie Landwirtschaft zählen. Als Breitbandantibiotikum ist es effektiv gegen eine Reihe von Bakterien inklusive *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* und *Shigella*.

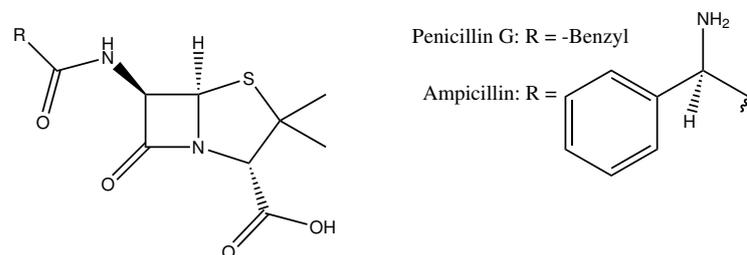


ABBILDUNG 3.1: Grundstruktur der Penicilline mit Penicillin G und Ampicillin als Beispiel

Penicilline wirken bakterizid, indem sie die Synthese von Peptidoglykanen durch Bindung an die Penicillin-bindenden Proteine 1a und 1b, während der Zellteilung hemmen. Die Penicillin-bindenden Proteine 1a und 1b gehören zur Klasse der Transpeptidasen und sind für die Vernetzung der Zellwand durch Entfernung eines D-Alanins verantwortlich [1]. 1929 wurden Penicilline von Sir Alexander Fleming entdeckt [2] und sind seitdem Gegenstand der Forschung, wodurch zahlreiche Derivate, wie auch das Ampicillin, entdeckt wurden. Der Vorteil besteht in dem Wirkmechanismus: Da Menschen keine Penicillin-bindenden Proteine

besitzen, sind sie von dem grundlegenden Mechanismus nicht betroffen. Nichtsdestotrotz können Antibiotika beim Menschen allergische Reaktionen, Atemschwierigkeiten und Anfälle auslösen. Ein weiterer Nachteil ist die Möglichkeit der Resistenzbildung gegen β -lactam Antibiotika. Zum Einen ist die Überexpression der Penicillin-bindenden Proteine möglich, wodurch sich die benötigte Wirkkonzentration erhöht. Außerdem können Lactamasen gebildet werden, die über eine nukleophile Substitutionsreaktion für die Öffnung des Lactamringes sorgen und auf diese Weise das Antibiotikum unwirksam machen. Als letztes sind Mutationen in der Kasette der Penicillin-bindenden Proteine bekannt, die eine Desensibilisierung der Proteine gegenüber β -lactam Antibiotika bewirken [3]. Um die Resistenzbildung zu minimieren sollte daher auf übermäßigen Einsatz von Antibiotika verzichtet werden und Rückstände in Lebensmitteln müssen überwacht werden, um Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen zu reduzieren.

Stand der Technik

Antibiotika werden Milchkühen gegeben, um sie resistenter gegen Krankheiten zu machen, die durch Bakterien ausgelöst werden. Rückstände der Antibiotika können auch in der Milch nachgewiesen werden. Die FDA (*Food and Drug Administration*) hat daher die maximal erlaubte Menge an Ampicillin in Milch auf 10 ppb oder 30 pM festgelegt [4]. Aufgrund der verschiedenen Derivate der Penicillin-Antibiotika ist vor allem ein hoher Grad an Spezifität nötig, um eine Unterscheidung der verschiedenen Antibiotika möglich zu machen. In der Literatur wurden verschiedene Systeme entwickelt, um Ampicillin nachzuweisen, die im Folgenden beschrieben sind.

Bisher finden Tests auf Ampicillin Rückstände in Milch mit Hilfe der *high pressure liquid chromatography* (HPLC) als Gold-Standard statt. Die HPLC besitzt zwar eine hohe Sensitivität und Spezifität, aber die Kosten für die

TABELLE 3.1: Möglichkeiten der Detektion von Ampicillin, LOD = *limit of detection*, HPLC = *high pressure liquid chromatography*, PBS = *phosphatgepufferte Salzlösung*, BP = *Bindepuffer des Aptamers während der Selektion*, SPR = *surface plasmon resonance*

Plattform	LOD	dynamischer Bereich	Matrix	Lit.
Elektrochemischer Aptasensor	30 nM	0,2 µM bis 15 000 µM	PBS	[5]
Mikrofluidische Raman-Spektr.	500 µM	k.A.	Milch	[6]
Lateral Flow Assay	529 µM	k. A.	BP	[7]
Goldpartikel-Aggregationsassay	0,49 nM	1 nM bis 500 nM	Milch	[8]
Fluoreszenz-basierter Aptasensor	1,43 nM	1,43 nM bis 143,1 nM	k.A.	[9]
Fluoreszenz-basierter Aptasensor	0,2 nM	0,28 nM bis 286,2 nM	PBS	[10]
Elektrochemischer Aptasensor	0,01 nM	0,1 nM bis 1000 nM	PBS	[11]
Mikrofluidische Impedanzmessung	0,1 nM	0,1 nM bis 10 nM	PBS	[12, 13]
SPR-basierter Biosensor	7,15 nM	k. A.	PBS	[14]

Geräte sowie das nötige geschulte Personal, machen die Detektion per HPLC sehr kostspielig.

Aus den genannten Gründen werden alternative Möglichkeiten zur Detektion von Ampicillin erforscht. In Tabelle 3.1 sind publizierte Aptamer-basierte Assays aufgeführt, die auf unterschiedlichste Art und Weise eine Detektion von Ampicillin ermöglichen. Aptamere bieten sich als Ergänzung zu Antikörpern als Detektionsmoleküle für die Verwendung in LFAs an, da sie, ähnlich wie Antikörper, eine affine und spezifische Bindung zum Analyten ausbilden. Der Vorteil liegt in der einfachen chemischen Synthese sowie der Möglichkeit Aptamere gegen fast jeden Analyten zu selektieren (s. Abschnitt 3.2). Da in dieser Arbeit ein Aptamer-basierter LFA entwickelt werden soll, wurden nur Aptamer-basierte Methoden in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Der Stand der Technik zeigt das Interesse der Forschung zur Detektion von Ampicillin und damit die Notwendigkeit einer Alternative zur HPLC. Andererseits ist keine der bisher erforschten Methoden ausreichend sensitiv oder kostengünstig, sodass noch Potential in der Erforschung weiterer Methoden liegt.

3.2 Grundlagen der Aptamere

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ermöglichen Aptamere die Detektion eines Targets aus einer komplexen Matrix, wie Milch, durch Ausbildung einer hochaffinen Bindung. Daher werden Aptamere in dieser Arbeit für den Nachweis von Ampicillin verwendet. Grundlegend bestehen Aptamere aus einzelsträngigen Nukleinsäuren, welche ihre Funktion der selektiven und sensitiven Bindung durch Ausbildung einer dreidimensionalen Konformation erhalten. Die Selektivität kann gegen beinahe jede Klasse an Molekül gerichtet sein, ob Metallionen, organische Moleküle, wie Ethanolamin [15], Proteine [16] bis hin zu ganzen Zellen [17] bzw. Viren [18]. Diese unglaubliche Menge an verschiedenen Zielmolekülen verdanken Aptamere unter anderem ihrem Selektionsprozess, der SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*). In dem Jahre 1990 wurde der SELEX Prozess unabhängig voneinander von zwei Forschergruppen entwickelt [19, 20]. Szostak *et al.* selektierten verschiedene RNA Aptamere, die gegen organische Farbstoffe gerichtet sind und Gold *et al.* fanden ein Aptamer, das an die T4 DNA Polymerase, also ein Protein, selektiv bindet.

Das Besondere an Aptameren ist ihre Struktur, die wie bei den Proteinen in Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur eingeteilt werden kann. Die Sekundärstruktur ergibt sich aus der Sequenz des Aptamers, wobei vor allem Basenpaarungen beachtet werden, die sich über Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen auszeichnen. Mittels *in-silico* Methoden lassen sich aus der Sequenz des Aptamers die energetisch günstigste Sekundärstruktur ermitteln. Diese Informationen sind für die Entwicklung von Aptasensoren von wichtiger Bedeutung. Viele Aptamere gegen kleine Moleküle besitzen eine haarnadelförmige Struktur, bestehend aus einem Stamm, dem die Nukleinsäuren hybridisiert vorliegen und einem einzelsträngigen schleifenartigen Bereich [21]. Die Identifizierung der Bindetasche des Aptamers ermöglicht eine Kürzung der Nukleinsäuresequenz sowie Anpassungen der Affinität gegenüber dem

Target z.B. durch Austausch einzelner Nukleotide.

Die Mechanismen der Bindung zwischen Target und Aptamer können über Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen beschrieben werden. Dabei spielen neben Wasserstoffbrückenbindungen vor allem hydrophobe und ionische Wechselwirkungen eine Rolle [21]. Beschrieben werden diese Interaktionen mit Modellen, wie dem *induced-fit* Mechanismus, bei dem das Aptamer durch Bindung an das Target die Konformation ändert oder dem Schlüssel-Schloss Prinzip, bei dem sich die Aptamerstruktur in Lösung bereits ohne das Target ausbildet. Oft findet eine Zwischenform, wie die konformative Selektion, statt. Dabei bildet der Rezeptor in Lösung unterschiedliche Strukturen mit lokalen Energieminima aus. Durch die Bindung an das Target verschiebt sich das thermodynamische Gleichgewicht in Richtung der bindenden Konformation [22]. Bei kleinen Molekülen mit aromatischen Gruppen kommt es häufig durch π - π -Wechselwirkungen zu einer Integration des Targets in die Struktur des Aptamers. Durch Zugabe des Targets findet keine große Änderung der Struktur mehr statt, weshalb die Wechselwirkungen des Aptamers mit kleinen Molekülen oft durch das Schlüssel-Schloss-Prinzip beschrieben werden können.

3.2.1 Der SELEX-Prozess

Das Verfahren der SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) wurde 1990 entwickelt und seitdem konnten, mit seiner Hilfe, Aptamere gegen fast jede Stoffklasse gefunden werden. Eine Stärke der SELEX ist die hohe Anpassungsfähigkeit des Selektionsprozesses. Seit der Entdeckung 1990 wurden zahlreiche neue Verfahren entwickelt, die den Prozess vereinfachen und automatisieren, wie die *cell*-SELEX [23], *microfluidic*-SELEX [24] und *capillary electrophoresis*-SELEX [25].

Im Folgenden wird die Selektion anhand eines Beispiels, der Selektion des in dieser Arbeit verwendeten Ampicillin Aptamers, verdeutlicht. Diese wurde von Song *et al.*[9] mit Hilfe einer *magnetic bead*-SELEX durchgeführt. Der

grundlegende Prozess der SELEX ist in Abbildung 3.2 zu sehen und lässt sich in vier Schritte unterteilen.

Vor dem ersten Schritt der SELEX wird eine synthetische ssDNA Bibliothek hergestellt, normalerweise bestehend aus einer randomisierten Sequenz mit einer Länge von 20 nt bis 80 nt, flankiert von zwei Primern mit einer Länge von 18 nt bis 21 nt [26]. Song *et al.* nutzten eine 40 nt lange Zufallsregion sowie einen 30 nt langen *forward* Primer und einen 20 nt langen *reverse* Primer, resultierend in einem 90 mer.

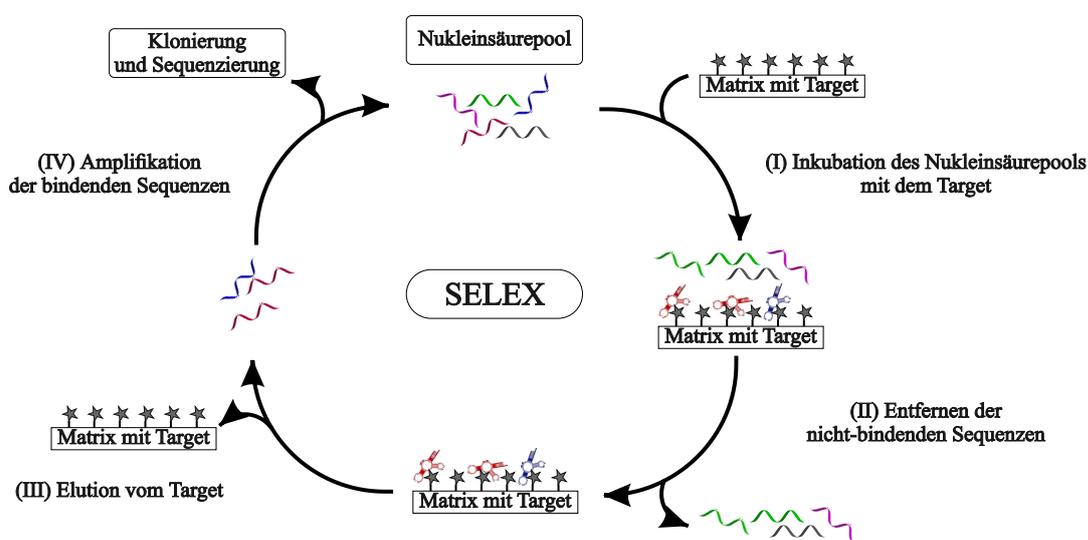


ABBILDUNG 3.2: schematische Darstellung der Selektion von Aptameren mittels SELEX

Vor der Selektion wurde das Ampicillin auf magnetischen Partikeln immobilisiert, indem tosyl-aktivierte Partikel mit dem Target inkubiert wurden und im Anschluss der Gehalt an Ampicillin auf der Partikeloberfläche indirekt aus dem Überstand bestimmt wurde. Da die Tosylgruppe eine gute Abgangsgruppe ist, wird eine kovalente Bindung an die magnetischen Partikel ermöglicht. Dies findet über eine nukleophile Substitution statt. Hier ist direkt ein Nachteil der SELEX gegen kleine Moleküle als Targets sichtbar. Kleine Moleküle verfügen oft über wenige funktionelle Gruppen, wodurch eine Immobilisation auf den magnetischen Partikeln einen Einfluss auf die Bindung zwischen Aptamer und Target haben kann. Im Falle von Ampicillin besitzt das primäre Amin der Seitenkette (s. Abbildung 3.1) die größte

Nukleophilie und stellt daher wahrscheinlich die funktionelle Gruppe für die Immobilisierung auf den magnetischen Partikeln dar. Diese funktionelle Gruppe kann nicht mehr zu der Bindung zum Aptamer beitragen, was einen Einfluss auf die Spezifität und Affinität des Aptamer haben kann.

Im ersten Schritt der SELEX wurden die magnetischen Partikel mit dem Ampicillin zu dem Nukleinsäurepool gegeben und zusammen inkubiert. Dabei wurde ein Puffer verwendet, bestehend aus Tris-HCl, Natriumchlorid, Kaliumchlorid sowie Magnesiumchlorid. Einwertige Ionen dienen bei der SELEX zur Abschirmung elektrostatischer Interaktionen und ermöglichen eine Bindung an das Target. Zweiwertige Ionen wie Magnesiumchlorid stabilisieren noch effektiver als einwertige Ionen die Sekundärstrukturen des Aptamers [27]. Hier wird ein Vorteil der SELEX deutlich, da die Pufferzusammensetzung den späteren Assaybedingungen angepasst werden können, wodurch eine Funktionalität des Aptamers in der späteren Anwendung gewährleistet werden kann.

Im zweiten Schritt wurden die gebundenen Oligonukleotide mittels magnetischer Separation abgetrennt und die nicht-bindenden Sequenzen entfernt. Zurück blieben die bindenden Sequenzen mit den magnetischen Partikeln (s. Abbildung 3.2, (II)).

Im dritten Schritt findet die Elution der bindenden Sequenzen statt. Diese erfolgte mit Natronlauge, was die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen verhindert und so die Struktur des Aptamers zerstört, was für eine Trennung von den Partikeln sorgt. Durch eine Erhöhung der Konzentration der Natronlauge kann die Stringenz der Elution variiert werden. Bei einer niedrigen Konzentration werden überwiegend die schwach oder unspezifisch bindende Sequenzen von den Partikeln gelöst. Für die Aufreinigung nach der Elution wurde die DNA mit Hilfe von reinem Ethanol gefällt. Das Ethanol verdrängt die Hydrathülle vom Aptamer, was schließlich zum Ausfallen der DNA führt. Die restlichen Komponenten verbleiben dabei in Lösung.

Nach der Isolation der bindenden Sequenzen erfolgt im letzten Schritt die Amplifikation mittels PCR über die vorhandenen Primerregionen. Für die PCR wurde eine *pfu* Polymerase eingesetzt, die über eine *proof-reading* Funktion verfügt [28]. Durch diese Funktion kann die Polymerase Replikationsfehler erkennen und korrigieren. Zusätzlich verfügte der eingesetzte *reverse*-Primer über eine Biotin-Gruppe. Diese ermöglicht später die Abtrennung der einzelsträngigen DNA (ssDNA), die identisch zur eingesetzten Sequenz aus der Start-Bibliothek ist.

Nachdem vierten Schritt wurden die amplifizierten Sequenzen für den kommenden Selektions-Amplifikations-Zyklus vorbereitet. Dazu erfolgte die Inkubation der Sequenzen mit Streptavidin überzogenen magnetischen Partikeln. Über den Biotin-Tag des *reverse*-Primers konnten die amplifizierten Sequenzen aufgereinigt werden und anschließend in basischer Umgebung, was zu einer Deprotonierung der DNA-Basen führt, in ssDNA überführt werden. Nach der Separation diente die ssDNA als Nukleinsäurepool für die nächste Runde der SELEX. Es werden so viele SELEX-Runden durchgeführt, bis nur wenige Sequenzen übrigblieben, die anschließend geklont und sequenziert werden. Normalerweise werden 8-15 Runden bei einer SELEX durchgeführt [29]. Song *et al.* führten nach 13 Runden unmodifizierte Primer ein, die PCR Produkte wurden in einen pENTR/TOPO Vektor geklont und das Konstrukt in *E. Coli* TOP10 Zellen transformiert. Die erhaltenen Aptamere wurden charakterisiert und die Sequenzen nach Homologien durchsucht. Auf Basis der Sequenzhomologien fand eine Kürzung der Aptamere von 90 nt auf 21 nt statt, die für eine Reduktion der Synthesekosten wünschenswert ist. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die konstanten Regionen eines Aptamers, also die Primerregionen, in den meisten Fällen kaum einen Einfluss auf die Bindung des Aptamers haben [30].

3.2.2 Konjugation der Aptamere mit Goldnanopartikeln

Für die Verwendung in LFAs müssen die Aptamere auf die Oberfläche der Goldnanopartikel konjugiert werden. In der Literatur sind verschiedene Möglichkeiten der Immobilisierung beschrieben. Nach der nass-chemischen Synthese weisen AuNPs eine stabilisierende Citrathülle auf, die eine Agglomeration der Partikel verhindert. Die Bindung der Citrathülle mit der Oberfläche der Goldpartikel findet über schwache adsorptive Wechselwirkungen statt, weshalb das Citrat durch einen Ligandenaustausch leicht ersetzt werden kann [31].

Die am häufigsten benutzte Methode für den Ligandenaustausch ist die Chemisorption von Thiol-modifizierten Aptameren. Dabei bildet sich eine stabile Schwefel-Gold-Bindung, die eine orientierte Immobilisierung des Aptamers ermöglicht. Der Vorteil der gerichteten Immobilisierung liegt bei einer hohen Funktionalität der Aptamer auf der Partikeloberfläche. Das Ziel ist eine *self-assembled monolayer* (SAM) aufzubauen, die eine möglichst hohe Stabilität der AuNPs garantiert [32].

Auch andere elektronegative Elemente, wie z.B. Stickstoff oder Sauerstoff können an die Oberfläche der Goldpartikel binden. Im Falle von Aptameren besitzen vor allem die Basen Adenin und Cytosin eine hohe Affinität [33, 34]. Durch unspezifische Adsorption an die AuNP-Oberfläche kann die Bildung einer SAM verhindert werden. Außerdem kann dadurch die korrekte Faltung und somit die Funktion des Aptamers beeinträchtigt werden.

3.3 Lateral Flow Assays

Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist die verlässliche Detektion von Verunreinigungen in Nahrungsmitteln wichtig für die Einschätzung der daraus resultierenden gesundheitlichen Gefahren. Die größten Hürden bei der Kontrolle dieser Parameter bleiben die benötigte Zeit für Analysen,

eine schlechte Infrastruktur, ein Mangel an Fachpersonal und eine zu teure Analytik [35]. Lateral Flow Assays gehören zur Gruppe der *point-of-care* (POC) Methoden, welche eine Lösung für viele dieser Herausforderungen bieten, indem eine einfache Handhabung, ein schnelles Ergebnis, Robustheit und niedrige Kosten vereint werden. Diese Vorteile haben dazu geführt, dass POC Geräte und vor allem Lateral Flow Assays, Gegenstand aktueller Forschung sind, was an der steigenden Anzahl an Publikationen zu dem Thema belegbar ist (s. Abbildung 3.3). Zudem gibt es LFAs gegen nahezu jede Art von Analyt, wie Proteine [36, 37], Toxine [38], Hormone [39], Ionen [40] und sogar ganze Zellen oder Viren [41].

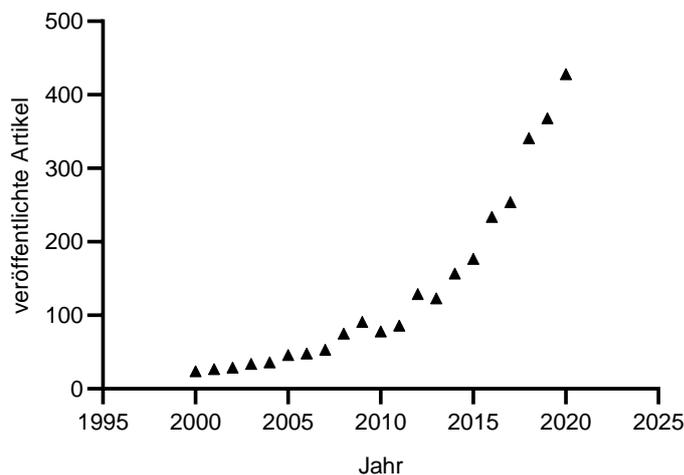


ABBILDUNG 3.3: Anzahl der Publikationen, die in der Datenbank Scopus entweder 'lateral flow' oder 'dip stick' im Titel besitzen in den Jahren 2000 bis 2020. Stand: 09.12.2020

Im Allgemeinen besteht ein LFA aus verschiedenen Membranen, die auf einer Trägerfolie fixiert werden können, um eine mechanische Stabilisierung zu erhalten (s. Abbildung 3.4). In einem typischen Assay wird die zu analysierende Probe auf ein Sample Pad aufgetragen, welches durch zugesetzte Stoffe, wie z.B. Puffersalze zur Veränderung des pH Wertes, die Probe an die Assaykonditionen anpasst. Die Probe wird mittels Kapillarkräften in Richtung des Conjugate Pads gezogen, wo die Probe ein Konjugat, bestehend aus Detektionsmolekül und einem Marker rehydriert.

Als Beispiel sei hier die Kombination aus Aptamer als Detektionsmolekül und Goldnanopartikel als Marker erwähnt. Konjugat und Analyt bilden zusammen einen Komplex, der eine kolorimetrische Auswertung des Tests ermöglicht [42]. Fänger-moleküle bilden auf der nachfolgenden Membran eine Test- und Kontrollzone, die das Konjugat fixieren [43], beispielsweise ein weiteres Aptamer. Dabei wird zwischen *signal-on* und *signal-off* Detektion unterschieden. Wie der Name schon vermuten lässt, wird bei einer *signal-on* Detektion das Signal stärker je mehr Target in der Probe vorhanden ist. Bei der *signal-off* Detektion hingegen ist die Rotfärbung der Testlinie am stärksten, wenn kein Target in der Probe vorhanden ist. Die Anreicherung der AuNPs auf der Testlinie kann dabei entweder mit dem Auge verfolgt werden oder mit einem speziellen Gerät, qualitativ oder quantitativ erfasst werden. Die Kontrolllinie zeigt einen korrekten Fluss der Probe an sowie die Funktionalität der Reagenzien. Das Absorbent Pad ermöglicht einen geregelten Fluss der Probe und ist die Triebkraft des LFAs. Außerdem verhindert das Absorbent Pad ein Zurückfließen der Probe. Wichtig ist ein Überlappen der Membranen, um die Weitergabe der Flüssigkeiten zu garantieren.

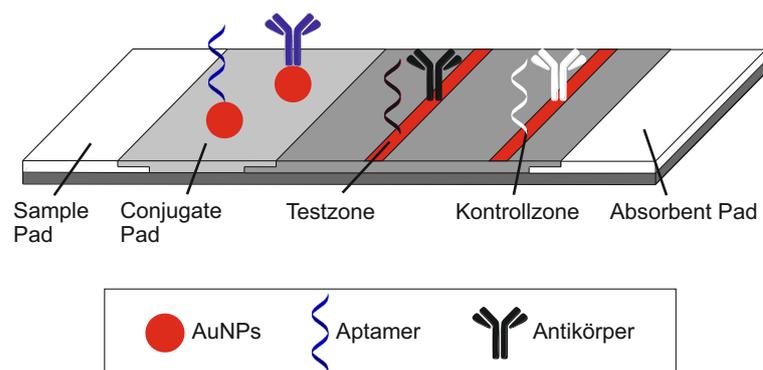


ABBILDUNG 3.4: schematische Darstellung eines LFAs

Die in Abbildung 3.4 dargestellten Komponenten eines LFAs werden im Folgenden genauer vorgestellt und ihre Funktion erläutert.

3.3.1 Das Sample Pad

Die Hauptfunktion des Sample Pads besteht in der Aufnahme und homogenen Verteilung der Flüssigkeit aus der Probe. Wichtig sind Eigenschaften, wie eine hohe Benetzbarkeit mit Wasser sowie eine gute Stabilität bei Nässe. Dabei kommen vor allem Materialien, wie Zellulose, Viskose und Glasfaser zum Einsatz. Durch die Vorbehandlung des Sample Pads mit Additiven oder Detergenzien kann Einfluss auf die Fließgeschwindigkeit, den pH-Wert oder andere Eigenschaften der Lösung genommen werden [44]. Zu Beginn jeder diagnostischen Untersuchung auf einen bestimmten Analyten wird daher das Probenmaterial auf das Sample Pad gegeben.

3.3.2 Das Conjugate Pad

Nachdem die Probe auf dem LFA aufgetragen wurde, erfolgt der Fluss in Richtung Conjugate Pad, wo die getrockneten Konjugate resuspendiert werden. Dementsprechend müssen die Pads eine gute Haltbarkeit der Konjugate nach dem Trocknen gewährleisten, zudem einen hydrophilen Charakter für eine homogene Benetzbarkeit der Oberfläche. Hierfür sind vor allem Materialien aus Glasfaser oder Polyester geeignet. Durch eine Vorbehandlung des Conjugate Pads wird der hydrophile Charakter der Membran verstärkt und ermöglicht das Resuspendieren der Konjugate bei Kontakt mit der Probe.

3.3.3 Die Testmembran

Nachdem Conjugate Pad erreicht die Kombination von Marker und Target die Testmembran, auf der die visuelle Detektion erfolgt und ist damit die Hauptkomponente eines LFAs. Typischerweise wird beim LFA eine Nitrocellulose Membran verwendet. Für die Nutzung im LFA muss die

Testmembran verschiedene Anforderungen erfüllen. Zum Einen muss die Testmembran einen Fluss der Probe über Kapillarkräfte ermöglichen. Dabei müssen die immobilisierten Fängermoleküle später den Fließkräften der Probe standhalten. Eine weitere Anforderung stellt daher die Möglichkeit zur Immobilisierung von Fängermolekülen, wie Antikörper oder Aptamere dar. Zum Anderen sollten Bestandteile, abseits des nachzuweisenden Analyten, wenige Interaktionen mit der Membran eingehen.

Membranen aus Nitrocellulose unterscheiden sich hauptsächlich hinsichtlich ihrer Porengöße. Die Porengröße beeinflusst viele Parameter eines LFAs und ist damit ein wichtiger Faktor in der Entwicklung. Kleine Poren verlangsamen den Transport der Flüssigkeit und damit des Analyten, wodurch sich die Reaktionszeit zwischen Analyt und Detektionsmolekül verlängert. Auf der anderen Seite eignen sich große Poren besser für viskose Proben, da die Zeit bis zur Auswertung des LFAs deutlich kürzer ist. Deshalb ist es sinnvoll verschiedene Membranen für die jeweilige Anwendung zu testen.

3.3.4 Das Absorbent Pad

Als letzte Station erreicht die Probe das Absorbent Pad, das für die Aufnahme der Flüssigkeit nach dem Test verantwortlich ist. Das wichtigste Kriterium ist daher die Menge an Wasser, die gebunden werden kann. Hier hat sich eine einfache Baumwollmembran als bestes Material in nahezu allen LFAs durchgesetzt. Ohne Absorbent Pad würde kein Fluss der Probe stattfinden. Außerdem schützt das Absorbent Pad vor einem Zurücklaufen der Flüssigkeit.

3.3.5 Die Konjugate

Die Konjugate werden eingesetzt, um die Bindung zwischen Detektionsmolekül und Target in ein kolorimetrisches Signal umzusetzen. Prinzipiell

kommen dabei verschiedene Materialien als Marker in Frage, wobei Goldnanopartikel aufgrund ihrer hervorragenden optischen und chemischen Eigenschaften bevorzugt werden [45]. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von AuNPs in LFAs ist die einfache Synthese. Die typischerweise verwendete nass-chemische Synthese erfolgt dabei über eine Reduktion von Tetrachlor-goldsäure mittels Natriumacetat zu elementarem Gold. Das Natriumcitrat fungiert hier als Reduktionsmittel und *capping agent*, das eine Agglomeration der Goldpartikel reduziert [46, 47]. Die dabei entstehenden Partikel sind in wässriger Lösung stabil und besitzen eine homogene Größenverteilung. Ihre charakteristische Rotfärbung erhalten die Goldpartikel dieser Größe durch Absorption von Licht bei einer Wellenlänge von 520 nm. Nach der Synthese der Partikel erfolgt die Kopplung mit dem Detektionsmolekül.

Ein Nachteil von Nanopartikeln ist die Möglichkeit der Agglomeration. Mit Hilfe der DLVO-Theorie lässt sich die Stabilität von kolloid-dispersen Systemen durch zwei Arten von Wechselwirkungen beschreiben: Attraktive Van-der-Waals- und elektrostatische Wechselwirkungen, beschrieben in Modellen zur elektrochemischen Doppelschicht, wie dem Stern Modell [48–50]. Für die AuNPs bedeutet das: Je größer die Partikel sind, desto größer sind auch die Van-der-Waals-Wechselwirkungen und damit die Wahrscheinlichkeit der Agglomeration.

Elektrostatische Wechselwirkungen können für eine Stabilisierung der Partikel sorgen, indem z.B. die Citratmoleküle nach der Synthese die Oberflächenladung reduzieren. Mit Hilfe der DLVO-Theorie kann erklärt werden, warum die Citratmoleküle für eine mäßige Abstoßung der Partikel verantwortlich sind, während die Adsorption stark negativ geladener Moleküle, wie Aptamere, stabilere Partikel erzeugt.

3.4 Assayvariationen von Aptamer-basierte Lateral Flow Assays

Die Erzeugung eines kolorimetrischen Signals mit Hilfe der Konjugate lässt sich durch unterschiedliche Assayformate bewerkstelligen. Aptamer-basierte LFAs lassen sich dabei in drei grundlegenden Strategien eingeteilt, die sich vor allem in der Art der Signalerzeugung unterscheiden. Diese Kategorien sind nach Han *et al.* [51]:

1. *Sandwich-Modus*
2. *Competitive Replacement*
3. *Target-Induced Dissociation (TID)-Modus*

3.4.1 *Sandwich-Modus*

Im Sandwich Format wird ein Fängermolekül auf der Testlinie immobilisiert und ein Detektionsmolekül auf den AuNPs (s. Abschnitt 3.3.2). Das Target bindet beim Durchlaufen des Conjugate Pads erst an das Konjugat und anschließend das Fängermolekül auf der Testlinie, was in einer Art Sandwich mit dem Target in der Mitte resultiert (s. Abbildung 3.5). Sandwich Assays weisen eine hohe Sensitivität und Spezifität auf, jedoch werden zwei Bindestellen zum Target benötigt. Deswegen werden sie normalerweise bei großen Molekülen, wie Proteinen oder Zellen, benutzt, während bei kleinen Targets mit niedrigem Molekulargewicht oft das kompetitive Format bevorzugt wird [52].

3.4.2 *Competitive Replacement*

Bei Assays, die auf dem Mechanismus des *Competitive Replacements* beruhen, steht das Target in Konkurrenz mit einem anderen Molekül um die Bindestelle des Aptamers. Dazu wird der Konkurrent des Targets entweder in definierter Menge auf Testlinie bzw. Marker immobilisiert oder der Konkurrent wird der Probe beigemischt. Durch die Konkurrenzsituation

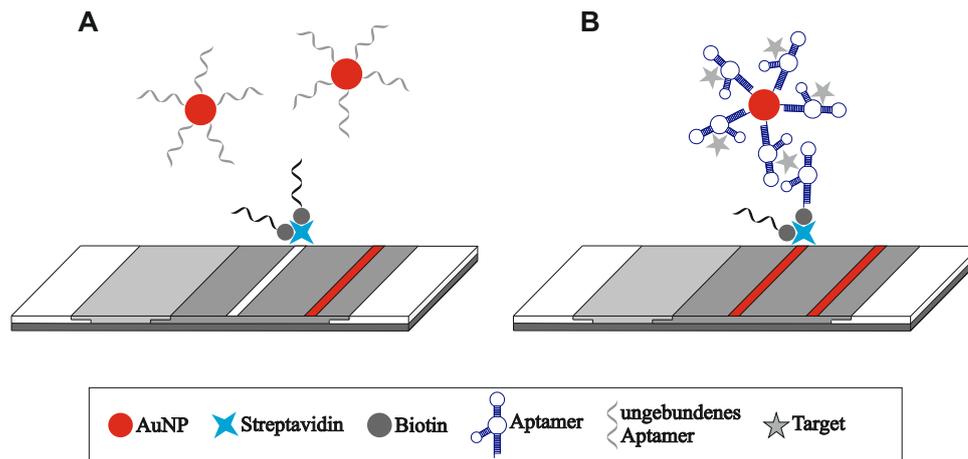


ABBILDUNG 3.5: Schema eines LFAs auf Basis des Sandwich-Modus, A: Ohne Target in der Probe bindet das Konjugat nicht an die Testlinie; B: Mit Target in der Probe binden beide Aptamere an das Zielmolekül und bilden einen Sandwich Komplex, der zu einer Rotfärbung der Testlinie führt

wird je nach Targetkonzentration in der Probe ein unterschiedliches Signal erzeugt (s. Abbildung 3.6). Bei kleinen Molekülen stellt die Immobilisierung des Targets ein Problem dar. Zum einen muss der Abstand zwischen Target und Oberfläche groß genug, um eine Bindung zum Aptamer ohne sterische Hinderung zu ermöglichen. Zum anderen wird eine funktionelle Gruppe für die Immobilisierung benötigt, was die möglichen Interaktionen zum Aptamer reduziert [53].

3.4.3 Target-Induced Dissociation-Modus

Der *Target-Induced Dissociation* (TID)-Modus beruht auf der Verwendung eines kurzen, zur Aptamersequenz komplementären, Oligonukleotids. Durch die Möglichkeit der Hybridisierung bildet sich ein Gleichgewicht zwischen ssDNA und dsDNA, das durch Zugabe des Targets verschoben wird. Bei dieser drei-Komponenten Reaktion konkurrieren der Analyt und das komplementäre Oligonukleotid, um die Bindung an das Aptamer. Der TID-Modus eignet sich daher hervorragend zur Detektion kleiner Moleküle, wie Ampicillin. Ohne Target in der Probe hybridisieren Aptamer und Oligonukleotid beim LFA auf der Testlinie, die sich durch die AuNPs rot

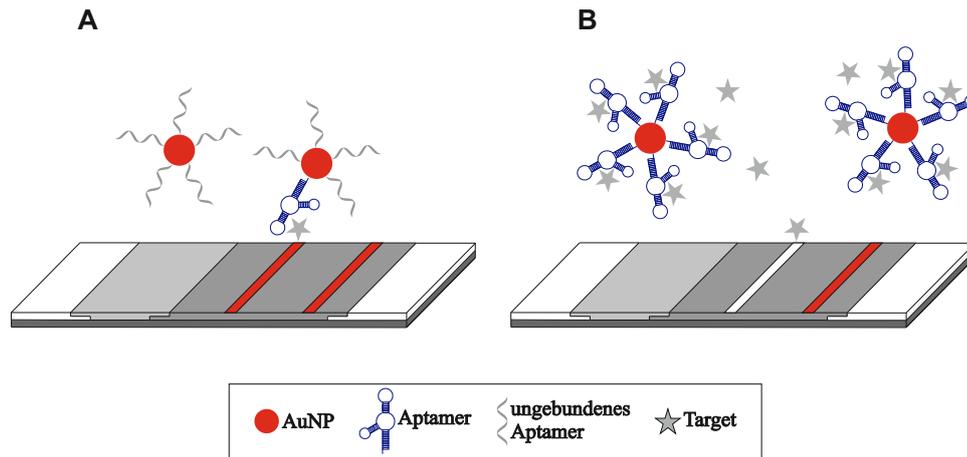


ABBILDUNG 3.6: Schema eines kompetitiven LFAs, A: Ohne Target in der Probe bindet das Aptamer an das Zielmolekül auf der Testlinie, was zu einer Rotfärbung der Linie führt; B: Das Zielmolekül auf der Testlinie steht in Konkurrenz mit dem Target in der Probe, was zu einer schwächeren Rotfärbung der Testlinie führt

verfärbt. Befindet sich das Zielmolekül in der Probe binden weniger Aptamere an die Oligonukleotide auf der Testlinie des LFAs, was mit einer schwächeren Rotfärbung einhergeht.

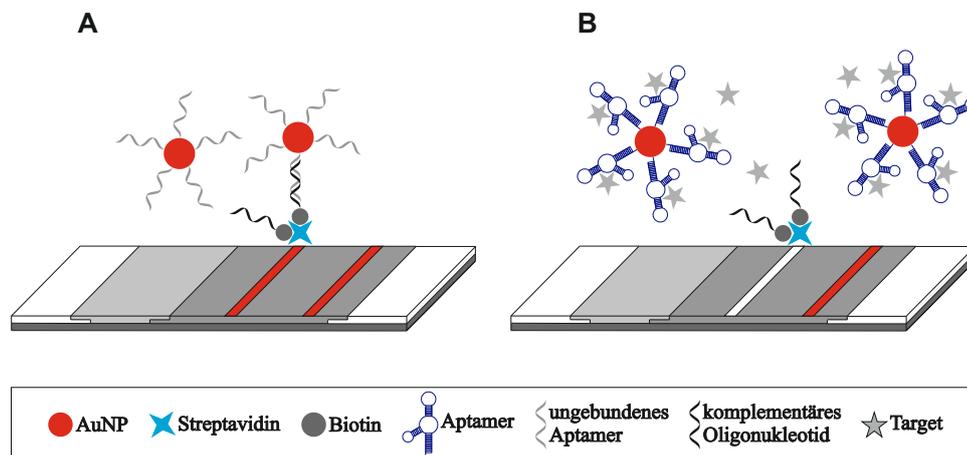


ABBILDUNG 3.7: Schema eines TID-basierten LFAs, A: Ohne Target in der Probe bindet das Aptamer an ein komplementäres Oligonukleotid auf der Testlinie, was zu einer Rotfärbung der Linie führt; B: Mit Target in der Probe bindet das Aptamer nicht an das Oligonukleotid, weshalb keine Rotfärbung der Testlinie sichtbar ist

Kapitel 4

Ergebnisse und Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines Aptamer-basierten Lateral Flow Assays zur Detektion von Ampicillin. Die benötigte Sensitivität des Assays ergibt sich aus den erlaubten Mengen in der zugrunde liegenden Matrix. Diese maximal erlaubte Menge an Ampicillin in Milch wurde von der FDA auf 30 pM festgelegt [4]. Die Grenze wird daher als Ziel für das *limit of detection* (LOD) festgelegt.

Die Detektion von Ampicillin soll mit Hilfe des TID-Formats durchgeführt werden (s. Abbildung 3.7). Während des Assays hybridisieren die Aptamere gegen Ampicillin mit einem Oligonukleotid auf der Testlinie des LFAs. Falls Ampicillin in der zu untersuchenden Probe vorhanden ist, bindet das Aptamer an Ampicillin und es findet keine Hybridisierung zwischen Aptamer und Oligonukleotid mehr statt.

Für die Entwicklung des LFAs wurden in den folgenden Kapiteln zunächst die verfügbaren Aptamere ausgesucht und charakterisiert sowie geeignete Oligonukleotid-Sequenzen entworfen, die sich für einen Assay zur Detektion von Ampicillin eignen. Das Oligonukleotid/Aptamer Paar wurde im Anschluss mittels *Microscale Thermophoresis* (MST), in der beide Bindungspartner gelöst vorliegen, charakterisiert. Darauf aufbauend wurde die Verdrängung des Ampicillins getestet und optimiert. Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Immobilisierung eines Bindungspartners auf die Verdrängung durch Ampicillin im Microarray Format untersucht. Die Immobilisierungsexperimente kommen den späteren Assaybedingungen näher, als die Charakterisierung in Lösung, und sind daher wichtig für die

Entwicklung des LFAs. Anschließend fand die Synthese der Goldnanopartikel statt, die daraufhin mit dem Aptamer gegen Ampicillin konjugiert wurden.

Die Ergebnisse wurden für die Detektion von Ampicillin auf einer Nitrocellulose Membran genutzt. Dort wurden Versuchsparameter optimiert und auf einem LFA getestet.

4.1 Charakterisierung des Ampicillin Aptamers

Für die Charakterisierung muss zunächst das optimale Aptamer sowie Oligonukleotid für eine kompetitive Verdrängung gefunden werden. Eine SELEX gegen Ampicillin wurde von Song *et al.* [9] durchgeführt. Drei der selektierten Aptamere mit den besten Dissoziationskonstanten (K_D s) wurden nach gemeinsamen Strukturmotiven bzw. Sequenzhomologien untersucht und diese als Basis für eine Kürzung der Aptamersequenzen von 90 nt auf 19 nt bis 21 nt verwendet. Das gekürzte Aptamer mit der niedrigsten K_D zu Ampicillin sowie das dazugehörige *full-length* Aptamer wurden für diese Arbeit ausgewählt und der Publikation entsprechend, A4 und AMP4 genannt. Die Sequenzen sind in Tabelle 8.1 dargestellt. Für die Selektion wurde ein Tris-Puffer gewählt (s. Tabelle 4.1).

In Abbildung 4.1 ist die Sekundärstruktur des A4-Aptamers abgebildet mit dem Bereich des gekürzten AMP4-Aptamers. Nach der Prognose der Sekundärstruktur liegen viele Bereiche des A4-Aptamers als *random coil* vor. Auffallend ist allerdings, dass im Stamm des AMP4-Aptamers ein A/T Basenpaar fehlt. Das fehlende Basenpaar hat vermutlich einen Einfluss auf die Stabilität der Sekundärstruktur.

Wichtig für die Faltung des Aptamers und damit für die Bindung an den Analyten sind die intramolekularen Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen. Die Sekundärstruktur des Aptamers, resultierend aus diesen Wechselwirkungen, kann über die Online Software

TABELLE 4.1: Zusammensetzung des Aptamer-Bindepuffers sowie die Funktion der einzelnen Komponenten

Komponente	Konzentration in mM	Funktion
Tris-HCl	20	Pufferfunktion im physiologischen Bereich
NaCl	50	Reduzierung elektrostatischer Wechselwirkungen
KCl	5	Reduzierung elektrostatischer Wechselwirkungen
MgCl ₂	5	Stabilisierung von G-Quadruplex Strukturen
pH	8	Stabilisierung von Sekundärstrukturen

Mfold berechnet werden (s. Abbildung 4.1) [54]. Vor allem im Bezug auf die nötigen komplementären Oligonukleotide, sind diese Informationen sehr wichtig, um geeignete Bereiche für eine Hybridisierung zu identifizieren. Die Unterschiede in der Sequenzlänge der beiden Aptamervarianten können einen Einfluss auf die Bindung des Aptamers zu Ampicillin sowie auf die Hybridisierung zu einem komplementären Oligonukleotid haben. Zu Beginn wurden daher die Bindungseigenschaften der Aptamervarianten zu Ampicillin bestimmt.

4.1.1 Bindung des Aptamers an Ampicillin

Für die Untersuchung der Bindung zwischen Aptamer und Target wurde zuerst die Dissoziationskonstante (K_D) ermittelt. Diese Konstante zeigt bei welcher Konzentration an Ligand der Rezeptor mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % im gebundenen Zustand vorliegt. Für die Untersuchung der K_D wurde die *Microscale Thermophoresis* (MST) verwendet.

Die MST misst die Bindungskonstante mit Hilfe der zeitlichen Veränderung der Fluoreszenz. Ein Bindungspartner muss daher über einen Fluoreszenz-Tag verfügen. Der Ligand wird in einer seriellen Verdünnung zu dem markierten Rezeptor gegeben [55]. Durch punktuelle Erhitzung der Lösung in Glaskapillaren mittels IR-Laser kann die Wanderung der Moleküle im thermischen Feld (Thermophorese) beobachtet werden. Da zu Beginn keine externe Kraft auf das System einwirkt, befindet es sich im Gleichgewicht

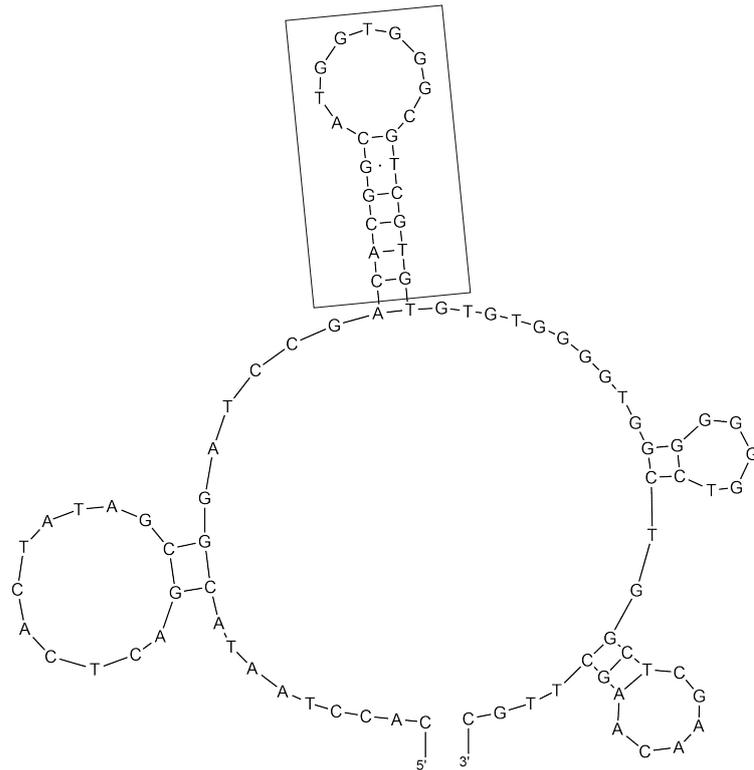


ABBILDUNG 4.1: Sekundärstruktur der A4 und AMP4 Aptamere, simuliert mittels Mfold. Das AMP4-Aptamer (schwarzer Kasten) wurde durch Kürzen der Sequenz des A4 Aptamers erhalten.

(s. Abbildung 4.2, 1). In der zweiten Phase wird die Lösung durch einen IR-Laser punktuell erhitzt. Der IR-Laser ist an den Pfad der Fluoreszenzmes-
 sung gekoppelt, wodurch die Intensität innerhalb der erhitzten Zone der Kapillare gemessen wird. Zuerst findet ein sogenannter T-Jump statt, der auf die Veränderung des Fluorophors bei unterschiedlichen Temperaturen zurück geht (s. Abbildung 4.2, 2). Anschließend ist die Veränderung der Fluoreszenzintensität auf die Bewegung der Moleküle mit oder gegen das thermische Feld zurück zu führen. Nach etwa 30 s befindet sich das System im Gleichgewicht und die Fluoreszenzintensität kann mit der Intensität vor dem Einschalten des IR-Lasers verglichen werden, um mittels Gleichung 4.1 den Signalunterschied zum Ursprungssignal zu ermitteln (s. Abbildung 4.2, 3). Durch die Auftragung der Konzentration des Liganden gegen $F_{norm}[\%]$ kann eine Bindungskurve erhalten werden (s. Abbildung 4.2, rechtes Bild). Für die Arbeit wurden die Signalintensitäten mittels sigmoidalem Fit des

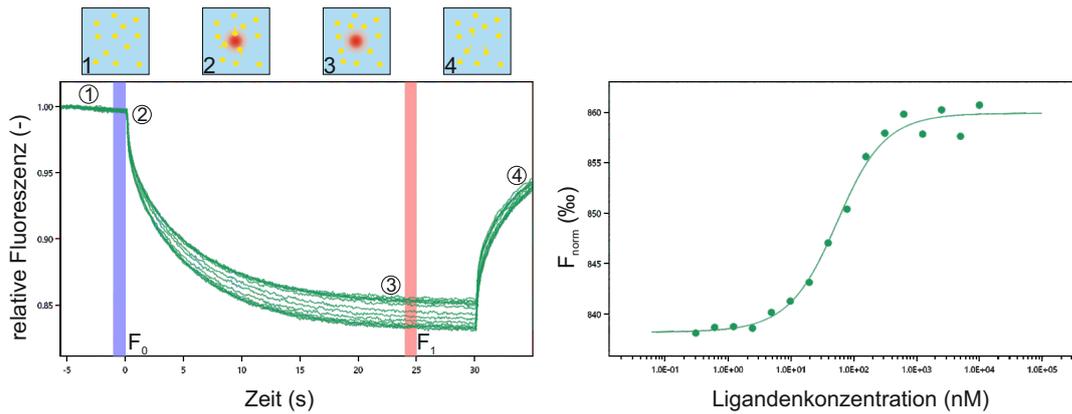


ABBILDUNG 4.2: Links: Messsignal einer MST-Kurve, nach [55], 1) Fluoreszenzsignal im thermischen Gleichgewicht, 2) Bewegung der Teilchen nach Aktivierung des IR-Lasers; in seltenen Fällen findet eine Wanderung zur höheren Temperatur statt, 3) Moleküle befinden sich im Gleichgewichtszustand, 4) Nach Abschalten des IR-Lasers und Abklingen des Temperaturgradienten bildet sich wieder das ursprüngliche Gleichgewicht aus, blauer Bereich F_0 steht für die Fluoreszenzintensität vor Beginn der Messung, roter Bereich F_1 steht für die Fluoreszenzintensität im thermophoretischen Gleichgewicht, Rechts: Messpunkte der Bindung eines Liganden in serieller Verdünnung an einen Rezeptor. Die Kurve zur Bestimmung der K_d wird dabei über einen sigmoidalen Fit erzeugt

Programms *GraphPad Prism* ausgewertet. Nach dem Ausschalten des IR-Lasers findet eine Diffusion zum Ausgangszustand statt, die nur durch die Masse der Teilchen beeinflusst wird (s. Abbildung 4.2, 4) [56].

$$F_{norm}[\%] = \frac{F_1}{F_0} \quad (4.1)$$

Für ein Experiment wurden immer 16 Verdünnungen des Liganden angesetzt. Dabei hängt die Thermophorese des Rezeptors bzw. Rezeptor-Liganden Komplexes im Falle von Nukleinsäuren von der Größe bzw. Länge der Sequenz, ihrer Faltung und der Hydrathülle des Moleküls bzw. Komplexes ab [57]. Änderungen der Hydrathülle des Moleküls durch die Rezeptor-Liganden Bindung beeinflussen die Entropie des Moleküls und damit das Verhalten bei einer Temperaturänderung. Normalerweise

bewegen sich die Moleküle entgegen dem thermischen Feld zu Bereichen mit geringerer Temperatur (positive Thermophorese), was zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität führt.

Zur Messung der K_D des gekürzten AMP4-Aptamers wurde eine serielle Verdünnung von Ampicillin mit einer maximalen Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ hergestellt und mit dem Cy5-markierten AMP4-Aptamer ($25\ \text{nM}$) versetzt. Die Lösung wurde für 30 min inkubiert und anschließend in Glaskapillaren überführt und gemessen.

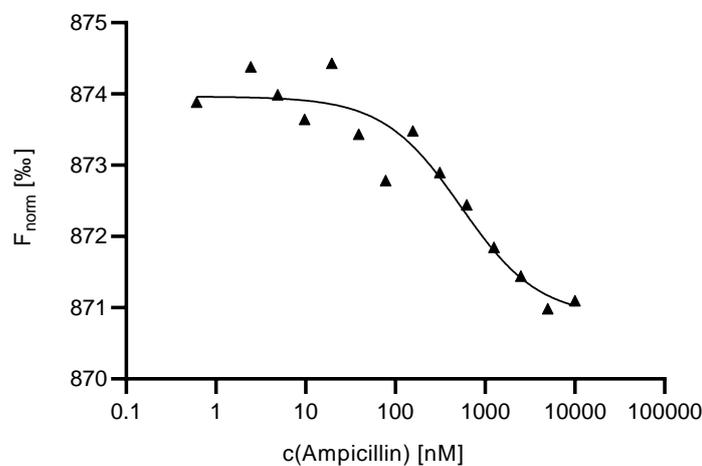


ABBILDUNG 4.3: MST Kurve der Bindung zwischen AMP4-Aptamer und Ampicillin mit einer K_D von $537,9\ \text{nM}$

Wie in Abbildung 4.3 zu sehen ist, konnte ein Bindung des Aptamers an das Ampicillin gezeigt werden. Die Dissoziationskonstante liegt mit $537,9\ \text{nM}$ im nanomolaren Bereich, was eine starke Bindung des Aptamers an Ampicillin bestätigt. Eine Herausforderung ist die niedrige Amplitude der Messung von 3,1. Die Amplitude der MST Messung ergibt sich aus dem Signalunterschied zwischen dem ungebundenen und dem gebundenen Zustand und ist damit ein Maß für das Signal-zu-Rausch Verhältnis der Messung. Laut Herstellerangaben sollte dieser Wert über 3 liegen, um Rückschlüsse auf die Bindung ziehen zu können. Dabei hängt die Amplitude von der Änderung der Thermophorese ab und damit von Änderungen

der Größe sowie Hydrathülle des Aptamers vor und nach der Bindung an Ampicillin.

Ein Vergleich der Molekülmassen von Aptamer und Ampicillin hilft zu verstehen, warum die Amplitude der MST Messung niedrig ist. Ampicillin besitzt ein Molekulargewicht von $349,41 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$, was verglichen mit dem Molekulargewicht des Aptamers von $7051,26 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ sehr gering ist [55, 56]. Daher findet für das Aptamers kaum eine Gewichtsänderung durch die Bindung statt.

Da sich die Ladung des Aptamers durch Bindung zu Ampicillin nicht ändert, hat in diesem Fall nur die Änderung der Hydrathülle einen Einfluss auf das Signal in der MST. Diese hängt vor allem von der Änderung der Struktur ab. Bei kleinen Molekülen mit aromatischen Gruppen kommt es oft zu einer Insertion des Targets in die Basen des Aptamers über π - π -Wechselwirkungen, sodass bei der Bindung des Aptamers keine große Strukturänderung stattfindet [21]. Trotzdem konnte in diesem Fall eine Bindung beobachtet werden und eine K_D für die Bindung des Aptamers zu Ampicillin in Höhe von 537,9 nM bestimmt werden.

Das Aptamer A4 ist das *full length* Aptamer des AMP4-Aptamers und besteht aus 90 nt. Eine Kürzung der Nukleinsäuresequenz kann die Bindungseigenschaften beeinflussen, weshalb ein Vergleich des AMP4-Aptamers mit dem A4-Aptamer sinnvoll schien. Die MST zur Bestimmung der Bindungskonstanten wurde unter den gleichen Bedingungen wie für das AMP4-Aptamer durchgeführt.

Entgegen der Erwartungen konnte für das Aptamer A4 keine Dissoziationskonstante erhalten werden (s. Abbildung 4.4). Dies ist womöglich auf die nicht messbare Strukturänderung des Aptamers während der Bindung zurückzuführen. Das *full length* Aptamer besitzt durch die große Anzahl an Basen eine Vielzahl an Faltungsmöglichkeiten mit unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten im thermischen Feld, die das Signal der Bindung des Aptamers zu Ampicillin überlagern können. Ein Vergleich

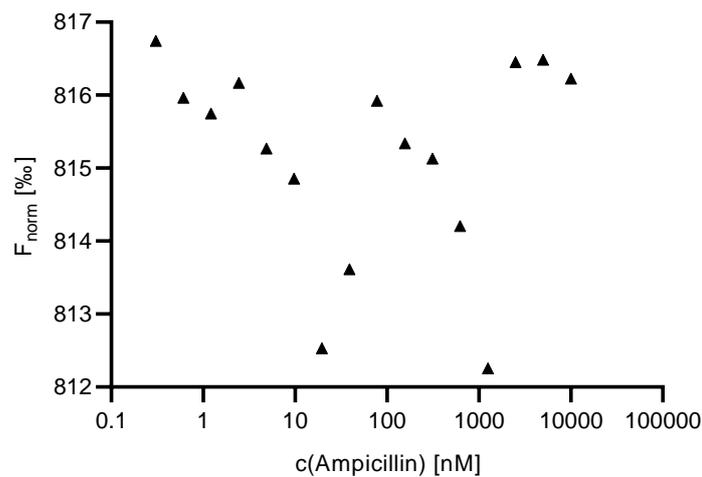


ABBILDUNG 4.4: MST Kurve der Bindung zwischen A4 Aptamer und Ampicillin

der Dissoziationskonstanten auf Basis der Bindung zwischen Aptamer und Ampicillin in der MST ist somit nicht durchführbar. Als Alternative kommt die Fluoreszenz-Markierung von Ampicillin in Frage, wodurch eine genaue Messung möglich sein sollte. Ampicillin verfügt nur über wenige funktionelle Gruppen und eine Fluoreszenz-Markierung würde mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Einfluss auf die Bindung des Aptamers haben.

Für eine Beurteilung der beiden Aptamere wurde daher als Alternative die *half maximal effective concentration* (EC₅₀) der kompetitiven Reaktion zwischen dem Oligonukleotid und Ampicillin bestimmt. Dabei hybridisiert das Oligonukleotid erst an das Aptamer und wird anschließend durch Zugabe von Ampicillin verdrängt. Bei der Verdrängung durch Ampicillin sollte eine messbare Strukturänderung des Aptamers stattfinden. Diese Untersuchung wird in Abschnitt 4.1.2 durchgeführt.

4.1.2 Entwicklung eines kompetitiven Assays zur Detektion von Ampicillin

Für die Entwicklung eines kompetitiven Assays wird zunächst ein komplementäres Oligonukleotid benötigt, das mit dem Aptamer hybridisiert und bei Zugabe von Ampicillin verdrängt wird. Die Anforderungen an das Oligonukleotid sind daher der richtige Bereich der Hybridisierung innerhalb der Aptamersequenz sowie eine optimale Stärke der Hybridisierung.

Der richtige Bereich der Hybridisierung kann dabei entweder in der Nähe der Bindestelle des Aptamers zum Ampicillin liegen oder an einem entfernten Bereich, wobei die Bindung des Oligonukleotids an das Aptamer die Faltung der Bindestelle, ähnlich einer allosterischen Inhibition, verändert. Mit einer Basenzahl des Aptamers von nur 21 nt findet eine Hybridisierung des Oligonukleotids vermutlich in der Nähe der Bindestelle zum Ampicillin statt. Die Stärke der Hybridisierung lässt sich über die Sequenzlänge des Oligonukleotids kontrollieren. Ist die Bindung zu stark findet keine Verdrängung durch Ampicillin statt; Ist die Hybridisierung zu schwach kann es zu einer unspezifischen Verdrängung des Oligonukleotids kommen[53, 58].

Aus der hauseigenen Literatur wurde entnommen, dass sich Oligonukleotide mit einer Länge von 10 nt besser als längere Sequenzen für kompetitive Assays eignen [59]. Mit einer Länge der Nukleinsäuresequenz von 10 nt als Ausgangspunkt wurden drei verschiedene Oligonukleotide entworfen (s. Abbildung 4.5). Bei einer Sequenzlänge des AMP4-Aptamers von 21 nt werden durch die drei Oligonukleotide mit einer Basenzahl von 10 nt alle Bereiche des Aptamers abgedeckt.

Oligo-C₁ hybridisiert an das 3'-Ende des Aptamers, Oligo-C₂ an das 5'-Ende und Oligo-C₃ in der Mitte des Aptamers. Oligo-C₁ und -C₂ binden dabei an die jeweiligen Stammbereiche der Struktur, -C₃ hingegen bindet in dem Schleifenbereich. Von der Position der Hybridisierung her kann Oligo-C₂ *a priori* als ungünstigstes Oligonukleotid identifiziert werden, da

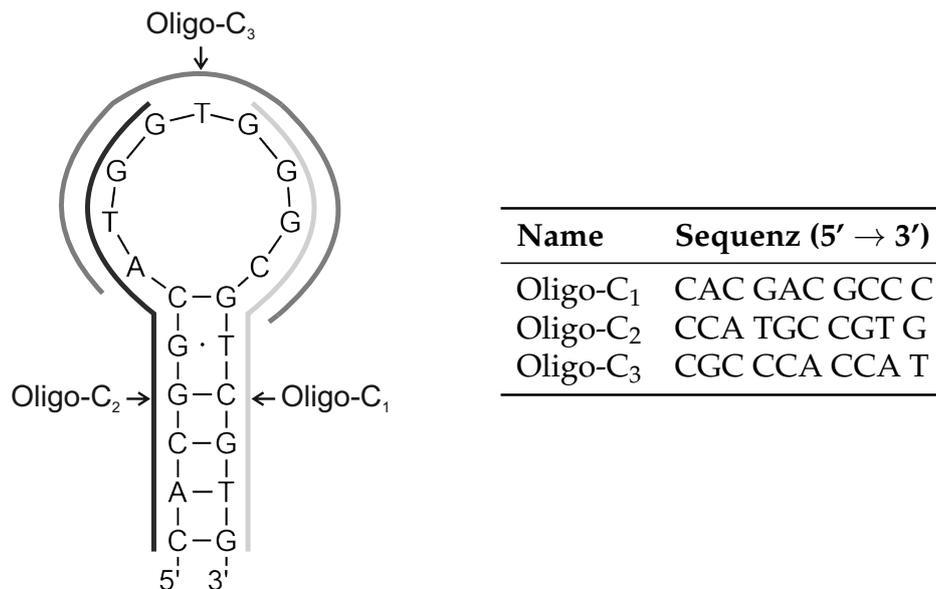


ABBILDUNG 4.5: A) Sekundärstruktur des Amp4 Aptamers inklusive gekennzeichnete komplementärer Bereiche, B) Tabelle mit den Sequenzen der getesteten Oligonukleotide

die Immobilisierung des Aptamers auf den AuNPs aus kosten-technischen Gründen bevorzugt über das 5'-Ende des Aptamers erfolgen sollte, wodurch sterische Hinderungen bei der Wechselwirkung zwischen Aptamer und Oligo-C₂ auftreten können.

Zu Beginn mussten die K_D s der Hybridisierungen der einzelnen Oligonukleotide mittels MST ermittelt werden. Diese geben Rückschlüsse über die Stärke der Hybridisierung zwischen Aptamer und Oligonukleotid. Die Experimente wurden analog zu Abschnitt 4.1.1 durchgeführt, indem zu dem Fluoreszenz-markierten Aptamer (25 nM) eine serielle Verdünnung mit einer maximalen Konzentration des Oligonukleotids von 5 μ M gegeben wurde. Die Inkubationsdauer betrug 30 min.

Alle drei Hybridisierungen konnten erfolgreich nachgewiesen werden. Die ermittelten Dissoziationskonstanten sind in Tab. 4.2 aufgeführt. Die K_D s sind für das AMP4-Aptamer geringer, als für das A4-Aptamer. Durch die höhere Basenzahl scheint die Hybridisierung mit den Oligonukleotiden erschwert zu werden. Auffällig sind die ähnlichen K_D s der Oligos-C₁ und -C₂. In beiden Fällen muss der Stamm-Bereich des Aptamers aufgebrochen werden und die ausgebildeten Basenpaare im Bereich des Stammes sind identisch. Im

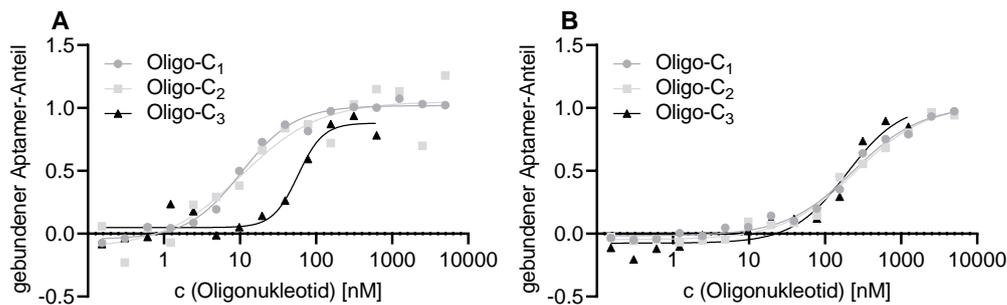


ABBILDUNG 4.6: MST Kurven zur Bestimmung der K_D mit Auftragung der eingesetzten Konzentration an Oligonukleotid gegen den gebundenen Anteil in %. Aus den Messpunkten kann über einen sigmoidalen Fit eine K_D berechnet werden; A) MST Kurven des AMP4-Aptamers mit den unterschiedlichen Oligonukleotiden, B) MST Kurven des A4-Aptamers mit den verschiedenen Oligonukleotiden

TABELLE 4.2: Dissoziationskonstanten der getesteten Oligonukleotide

Name	K_D in nM	
	AMP4-Aptamer	A4-Aptamer
Oligo-C ₁	10,4	236,4
Oligo-C ₂	10,5	248,4
Oligo-C ₃	57,8	193,3

Gegensatz dazu ist die Bindung zu Oligo-C₃ schwächer, was mit der Hybridisierung im Schleifenbereich erklärbar ist. Das Ausbilden des Stammes stellt hier eine Konkurrenzreaktion dar, die einer Hybridisierung im Wege steht. Bei allen drei Oligonukleotiden liegen die Dissoziationskonstanten im niedrigen nanomolaren Bereich und deutlich unter der Bindungskonstante des Ampicillins. Eine Verdrängung der Oligonukleotide durch Ampicillin wird daher vermutlich unvollständig stattfinden, da die Hybridisierung bevorzugt gegenüber der Ampicillin Bindung abläuft.

Bei Oligo-C₃ wurde nur ein Ausschnitt aus dem MST Graphen gezeigt, da bei hohen Konzentrationen an Ligand ein rapider Abfall der Fluoreszenz stattfand (s. Abbildung 4.7). Dies konnte sowohl für das AMP4-Aptamer als auch für das A4-Aptamer beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung

für dieses Phänomen ist die Bildung von Multimeren aus mehreren Aptamer/Oligonukleotid-Komplexen. Die Hybridisierung von Oligo-C₃ kann zu einer Öffnung des Stammbereiches des Aptamers führen. Über diese geöffneten Stammbereiche des Aptamers, die komplementär miteinander sind, kann theoretisch die Hybridisierung zu einem weiteren Aptamer/Oligonukleotid-Komplex stattfinden. Normalerweise laufen intramolekulare Bindungen in Molekülen bevorzugt ab, aber möglicherweise verschieben hohe Konzentrationen an Oligo-C₃ das Gleichgewicht zu intermolekularen Bindungen. Bei ausreichender Menge an Aptamer und Oligonukleotid könnte eine Art der Polymerisierung von Aptameren stattfinden. Die K_D -Werte von Oligo-C₃ müssen aufgrund des starken Abfalls mit Vorsicht interpretiert werden. Es muss angemerkt werden, dass bei einem LFA beide Bindungspartner immobilisiert vorliegen, was eine Bildung von Multimeren unwahrscheinlich macht.

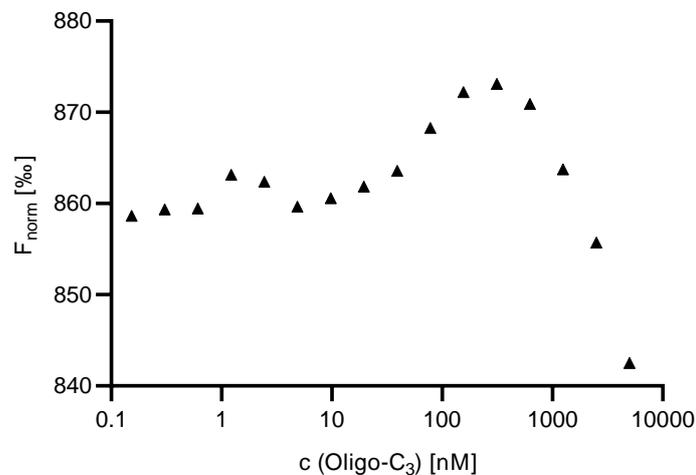


ABBILDUNG 4.7: MST Kurve der Hybridisierung von dem AMP4-Aptamer und Oligo-C₃

Im nächsten Schritt wurde der EC_{50} -Wert von Ampicillin ermittelt, also die Konzentration bei der 50 % der maximalen Signaländerung durch Zugabe von Ampicillin erreicht ist. Für dieses Experiment wurde Cy5-markiertes Oligonukleotid und Aptamer im Verhältnis eins zu eins vorgelegt und mit einer Standardreihe an Ampicillin zusammen inkubiert. Theoretisch

kann eine Verdrängung des Oligonukleotids vom Aptamer stattfinden, die Bildung eines Aptamer-Oligonukleotid-Ampicillin Komplexes oder es findet nach der Hybridisierung keine Bindung an Ampicillin mehr statt. Die Unterscheidung wird durch die Nutzung des Cy5-markierten Oligonukleotids ermöglicht. Der Signalunterschied sollte deutlich sichtbar sein zwischen freiem Oligonukleotid und der hybridisierten Form, während die Bildung eines Aptamer-Oligonukleotid-Ampicillin Komplexes kaum eine Änderung der Größe oder Struktur hervorrufen sollte. Für den Versuch wurden 25 nM AMP4-Aptamer bzw. A4-Aptamer mit 25 nM Cy5-Oligonukleotid versetzt und für 30 min vorinkubiert. Die maximale Ampicillin Konzentration betrug 5 μ M und lag damit um den Faktor 200 über der Oligonukleotid und Aptamer Konzentration, während die minimale Konzentration mit 0,15 nM um den Faktor 200 niedriger lag. Selbst bei einer unvollständigen Verdrängung des hybridisierten Oligonukleotids sollte eine Signaländerung mit Hilfe der MST detektierbar sein, da das Oligonukleotid eine große Änderung der Hydrathülle, Größe und Ladungsverteilung erfährt, sobald es an das Aptamer bindet.

Eine Verdrängung von Oligo-C₂ konnte bei der eingesetzten Ampicillin Konzentration von maximal 5 μ M bei keinem der beiden Aptamere detektiert werden (s. Abbildung 4.8). Es konnte im letzten Versuch gezeigt werden, dass Oligo-C₂ and das AMP4-Aptamer mit einer K_D von 10,56 nM hybridisiert (s. Tabelle 4.2). Da die K_D fast identisch mit der Stärke der Hybridisierung des Aptamers zu Oligo-C₁ ist, stellt sich die Frage, warum keine Verdrängung im Falle des Oligos-C₂ beobachtet werden konnte. Eine mögliche Erklärung besteht in der Bildung eines Aptamer-Oligonukleotid-Ampicillin Komplexes, da dann keine Verdrängung von Oligo-C₂ stattfinden würde. Dies würde begründen, warum die Verdrängung nicht schlechter, sondern gar nicht messbar ist. Hingegen konnte für Oligo-C₁ bei beiden Aptamervarianten eine Verdrängung beobachtet werden. Dabei liegt der EC₅₀-Wert beim AMP4-Aptamer und A4-Aptamer mit jeweils 5,141 nM sowie 9,203 nM im niedrigen nanomolaren Bereich.

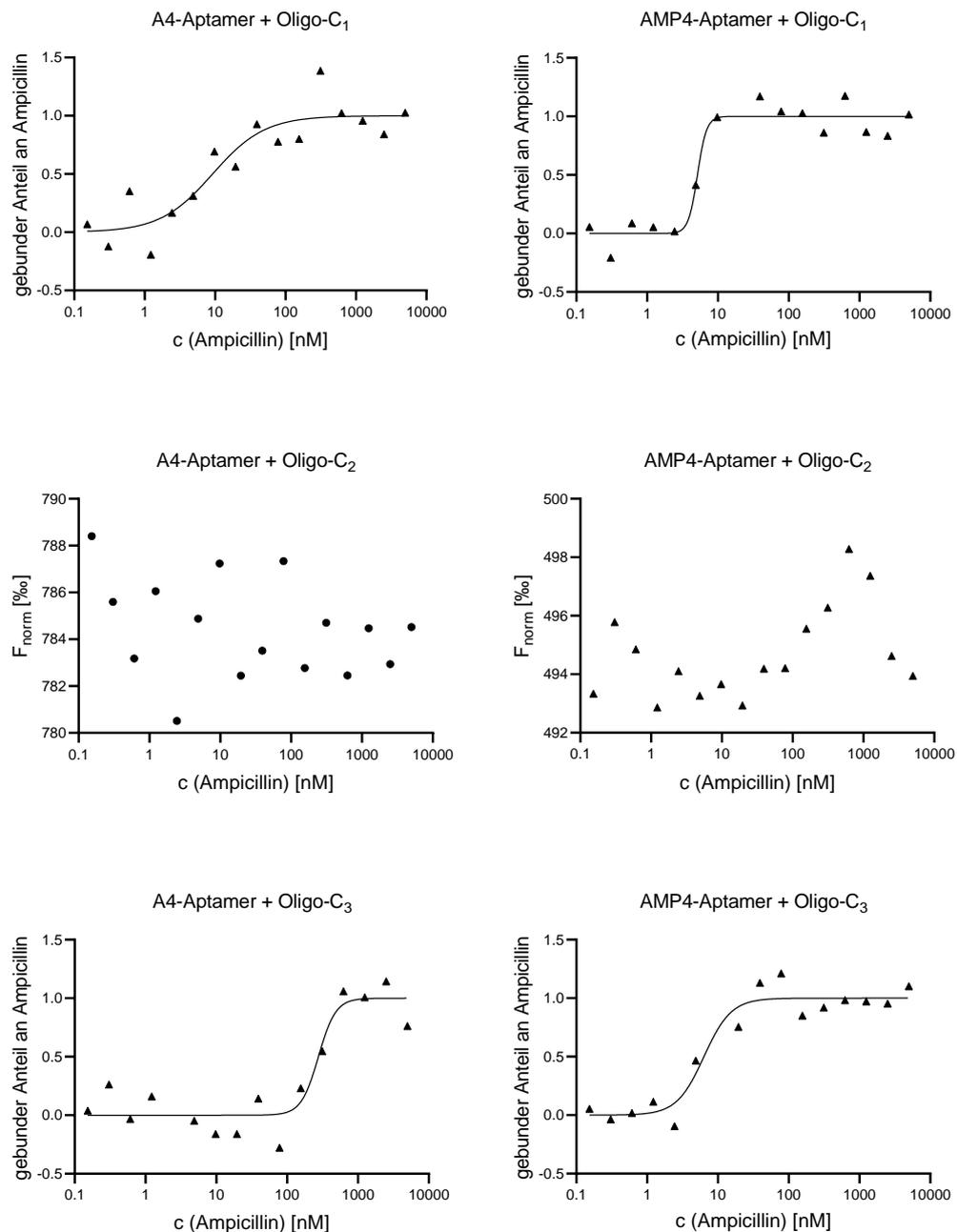


ABBILDUNG 4.8: MST Kurven der Konkurrenzreaktion zwischen Ampicillin und Oligonukleotid um die Bindung zum Aptamer

Auch bei Oligo-C₃ konnte für beide Aptamervarianten ein EC₅₀ ermittelt werden. Für das AMP4-Aptamer liegt dieser Wert mit 6,349 nM deutlich unter dem Wert von 276,7 nM für das A4-Aptamer. Dieser Unterschied lässt sich möglicherweise mit dem zusätzlichen A/T Basenpaar im Stamm

TABELLE 4.3: EC₅₀-Werte sowie Amplituden der MST Ergebnisse der Verdrängung des Cy5-markierten Oligonukleotids vom Aptamer

Aptamer	Name	EC ₅₀ in nM	Amplitude
A4-Aptamer	Oligo-C ₁	9,20 ± 5,01	5,09
	Oligo-C ₂	-	-
	Oligo-C ₃	276,70 ± 59,39	5,80
AMP4-Aptamer	Oligo-C ₁	5,14 ± 0,67	5,10
	Oligo-C ₂	-	-
	Oligo-C ₃	6,35 ± 1,85	5,89

des A4-Aptamers erklären, das für eine zusätzliche Stabilisierung des Aptamerstammes sorgt (s. Abbildung 4.1). Denkbar sind aber auch sterische Einflüsse aufgrund der höheren Basenzahl im Falle des A4-Aptamers.

Die Amplituden konnte bei allen detektierten Signaländerungen auf über 5 gesteigert werden, was einer deutlichen Verbesserung gegenüber der Messung der Bindung zwischen Aptamer und Ampicillin entspricht (s. Tabelle 4.3). Dadurch lassen sich präzisere Aussagen über die Bindung erhalten. Die Amplitude sollte mindestens über 3 liegen, damit ein vernünftiges Signal-Rausch-Verhältnis vorliegt. Hier zeigt sich außerdem, das der TID-Mechanismus eine sensitivere Messung in der MST ermöglicht, als die reine Messung der Bindung zwischen Aptamer und Ampicillin. Diese konnte beim *full length* Aptamer nicht detektiert werden; die Verdrängung mit Hilfe des Oligos beweist aber eine Bindung mit ähnlicher Affinität, wie das AMP4-Aptamer.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Verwendung des AMP4-Aptamers nicht negativ auf die Bindung von Ampicillin zu Aptamer auswirkt und das gekürzte Aptamer verwendet werden kann. Beeindruckend ist, dass die gekürzte Variante in beiden Fällen sogar niedrigere EC₅₀-Werte als das *full length* Aptamer besitzt.

Auf grund der fehlenden Verdrängung wurde Oligo-C₂ nicht weiter für die Verwendung auf dem LFA in Betracht gezogen. Zusätzlich bindet Oligo-C₂

an das 5'-Ende des Aptamers, was bei einer Immobilisierung zu sterischen Problemen führen kann, da die Immobilisierung häufig über das 5'-Ende realisiert wird.

Die Bindungsversuche der Aptamere in Lösung konnte damit abgeschlossen werden. Auf Basis der Ergebnisse der Verdrängung (s. Tabelle 4.3) wurde das gekürzte AMP4-Aptamer zusammen mit Oligo-C₁ für weitere Experimente ausgewählt. Neben dem niedrigsten EC₅₀-Wert wurde mit der MST kein Abfall der Fluoreszenzintensität bei der Hybridisierung mit hohen Konzentrationen an Oligonukleotid festgestellt, wie es bei Oligo-C₃ der Fall war (s. Abbildung 4.7). Im Folgenden wurden die strukturellen Eigenschaften des AMP4-Aptamer mittels Circular Dichroism (CD) Spektroskopie untersucht.

4.1.3 CD-Spektrometrie

Die Ergebnisse der MST Messungen, vor allem der Bindung des Aptamers an Ampicillin, lassen keine große Strukturänderung des Aptamers während der Targetbindung vermuten. Um diese Vermutung zu bestätigen wurde das Aptamer mittels Circular Dichroism (CD) Spektroskopie untersucht. Dabei wird die Differenz der Absorption einer Substanz zwischen rechts- und links zirkular polarisiertem Licht ermittelt. CD-Spektrometrie ist eine hervorragende Methode der Strukturaufklärung von Nukleinsäuren und Proteinen. Im Bereich der gemessenen Wellenlängen findet hauptsächlich eine Absorption durch die Nukleinsäurebasen statt. Je nach Struktur variiert der Einfluss der chemischen Umgebung auf die Basen und damit die Absorption des zirkular polarisiertem Licht. Die chemische Umgebung der Nukleinsäurebasen wird von benachbarten Basen, dem Phosphatrückgrat und dem Zucker beeinflusst. Dadurch ist die CD-Spektrometrie sensitiv für Strukturänderungen. Die Auswertung erfolgt über einen empirischen Vergleich mit vorhandenen Spektren bekannter Strukturen statt. Diese Strukturen wurden mittels Röntgenkristalluntersuchungen aufgeklärt und

anschließend mit den Ergebnissen der CD-Messungen verglichen (s. Tabelle 4.4) [60].

Bei der CD-Spektrometrie werden für die Strukturaufklärung von Nucleinsäuren typischerweise Wellenlängen im Bereich von 180 bis 320 nm verglichen. Die Differenz zwischen rechts- und links zirkular polarisiertem Licht wird als Elliptizität bezeichnet und in Milligrad (mdeg) angegeben. Das Experiment wurde durchgeführt, indem das Aptamer mit dem Bindepuffer auf eine Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ gebracht wurde. Für die Bindung zu Ampicillin wurde eine äquimolare Menge an Ampicillin zu dem Aptamer gegeben und über Nacht inkubiert.

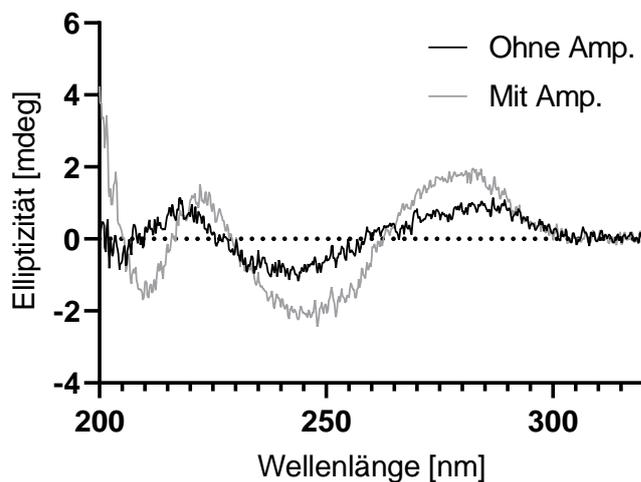


ABBILDUNG 4.9: Ergebnis des CD-Spektroskopie-Experimentes zur Bestimmung der Struktur des AMP4-Aptamers, einmal ohne Ampicillin und einmal mit $10\ \mu\text{M}$ Ampicillin.

Die in dem Experiment erhaltenen CD-Spektren sind in Abbildung 4.9 dargestellt. Die Elliptizität durchläuft dabei einige Maxima sowie Minima in dem untersuchten Wellenlängenbereich. Zwischen den beiden Kurven sind Unterschiede erkennbar, die eine leichte Veränderung der Struktur durch Zugabe von Ampicillin belegen.

Durch Zugabe von Ampicillin findet eine leichte Verschiebung der Maxima

TABELLE 4.4: Wellenlängen der Maxima, Minima und *Crossover* repräsentativer Struktur motive von Nukleinsäuren in der CD-Spektrometrie, nach [60]

Nukleinsäure	λ_{min} in nm	$\lambda_{crossover}$ in nm	λ_{max} in nm
<i>Duplex</i>			
Calf thymus DNA (A form)	210	256	266
Calf thymus DNA (B form)	244	258	216, 274
[<i>Poly(dGdC)</i>] ₂ (A form)	210, 300	244, 288	273
[<i>Poly(dGdC)</i>] ₂ (B form)	205, 252	268	276
[<i>Poly(dGdC)</i>] ₂ (Z form)	195, 290	217, 278	267
<i>Triplex</i>			
[<i>Poly(dA)</i>] ₂ :poly(dT)	248	234, 276	222, 286
Poly(dA):[<i>poly(dT)</i>] ₂	246	253	257, 278
<i>Quadruplex</i>			
Oligo(dG ₁₂) (parallel)	239	247	257
Oligo(dG ₄ dT ₄ dG ₄) (antiparallel)	264	251, 278	241, 296
<i>i-motif</i>			
[<i>poly(dC)</i>] ₂	265	274	290

zu einer Wellenlänge von 222,2 nm und 282,4 nm statt. Dagegen befinden sich die Minima bei 209,6 nm und 243,8 nm.

Als zweites fällt auf, dass die Elliptizität durch Zugabe von Ampicillin zunimmt, was auf eine Stabilisierung der Struktur hindeutet. Durch die Bindung von Ampicillin werden zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen und aromatische Wechselwirkungen aufgebaut, die das lokale Minimum der bindenden Struktur reduzieren. Dadurch verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung der bindenden Struktur, was durch ein stärkeres Signal messbar wird.

Wie oben erwähnt, erfolgt die Auswertung durch einen Literaturvergleich zu empirische ermittelten Referenzstrukturen (s. Tabelle 4.4)[60]. Dabei werden die Maxima und Minima mit Literaturwerten verglichen.

Der Vergleich der experimentell gemessenen Extrempunkte mit den Werten aus Tabelle 4.4 lässt darauf schließen, dass das Aptamer eine B-DNA bzw. Helix als Strukturmerkmal aufweist, die durch Ampicillin zusätzlich stabilisiert wird. Eine Stabilisierung der Helix kann beispielsweise durch

Wechselwirkungen mit den zwei ungepaarten Basen im Stammbereich stattfinden (s. Abbildung 4.1). Diese Ergebnisse erklären die geringe Amplitude der MST Messung zwischen Aptamer und Ampicillin, da die MST vor allem auf, mit einer Strukturänderung verbundenen, Änderung der Hydrathülle reagiert. Diese Strukturänderung findet bei dem vorliegenden Aptamer bei Targetbindung nur in geringem Maße statt.

Die B-DNA als Strukturmerkmal lässt sich bei dem AMP4-Aptamer durch inter- oder intramolekulare Basenpaare realisieren. Intermolekulare Basenpaare würden einer Dimerisierung des Aptamers entsprechen, was einen erheblichen Einfluss auf den Assay ausüben würde (s. Abbildung 4.10). Daher wurde dies ausgeschlossen, indem die intermolekulare Hybridisierung zu einem weiteren, identischen Aptamer untersucht wurde. Im Microarray Format ließ sich eine Bindung zwischen zwei Aptameren kaum detektieren, was für die Ausbildung der Schleifenstruktur in Lösung spricht. Nichtsdestotrotz besteht die Möglichkeit der Dimer Bildung, weshalb die Aptamere in den kommenden Versuchen vor Verwendung zur Denaturierung auf 95 °C erhitzt wurden, um die gebildeten Sekundärstrukturen, und damit auch die Dimere, aufzubrechen.

Die Charakterisierung der Bindung zwischen AMP4-Aptamer und Ampicillin wurde damit erfolgreich abgeschlossen. In Abschnitt 4.1.4 wird mit Hilfe von Microarray Experimenten das Aptamer immobilisiert und ein kompetitiver Assay zur Detektion von Ampicillin entwickelt.

4.1.4 Immobilisierungsstudien im Microarray-Format

Als nächster Schritt wurde ein Bindungspartner immobilisiert, um den Einfluss auf die Verdrängung durch Ampicillin zu testen. Da auch im LFA einer der Bindungspartner immobilisiert vorliegen wird, kann damit eine Annäherung an die späteren Assay Konditionen erreicht werden. Hierzu wurde das Microarray-Format ausgewählt. In Abbildung 4.11 ist der Aufbau eines Microarrays graphisch dargestellt. Jeder Microarray wird in 16 Blöcke

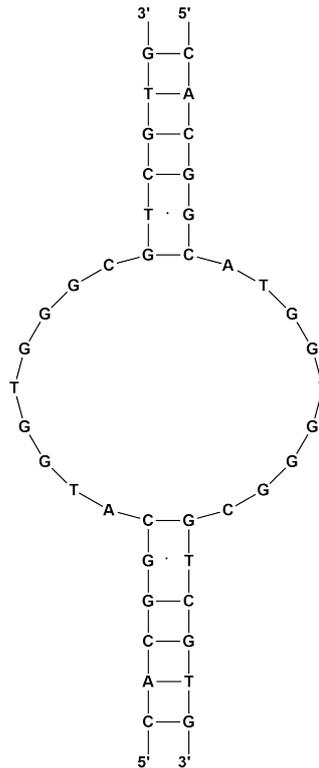


ABBILDUNG 4.10: Sekundärstruktur des AMP4-Aptamers durch intermolekulare Wechselwirkungen

aufgeteilt. In diese Blöcke werden die zu immobilisierenden Aptamere aufgetragen. Innerhalb eines Blocks können verschiedene Aptamerlösungen gespottet werden, untereinander sind die Blöcke aber identisch. Der Vorteil von Microarray Experimenten liegt in der hohen Reproduzierbarkeit sowie der hohen Variationsmöglichkeit, wodurch viele Parameter gleichzeitig getestet werden können. Bis zu 16 verschiedene Inkubationsbedingungen können auf jedem Microarray getestet werden. Bei der Immobilisierung eines Bindungspartners wird dem Aptamer bzw. Oligonukleotid Bewegungsfreiheit genommen, was zu einer sterischen Hinderung der Bindung führen kann. Für die Verwendung in einem LFA muss daher die Funktionalität des Aptamers auch nach der Immobilisierung gewährleistet sein.

Die ersten Versuche wurden auf 3D-Aldehyd Microarrays durchgeführt. Diese besitzen den Vorteil einer dreidimensionalen Oberfläche, die später auch im LFA verwendet wird. Die Aldehyd-Gruppen auf der Oberfläche der Slides reagieren mit Nukleophilen, wie Amino-Gruppen, zu einem

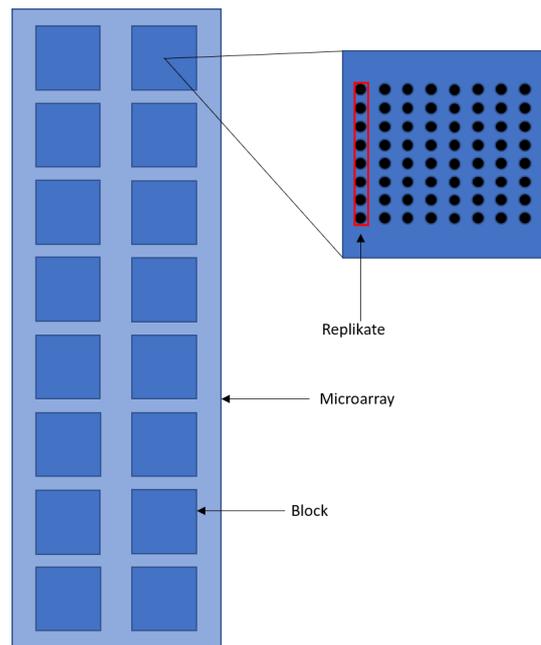


ABBILDUNG 4.11: Schematische Darstellung eines Microarrays

Imin. Es wurden daher im Folgenden am 5'-Terminus Amino-modifizierte Aptamere für sämtliche Microarray Experimente verwendet. Das Ergebnis der reversiblen Kondensationsreaktion zwischen der 5'-terminalen Amino-Gruppe des Aptamers und der Aldehyd-Matrix ist ein Imin, das im nächsten Schritt durch Zugabe von Natriumborhydrid in einem Ethanol/Wasser-Gemisch zu einem sekundären Amin reduziert wird. Dadurch kann eine kovalente Fixierung des Aptamers erreicht werden (s. Abbildung 4.12). Das eingesetzte Ethanol dient als Protonendonator und führt zu einer deutlichen Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit. Außerdem wird die Oberfläche des Slides geblockt, da die auf dem Slide verbliebenen Aldehydgruppen ebenfalls durch das Natriumborhydrid zum Alkohol reduziert werden.

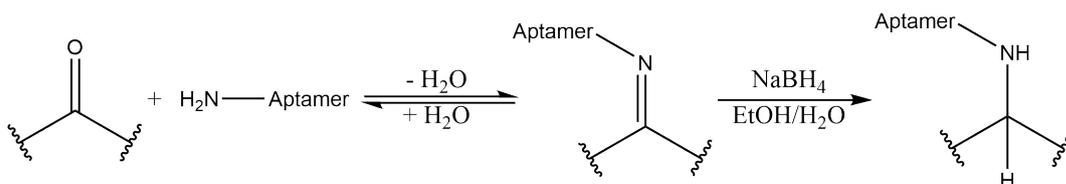


ABBILDUNG 4.12: Reaktionsweg zur Immobilisierung von Amino-modifiziertem Aptamer

Um die Verdrängung des Oligonukleotids durch Ampicillin nach Immobilisierung des Aptamers zu testen, musste die optimale Konzentration für die Immobilisierung gewählt werden. Dafür wurden verschiedene Konzentrationen an Aptamer mit Hilfe des GeSiM Nanoplotters gespottet und über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag erfolgte das Blockieren der Oberfläche mit Natriumborhydrid (s. Abbildung 4.12), gefolgt von einer Inkubation im Bindepuffer des Aptamers, um eine korrekte Faltung der immobilisierten Aptamere zu gewährleisten. Danach wurden unterschiedlichen Konzentrationen an Cy5-markiertem Oligo-C₁ zugegeben. Die Lösungen wurden nach 2 h abgenommen und der Slide mit Bindepuffer gewaschen.

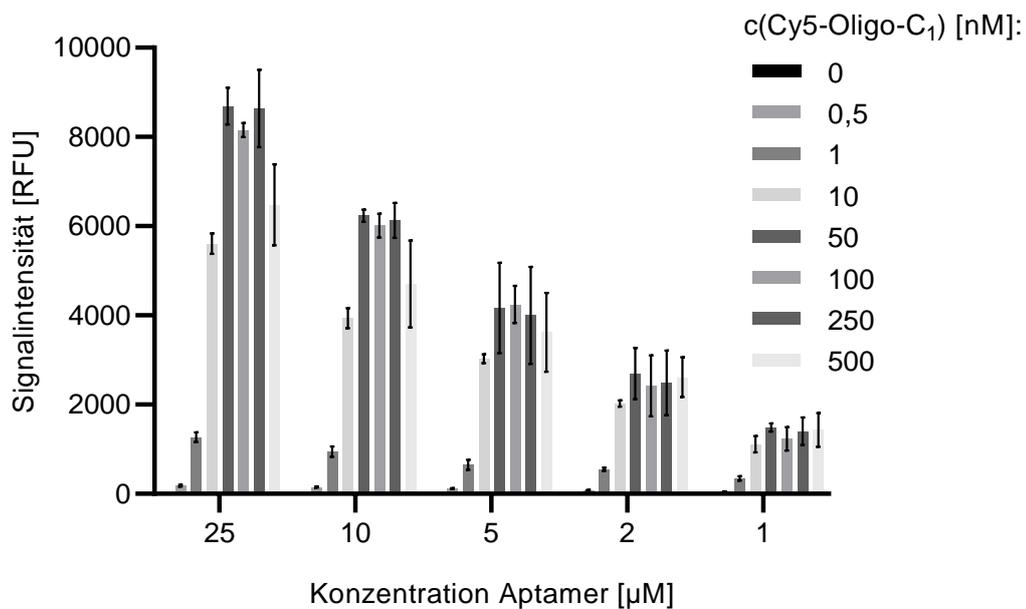


ABBILDUNG 4.13: Ergebnisse des Microarray Experiments. Die gemessenen Signaländerungen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen an Cy5-markiertem Oligo-C₁ zu dem immobilisierten AMP4-Aptamer, n = 8

Bei der Betrachtung der Aptamerkonzentration fällt auf, dass das Fluoreszenzsignal bis zu einer Konzentration von 25 µM ansteigt (s. Abbildung 4.13). Der Einfluss der Aptamerkonzentration auf das Fluoreszenzsignal und damit auf die Anzahl der Hybridisierungen ist deutlich erkennbar. Selbst bei einer Konzentration von 25 µM ist keine Sättigung der Oberfläche

erreicht. Nichtsdestotrotz wurden keiner höheren Konzentrationen getestet. Einerseits muss sich das Aptamer in Anwesenheit von Ampicillin richtig falten können, wobei eine zu hohe Immobilisierungsdichte aus sterischer Sicht hinderlich sein kann und andererseits ist die Verwendung zu hoher Aptamerdichten aus wirtschaftlicher Sicht nicht sinnvoll. Es wurde daher auch im weiteren Verlauf auf Konzentrationen über 25 μM verzichtet.

Bei der Menge an Cy5-markiertem Oligonukleotid konnte gezeigt werden, dass eine Sättigung bei 50 nM erreicht wird. Bei einer Konzentration von 500 nM findet wiederum eine Reduktion der Fluoreszenzintensität statt. Möglicherweise ist dies auf Grund von Quenching Effekten der Fall. Quenching von Fluoreszenzsignalen tritt auf, wenn eine große Anzahl an Fluorophoren auf kleinem Raum konzentriert ist und emittierte Photonen reabsorbiert werden, was in einer Reduktion des gemessenen Signals resultiert [61]. Dieser Effekt ist bei niedrigen Konzentrationen an immobilisiertem Aptamer nicht so deutlich ausgeprägt, sondern wird erst bei einer Konzentration von 5 μM sichtbar.

Aus dem Diagramm in Abbildung 4.13 lässt sich die optimale Konzentration an Oligonukleotid für die Verdrängung vom Aptamer durch Ampicillin bestimmen. Je höher das Verhältnis von Oligonukleotid zu Aptamer ist, desto sensitiver wird der Assay. Dieser positive Effekt wird allerdings umgekehrt sobald die Sättigungskonzentration, hier 50 nM Oligo-C₁, erreicht ist, weil im gesättigten Bereich ein Überschuss an Oligonukleotid vorliegt, der die Verdrängung durch Ampicillin negativ beeinträchtigen kann. Außerdem kommt es bei höheren Konzentrationen zu dem oben erwähnten Quenching der Fluoreszenz.

Für die kommenden Microarray-Experimenten wurde daher eine Konzentration an Fluoreszenz-markiertem Oligonukleotid von 10 nM verwendet. Mit einer Aptamerkonzentration von 10 μM konnte ein ausreichend starkes Signal erzielt werden und die Verwendung geringer Konzentrationen wird für den zu entwickelnden LFA aus Kostengründen angestrebt, weshalb diese Aptamerkonzentration für folgende

Microarray-Experimente verwendet wurde.

4.1.5 Verdrängung des Oligonukleotids im Microarray-Format unter Verwendung verschiedener Spacer

Für die vorliegende Arbeit sollen Spacer für die Konjugation von Aptameren auf die AuNP Oberfläche verwendet werden (s. Abbildung 4.14). Sie bestehen aus Molekülketten, die den Abstand zwischen vom Aptamer zur Oberfläche vergrößern. Durch den erhöhten Abstand wird die korrekte Faltung des Aptamers erleichtert. In diesem Kapitel wird der Einfluss unterschiedlicher Spacer auf die Signalintensität der Hybridisierung mit Oligo-C₁ und die Verdrängungseffizienz durch Ampicillin untersucht. Dafür wird ein Microarray Experiment unter den in Kapitel 4.1.2 ermittelten Bedingungen durchgeführt und zusätzlich mit Ampicillin inkubiert. Ziel ist es, eine Verringerung der Fluoreszenzintensität durch Zugabe von Ampicillin zu beobachten.

In der Literatur werden als Spacer oft Poly-Thymin (T) Erweiterungen in das Aptamere eingebaut, weil Thymin von den vier DNA-Basen, die geringste Affinität zu Gold aufweist [62]. Die geringe Affinität sorgt für eine aufrechte Position der Aptamere auf der Goldpartikeloberfläche. Der Vorteil von einem Polynukleotid als Abstandshalter ist die einfache und kostengünstige Integration in den Syntheseprozess der Aptamere. Der Nachteil liegt in möglichen Wechselwirkungen mit der Sequenz des Aptamers über die Bildung von Basenpaaren [34].

Alternativ werden neutrale Polymerspacer verwendet, die ebenfalls eine geringe Affinität zu Gold besitzen. Hexaethylenglykol (HEG) eignet sich als Spacer für die Immobilisierung von Aptameren auf der Goldoberfläche aufgrund der einfachen Synthese sowie dem routinemäßigen Einbau in Aptamersequenzen. Außerdem besitzen nach Mirkin *et al.* Aptamere, die

TABELLE 4.5: Tabelle mit den verwendeten Spacern

Nummer	Spacer
1	T ₉ C ₁₀
2	T ₆
3	HEG
4	T ₆ -HEG
5	T ₆ -HEG ₂

über einen neutralen Polymerspacer immobilisiert wurden, die höchste Hybridisierungseffizienz mit komplementären Oligonukleotiden im Vergleich zu Poly-T oder Poly-A Spacern [63].

Zusätzlich wurde ein T₉-C₁₀-Spacer getestet. Dieser besitzt neben einer Poly-T Modifikation noch eine Erweiterung aus zehn Kohlenstoffatomen. Dieser T₉-C₁₀-Spacer wurde bereits in Vorversuchen als geeigneter für einen kompetitiven Assay als die Variante ohne Spacer identifiziert (s. Anhang, Abschnitt 6) und in diesem Experiment als Referenz verwendet. Es wurden daher fünf verschiedene Aptamervarianten auf Basis geladener Poly-T sowie ungeladener HEG Spacer getestet (s. Tabelle 4.5).

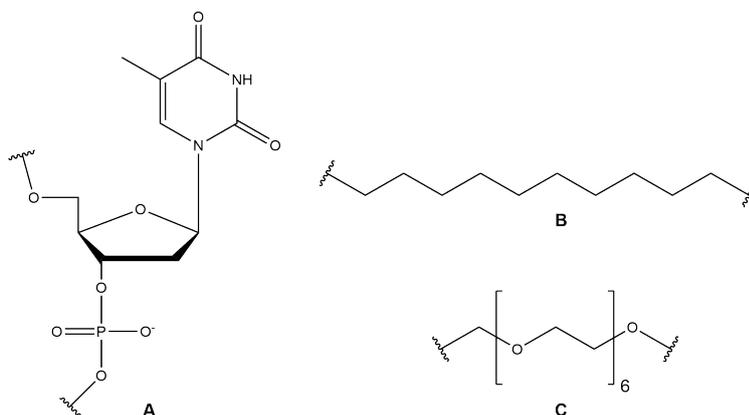


ABBILDUNG 4.14: Strukturformeln der verwendeten Spacermotive, A: Thymin-Nukleotid, B: Dekan (C₁₀), C: Hexaethylenglykol

Für die Testung der verschiedenen Spacer im Microarray-Format wurden die Amino-modifizierten Aptamere auf 3D-Aldehyd Slides immobilisiert, sodass in jedem Block des Microarrays alle Varianten des AMP4-Aptamers

immobilisiert vorlagen. Nach der Immobilisierung der Aptamere wurde der Slide geblockt und die gebildeten Imine reduziert. Um eine korrekte Faltung des Aptamers zu garantieren, folgte eine kurze Inkubation des Aptamers im Bindepuffer vor der simultanen Zugabe des Cy5-markierten Oligos-C₁ (10 nM) und Ampicillin (Konzentrationsbereich: 1 bis 10 000 nM) für 2 h. Diese gleichzeitige Zugabe des Oligonukleotids und des Ampicillin findet später auch beim LFA statt und wurde daher einer sequentiellen Zugabe vorgezogen.

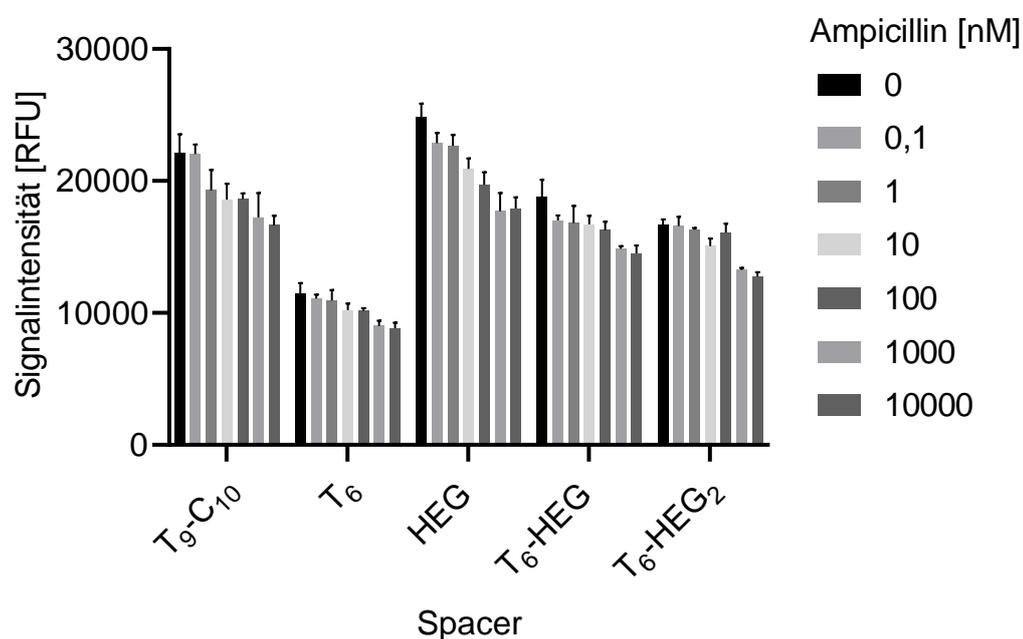


ABBILDUNG 4.15: Vergleich verschiedener Spacer zwischen Aptamer und Microarray Oberfläche durch Inkubation des immobilisierten Aptamers mit Oligo-C₁ und Ampicillin

Die Signalintensitäten der Hybridisierung, also ohne Zugabe von Ampicillin, sind beim T₆-Spacer mit 11 437 RFU am niedrigsten und beim HEG-Spacer mit 24 824 RFU am höchsten (s. Abbildung 4.15). Aus dem Vergleich zwischen T₆-, T₆-HEG- und T₆-HEG₂-Spacer lässt sich der Einfluss der Spacerlänge auf die Hybridisierung ablesen. Zwischen dem T₆ und T₆-HEG-Spacer steigt die Signalstärke von 11 437 RFU auf 18 781 RFU an, was auf einen positiven Einfluss eines längeren Spacers hindeutet. Dieser Effekt kehrt sich bei einer Verlängerung zum T₆-HEG₂-Spacer um, ersichtlich aus der

niedrigeren Signalstärke von 16 709 RFU. Die Signalintensitäten können zum Einen erklärt werden mit unterschiedlichen Immobilisierungseffizienzen für die verschiedenen Spacervariationen. Beeinflusst wird die Immobilisierungseffizienz z.B. durch die Zugänglichkeit der terminalen Aminogruppe. Wird diese durch den Spacer sterisch beeinflusst, sinkt die Immobilisierungseffizienz und damit die Signalstärke. Zum Anderen wird die Signalstärke durch die Hybridisierungseffizienz mit dem Oligonukleotid verändert. Hier sind Rückfaltungseffekte durch einen zu lange Spacer denkbar, die das immobilisierte Aptamer von dem Oligonukleotid abschirmen und damit die Hybridisierungseffizienz reduzieren.

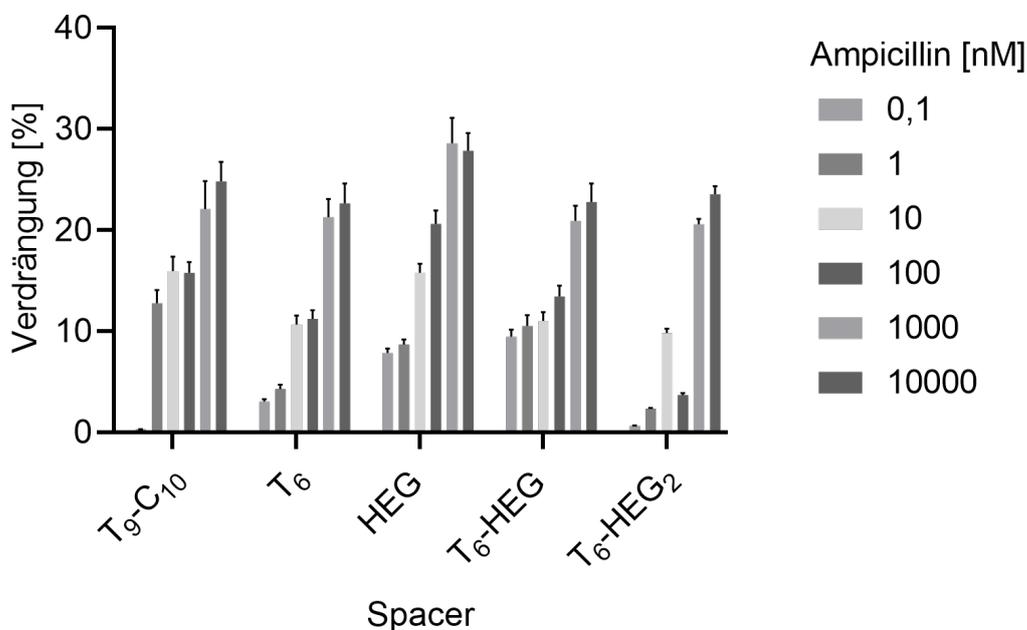


ABBILDUNG 4.16: Vergleich der Verdrängungseffizienz durch Zugabe von Ampicillin und Oligo-C₁ zum immobilisierten AMP4-Aptamer

Neben der Hybridisierungseffizienz kann aus den Daten die Verdrängung durch Ampicillin berechnet werden. Dabei wurde die Verdrängungseffizienz (s. Tabelle 4.6) aus dem Quotienten der Signalstärke (SI) mit der höchsten Ampicillinkonzentration von 10 μ M und der Kontrolle ohne Ampicillin ermittelt.

TABELLE 4.6: Ergebnisse des Microarray-Experiments zum Vergleich unterschiedlicher Aptamer-Spacer durch Bestimmung der Verdrängungseffizienz von Oligo-C₁ durch 10 μM Ampicillin

Spacer	Signalintensität der Hybridisierung in [RFU]	Verdrängungseffizienz in %
T ₉ C ₁₀	22 116	24,82
T ₆	11 437	22,65
HEG	24 824	27,86
T ₆ -HEG	18 781	22,77
T ₆ -HEG ₂	16 709	23,53

$$\text{Verdrängungseffizienz}[\%] = 100 \cdot \left(1 - \frac{SI_{c(\text{Ampicillin})}}{SI_{c(\text{Ampicillin})=0 \mu\text{M}}} \right) \quad (4.2)$$

Es konnte gezeigt werden, dass bei allen Varianten des AMP4-Aptamers die Verdrängung funktioniert. Dabei ist die Verdrängungseffizienz beim HEG-AMP4-Aptamer mit 27,86 % am höchsten (s. Abbildung 4.16). Anscheinend hat hier die Wahl des Spacers keinen großen Einfluss auf die Verdrängung des Oligonukleotids, was an der fast gleich bleibenden Verdrängungseffizienz ersichtlich ist.

Trotz der funktionierenden Verdrängung durch Ampicillin konnte nur eine Signaländerung von 27,86 % festgestellt werden. Für die spätere Anwendung ist die Verdrängungseffizienz zu niedrig. Im nächsten Schritt wurde daher das Experiment wiederholt, allerdings wurden wie in Kapitel 4.1.2 alle drei Oligonukleotide miteinander verglichen. Zwar konnte in der MST gezeigt werden, dass Oligo-C₁ den niedrigsten EC₅₀-Wert von den drei Oligonukleotiden besitzt, aber auf die Verdrängungseffizienz kann aus den MST Ergebnissen nicht geschlossen werden. Sobald der EC₅₀-Wert erreicht ist, findet keine weitere Verdrängung durch eine Erhöhung der Ampicillin Konzentration statt; Wie hoch die Verdrängungseffizienz beim

Erreichen des EC_{50} -Wertes ist, kann dabei nicht bestimmt werden. Ein Vergleich der drei Oligonukleotide zur Bestimmung der Verdrängungseffizienz im Microarray Format schien daher sinnvoll. Dieses Mal wurde keine Verdünnungsreihe von Ampicillin verwendet, sondern eine Kontrolle ohne Zugabe von Ampicillin sowie eine Ampicillin Konzentration von $10\ \mu\text{M}$, um eine maximale Verdrängung zu ermöglichen. Wie im letzten Versuch wurden die Aptamere auf einen 3D-Aldehyd Slide gespottet, getrocknet, am nächsten Tag geblockt und dann mit Cy5-markiertem Oligonukleotid und Ampicillin inkubiert. Nach 2 h wurden die Lösungen abgenommen und der Slide mit Bindepuffer des Aptamers gewaschen. Nach dem Trocknen wurde der Slide eingescannt und die Fluoreszenzintensitäten mit Hilfe des Programms GenePix ausgewertet.

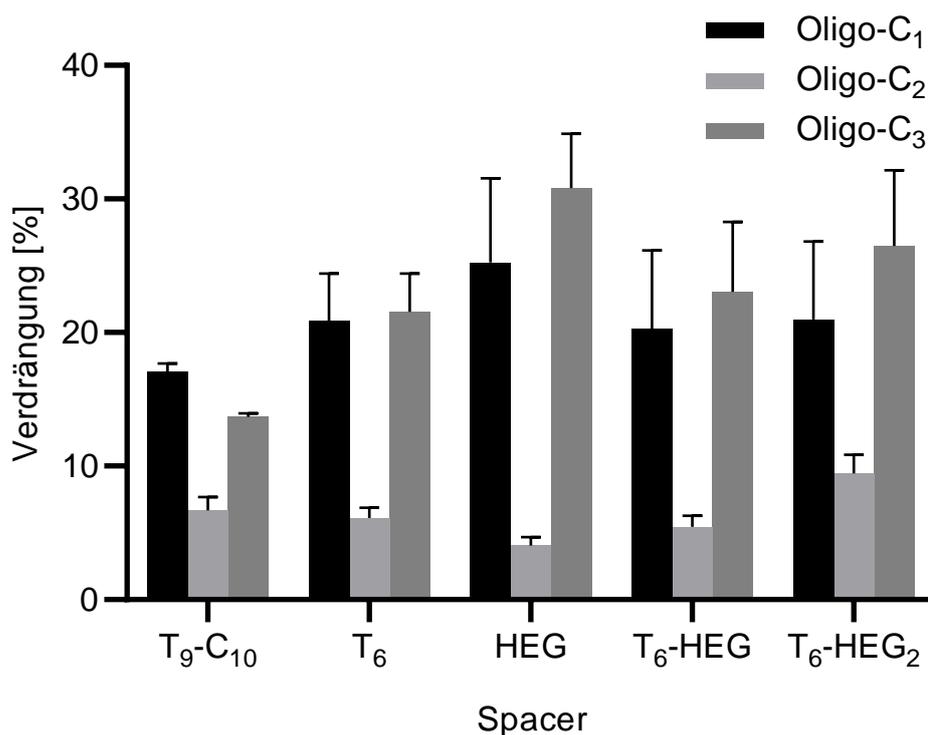


ABBILDUNG 4.17: Verdrängungseffizienz der drei Oligonukleotide vom AMP4-Aptamer durch Zugabe von $10\ \mu\text{M}$ Ampicillin aufgetragen gegen die Spacervarianten des Aptamers

In Tabelle 4.7 ist der Einfluss des Spacers auf die Verdrängungseffizienz zu sehen. Wie in dem Versuch davor, konnte die beste Verdrängung mit dem

TABELLE 4.7: Microarray Experiment zur Optimierung der Verdrängung durch Bindung des Aptamers an Ampicillin. Dazu wurden die Oligonukleotide mit den unterschiedlichen Spacervarianten inkubiert. Angegeben wurden die mit Hilfe von Formel 4.2 ermittelten Verdrängungseffizienzen in %

Spacer	Verdrängungseffizienz in %		
	Oligo-C ₁	Oligo-C ₂	Oligo-C ₃
T ₉ C ₁₀	17,08	6,67	13,68
T ₆	20,88	6,10	21,55
HEG	25,27	4,05	30,83
T ₆ -HEG	20,29	5,44	23,06
T ₆ -HEG ₂	20,99	9,47	26,50

HEG-Spacer und mit dem T₆-HEG₂-Spacer erzielt werden. Für die kommenden Experimente wurde daher der HEG-Spacer für eine Immobilisierung des Aptamers verwendet.

Unabhängig vom Spacer kann auch ein deutlicher Einfluss der Oligonukleotide erkannt werden (s. Abbildung 4.17). Die Signalintensität von Oligo-C₁ sinkt um maximal 25,27 % ab, wenn 10 µM Ampicillin zur Inkubationslösung gegeben werden. Bei Oligo-C₂ konnte im Gegensatz zur MST eine Verdrängung durch Ampicillin detektiert werden, allerdings im einstelligen Bereich. Mit 30,83 % konnte die höchste Effizienz bei Oligo-C₃ in Kombination mit dem HEG-AMP4-Aptamer festgestellt werden. Daher wurde anstelle von Oligo-C₁ das Oligo-C₃ für kommende Versuche ausgewählt.

Um die Verdrängungseffizienz weiter zu verbessern wurden daraufhin zwei verkürzte Varianten von Oligo-C₃ getestet, die im Folgenden Oligo-C_{3a} und Oligo-C_{3b} bezeichnet werden. Diese hybridisieren leicht versetzt im Bereich von Oligo-C₃, allerdings wurde die Sequenzlänge von 10 nt auf 8 nt reduziert. Die Sequenzen sowie die Bereiche der Hybridisierung mit dem AMP4-Aptamer sind in Abbildung 4.18 zu finden. Durch die Verkürzung sollte eine schwächere Hybridisierung und damit eine bessere Verdrängung des Oligos durch Ampicillin erreicht werden. Neben der Frage, ob die verkürzten Oligonukleotide besser vom Aptamer verdrängt werden, muss

der Einfluss auf die Signalintensität und der damit verbundenen Sensitivität des späteren Assays überprüft werden.

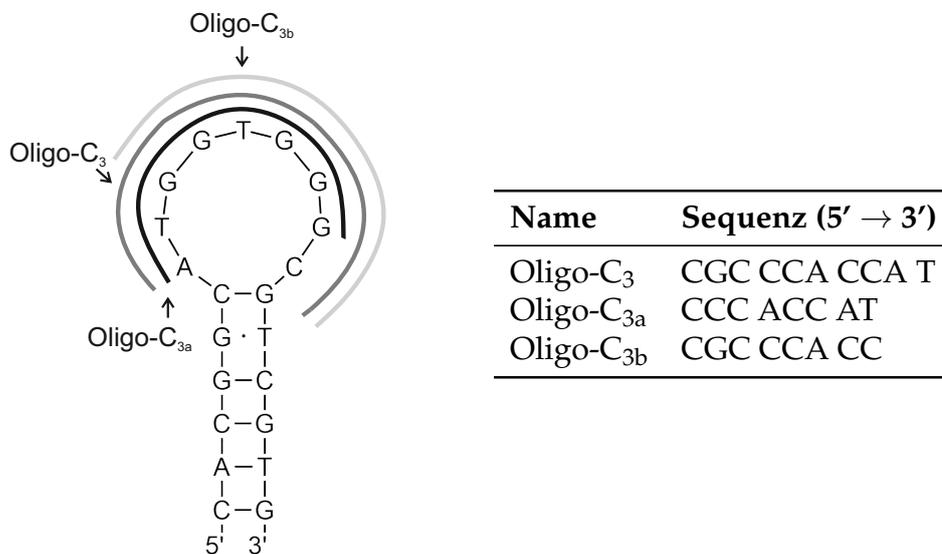


ABBILDUNG 4.18: A) Sekundärstruktur des AMP4-Aptamers inklusive gekennzeichnete komplementärer Bereiche, B) Sequenzen der getesteten Varianten von Oligo-C₃

Für das Experiment zum Vergleich der Oligonukleotide wurden 10 μ M NH₂-HEG-AMP4-Aptamer auf einem 3D-Aldehyd-Slide immobilisiert. Die Inkubation erfolgte für 2 h mit 10 μ M Ampicillin und 10 nM Oligonukleotid.

Bei dem Experiment konnte eine auffallend niedrige Signalstärke bei Oligo-C_{3a} beobachtet werden. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt eindeutig auf Seite der dissoziierten Sequenzen. Oligo-C_{3a} besitzt einen geringeren Anteil an G/C-Basen, was eine niedrigere Signalstärke erklären würde, da G/C Basenpaare mehr Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können und daher stabilisierend auf die Hybridisierung zwischen Oligonukleotid und Aptamer wirken. Zusätzlich bindet Oligo-C_{3a} im Gegensatz zu Oligo-C_{3b} nicht im Stammbereich des Aptamers, was eine Öffnung des Stammes und folglich eine Hybridisierung erschweren kann.

Die Verdrängungseffizienzen konnten durch die Benutzung von Oligo-C_{3b} auf über 50 % gesteigert werden. Diese Beobachtung kann mit der niedrigeren Basenzahl erklärt werden, die zu einer schwächeren Hybridisierung

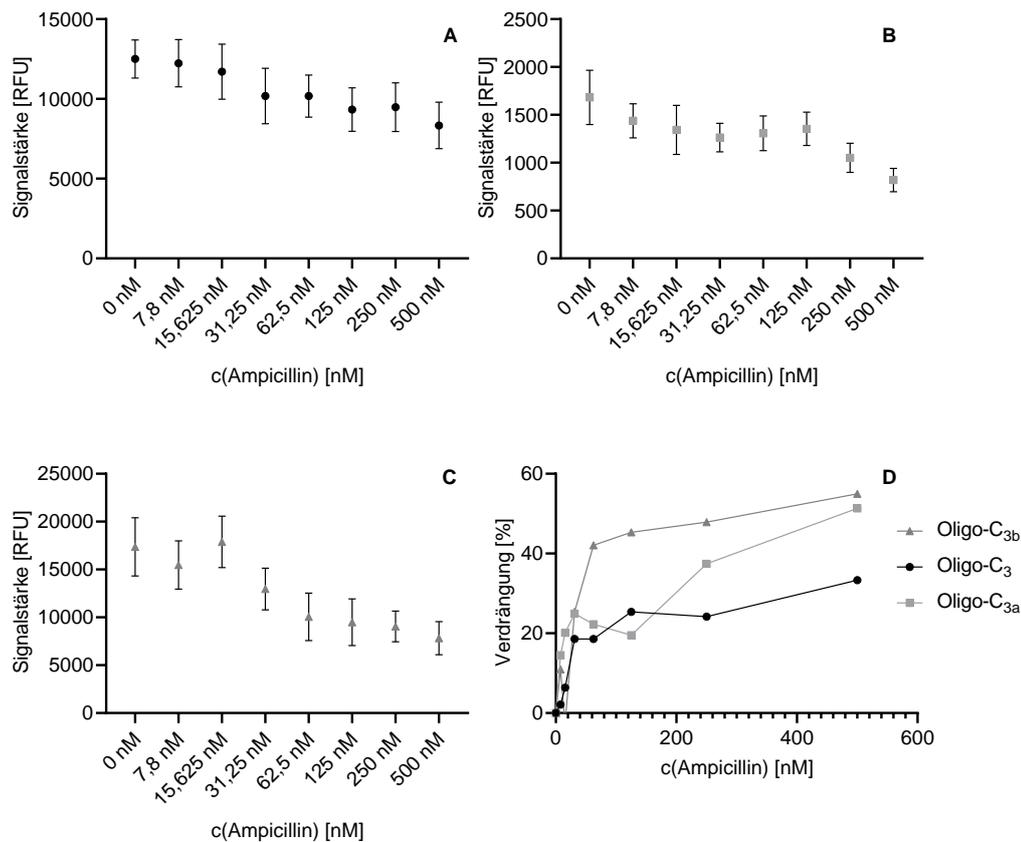


ABBILDUNG 4.19: A-C: Auftragung der Signalstärke gegen die Konzentration an Ampicillin. A: Oligo-C₃, B: Oligo-C_{3a}, Oligo-C_{3b}, D: Verdrängungseffizienzen ermittelt nach Formel 4.2

zwischen Aptamer und Oligonukleotid führt. Ab einer Konzentration von lediglich 15,625 nM findet hier eine signifikante Änderung der Fluoreszenzintensität statt, die bei 62,5 nM bereits über 40 % beträgt und auf 55 % ansteigt (s. Abbildung 4.19). Oligo-C₃ wird bei einer Konzentration von 31,25 nM Ampicillin bereits zu über 20 % verdrängt. Die Verdrängungseffizienz steigt weiter auf bis zu 33,32 % an und stimmt mit der Verdrängung aus dem vorangegangenen Versuch überein (s. Tabelle 4.7), was zeigt, dass bei einer Konzentration an Ampicillin von über 500 nM kaum weiteres Oligonukleotid von dem Aptamer verdrängt wird.

Ein Vergleich der Oligonukleotide bezüglich ihrer Hybridisierungs- und Verdrängungseffizienz legt die Verwendung von Oligo-C_{3b} für den Assay nahe (s. Abbildung 4.19). Oligo-C_{3a} wurde aufgrund der schlechteren

Hybridisierung als ungeeignet eingestuft. Mit den Microarray Experimenten konnte eine Verbesserung der Verdrängung auf 55 % erreicht werden und mit Oligo-C_{3b} ein geeignetes Oligonukleotid für den kompetitiven Assay gefunden werden. Im nächsten Kapitel wird die Synthese der Goldnanopartikel sowie die Konjugation des Aptamers mit den Partikeln beschrieben.

4.2 Konjugation von Aptamer an Nanopartikel

Die Erzeugung eines kolorimetrischen Signals auf dem LFA soll mit Hilfe von Goldnanopartikeln (AuNPs) stattfinden. In diesem Kapitel werden daher die AuNPs synthetisiert und die Herstellung optimiert. Auf den Ergebnissen aufbauend wird im Anschluss das AMP4-Aptamer auf der Oberfläche der Goldnanopartikel immobilisiert.

4.2.1 Chemische Synthese der Goldnanopartikel

Für die kolorimetrische Detektion von Ampicillin wurden, aufgrund ihrer Vorteile, Goldnanopartikel (AuNPs) benutzt (s. Abschnitt 3.3.2).

Entscheidende Faktoren für die Verwendung von Goldnanopartikeln für LFAs sind deren Farbintensität, Stabilität sowie Monodispersität. Die Farbintensität hat einen großen Einfluss auf die Sensitivität des späteren Assays. Je größer die Farbintensität, desto leichter ist die kolorimetrische Auswertung des LFAs. Für die Konjugation mit Aptameren ist eine hohe Stabilität der Partikel unerlässlich, da oft die Ionenstärke der Lösung erhöht wird, um die negative Ladung der Aptamere zu kompensieren (s. Abschnitt 4.2.2). Eine Erhöhung der Ionenstärke führt leicht zur Agglomeration der Partikel, weshalb eine hohe Stabilität eine Voraussetzung an die AuNPs darstellt.

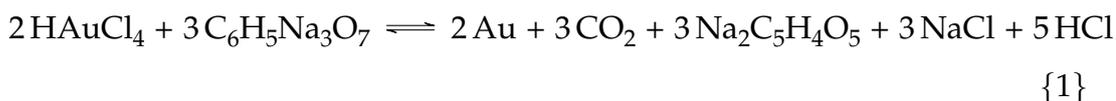
Im Folgenden Kapitel sollen zwei Konjugationsmethoden, die Frens-Methode sowie die *Seeding Growth*-Methode, miteinander verglichen werden. Die

dem Vergleich zugrunde liegenden Qualitätsmerkmale sind die angesprochene Farbintensität, Stabilität und Monodispersität der Partikel.

Bereits 1951 wurde eine Synthese für AuNPs von Turkevich *et al.* entwickelt [64]. Laut dem Protokoll wird eine wässrige Lösung aus Tri-Natriumcitrat bis zum Siedepunkt erhitzt und mit goldchloriger Säure (HAuCl₄) versetzt. Durch Reduktion der Au(III)-Ionen zu elementarem Gold, verfärbt sich die klare Lösung erst bläulich und anschließend dunkelrot. Zum Einen dient Citrat als Reduktionsmittel der Reaktion (s. Abbildung 1), das bis zum CO₂ oxidiert wird. Zum Anderen sorgt es für eine Stabilisierung der Nanopartikel, indem das Citrat auf die Oberfläche der AuNPs physisorbiert und damit als Schutzgruppe fungiert. Den dritten Einfluss hat Citrat auf den pH-Wert, da Citrat auch als Puffer dient und den Einfluss der goldchlorigen Säure ausgleicht.

Eine Verbesserung der Synthese sowie eine genauere Untersuchung der Reaktionsparameter wurde 1973 von Frens *et al.* durchgeführt [46], wonach durch eine Veränderung des Verhältnisses der goldchlorigen Säure zu Tri-Natriumcitrat die Größe der Partikel zwischen 8 und 147 nm einstellbar ist. In der Literatur wird daher bei der Synthese von AuNPs häufiger von der Frens-Methode gesprochen. Dieser Name wird daher im Folgenden verwendet.

Die Summenformel der vollständigen Oxidation ist in Formel 1 angegeben. Zu beachten ist, dass nicht immer die vollständige Reduktion des Citrats stattfindet, sondern auch stabile Zwischenprodukte gebildet werden.



Als Alternative wurde die *Seeding Growth* Methode von Bastus *et al.* getestet [65]. Die Synthese beginnt analog zur Frens Methode mit dem

TABELLE 4.8: Durchführung der Synthese von AuNPs mittels Frens und *Seeding Growth* Methode, Schritt 5 wird beim *Seeding Growth* wiederholt bis die gewünschte Partikelgröße erreicht ist

Schritt	Frens-Methode	<i>Seeding Growth</i>
1	Zugabe von: 50 nmol HAuCl ₄ 194 nmol Citrat	Zugabe von: 8,325 nmol HAuCl ₄ , 108,64 nmol Citrat
2	Erhitzen der Lösung bis zum Siedepunkt	
3	Rühren für 30 min	
4	Beendigung der Synthese	Abkühlen der Suspension auf 90 °C
5	-	Zugabe von: 8,325 nmol HAuCl ₄ , 19,4 nmol Citrat
	-	30 min warten

Erhitzen der Substrate bis zum Siedepunkt, allerdings sind die eingesetzten Substratkonzentrationen wesentlich geringer (s. Tabelle 4.8).

Im Gegensatz zur *Seeding Growth* Methode wird bei der Frens-Methode zu Beginn die sechsfache Stoffmenge an goldchloriger Säure zugegeben. Nach 30 min erfolgt eine Reduktion der Temperatur auf 90 °C, gefolgt von einer schrittweisen Erhöhung der Substratkonzentrationen. Durch eine Reduktion der Temperatur nach der ersten Zugabe der goldchlorigen Säure wird der Schritt der Goldreduktion verlangsamt, was eine sekundäre Keimbildung minimieren soll. Dies führt zu einem Partikelwachstum ohne weitere Keimbildung. Die geringeren Konzentrationen führen nach Bastus *et al.* zu einer Größenfokussierung der Partikel und zu einer monodisperseren Lösung, als die Frens Methode. Je mehr Zyklen des Prozesses durchgeführt werden, desto größer sind die entstehenden Partikel. Für einen Vergleich der beiden Methoden wurden Partikel mit einer Größe von 14 nm hergestellt, da Partikel dieser Größe normalerweise in LFAs verwendet werden.

Die Analytik der Partikel erfolgt hauptsächlich über die Auswertung der UV-Vis Spektren [66]. Aus den Spektren kann sowohl die Größe der Partikel als auch die Konzentration berechnet werden, wofür eine Reihe unterschiedlicher Gleichungen benötigt werden. Diese Gleichungen wurden von Haiss *et al.* experimentell, durch einen Vergleich zwischen UV-Vis

Spektren und TEM Bildern von AuNPs unterschiedlicher Größe, bestimmt. Die Berechnung der Konzentration findet auf Grundlage des Lambert-Beer'schen Gesetzes statt (s. Formel 4.3). Dabei wird erst aus dem UV-Vis Spektrum die Größe der Partikel ermittelt, die wiederum einen Einfluss auf den Extinktionskoeffizienten ε_λ hat.

$$E_\lambda = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I_1} \right) = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d \quad (4.3)$$

Aus der Abhängigkeit des Extinktionskoeffizienten vom Partikeldurchmesser ergibt sich eine steigende Farbintensität mit fortschreitender Größe. Für kolorimetrische Assays sind daher, von der Sensitivität her, große AuNPs besser geeignet. Ein Nachteil großer Partikel stellt allerdings die geringe Stabilität dar. Die Van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen den Partikeln werden mit zunehmendem Radius der AuNPs größer, was eine Agglomeration begünstigt. Die Partikelgröße von 14 nm hat sich dabei in der Literatur für den Einsatz in LFAs durchgesetzt, da die Partikel eine hervorragende Stabilität und Reproduzierbarkeit der Synthese aufweisen.

Aus dem Verhältnis der Absorption bei 800 nm und 380 nm kann nach Barcikowski *et al.* der Grad der Agglomeration bestimmt werden [67]. Dadurch kann eine Aussage über die Stabilität der Konjugate getroffen werden. Agglomerierte AuNPs besitzen eine Absorption bei höheren Wellenlängen, wodurch sich aus dem Verhältnis eine Aussage über die Menge an agglomerierten Partikeln treffen lässt. Wie bei der Größenbestimmung wird hier ein Verhältnis zweier Wellenlängen genutzt, um einen konzentrationsunabhängigen Wert zu erhalten. Dieser Wert wird *primary particle index* (PPI) genannt und ist in Tabelle 4.9 aufgeführt. Je höher der PPI ist, desto stabiler sind die AuNPs in der Suspension.

$$PPI = \frac{A_{380}}{A_{800}} \quad (4.4)$$

Der Versuch zum Vergleich der beiden Synthesewege wurde, wie in Tabelle 4.8 beschrieben, durchgeführt. Nach der Synthese wurde von der Suspension ein UV-Vis Spektrum aufgenommen.

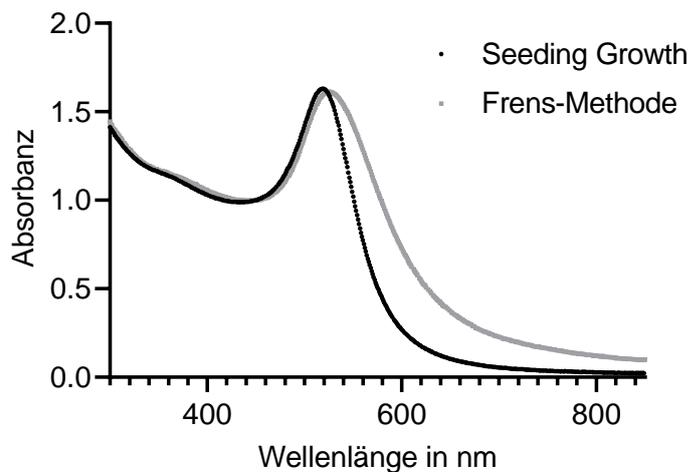


ABBILDUNG 4.20: UV-Vis Spektren der beiden Synthesemethoden, die Spektren wurden auf eine Wellenlänge von 450 nm normiert

Es konnte basierend auf beiden Protokollen AuNPs hergestellt werden. Zu beobachten war ein wesentlich langsamerer Farbumschlag ins dunkelrote bei der *Seeding Growth* Methode sowie eine geringere Farbintensität der Lösung während der gesamten Synthese, was auf eine niedrigere Konzentration an AuNPs hinweist. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der geringeren Substratmenge an goldchloriger Säure, die für die Synthese verwendet wurde.

Die Ergebnisse des Versuches und damit einhergehend der charakteristische Verlauf eines UV-Vis Spektrums von AuNPs ist in Abbildung 4.20 zu sehen. Nach der Absorption bei niedrigen Wellenlängen entsteht ein Minimum bei 450 nm, das bei 520 nm in ein Maximum übergeht. Dieses Maximum ist für

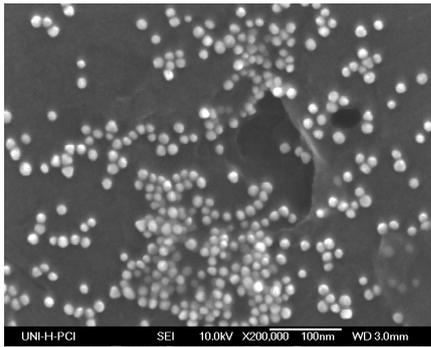
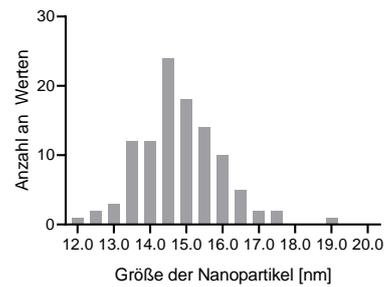
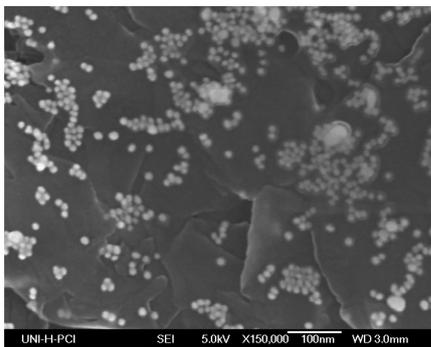
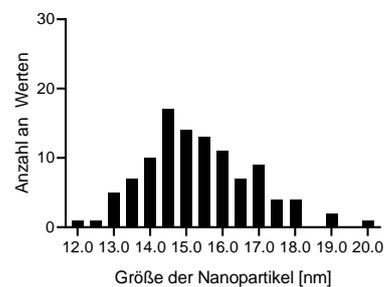
TABELLE 4.9: Größe und Konzentration der synthetisierten AuNPs

Methode	d_{AuNP} in nm		c_{AuNP} in nM	PPI
	UV-Vis	REM		
Frens	14	$15,34 \pm 1,48$ nm	5,55	9,02
<i>Seeding Growth</i>	14,71	$14,72 \pm 1,12$ nm	4,75	39

die Rotfärbung der Suspension verantwortlich. Danach fällt die Absorption der Suspension stark ab; in diesem Bereich der höheren Wellenlängen absorbieren lediglich agglomerierte Partikel. In dem vorliegenden Fall konnte ein Unterschied zwischen den beiden Synthesemethoden festgestellt werden. Im Falle der Frens-Methode konnte ein langsamerer Abfall der Absorption nach dem Maximum bei 520 nm festgestellt werden, was in einem breiteren Peak resultiert. Dieser breitere Peak deutet auf Partikel in der Lösung hin, die bei höherer Wellenlänge als 520 nm Licht absorbieren und damit auf Agglomerate.

Zusätzlich wurden Rasterelektronenmikroskop (REM)-Aufnahmen angefertigt, die eine Bestimmung der Morphologie sowie des Feret Durchmessers der Partikel erlauben. Außerdem lässt sich die Größenverteilung und damit die Polydispersität der Partikel aus den REM-Aufnahmen ermitteln. Für die Aufnahmen wurden die Partikel über Nacht auf einem Objektträger getrocknet und anschließend analysiert.

Mit Hilfe der angegebenen Vergrößerung kann über die Aufnahme des Mikroskops nun eine mittlere Größe der Partikel bestimmt werden sowie die Größenverteilung. Der erhaltene Wert für den Feret Durchmesser kann anschließend mit den berechneten Werten aus der UV-Vis Messung verglichen werden (s. Tabelle 4.9). Bei einem Vergleich der beiden Synthesewege fällt auf, dass die durchschnittliche Größe der Partikel sehr ähnlich ist, aber die Frens-Methode eine breitere Größenverteilung aufweist. Die wiederholte Zugabe von Substraten scheint hingegen zu einem gleichmäßigeren Partikelwachstum zu führen, resultierend in einer engeren Größenverteilung.

(A) REM-Aufnahme der AuNPs nach *Seeding Growth* Methode(B) Histogramm der Partikelgröße nach *Seeding Growth* Methode, ermittelt aus 106 Partikeln(C) REM-Aufnahme der Partikel nach Frens-Methode *et al.*[46]

(D) Histogramm der Partikelgröße nach Frens Methode, ermittelt aus 106 Partikeln

ABBILDUNG 4.21: REM-Aufnahmen und Größenverteilung der AuNPs nach unterschiedlicher Synthese

Die Größenbestimmung der Partikel mittels UV-Vis Spektrometrie ergibt eine gute Übereinstimmung mit den REM-Aufnahmen. Hier zeigt sich, dass die UV-Vis Spektren eine einfache Alternative zu Aufnahmen mit einem Elektronenmikroskop bieten. Die Partikel weisen eine durchschnittliche Größe von 14 bis 15 nm auf und beide Methoden liefern Partikel mit einer ähnlichen Größe. Die Partikel nach der Frens-Methode besitzen eine höhere Konzentration als die nach der *Seeding Growth* Methode. Dies ist mit der höheren eingesetzten Stoffmenge an Gold(III)-Ionen erklärbar (s. Tabelle 4.8). Der PPI der *Seeding Growth*-Methode ist mit 39 deutlich höher als der PPI der Frens-Methode mit 9,02, was auf eine höhere Stabilität der Partikel nach zyklischer Zugabe der Substrate hindeutet. Diese Erkenntnis wurde in der Abbildung 4.20 durch den langsameren Abfall der Absorption nach dem Erreichen des Maximums bei 520 nm bereits angedeutet.

Die Vorteile der Frens-Methode sind damit eine schnellere Synthese sowie eine höhere Konzentration an Partikeln im Syntheseansatz. Hingegen liefern die Partikel der *Seeding Growth*-Methode homogenere Partikel mit einem höheren PPI. Die Konzentration der Partikel hat in diesem Schritt keine große Bedeutung, da nach der Konjugation im nächsten Schritt eine Aufkonzentration der Partikel erfolgt. Die Synthese der Goldnanopartikel nach Vorschrift von Bastus *et al.* [65] wurde daraufhin für alle weiteren Konjugationsexperimente durchgeführt.

4.2.2 Optimierung der Konjugation

Nach der Bestimmung des Aptamer-Oligonukleotid Paares für den LFA und der Synthese der AuNPs wurde im nächsten Schritt die Kopplung beider Komponenten optimiert. Die in der Literatur am häufigsten verwendete Methode der Kopplung von AuNPs mit Nukleinsäuren besteht in der Verwendung von Thiol-Gruppen. Thiol-modifizierte Nukleinsäuren können leicht synthetisiert werden und Schwefel chemisorbiert auf die Goldoberfläche, was zu einer effizienten, fast kovalenten Kopplung der Komponenten führt. Alle Experimente in diesem Kapitel wurden daher mit am 5'-Terminus Thiol-modifizierten Nukleinsäuresequenzen durchgeführt.

Theoretisch lassen sich sowohl das Aptamer als auch das Oligonukleotid mit den AuNPs koppeln. Der Vorteil das Aptamer auf den AuNPs zu immobilisieren, liegt in einer längeren Inkubationszeit des Aptamers mit dem Target während des zu entwickelnden LFAs, da das Konjugat von der Probe rehydriert wird und bis zum Erreichen der Testlinie mit dem Ampicillin reagieren kann. Auf der anderen Seite ist die Menge an immobilisiertem Aptamer auf den AuNPs nur begrenzt einstellbar, weil die Aptamere auch für die Stabilität der Partikel sorgen. Ist die eingesetzte Aptamerkonzentration zu gering, kann es zum Agglomerieren der AuNPs kommen. Nach Literaturangaben können über 100 Aptamere pro AuNP immobilisiert werden [63]. Ein Großteil dieser Aptamere muss an Ampicillin

binden bevor keine Fixierung an der Testlinie mehr stattfindet. Wenn das Aptamer auf der Testlinie immobilisiert wird, reicht ein Ampicillin Molekül aus, um die Hybridisierung zu verhindern. Hier liegt der Vorteil der Fixierung des Aptamers auf der Testlinie des LFAs. Durch die Verwendung einer geringeren Konzentration an Aptamer kann die Beladungsdichte auf der Testlinie an die Assaybedingungen, vor allem in Bezug auf die benötigte Sensitivität, angepasst werden. Die Konjugation wurde hier für das Aptamer sowie das Oligonukleotid getestet.

Prinzipiell sind verschiedene Methoden möglich, um Aptamere auf AuNPs zu immobilisieren. Bei allen Methoden steht die Überwindung der elektrostatischen Abstoßung der Aptamere untereinander im Fokus, bei gleichzeitiger Verhinderung der Agglomeration der Partikel. Ziel ist die Synthese von Konjugaten mit für den LFA benötigten Eigenschaften, wie einer hohen Konzentration und einer hohen Stabilität. Die Konzentration der Konjugate ist für eine hohe Farbintensität der Testlinie beim späteren LFA wichtig. Die Stabilität ist für das Trocknen auf dem Conjugate Pad, die Lagerfähigkeit der LFAs und das homogene Resuspendieren der Konjugate während der Durchführung eines LFAs von Bedeutung.

Das Salt-Aging

Die Standardmethode von Mirkin *et al.* zur Immobilisation von Thiol-modifizierten Aptameren auf AuNPs [63]. Dabei wird über acht Schritte die Natriumchloridkonzentration einer Suspension aus AuNPs und Aptamer auf 0,7M erhöht. Die Aptamere besitzen aufgrund des Phosphat-Rückgrates der Nukleinsäuren eine hohe Dichte an negativer Ladung, die für die Konjugation abgeschirmt werden muss, um eine hohe Beladung von Aptameren auf der Partikeloberfläche zu erreichen. Die Ladung der AuNPs, insbesondere der Citrathülle, wird auf diese Weise ebenfalls langsam mit Natrium-Ionen ausgeglichen, was zu einer Verringerung der Debye-Länge und damit der Abstoßung der AuNPs untereinander führt. Eine zu schnelle Erhöhung resultiert daher in einer Agglomeration der Partikel.

Die pH-Erniedrigung

Diese Methode wurde von Liu *et al.* beschrieben [68]. Dabei wird der pH-Wert mit Hilfe eines Citrat-Puffers auf drei reduziert. Gleichzeitig werden Natriumionen in das System gebracht, was wie beim Salt-Aging zu einer Absättigung der negativen Ladung führt. Nach Liu *et al.* kann so eine quantitative Adsorption der Nukleinsäuren erreicht werden. Beim Salt-Aging wird dagegen ein deutlicher Überschuss an Aptamer benötigt. Außerdem ist die Konjugation bereits nach 10 min beendet, was eine Zeitersparnis bedeutet. Dies ist vor allem im Hinblick auf die spätere kommerzielle Anwendung vorteilhaft. Die quantitative Adsorption und die Zeitersparnis der Konjugation können nach Liu *et al.* auf die Protonierung des Citrats um die AuNPs zurückgeführt werden. Dadurch sinkt die Affinität des Citrats zu den AuNPs, was einen Ligandenaustausch begünstigt. Auf der Seite der Nukleinsäuren führt ein pH-Wert von drei zu einer Protonierung von Adenin und Cytosin, was die negative Ladung der Aptamere verringert.

Das Freezing

Als letztes wurde eine weitere Methode von Liu *et al.* getestet [69]. Dabei werden die Aptamere zusammen mit den AuNPs eingefroren. Die Freezing-Methode basiert auf der Tatsache, dass beim Einfrieren Eiskristalle gebildet werden und sich dadurch die Konzentration an Aptamer und AuNPs in der verbleibenden Lösung sehr langsam erhöht. So kann auch ohne Absättigung der Ladung eine Annäherung trotz elektrostatischer Abstoßung erreicht werden. Der Vorteil ist die Einfachheit dieser Konjugation, die ohne die Verwendung von Zusätzen wie Natriumchlorid oder Citrat-Puffer auskommt. Es wurden zwei verschiedene Varianten dieser Synthese getestet. Einerseits wurden die Partikel bei -20 °C eingefroren, andererseits bei -80 °C. Die Geschwindigkeit der Konjugation kann dadurch von 2 h auf 30 min reduziert werden.

TABELLE 4.10: Verwendete Nukleinsäuresequenzen für die Konjugation auf AuNPs, alle Sequenzen besitzen eine Thiol-Modifizierung am 5'-Ende

Nummer	Name	Spacer
1	AMP4-Aptamer	-
2	HEG-AMP4-Aptamer	HEG
3	HEG ₄ -AMP4-Aptamer	4 x HEG
4	HEG-Oligo-C _{3b}	HEG

Da bei den Microarray Experimenten der HEG-Spacer die höchsten Signalintensitäten sowie Verdrängungseffizienzen besaß, wurde er für einen Vergleich der Konjugationsmethoden verwendet. Zusätzlich wurde das AMP4-Aptamer ohne Spacer und ein HEG₄-AMP4-Aptamer getestet, wodurch Rückschlüsse auf den Einfluss der Spacerlänge gezogen werden können. Die Konjugation des Oligonukleotids mit den AuNPs wurde mit einem SH-HEG-Oligo-C_{3b} durchgeführt (s. Tabelle 4.10). So kann später das Assayformat umgekehrt werden, also das Oligonukleotid wird mit den AuNPs konjugiert und das Aptamer auf der Testlinie fixiert. Einen zusätzlichen Einfluss auf die Stabilität der Partikel haben Emulgatoren, die ein Agglomerieren der Partikel verhindern können. Daher wurde für das SH-HEG₄-AMP4-Aptamer auch die Konjugation mit 0,05 % Tween 20 getestet. Die Unterschiede der Konjugationsmethoden (Salt-Aging, pH-Erniedrigung und Freezing) sind in Tabelle 4.11 dargestellt.

Das Salt-Aging Protokoll ist durch die schrittweise Erhöhung der Konzentration an Natriumchlorid am aufwändigsten, während die pH-Erniedrigung, von der Reaktionszeit her, die schnellste Konjugationsmethode darstellt. Etwas langsamer ist das Freezing, bietet aber den Vorteil, dass keine weiteren Komponenten in das AuNP-Aptamer Gemisch eingebracht werden. Für die Methoden des Salt-Agings und der pH-Erniedrigung wurde eine lange Vorinkubation genutzt, um bereits eine geringe Anzahl an Aptameren auf der Partikeloberfläche zu immobilisieren und die Partikel vor der Salzzugabe ausreichend zu stabilisieren. Die Konzentration an Natriumionen lag am

TABELLE 4.11: Durchführung der Konjugation nach den getesteten Methoden

Schritt	Salt-Aging	pH-Erniedrigung	Freezing
Vorinkubation	16 h	16 h	10 min
Reaktion	iterativer Prozess: 1) Erhöhung c_{NaCl} um 0,1 mM 2) Ultraschallbad für 10 s 3) 30 min warten	Zugabe von 500 mM Natriumcitrat Puffer	Ansatz wird eingefroren
Reaktionszeit in min	70 min	10 min	30 min bzw. 2h
Zentrifugation	30 min, 16 000 × g	30 min, 16 000 × g	30 min, 16 000 × g
Gesamtdauer	17 h 40 min	16 h 40 min	60 min bzw. 270 min

Ende für das Salt-Aging bei 0,7 M und für die pH-Methode bei 0,03 M.

Für die Konjugation wurden jeweils die hergestellten AuNPs (4,75 nM) mit Aptamer (finale Konzentration: 2 μ M) versetzt, was einem Verhältnis von etwa 1 zu 420 entspricht. Das eine Konzentration von 2 μ M Aptamer benötigt wird, konnte in Vorversuchen bestimmt werden (s. Anhang, Abschnitt 6). Dabei führten geringere Konzentrationen zu einem Ausfallen der Konjugate. Nach der Reaktion wurden die Suspensionen abzentrifugiert und die Überstände zur Bestimmung der Konjugationseffizienz aufgehoben. Das Pellet wurde im Bindepuffer des Aptamers ohne $MgCl_2$ resuspendiert. Das Magnesiumchlorid des Bindepuffers führte zur Agglomeration der Partikel, weshalb es für das Waschen nicht weiter genutzt wurde. Nachdem Resuspendieren konnten die Partikel im vollständigen Bindepuffer des Aptamers verdünnt werden ohne zu agglomerieren. Als Additive wurden 0,05 % Tween 20 und 2 % Saccharose dem Puffer zugesetzt, da sie Stabilität der Konjugate erhöhen.

Mittels Gelelektrophorese kann eine qualitative Aussage über den Konjugationserfolg getroffen werden. Agglomerierte Partikel verbleiben bei der Gelelektrophorese innerhalb der Kammern, während stabile Konjugate Richtung Kathode wandern. Die Immobilisierung von Aptameren führt zu einer Reduktion der Oberflächenladung der Partikel, wodurch sie im elektrischen Feld weiter Richtung Kathode wandern. Dadurch lassen sich zusätzlich Rückschlüsse auf die Homogenität der konjugierten Partikel ziehen. Bei einer gleichen Anzahl Aptamere auf der Partikeloberfläche sollten die Partikel auch die gleiche Laufrichtung aufweisen.

Abbildung 4.22 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese. Es konnten für das AMP4-Aptamer ohne Spacer und für das AMP4-HEG-Aptamer nur mittels pH-Erniedrigung stabile Konjugate hergestellt werden. Das Verschmieren der Bande bei der pH-Erniedrigung deutet auf eine hohe Heterogenität der Aptamerdichte hin. Scheinbar besitzen die Konjugate eine unterschiedliche Ladung bzw. Größe, was mit verschiedenen Aptamerdichten auf den Partikeln erklärbar ist.

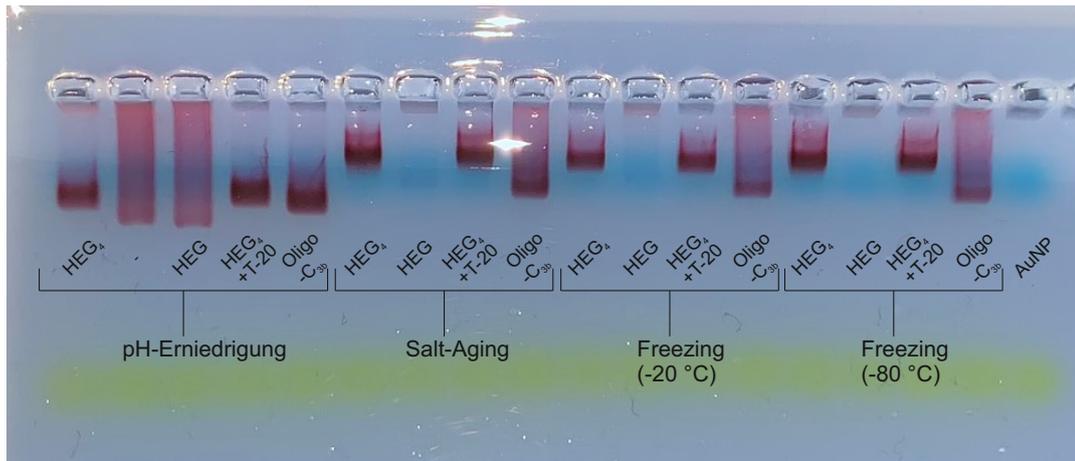


ABBILDUNG 4.22: Agarosegel (3%) der synthetisierten Konjugate, sortiert nach der Methode der Immobilisierung, agglomerierte Ansätze des AMP4-Aptamers ohne Spacer wurden nur für die pH-Erniedrigung aufgetragen

Bei den anderen Konjugationsmethoden sind kaum Unterschiede bei den Konjugaten erkennbar. Die agglomerierten Partikel mit SH-HEG-Aptamer verlassen die Taschen des Gels nicht. Dagegen wandern die Aptamere mit vierfachem HEG Spacer alle gleich weit im Gel, genauso weit wie die Konjugate, die mit Hilfe von Tween 20 stabilisiert wurden.

Auffällig ist, dass Oligo-C_{3b} durch die Methode der pH-Erniedrigung stabil konjugiert werden kann. Bei den anderen Konjugationsmethoden deutet das Verschmieren der Bande ebenfalls auf eine hohe Heterogenität der Aptamerdichte auf der Oberfläche der Partikel hin.

Über die UV-Vis Spektren der Konjugate können Aussagen über die Stabilität der Partikel getroffen werden (s. Abbildung 4.23). Dafür sind der PPI (*primary particle index*) und die Wellenlänge des Absorptionsmaximums λ_{SPR} entscheidend (s. Tabelle 4.12). Bei stabilen Konjugaten verschiebt sich λ_{SPR} hin zu höheren Wellenlängen, da es zu einer Änderung der optischen Dichte an der Partikeloberfläche, durch die Immobilisierung der Aptamere, kommt. Zum Vergleich werden auch die Spektren der reinen AuNPs gezeigt. Die Werte wurden auf die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm normiert. Dadurch lassen sich die Spektren besser miteinander vergleichen.

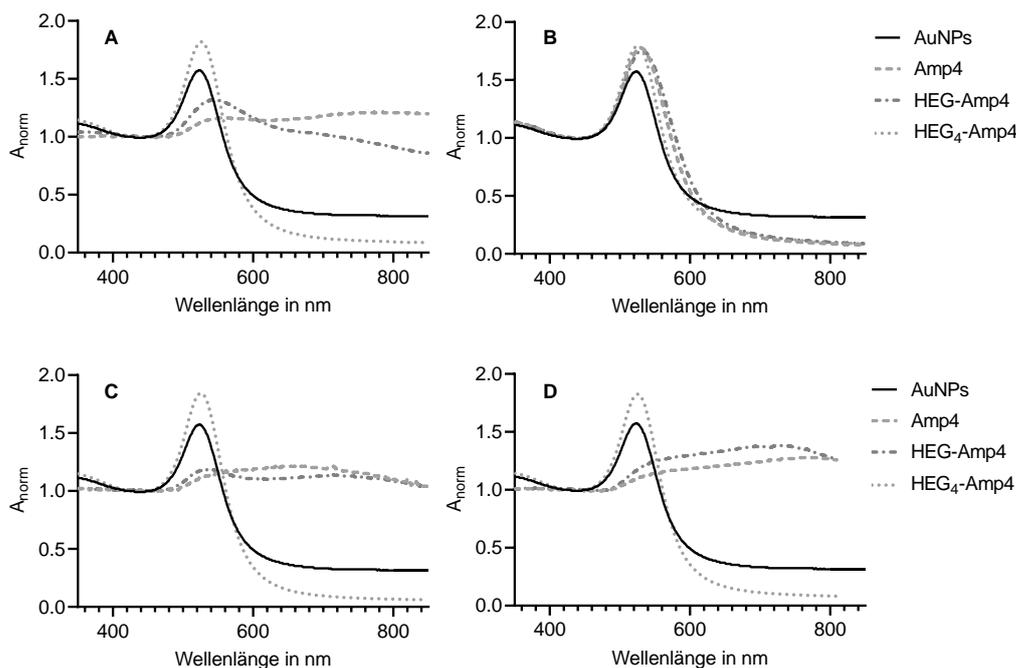


ABBILDUNG 4.23: Vergleich der verschiedenen Spacer für die Konjugation auf AuNPs, Werte normiert auf die Absorption bei 450 nm, A-D: UV-Vis Spektren der Konjugation mittels: A: Salt-Aging, B: pH-Erniedrigung, C: Freezing bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, D: Freezing bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

Mittels pH-Erniedrigung ließ sich mit allen Aptamervarianten ein stabiles Konjugat erhalten. Für alle Aptamervarianten ist das Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 520 nm nur nach der Methode der pH-Erniedrigung ersichtlich. Bei den anderen Konjugationsmethoden kann jeweils lediglich das HEG₄-AMP4-Aptamer überzeugen. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der Gelelektrophorese. Es lassen sich leichte Unterschiede zwischen dem Aptamer ohne Spacer und mit einfachem HEG Spacer feststellen. Der einfache HEG Spacer führt zu einer gewissen Stabilisierung der Konjugate, z.B. beim Salt-Aging Prozess. Zum Einen verringert der neutral geladene HEG Spacer die Abstoßung der Aptamere untereinander im Bereich über der Partikeloberfläche, was eine höhere Immobilisierungsdichte an Aptamer erlaubt. Zum Anderen werden durch den Spacer die Wechselwirkungen der Basen des Aptamers mit den AuNPs verringert, wodurch die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, dass das Aptamer

eine aufgerichtete Position auf dem Partikel einnimmt. Aus der Auswertung der UV-Vis Spektren lässt sich die pH-Erniedrigung als vielversprechender Kandidat für die Konjugationsmethode ableiten.

Aus dem Ergebnis der Gelelektrophorese und der UV-Vis Spektren kann das SH-HEG₄-Aptamer bereits als beste Aptamervariante identifiziert werden. Mit einem 4x HEG-Spacer konnte mit allen Konjugationsmethoden ein stabiles Konjugat synthetisiert werden.

Die Größenbestimmung der AuNPs, wie sie bisher durchgeführt wurde, ist für reine AuNPs optimiert worden. Bei Konjugaten ist die optische Dichte über der Partikeloberfläche durch die Aptamere verändert, was einen Einfluss auf den SPR-Peak hat. Das Ausmaß der Verschiebung des SPR-Peaks zu höheren Wellenlängen ist ein Indiz für eine funktionierende Konjugation, lässt aber kaum Rückschlüsse auf die Größe der Partikel zu. Daher wurden der hydrodynamische Durchmesser der Konjugate mittels *dynamic light scattering* (DLS) bestimmt. Die dynamische Lichtstreuung basiert auf der unterschiedlichen Molekularbewegung von Kolloiden. Mittels Laser wird die Lichtstreuung der Suspension in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt. Daraus lässt sich die Beweglichkeit der Teilchen bzw. der Diffusionskoeffizienten D ermitteln. Dieser steht über die Stokes-Einstein-Gleichung (vgl. 4.5) in Beziehung zum hydrodynamischen Radius des Partikels [70]. Neben der Größe der Partikel haben die Boltzmannkonstante k_B , die Temperatur T sowie die Viskosität η einen Einfluss auf die Diffusion der Partikel in Lösung. Grundsätzlich wird über die DLS-Messung der hydrodynamische Durchmesser der Partikel bestimmt. Neben dem Partikel selbst wird zusätzlich die Hydrathülle berücksichtigt, da diese ebenfalls einen Einfluss auf die Diffusion hat.

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot r} \quad (4.5)$$

Neben der Größe der Partikel ist die Konzentration ein entscheidender

TABELLE 4.12: Ergebnisse der Konjugation. Bei fehlenden Werten sind die AuNPs agglomeriert, weshalb sie nicht weiter analysiert wurden.

Methode	SH-Oligonukleotid	λ_{SPR} in nm	Größe in nm		Konzentration der Partikel in Partikel pro ml	PPI
			NTA	DLS		
	reine AuNP	523	26,56	40	-	3,38
	AMP4	540	-	-	-	0,83
Salt-Aging	HEG-AMP4	540	137	255,8	$5,95 \cdot 10^{10}$	1,13
	HEG ₄ -AMP4	525	66	50,9	$2,74 \cdot 10^{11}$	11,68
	HEG ₄ -AMP4 mit Tween 20	530	43	50,6	$4,18 \cdot 10^{11}$	8,82
	HEG-Oligo-C _{3b}	532	111	280,6	$1,12 \cdot 10^{11}$	4,32
	AMP4	530	110	134,4	$3,67 \cdot 10^{11}$	12,56
	HEG-AMP4	531	105	117,5	$2,79 \cdot 10^{10}$	10,80
pH-Erniedrigung	HEG ₄ -AMP4	525	135	247,7	$4,33 \cdot 10^{10}$	11,02
	HEG ₄ -AMP4 mit Tween 20	524	65	82,4	$1,66 \cdot 10^{11}$	17,40
	HEG-Oligo-C _{3b}	525	46	34,6	$2,71 \cdot 10^{11}$	17,77
	AMP4	525	-	-	-	0,92
	HEG-AMP4	530	83	4702,4	$1,94 \cdot 10^{10}$	0,93
Freezing -20 °C	HEG ₄ -AMP4	531	47	51,5	$5,38 \cdot 10^{11}$	16,35
	HEG ₄ -AMP4 mit Tween 20	525	50	56,5	$5,53 \cdot 10^{11}$	15,51
	HEG-Oligo-C _{3b}	529	89	179,1	$2,48 \cdot 10^{11}$	7,76
	AMP4	540	-	-	-	0,80
	HEG-AMP4	-	122	527,9	$2,25 \cdot 10^{10}$	0,79
Freezing -80 °C	HEG ₄ -AMP4	525	45	57,7	$4,77 \cdot 10^{11}$	13,06
	HEG ₄ -AMP4 mit Tween 20	525	49	51,2	$3,58 \cdot 10^{11}$	15,89
	HEG-Oligo-C _{3b}	531	131	199,5	$1,52 \cdot 10^{11}$	5,81

Faktor, um später eine intensive Rotfärbung der Testlinie zu ermöglichen. Die Konzentration von AuNPs ist mittels *nanoparticle tracking analysis* (NTA)-Messung bestimmbar. Die NTA-Messung beruht auf derselben theoretischen Grundlage, wie die DLS-Messung. Der Unterschied liegt in der Bestimmung des Diffusionskoeffizienten D . Bei der NTA-Messung wird die Probe mit einem Laser bestrahlt und ein Video der Lichtstreuung aufgezeichnet. Aus diesem Video lässt sich die Bewegung hunderter Partikel gleichzeitig verfolgen und daraus die Partikelgröße, die Konzentration sowie die Größenverteilung bestimmen.

Beim Salt-Aging konnte für das HEG₄-AMP4-Aptamer ein stabiles Konjugat hergestellt werden. Tween 20 als Additiv hat anscheinend einen stabilisierenden Einfluss auf die Partikel, ersichtlich an der unterschiedlichen Konzentration der Partikel von $2,74 \cdot 10^{11}$ und $4,18 \cdot 10^{11}$ Partikel pro ml. Außerdem besitzen die Partikel nach der DLS-Messung eine geringere Größe, wenn Tween-20 zugegeben wurde. Scheinbar verhindert Tween-20 beim Salt-Aging die Agglomeration der Partikel durch eine Reduktion der Wechselwirkungen zwischen den Partikeln. Oligo-C_{3b} besitzt mit 8 nt eine wesentlich kürzere Sequenz als das Aptamer mit 21 nt. Die Konjugation mit der Salt-Aging Methode hat für Oligo-C_{3b} zwar funktioniert, aber die Konzentration des Konjugats ist geringer als bei den anderen Methoden und die DLS-Messung ergibt eine Größe von 280,59 nm. Beides deutet auf Agglomeration hin, was durch den niedrigen PPI von 4,32 noch unterstützt wird.

Die Methode der pH-Erniedrigung hat hingegen für alle verwendeten Varianten des AMP4-Aptamers ein stabiles Konjugat erzeugt. Es ist die einzige verwendete Methode bei der alle Konjugationsansätze funktioniert haben. Allerdings zeigt ein Vergleich der Konjugate mit HEG₄-AMP4-Aptamer zwischen den Konjugationsmethoden, dass die Konjugate größer sind und eine niedrigere Konzentration besitzen. Anscheinend funktioniert die pH-Erniedrigung mit dem HEG₄-AMP4-Aptamer schlechter, als mit anderen Methoden. Auch bei der pH-Erniedrigung hat die Zugabe

von Tween-20 einen positiven Effekt auf die Konjugation, was aus der höheren Konzentration der Konjugate ersichtlich ist. Möglicherweise führt die gleichzeitige Erhöhung der Ionenstärke der Lösung zusammen mit der Reduktion des pH Wertes zu einer schnellen Adsorption der Aptamere, weshalb einige Partikel eine hohe Aptamerdichte besitzen und andere Partikel aufgrund einer zu geringen Aptamerdichte agglomerieren. Der Zusatz von Tween-20 verhindert das Agglomerieren und begünstigt eine gleichmäßigere Aptamerdichte auf den AuNPs.

Die Freezing Methode ist die einfachste der verwendeten Methoden. Das Einfrieren bei -80°C ist in der Durchführung schneller als die Methode bei -20°C (s. Tabelle 4.11). Abgesehen von der Durchführung konnte bei beiden Freezing Methoden stabile Konjugate erhalten werden, die sich kaum voneinander unterscheiden. Der Zusatz von Tween-20 hat bei dieser Konjugation kaum einen Einfluss auf die Konjugation. Da die Ionenstärke der Lösung nicht erhöht wird, müssen die Partikel während der Konjugation anscheinend nicht stabilisiert werden. Hier liegt ein großer Vorteil der Freezing-Methode, da keine weiteren Substanzen in die AuNP/Aptamer-Suspension eingebracht werden. Wie beim Salt-Aging sind die AuNPs mit AMP4-Aptamer ohne Spacer und mit einfachem HEG Spacer agglomeriert. Dieses Phänomen kann aus den DLS Messungen abgelesen werden. Die Größe der Partikel beträgt laut DLS Messung $4702,36\text{ nm}$ für das HEG-AMP4 Aptamer, eingefroren bei -20°C . Dieser Wert ist ein eindeutiges Indiz für ein Agglomerieren der Partikel. Durch das Freezing bei -20°C konnte für das HEG₄-AMP4-Aptamer die besten Konjugate hergestellt werden. Außerdem wurden mit $5,38 \cdot 10^{11}$ Partikel pro ml die höchste Konzentration sowie ein sehr guter PPI von 16,35 gemessen.

Da in den Microarray Experimenten der HEG Spacer die besten Ergebnisse mit Bezug auf die Funktionalität der Aptamere lieferte, wurde er für die Konjugation genutzt. Hier hat sich gezeigt, dass ein einfacher HEG Spacer zu wenig stabilisierend auf die Partikel wirkt. Dies kann durch die Abstoßung

der Nucleobasen kommen. Direkt über der Partikeloberfläche ist der Abstand der Aptamere am geringsten. Wenn hier die Abstoßung der Aptamere untereinander zu groß ist, werden nur wenige Aptamere immobilisiert und die Partikel werden nicht ausreichend stabilisiert. Der vierfache HEG Spacer sorgt für einen größeren Abstand zur Oberfläche der Partikel und damit für eine geringere elektrostatische Abstoßung der Aptamere, wodurch mehr Aptamere immobilisiert werden können. Aufgrund der Ergebnisse wurde das SH-HEG₄-AMP₄-Aptamer für kommende Experimente ausgewählt.

In diesem Abschnitt der Arbeit konnte erfolgreich die Konjugation des Aptamers auf der Partikeloberfläche optimiert werden. Zwar konnte mittels pH-Erniedrigung für jede Aptamervariante ein stabiles Konjugat hergestellt werden, aber für das SH-HEG₄-AMP₄-Aptamer konnte in Kombination mit dem Freezing ein besseres Konjugat, bezüglich Größe sowie Konzentration der Partikel, synthetisiert werden. Mittels Salt-Aging konnten ebenfalls stabile Konjugate hergestellt werden, aber der hohe Aufwand der Konjugation schließen die Methode für kommende Versuche aus. Aufgrund der schnelleren Durchführung, im Vergleich zum Freezing bei -20 °C, wurde das Freezing bei -80 °C als beste Konjugationsmethode ausgewählt. Für das HEG-Oligo-C_{3b} wurde die pH-Erniedrigung gewählt, da hierfür die Gelelektrophorese eine homogene Aptamerdichte gezeigt hat und der PPI mit 17,77 der höchste aller Konjugate war.

4.3 Entwicklung eines LFAs zur Detektion von Ampicillin

In diesem Kapitel soll die Funktionalität der synthetisierten Konjugate untersucht werden. Dazu wird ein LFA zur Detektion von Ampicillin hergestellt und getestet. Ein großer Unterschied ist dabei der Übergang von einem statischen auf ein dynamisches System. Die Reaktionszeit beträgt hier weniger als 10 min, im Gegensatz zu 2 h im Microarray-Format, weshalb

sich auf dem LFA möglicherweise kein vollständiges Gleichgewicht zwischen freiem und gebundenem Aptamer einstellen kann. Außerdem liegen im LFA beide Komponenten, also Aptamer und Oligonukleotid, immobilisiert vor. Für die Überprüfung der Funktionalität wurden verschiedene Parameter und Pufferbestandteile aus Vorarbeiten von Alina Eilers¹ übernommen. Es werden LFA und Dipstick-Assay synonym verwendet, wobei normalerweise ein LFA zusätzlich über ein Sample Pad verfügt, welches hier aus pragmatischen Gründen nicht verwendet wurde.

4.3.1 Optimierung des LFA-Systems

Ein LFA setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen. Diese Komponenten erfüllen jeweils eine bestimmte Funktion und müssen ihrer Funktion entsprechend präpariert werden. Die Vorbereitung eines LFAs lief nach den folgenden Schritten ab.

1. Das Conjugate Pad wird für 2 h blockiert mit 1 % BSA, 0,05 % Tween 20 in 1x PBS und anschließend getrocknet. Das verwendete BSA sowie Tween 20 sorgen dafür, dass die getrockneten Konjugate, keine zu starken Wechselwirkungen mit der Membran eingehen und sich bei Kontakt mit dem Laufpuffer resuspendieren lassen.
2. Auf einer Trägerfolie wird die Nitrocellulose Membran aufgeklebt. Anschließend werden das Conjugate Pad und das Absorbent Pad auf beide Seiten der Nitrocellulose Membran aufgeklebt, sodass die Membranen sich überlappen.
3. Für das Aufbringen der Testlinie wurde ein Biotin-modifiziertes Oligonukleotid verwendet. Die Biotin-Streptavidin Bindung gilt als nahezu kovalent, weshalb sie sich hervorragend für die Verwendung in LFAs eignet. Das Verhältnis von Biotin-Oligonukleotid zu Streptavidin ist für die spätere Funktion wichtig. Je mehr Oligonukleotide auf der

¹A. Eilers (2021), Einsatz Aptamer-modifizierter Gold-Nanopartikel in der Diagnostik, Dissertation

Testlinie sind, desto mehr Goldpartikel können an der Membran binden, resultierend in einer Erhöhung der Intensität der Testlinie. Streptavidin und biotinyliertes Oligonukleotid werden anfangs im Verhältnis 1 zu 2 inkubiert und mit Hilfe des Nanospotters auf die Nitrocellulose Membran aufgetragen. Insbesondere bei kompetitiven LFAs kann eine zu hohe Beladungsdichte mit Oligonukleotiden aufgrund von Aviditätseffekten problematisch sein. Wenn mehrere Aptamere auf einem einzelnen AuNP an die Testlinie binden, führt nur die Bindung des Targets an alle, an der Testlinie gebundenen Aptamere, zu einer Verminderung der Testlinienintensität. Zu Beginn wurden 50 μM Oligonukleotid und 25 μM Streptavidin verwendet.

4. Auf dem Conjugate Pad werden die Konjugate getrocknet. Über die Menge und Konzentration der Konjugate kann direkt Einfluss auf die Sensitivität des Assays genommen werden. Die Konjugate wurden im Aufbereitungsprozess auf das 10-fache aufkonzentriert und anschließend mittels Absorption aus den UV-Vis Daten immer auf die gleiche Konzentration eingestellt. Anschließend wurden 3 μL der Suspension aufgetragen und für 5 min bei Raumtemperatur einziehen lassen.
5. Der LFA wird in den Laufpuffer bestehend aus dem Bindepuffer des Aptamers sowie 1 % BSA und 0,1 % Tween 20 gestellt. Die Laufzeit des LFAs betrug 10 min. Der Bindepuffer des Aptamers sorgt für eine optimale Faltung des Aptamers zur Bindung an Ampicillin, das BSA und Tween 20 sorgen für ein Blockieren der Nitrocellulose Membran während des Flusses. Das Ampicillin wird gegebenenfalls direkt in den Laufpuffer gemischt.
6. Der LFA wurde mit Hilfe eines einfachen Flachbettscanners eingescannt. Die Auswertung erfolgte im Anschluss mittels ImageJ.

Nach diesem Schema wurden die LFAs hergestellt. Zu Beginn sollte die Hybridisierung sowie Verdrängung, durch Zugabe von 10 μM Ampicillin

zum Laufpuffer, getestet werden. Da sich in den Microarray Experimenten Oligo-C_{3b} für die Detektion als vorteilhaft erwiesen hat, wurde es hier verwendet. Dazu wurde das biotinylierte Oligonukleotid mit Streptavidin inkubiert und anschließend auf die Testlinie aufgetragen. Zum Vergleich wurde das biotinylierte Oligo-C₃ benutzt.

Für Schritt vier wurden die Konjugate synthetisiert, wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben. Diese wurden anschließend auf das Conjugate Pad gegeben und für 5 min getrocknet, bevor der LFA in 100 µl Laufpuffer gestellt wurde. Nach 10 min wurde der LFA aus dem Laufpuffer genommen und getrocknet.

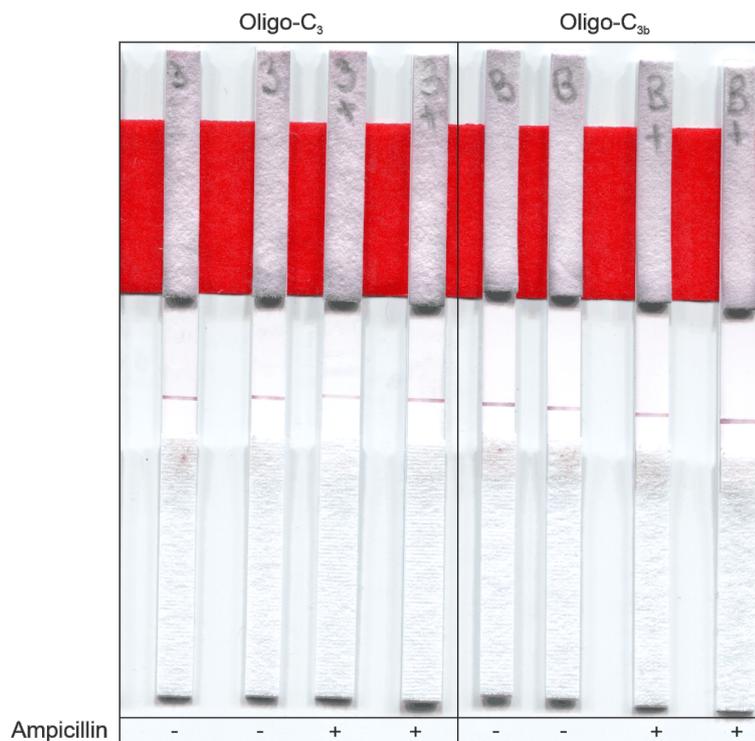


ABBILDUNG 4.24: Hybridisierung und Verdrängung von Oligo-C₃ bzw. -C_{3b} durch Ampicillin auf LFAs, 1 und 2: Hybridisierung von Aptamer-AuNPs an Biotin-Oligo-C₃ auf der Testlinie; 3 und 4: Inkubation wie 1 und 2 plus Ampicillin 10 µM; 5 und 6: Hybridisierung von Aptamer-AuNPs an Biotin-Oligo-C_{3b} auf der Testlinie; 7 und 8: Inkubation wie 5 und 6 plus Ampicillin 10 µM

Die Abbildung 4.25 zeigt, dass die Hybridisierung im dynamischen System funktioniert. Bei den Proben ohne Ampicillin ist eine klare Rotfärbung der Testlinie zu sehen. Trotz einer Laufzeit des LFAs von nur 10 min findet eine

Fixierung der Konjugate auf der Testlinie statt. Außerdem scheint weder das Blockieren des Conjugate Pads noch der verwendete Laufpuffer einen Einfluss auf die Stabilität bzw. die Funktionalität der Konjugate zu haben. Die Menge der verwendeten Konjugate führt zu einer intensiven Rotfärbung und ist damit ausreichend für eine Detektion von Ampicillin.

Eine Herausforderung liegt in der Steigerung der Reproduzierbarkeit. Die Messung als Duplikat zeigt deutliche Abweichungen der Signalintensitäten, sichtbar auch per Auge. Außerdem erscheinen die Linien inhomogen, was mit einem ungleichmäßigen Fluss der Probe begründet werden kann.

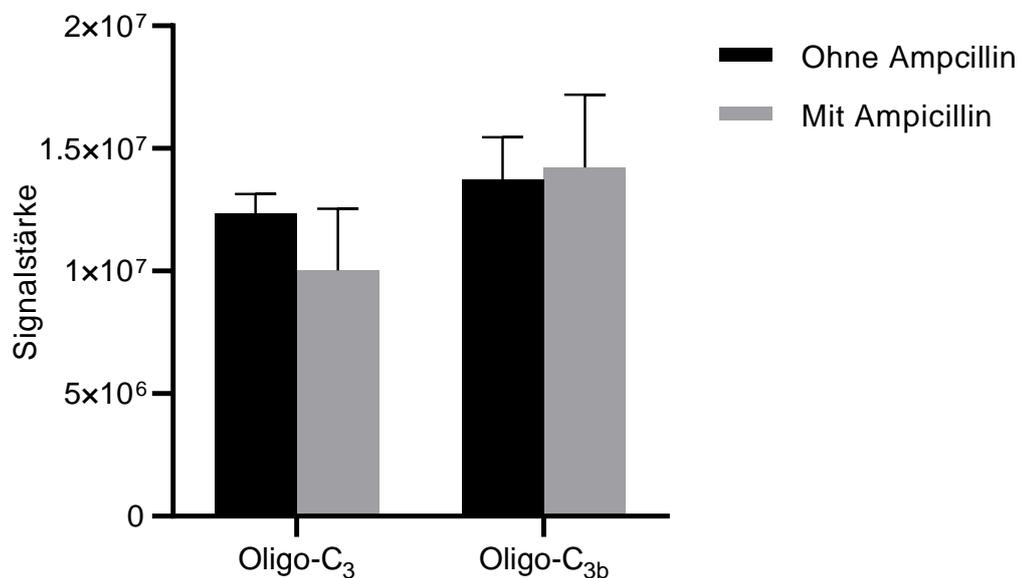


ABBILDUNG 4.25: Konkurrenz des Oligonukleotids durch Ampicillin auf LFAs, $n = 2$

Es fällt auf, dass die Signalstärke von Oligo-C₃ nicht über der von Oligo-C_{3b} liegt. Die Abbildung 4.25 zeigt die Höhe der ausgewerteten Signale. Bei beiden Oligonukleotiden werden fast gleich viele AuNPs immobilisiert, obwohl die Sequenz von Oligo-C_{3b} um zwei Nucleotide kürzer und damit der Energiegewinn der Hybridisierung geringer ist.

Eine mögliche Erklärung sind Aviditätseffekte durch Interaktion mehrerer

Oligonukleotide auf der Testlinie mit einem einzigen Konjugat. Der Energiegewinn bei der Hybridisierung durch die zwei zusätzlichen Basen von Oligo-C₃ wäre vernachlässigbar im Vergleich zu einer Bindung zu weiteren Oligonukleotiden. Das wäre ein Hinweis auf eine zu hohe Immobilisierungsdichte der Aptamere bzw. Oligonukleotide. Eine weitere Erklärung für die gleiche Signalstärke bei den LFAs ist, dass jedes Oligonukleotid auf der Testlinie mit einem Aptamer wechselwirkt und damit die Testlinie abgesättigt ist. Diese Vermutung kann durch eine geringere Menge an Konjugat pro LFA geprüft werden.

Neben der Signalstärke wurde auch die Verdrängung untersucht. Die Testlinie ist auch bei den Proben mit Ampicillin deutlich sichtbar, was gegen eine vollständige Verdrängung spricht. Dies wird durch einen Vergleich der Signalstärken bestätigt. Obwohl im Microarray Format die Intensitäten durch Zugabe von Ampicillin sanken, konnte der gleiche Effekt auf LFAs nicht beobachtet werden. Als mögliche Ursache kommt die verkürzte Reaktionszeit in Frage. Diese betrug im Microarray Format noch 2 h, hier weniger als 10 min. Wenn sich kein vollständiges Gleichgewicht zwischen Aptamer und Ampicillin einstellen kann, ist keine Signalreduktion durch Zugabe von Ampicillin zu erwarten. Diese Vermutung könnte überprüft werden, indem die Konjugate nicht auf dem Conjugate Pad getrocknet werden, sondern in den Laufpuffer zum Ampicillin gegeben werden, wodurch sich ein vorgelagertes Gleichgewicht zwischen Konjugat und Ampicillin bilden kann.

Eine weitere Möglichkeit sind die oben erwähnten Aviditätseffekte. Jedes Streptavidin verfügt theoretisch über zwei Oligonukleotide, da beide Komponenten im Verhältnis zwei zu eins inkubiert wurden. Durch eine zu hohe Aptamerdichte auf den AuNPs oder eine zu hohe Oligonukleotiddichte auf der Testlinie kann es zur Hybridisierung mehrerer Oligonukleotide mit mehreren Aptameren kommen. Das Konjugat würde nur dann nicht an der Testlinie gebunden werden, wenn jedes Aptamer ein Target gebunden hat. Diese Vermutung ließe sich durch eine Verringerung der jeweiligen Dichte

erreichen.

Um die Hypothese der Benachteiligung der Verdrängung aufgrund von Aviditätseffekten zu überprüfen, wurde auf das Microarray-Format gewechselt. Dieses Mal unter Verwendung einer Nitrocellulose Membran, die ähnliche Eigenschaften, wie die Testmembran des LFAs aufweist. Das System ist einfacher, da statt einem dynamischen System, wie dem LFA, ein statisches System verwendet wird. Da für die Vermeidung von Agglomeration während der Konjugation eine hohe Aptamerdichte nötig ist, wurde die Oligonukleotiddichte auf der Testlinie verringert.

4.3.2 Optimierung des Verhältnisses von Biotin-Oligonukleotid zu Streptavidin

In diesem Kapitel wird der Frage nachgegangen, ob ein zu hoher Bedeckungsgrad an Oligonukleotiden auf der Testmembran die Verdrängung durch Begünstigung von Aviditätseffekten negativ beeinflusst. Dafür wurden unterschiedliche Verhältnisse von Streptavidin zu Biotin-Oligonukleotid miteinander verglichen (s. Tabelle 4.13). Die Streptavidin Konzentration wurde dabei konstant bei 25 μM gehalten, um den Bedeckungsgrad der Membran mit Streptavidin nicht zu verändern.

Für das Experiment wurden biotinyliertes Oligonukleotid und Streptavidin in unterschiedlichen Verhältnissen zusammen gegeben und für zwei Stunden inkubiert. Die Lösung wurden anschließend mit dem Nanospotter auf Nitrocellulose Microarrays übertragen und getrocknet. Die Oberfläche wurde mit Hilfe von 1 % BSA und 0,05 % Tween 20 in PBS geblockt.

Die Synthese der AuNPs-Aptamer Konjugate wurde, wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, durchgeführt. Die Konjugate wurden mit dem Laufpuffer aus dem LFA Versuch in einem Verhältnis von 1 zu 50 verdünnt und auf den Nitrocellulose Microarray gegeben. Wenn eine Verdrängung beobachtet werden sollte, wurde 10 μM Ampicillin zum Puffer gegeben. Nach 2 h

TABELLE 4.13: Konzentrationen der verwendeten Substrate für die Fixierung des Oligonukleotids auf der Nitrocellulose Membran

Name	$c_{\text{Biotin-Oligo}}$ in μM	$c_{\text{Streptavidin}}$ in μM	Biotin:Streptavidin
Oligo-C ₃	50	25	2:1
	5	25	1:5
	1	25	1:25
Oligo-C _{3b}	50	25	2:1
	5	25	1:5
	1	25	1:25

wurde die Reaktion beendet und der Nitrocellulose Microarray mit dem Bindepuffer des Aptamers gewaschen. Die Reaktionszeit entspricht dabei wieder der Zeit von den Microarray Experimenten, um die Reaktionszeit als zusätzlichen Parameter konstant zu halten. So ist eine große Nähe zu den anderen Microarray Experimenten gegeben, bei denen eine Verdrängung beobachtet wurde (s. Abbildung 4.19).

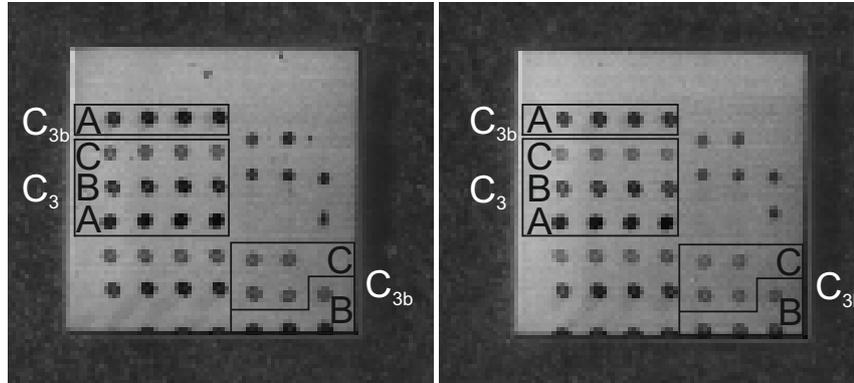


ABBILDUNG 4.26: Nitrocellulose Microarray Ausschnitt als 16 bit Greyscale Bild gescannt, ursprünglich waren die Punkte durch die Konjugate rot gefärbt, Gespottete Verhältnisse: A: 1 zu 2, B: 5 zu 1, C: 25 zu 1, links: ohne Zugabe von Ampicillin, rechts: mit Zugabe von 10 μM Ampicillin

Auf dem Microarray in Abbildung 4.26 kann durch einen Vergleich der beiden Blöcke die Verdrängung von Oligo-C₃ sowie -C_{3b} durch Ampicillin gesehen werden. Beispielsweise sind die Signale von Oligo-C_{3b} bei dem Verhältnis 25 zu 1 (s. Abbildung 4.26, C) schwächer, wenn Ampicillin zugegeben wurde.

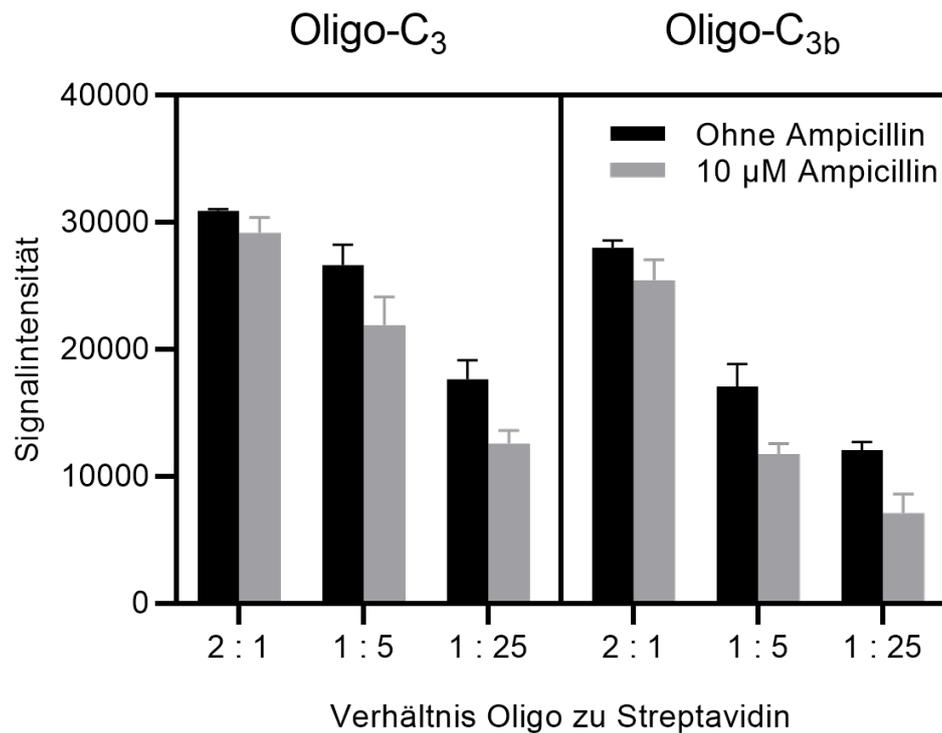


ABBILDUNG 4.27: Signalstärken der eingesetzten Biotin-Aptamer/Streptavidin Verhältnisse, ausgewertet mit ImageJ

Die Signalstärken nehmen, wie zu erwarten war, mit sinkender Konzentration an Oligonukleotid ab. Allerdings sinkt bei Oligo-C₃ die Signalstärke beim Übergang von einem Biotin/Streptavidin Verhältnis von 2:1 zu 1:5 nur schwach, trotz einer Verringerung der eingesetzten Konzentration an Oligonukleotid um 90%. (s. Abbildung 4.27, links). Eine mögliche Erklärung sind die angesprochenen Aviditätseffekte. Ist der Bedeckungsgrad an Oligonukleotid auf der Nitrocellulose Membran zu hoch, kann ein Konjugat über mehrere Bindungen auf der Testlinie fixiert werden. Bei einer Erhöhung der Konzentration an Ampicillin würde die Signalstärke erst sinken, wenn diese Mehrfachbindungen nicht mehr auftreten.

Die Verdrängungseffizienz steigt mit sinkender Konzentration an Oligonukleotid an, von 5,54% bei einem 2:1 Verhältnis von Oligo-C₃ zu Streptavidin auf 28,72% bei einem Verhältnis von 1:25. Gleiches gilt für das Oligo-C_{3b}, hier steigt die Verdrängungseffizienz von 9,21 auf 41,02%. Generell

TABELLE 4.14: Verdrängungseffizienzen und Signalstärken der AuNPs Konjugate auf Nitrocellulose Microarrays

Oligo	Biotin:Streptavidin	Signalstärke	Verdrängungseffizienz in %
Oligo-C ₃	2:1	30912	5,54
	1:5	26652	17,76
	1:25	17641	28,72
Oligo-C _{3b}	2:1	28031	9,21
	1:5	17078	31,29
	1:25	12072	41,02

konnte ein größerer Signalunterschied durch Zugabe von Ampicillin beim kürzeren Oligo-C_{3b} beobachtet werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den vorangegangenen Microarray Experimenten (s. Abbildung 4.19). Das Steigen der Verdrängungseffizienz bis zu einem Biotin/Streptavidin Verhältnis von 1:25 deutet darauf hin, dass hier noch Aviditätseffekte vorliegen. Sobald die Bindung des Konjugats nur noch über ein Aptamer mit einem Oligonukleotid auf der Testlinie stattfindet, sollte die Verdrängungseffizienz durch eine Verringerung der Oligonukleotid Konzentration nicht weiter steigen.

Durch das Experiment konnte gezeigt werden, dass in dem beobachteten Bereich die Verdrängung mit sinkender Konzentration an biotinyliertem Oligonukleotid stärker wird, womit vermutlich die Ursache des Problems der schlechten Verdrängungseffizienz im LFA identifiziert werden konnte. Mit der Verwendung von Nitrocellulose Microarrays in Kombination mit AuNP-Konjugaten konnte außerdem ein geeignetes Mittel für kommende Optimierungsschritte gefunden werden bevor auf das LFA System gewechselt wird.

Kapitel 5

Zusammenfassung und Ausblick

Die Entwicklung Aptamer-basierter Lateral Flow Assays ermöglicht die Detektion kleiner Moleküle mittels *point-of-care*-Testing. In der vorliegenden Arbeit wurde Ampicillin als repräsentatives Molekül dieser Gruppe gewählt und ein LFA zu dessen Detektion entwickelt.

Um einen LFA zur Detektion von Ampicillin zu entwickeln, wurde zunächst ein geeignetes Aptamer für die Detektion von Ampicillin ausgewählt. Aus der Selektion gegen Ampicillin von Song *et al.* wurde das Aptamer (A4) mit der niedrigsten Dissoziationskonstante ausgewählt und zusammen mit der gekürzten Aptamervariante (AMP4) charakterisiert. Mittels MST wurden die Bindungseigenschaften der Aptamere bestimmt und eine Entscheidung getroffen, welche der Aptamervarianten für eine Detektion von Ampicillin verwendet werden soll. Da eine direkte Messung der Dissoziationskonstanten K_D der Bindung beim A4-Aptamer nicht möglich war, wurde stattdessen die *half maximal effective concentration* (EC_{50} -Wert) ermittelt. Die Bestimmung der EC_{50} -Werte erfolgte über eine kompetitive Reaktion, bei der ein komplementäres Oligonukleotid durch das Zielmolekül vom Aptamer verdrängt wird. Die gleiche kompetitive Reaktion sollte später auch für den LFA verwendet werden, weshalb die EC_{50} -Werte für einen Vergleich der Aptamere geeignet schien. Dazu wurden drei komplementäre Oligonukleotide entworfen, die an verschiedene Bereiche der Aptamersequenz hybridisieren. Bei beiden Aptameren konnten für zwei der drei Oligonukleotide EC_{50} -Werte ermittelt werden. Hier konnte vor allem das gekürzte Amp4-Aptamer mit EC_{50} -Werten im einstelligen nanomolaren Bereich überzeugen und wurde daher für die LFA Entwicklung ausgewählt.

Mittels CD-Spektrometrie konnten weitere Einblicke in die Struktur des Aptamers erhalten werden, wobei das dominante Strukturmotiv des Aptamers als B-DNA bzw. Helix identifiziert wurde. Diese Struktur wird durch Zugabe des Aptamers stabilisiert.

Das Oligo-C₁ wies bei MST Experimenten die niedrigsten EC₅₀-Werte auf und wurde daher für Immobilisierungsversuche auf Microarrays verwendet. Im ersten Schritt wurden hier die Konzentrationen des Aptamer/Oligonukleotid-Paares optimiert, indem das Aptamer immobilisiert und mit dem Oligonukleotid in verschiedenen Konzentrationen inkubiert wurde. Dabei erwies sich eine Aptamerkonzentration von 10 µM bei Inkubation mit einer Oligonukleotidkonzentration von 10 nM als vorteilhaft.

Um eine korrekte Faltung des Aptamers im späteren Assay zu unterstützen, wurden Spacer zwischen Aptamer und Immobilisierungsoberfläche getestet. Hier konnte mit Hilfe eines neutralen HEG-Spacers eine Verdrängung im Microarray-Format von 27,86 % erreicht werden. Ein Einfluss des Spacers auf die Hybridisierungseffizienz des Oligonukleotids sowie die Verdrängung durch Ampicillin konnte eindeutig gezeigt werden. Der HEG-Spacer konnte dabei als am besten geeignet für die Verwendung im LFA identifiziert werden.

Für eine Verbesserung der Verdrängung durch Ampicillin wurden noch einmal die anderen Oligonukleotide im Microarray Format getestet, wobei sich Oligo-C₃ im Gegensatz zur MST mit einer Verdrängung von maximal 30,83 % durchsetzen konnte. Auch bei Oligo-C₃ erwies sich der HEG-Spacer als vorteilhaft gegenüber den anderen Spacervarianten. Des Weiteren konnte durch das rationale Kürzen der Oligonukleotid-Sequenz auf 8 nt die Verdrängung auf 55 % verbessert werden. Diese Verdrängungseffizienz wurde als ausreichend für die weiteren Experimente eingestuft. Damit konnte erfolgreich eine Möglichkeit der Detektion von Ampicillin im Microarray Format etabliert werden.

Goldnanopartikel (AuNPs) werden für den LFA verwendet, um die Bindung

des Aptamers an Ampicillin in ein kolorimetrisches Signal umzusetzen. Für die Arbeit wurden AuNPs, über die Frens- sowie die *Seedings Growth* Methode, mit einer Größe von etwa 14 nm synthetisiert. Durch die wiederholte Zugabe der Substrate während der *Seeding Growth* Methode konnten AuNPs mit einer homogeneren Größenverteilung synthetisiert werden, als mit der Frens-Methode, was mit REM-Aufnahmen gezeigt werden konnte. Aus den UV-Vis Spektren der Partikel konnte mit dem PPI die Stabilität AuNPs bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass die AuNPs nach der *Seedings Growth* Methode eine höhere Stabilität besitzen, weshalb diese Methode für eine Detektion von Ampicillin besser geeignet war.

In der darauffolgenden Konjugation der AuNPs mit dem AMP4-Aptamer wurde der Fokus auf eine optimale Stabilität sowie eine hohe Konzentration der Konjugate gelegt. Um die Aptamere auf der Goldoberfläche zu immobilisieren, wurden Thiol-modifizierte Aptamere verwendet. Für die Konjugation standen drei unterschiedliche Methoden zur Auswahl - das Salt-Aging, die pH-Erniedrigung und das Freezing. In den Microarray Experimenten konnte der HEG-Spacer überzeugen, weshalb er für die Konjugation verwendet wurde. Hier zeigte sich, dass das HEG-AMP4-Aptamer die AuNPs zu wenig stabilisiert. Stattdessen wurde ein längerer HEG₄-Spacer verwendet, womit für alle drei Konjugationsmethoden stabile Konjugate hergestellt werden konnten.

Bei der ersten Methode, dem Salt-Aging, wird die Salzionenkonzentration der Lösung schrittweise erhöht, um die elektrostatische Abstoßung der Aptamere zu verringern. Mit Hilfe des Salt-Agings konnten zwar stabile Konjugate mit einem PPI von 11,68 für das HEG₄-AMP4-Aptamer hergestellt werden, ein Nachteil war allerdings die aufwändige Durchführung. Bei der pH-Erniedrigung wird der pH-Wert mit einem Citratpuffer auf 3 reduziert, wodurch sich die Reaktionszeit auf 10 min reduziert. Als einzige verwendete Methode erlaubte die pH-Erniedrigung eine Synthese von Konjugaten mit dem AMP4-Aptamer ohne Spacer und auch für das HEG₄-AMP4-Aptamer konnten stabile Konjugate mit einem PPI von 11,02 erhalten werden. Ein

Nachteil war die geringe Konzentration der Partikel. Bei beiden Methoden, dem Salt-Aging sowie der pH-Erniedrigung, konnte die Konjugation durch den Zusatz von Tween 20 optimiert werden, was sich in einer Reduktion des hydrodynamischen Durchmessers zeigte. Hingegen hatte bei der letzten Konjugationsmethode, dem Freezing, die Zugabe von Tween 20 kaum einen Effekt. Bei dieser Methode wird eine Annäherung von Aptamer und AuNPs durch das Einfrieren der Lösung erreicht. Die Freezing Methode konnte mit der schnellen und einfachen Durchführung sowie der hohen Konzentration der Konjugate überzeugen.

Damit konnte die Synthese und Konjugation der AuNPs abgeschlossen werden. Mit der *Seeding Growth* Methode konnten erfolgreich Goldnanopartikel hergestellt werden und die Funktionalisierung der AuNPs mit SH-HEG₄-AMP₄-Aptamer mittels Freezing-Methode führte zu stabilen Konjugaten, die sich zum Einsatz in LFAs eignen.

Mit den Ergebnissen aus den vorangegangenen Versuchen wurde die Detektion von Ampicillin im LFA Format getestet. Dafür wurde biotinyliertes Oligo-C_{3b} mit Streptavidin zusammen inkubiert und durch den Nanospotter auf eine Nitrocellulose Membran übertragen. Es konnte beim LFA eine Rotfärbung durch Anreicherung der Konjugate auf der Testlinie erreicht werden, was darauf hindeutete, dass die Konjugate für die Verwendung in LFAs geeignet waren. Allerdings konnte keine Abschwächung der Rotfärbung durch Zugabe von Ampicillin erreicht werden.

Als Ursache wurden Aviditätseffekte in Betracht gezogen. Diese treten auf, wenn mehrere Aptamere eines AuNPs mit verschiedenen Oligonukleotiden auf der Membran hybridisieren. Dadurch verstärkt sich die Verankerung der Konjugate auf der Testlinie, was in einer schwächeren Verdrängung resultiert. Diese Vermutung wurde überprüft, indem die Dichte der Oligonukleotide auf der Testlinie reduziert wurde. Eine Möglichkeit stellte dafür die Verwendung eines niedrigeren Oligonukleotid/Streptavidin Verhältnisses dar. Bei einem Verhältnis von 1 zu 25 konnte eine Signalreduktion von 35,9 % erreicht werden, was die Vermutung von Aviditätseffekten untermauerte. Es

konnte gezeigt werden, dass mit den HEG₄-AMP₄-Aptamer Konjugaten in Kombination mit Oligo-C_{3b} eine Detektion von Ampicillin auf Nitrocellulose Microarrays möglich ist. Die Komponenten konnten allerdings nicht für die Detektion von Ampicillin auf einem LFA optimiert werden.

Im nächsten Schritt sollte der Bedeckungsgrad der Oligonukleotide auf der Testlinie des LFAs reduziert werden, damit die Aviditätseffekte minimiert werden können. Möglicherweise kann dadurch eine Detektion von Ampicillin mit einem LFA ermöglicht werden. Allerdings muss auch die benötigte Sensitivität erreicht werden. Diese kann durch eine Erhöhung der Konjugatmenge pro LFA erzielt werden oder durch eine Optimierung der verwendeten Komponenten, wie z.B. dem Laufpuffer. Alternativ kann versucht werden die Menge an eingesetztem Aptamer zu verringern. Je weniger Aptamere auf den AuNPs immobilisiert sind, desto weniger Ampicillin wird benötigt, um eine Schwächung der Rotfärbung zu erreichen. Da in dieser Arbeit das Oligo-C_{3b} erfolgreich mit AuNPs konjugiert wurde, ist auch eine Umkehrung des Assays denkbar, also das Aptamer auf der Testlinie zu immobilisieren. Dadurch kann die Menge an Aptamer leichter variiert werden.

Für diese weiterführenden Arbeiten wurden in der vorliegenden Dissertation wesentliche Grundlagen erfolgreich bearbeitet. Die Verwendung von Nitrocellulose Microarrays zusammen mit Aptamer-Konjugaten bietet die Möglichkeit wesentliche Parameter des LFAs hoch parallelisiert zu optimieren, z.B. die Untersuchung der Konjugate auf ihre Funktionalität oder die Reduktion von Aviditätseffekten, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden.

Literatur

- (1) Cushnie, T. P.; O'Driscoll, N. H.; Lamb, A. J. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2016**, *73*, 4471–4492.
- (2) Fleming, A. *British Journal of Experimental Pathology* **1929**, *10*, 226–236.
- (3) Poole, K. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2004**, *61*, 2200–2223.
- (4) FDA Tolerance And/Or Target Testing Levels Of Animal Drug Residues In Milk, 2018.
- (5) Gang Yu, Z.-g.; Sutlief, A. L.; Lai, R. Y. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2018**, *258*, 722–729.
- (6) Andreou, C.; Mirsafavi, R.; Moskovits, M.; Meinhart, C. D. *The Analyst* **2015**, *140*, 5003–5005.
- (7) Kaiser, L.; Weisser, J.; Kohl, M.; Deigner, H.-P. *Scientific Reports* **2018**, *8*, 5628.
- (8) Shayesteh, O. H.; Ghavami, R. *Microchimica Acta* **2019**, *186*, DOI: 10.1007/s00604-019-3524-4.
- (9) Song, K. M.; Jeong, E.; Jeon, W.; Cho, M.; Ban, C. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, *402*, 2153–2161.
- (10) Luo, Z.; Wang, Y.; Lu, X.; Chen, J.; Wei, F.; Huang, Z.; Zhou, C.; Duan, Y. *Analytica Chimica Acta* **2017**, *984*, 177–184.
- (11) Yang, Z.; Ding, X.; Guo, Q.; Wang, Y.; Lu, Z.; Ou, H.; Luo, Z.; Lou, X. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2017**, *253*, 1129–1136.
- (12) Daprà, J.; Lauridsen, L. H.; Nielsen, A. T.; Rozlosnik, N. *Biosensors and Bioelectronics* **2013**, *43*, 315–320.
- (13) Rosati, G.; Daprà, J.; Cherré, S.; Rozlosnik, N. *Electroanalysis* **2014**, *26*, 1400–1408.
- (14) Zhang, Z.; Chen, W.; Zhao, H.; Xu, K. *Nanophotonics, Nanoelectronics and Nanosensor, N3 2013* **2013**, 8–10.

- (15) Mann, D.; Reinemann, C.; Stoltenburg, R.; Strehlitz, B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *338*, 1928–1934.
- (16) Latham, J. A.; Johnson, R.; Toole, J. J. *Nucleic Acids Research* **1994**, *22*, 2817–2822.
- (17) Shangguan, D.; Meng, L.; Cao, Z. C.; Xiao, Z.; Fang, X.; Li, Y.; Cardona, D.; Witek, R. P.; Liu, C.; Tan, W. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 721–728.
- (18) John G., B.; Maria P., C.; Alicia M., R.; Taylor, P.; Carrie, A.; John S., L. *BMC research notes* **2012**, *5*, 633.
- (19) Tuerk, C.; Gold, L. *Science (New York, N.Y.)* **1990**, *249*, 505–510.
- (20) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, *346*, 818–822.
- (21) Hermann, T.; Patel, D. J. D. *Science* **2000**, *287*, 820–825.
- (22) Du, X.; Li, Y.; Xia, Y.-L.; Ai, S.-M.; Liang, J.; Sang, P.; Ji, X.-L.; Liu, S.-Q. *International Journal of Molecular Sciences* **2016**, *17*, 144.
- (23) Daniels, D. A.; Chen, H.; Hicke, B. J.; Swiderek, K. M.; Gold, L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 15416–15421.
- (24) Lou, X.; Qian, J.; Xiao, Y.; Viel, L.; Gerdon, A. E.; Lagally, E. T.; Atzberger, P.; Tarasow, T. M.; Heeger, A. J.; Soh, H. T. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 2989–2994.
- (25) Mendonsa, S. D.; Bowser, M. T. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 20–21.
- (26) Dong, Y.; Wang, Z.; Wang, S.; Wu, Y.; Ma, Y.; Liu, J. *Aptamers for Analytical Applications* **2018**, 1–25.
- (27) Tan, Z. J.; Chen, S. J. *Biophysical Journal* **2006**, *90*, 1175–1190.
- (28) Terpe, K. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2013**, *97*, 10243–10254.
- (29) Szeitner, Z.; András, J.; Gyurcsányi, R. E.; Mészáros, T. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2014**, *101*, 58–65.
- (30) Cowperthwaite, M. C.; Ellington, A. D. *Journal of Molecular Evolution* **2008**, *67*, 95–102.
- (31) Liu, B.; Liu, J. *Anal. Methods* **2017**, *9*, 2633–2643.

-
- (32) Balamurugan, S.; Obubuafo, A.; Soper, S. A.; Spivak, D. A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *390*, 1009–1021.
- (33) Liu, J. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2012**, *14*, 10485.
- (34) Koo, K. M.; Sina, A. A.; Carrascosa, L. G.; Shiddiky, M. J.; Trau, M. *Analytical Methods* **2015**, *7*, 7042–7054.
- (35) Zhang, Y.; Gao, D.; Fan, J.; Nie, J.; Le, S.; Zhu, W.; Yang, J.; Li, J. *Biosensors and Bioelectronics* **2016**, *78*, 538–546.
- (36) Mdluli, P.; Tetyana, P.; Sosibo, N.; van der Walt, H.; Mlambo, M.; Skepu, A.; Tshikhudo, R. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, *54*, 1–6.
- (37) Klewitz, T.; Gessler, F.; Beer, H.; Pflanz, K.; Scheper, T. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2006**, *113*, 582–589.
- (38) Zhou, W.; Kong, W.; Dou, X.; Zhao, M.; Ouyang, Z.; Yang, M. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2016**, *1022*, 102–108.
- (39) Jeong, J.; Kim, T.; Oh, S. W.; Choi, E. Y. *BioChip J* **2013**, *7*, 408–414.
- (40) Knecht, M. R.; Sethi, M. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *394*, 33–46.
- (41) Bruno, J. *Pathogens* **2014**, *3*, 341–355.
- (42) Ahmad Raston, N. H.; Nguyen, V. T.; Gu, M. B. *Biosensors and Bioelectronics* **2017**, *93*, 21–25.
- (43) Chen, A.; Yang, S. *Biosensors and Bioelectronics* **2015**, *71*, 230–242.
- (44) Posthuma-Trumpie, G. A.; Korf, J.; Van Amerongen, A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *393*, 569–582.
- (45) Faraday, M. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1857**, *147*, 145–181.
- (46) FRENS, G. *Nature Physical Science* **1973**, *241*, 20–22.
- (47) Polte, J.; Herder, M.; Erler, R.; Rolf, S.; Fischer, A.; Würth, C.; Thünemann, A. F.; Kraehnert, R.; Emmerling, F. *Nanoscale* **2010**, *2*, 2463–2469.
- (48) Derjaguin, B.; Landau, L. *Progress in Surface Science* **1993**, *43*, 30–59.
- (49) Bockris, J. O.; Müller, K.; Devanathan, M. A. V. *Sensors and Actuators* **1963**, *274*, 97–109.

-
- (50) Stern, O. *Zeitschrift für Elektrochemie* **1924**, *30*, 508–516.
- (51) Han, K.; Liang, Z.; Zhou, N. *Sensors* **2010**, *10*, 4541–4557.
- (52) Dhiman, A.; Kalra, P.; Bansal, V.; Bruno, J. G.; Sharma, T. K. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2017**, *246*, 535–553.
- (53) Schüling, T.; Eilers, A.; Scheper, T.; Walter, J. G. *AIMS Bioengineering* **2018**, *5*, 78–102.
- (54) Zuker, M. *Nucleic Acids Research* **2003**, *31*, 3406–3415.
- (55) Jerabek-Willemsen, M.; Andr??, T.; Wanner, R.; Roth, H. M.; Duhr, S.; Baaske, P.; Breitsprecher, D. *Journal of Molecular Structure* **2014**, *1077*, 101–113.
- (56) Seidel, S. A. u. a. *Methods* **2013**, *59*, 301–315.
- (57) Duhr, S.; Braun, D. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 19678–19682.
- (58) Fischer, C.; Wessels, H.; Paschke-Kratzin, A.; Fischer, M. *Analytical Biochemistry* **2017**, *522*, 53–60.
- (59) Heilkenbrinker, A.; Reinemann, C.; Stoltenburg, R.; Walter, J. G.; Jochums, A.; Stahl, F.; Zimmermann, S.; Strehlitz, B.; Scheper, T. *Analytical Chemistry* **2015**, *87*, 677–685.
- (60) Bishop, G. R.; Chaires, J. B. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* **2004**, 7.11.1–7.11.8.
- (61) Ramdas, L.; Coombes, K. R.; Baggerly, K.; Abruzzo, L.; Highsmith, W. E.; Krogmann, T.; Hamilton, S. R.; Zhang, W. *Genome biology* **2001**, *2*, 1–7.
- (62) Storhoff, J. J.; Elghanian, R.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *Langmuir* **2002**, *18*, 6666–6670.
- (63) Hurst, S. J.; Lytton-Jean, A. K. R.; Mirkin, C. A. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 8313–8318.
- (64) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, 1951.
- (65) Bastus, N. G.; Comenge, J.; Puentes, V. *Langmuir* **2011**, *27*, 11098–11105.
- (66) Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 4215–4221.

-
- (67) Rehbock, C.; Merk, V.; Gamrad, L.; Streubel, R.; Barcikowski, S. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15*, 3057–3067.
- (68) Zhang, X.; Servos, M. R.; Liu, J. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 7266–7269.
- (69) Liu, B.; Liu, J. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139*, 9471–9474.
- (70) Einstein, A. *Annalen der Physik* **1905**, *322*, 549–560.

Kapitel 6

Anhang

Microarray zum Vergleich vom NH₂-AMP4-Aptamer und NH₂-T₉-C₁₀-Aptamer

Für einen Vergleich zwischen dem NH₂-AMP4-Aptamer und NH₂-T₉-C₁₀-Aptamer wurden jeweils unterschiedliche Konzentrationen des Aptamers mit dem Nanospotter auf einen 3D-Aldehydslide gespottet. Der Microarray wurde über Nacht getrocknet und anschließend mit Natriumborhydrid reduziert. Die Inkubation mit Cy5-markiertem Oligo-C₁ (10 nM) erfolgte im BP des Aptamers für 2 h. Für eine Verdrängung des Oligonukleotids wurden 10 µM Ampicillin zugegeben.

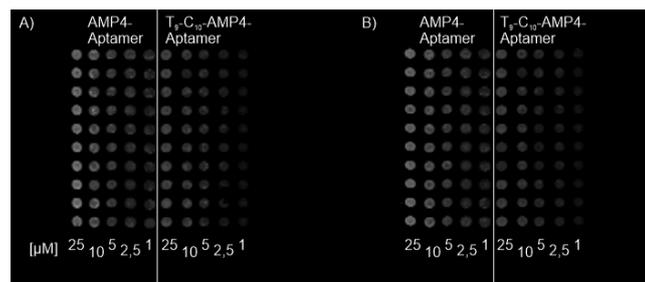


ABBILDUNG 6.1: Microarray-Blöcke des Vergleiches zwischen NH₂-AMP4-Aptamer und NH₂-T₉-C₁₀-Aptamer, A) ohne Ampicillin; B) mit 10 µM Ampicillin

Bei dem NH₂-AMP4-Aptamer sind die Signalstärken höher als bei dem NH₂-T₉-C₁₀-Aptamer, aber die Verdrängungseffizienzen sind bei dem NH₂-T₉-C₁₀-Aptamer fast doppelt so hoch, weshalb es für die Microarray Experimente in Kapitel 4.1.5 verwendet wurde.

TABELLE 6.1: Verdrängungseffizienzen des Versuches aus Abbildung 6.1

Aptamer	Konzentration in μM	Verdrängung in %
AMP4-Aptamer	25	12,5
	10	14,1
	5	13,0
	2,5	17,2
	1	12,3
T ₉ -C ₁₀ -Aptamer	25	11,7
	10	20,3
	5	27,1
	2,5	26,9
	1	23,6

Bestimmung der optimalen Aptamerkonzentration für die Konjugation

Insgesamt wurden fünf verschiedene Konzentrationen an SH-HEG-AMP4-Aptamer für die Konjugation getestet (s. Tabelle 6.2). Dazu wurden die Konjugation wie in Kapitel 8.3.2 hergestellt. Bei einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ sind die AuNPs während der Konjugation agglomeriert. Die anderen Konjugate wurden jeweils auf einen LFA gegeben. Dabei wurde lediglich die Hybrisierung zwischen Aptamer und Oligonukleotid betrachtet.

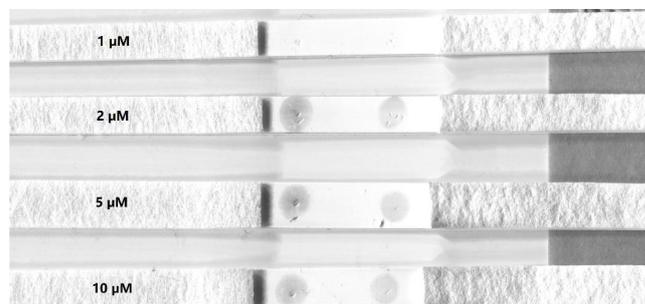


ABBILDUNG 6.2: LFAs zur Bestimmung der optimalen Aptamerkonzentration für die Konjugation

Der LFA wurde, wie in Abschnitt 8.6 beschrieben, durchgeführt. Ab einer

TABELLE 6.2: eingesetzte Aptamerkonzentrationen, Zustand der Lösung nach der Konjugation und beobachtete Hybridisierung

Konzentration an Aptamer in μM	Stabilität der Konjugate	Hybridisierung
0,5	Konjugat ausgefallen	-
1	Konjugat stabil	Nein
2	Konjugat stabil	Ja
5	Konjugat stabil	Ja
10	Konjugat stabil	Ja

Konzentration von $2\ \mu\text{M}$ kann eine Hybridisierung und damit eine Rotfärbung der Testlinie beobachtet werden (s. Abbildung 6.2). Die Intensität der Rotlinie nimmt mit steigender Konzentration an Aptamer nur schwach zu, weshalb für alle Experimente zur Konjugation eine Aptamerkonzentration von $2\ \mu\text{M}$ verwendet wurde.

Kapitel 7

Material

7.1 Geräte und Software

Laborgeräte	Hersteller
Epoch Mikroplatten-Spektralphotometer	BioTek Instruments Inc., Winooski, USA
GenePix 4000B Microarray-Scanner	Axon Instruments, Foster City, CA, USA
J-815 Circular Dichroism Spectrometer	JASCO
Litesizer™500	Anton Paar GmbH, Graz, Österreich
Monolith NT. 115	Nanotemper Technology, München, DE
Mupid™-One Electrophoresis System	NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren, DE
NanoDrop-ND1000	PeEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
NanoSight LM 10	Malvern Panalytical
Nano-Plotter™	GeSiM mbH, Radeberg, DE
pH-Meter HI 110	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen, DE
Reinstwasseranlage Arium 611	Sartorius AG, Göttingen, DE
Dahle Schneidemaschine 868	Novus Dahle GmbH, Lingen, DE
Schüttler	IKA Vibrax VXR Basic
Take3-Mikrovolumenplatte	BioTek Instruments Inc., Winooski, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Ultraschallbad Sonorex Super R4 510 H	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE
Vortex Mischer	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Zentrifugen:	
-Micro Star 17R	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
-Mini-Zentrifuge ROTILABO®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE

7.2 Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
5 X Green GoTaq [®] Reaktionspuffer	Promega
Agarose Standard	Carl Roth
Ampicillin-Trihydrat	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Fluka Analytical
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich
Nukleinsäuren	Integratged DNA Technologies / IDT
EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid)	Sigma-Aldrich
Ethanol	Carl Roth
Gold(III)-chlorid-Hydrat ($\text{AuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	Fluka Analytical
Milchpulver	Carl Roth
Natriumchlorid	VWR
Natriumborhydrid (NaBH_4)	Merck Millipore
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth
Nuclease-Free Water for Molecular Biology	Sigma-Aldrich
Ochratoxin A	Sigma-Aldrich
ROTI [®] GelStain	Carl Roth
Saccharose	Sigma-Aldrich
Salpetersäure (HNO_3)	Fluka Analytical
Salzsäure	Carl Roth
Streptavidin	IBA
SYBR [®] Green II	Thermo Fisher Scientific
TRIS	Sigma-Aldrich
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich
Tween [®] 20	AppliChem PanReac
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Sigma-Aldrich

7.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
2D-Aldehyd-modifizierter Glasslide	PolyAn GmbH, Berlin, DE
3D-Aldehyd-modifizierter Glasslide	PolyAn GmbH, Berlin, DE
96-Well-Platte	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Hybridisierungskammer NEXTERION [®] IC-16	SCHOTT AG, Mainz, DE
Nitrocellulose Membran	Sartorius, Göttingen, DE
Pipettenspitzen	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Standard MST-Kapillaren	Nanotemper Technology, München, DE
Trägerfolie KN-2211 [™]	Kenosha Tapes, Amstelveen, NL

7.4 Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
1 x PBS	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	10 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O
	2 mM KH ₂ PO ₄
	pH 7,4
20 x SSC	3 M NaCl
	300 mM Tri-Natriumcitrat-dihydrat pH 7, eingestellt mit 1 M HCl
50 x TAE	2 M TRIS
	50 mM EDTA
	pH 8, eingestellt mit konz. Essigsäure
	20 mM Tris-HCl

Bindepuffer (BP)

	50 mM NaCl
	5 mM KCl
	5 mM MgCl ₂
	pH 8, eingestellt mit 1 M NaOH
Blockierungslösung für Microarrays	0,1 g Natriumborhydrid 30 ml 1 x PBS 10 ml Ethanol (100 %)
Citratpuffer	500 mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat pH 3, eingestellt mit 1 bzw. 12 M HCl
Königswasser	3 Teile HCl (37 %ige) 1 Teile HNO ₃ (65 %ige)
Laufpuffer für den LFA	BP 1 % BSA 0,05 % Tween 20
PBTS-Lösung	1 x PBS 5 % BSA 0,05 % Tween 20
Resuspensionspuffer	BP ohne Magnesium 2 % Saccharose 0,05 % Tween 20

Kapitel 8

Methoden

8.1 Allgemeine Informationen

8.1.1 Sequenzen verwendeter Nukleinsäuren

Während der Arbeit wurden verschiedene Nukleinsäuresequenzen für die Verwendung in einem LFA zur Detektion von Ampicillin getestet. Alle, in der vorliegenden Arbeit, verwendeten Sequenzen sowie deren Namen sind in Tabelle 8.1 aufgelistet.

8.1.2 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Für die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem NanoDrop 1000 Spektrophotometer der Firma Thermo Fisher Scientific bestimmt. Durch Umstellen

TABELLE 8.1: Sequenzen der verwendeten Aptamer und Oligonukleotide [9]

Name	Sequenz	nt
AMP4	5'-CAC GGC ATG GTG GGC GTC GTG-3'	21
A4	5'-CAC CTA ATA CGA CTC ACT ATA GCG GAT CCG ACA CGG CAT GGT GGG CGT CGT GTG TGT GGG GTG GGG GGG TCC TGG CTC GAA CAA GCT TGC-3'	90
AMP4-C ₁	5'-CAC GAC GCC C-3'	10
AMP4-C ₂	5'-CCA TGC CGT G-3'	10
AMP4-C ₃	5'-CGC CCA CCA T-3'	10
AMP4-C _{3a}	5'-CCC ACC AT -3'	8
AMP4-C _{3b}	5'-CGC CCA CC-3'	8

des Lambert-Beerschen Gesetzes (Formel 4.3) kann aus der Absorption die Konzentration der Nukleinsäuren ermittelt werden.

$$E_{\lambda} = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I_1}\right) = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \Leftrightarrow c_{Aptamer} = \frac{E_{260}}{\varepsilon_{260} \cdot d} \quad (8.1)$$

Dabei wurde die Schichtdicke d auf 1 cm festgesetzt; der Extinktionskoeffizienten ε_{λ} wurde dem Datenblatt der Nukleinsäuren entnommen.

Lyophilisierte Nukleinsäuren wurden in deionisiertem H₂O gelöst und auf eine Konzentration zwischen 100 μ M bis 200 μ M gebracht. Die Lagerung erfolgte in Aliquots bei einer Temperatur von -20 °C. Für die Messung der Konzentration wurden die Nukleinsäuren 1:100 verdünnt und 2 μ L für die Messung verwendet.

8.2 Synthese von Goldnanopartikeln

Für die Herstellung der Goldpartikel müssen sämtliche Glasgeräte frei von Verunreinigungen sein, die als Nukleationskeime dienen können. Daher wurden die Glasgeräte vor der Benutzung mit Hilfe von Königswasser gereinigt und ausschließlich für die Synthese der Goldpartikel verwendet.

8.2.1 Synthese nach der *Seeding Growth*-Methode

Für die Synthese der Goldnanopartikel wurden, der Vorschrift von [65] folgend, in einem Dreihals-Rundkolben 47,2 ml dest. Wasser mit 2,8 ml Natriumcitrat (38,8 mM) vermischt und unter Rühren zum Sieden erhitzt. Zu der siedenden Lösung wurden 333 μ L HAuCl₄ (50 mM) gegeben und für 30 min gerührt. Dabei war ein, für die Herstellung von Gold-Nanopartikeln, charakteristischer Farbumschlag von klar über blau bis zu dunkelrot zu beobachten. Anschließend wurde die Temperatur auf 90 °C gesenkt und mit dem iterativen Wachstum begonnen. Dazu wurden im ersten Schritt weitere 500 μ L Natriumcitrat (38,8 μ M) zugegeben und für 2 min gewartet

um Temperaturschwankungen auszugleichen, bevor 333 μL HAuCl_4 -Lösung zugegeben und für 30 min gewartet wurde. Diese drei Schritte wurden dreimal wiederholt, um Partikel mit einem Feret Durchmesser von 14 nm zu synthetisieren. Die Lagerung der Partikel erfolgte unter Lichtausschluss bei 4 °C.

8.2.2 Synthese nach der Frens-Methode

Die Synthese wurde durchgeführt, indem 49 ml dest. Wasser mit 1 ml HAuCl_4 versetzt und unter Rühren zum Siedepunkt erhitzt wurde. Danach erfolgte die Zugabe von 5 ml Natriumcitrat. Während der Reduktion des Goldes konnte ein Farbumschlag von gelb zu dunkelrot beobachtet werden. Nach 20 min wurde die Lösung von der Heizplatte genommen und gewartet bis die Partikel abgekühlt waren, um sie in eine Glasflasche zu füllen und unter Lichtausschluss bei 4 °C zu lagern.

8.3 Konjugation von Oligonukleotiden an Goldnanopartikel

Für die Konjugation wurden die Partikel, wie in Abschnitt 8.2 beschrieben, hergestellt. Zur Konjugation der AuNPs mit Oligonukleotiden wurden drei Methoden untersucht. Die pH-Erniedrigung [68], das Salt-Aging [63] und die Freezing-Methode [69]. Es wurden unterschiedliche Aptamervarianten verwendet, die sich hinsichtlich der Länge eines HEG-Spacers unterschieden. Außerdem fand die Konjugation des Oligos- C_{3b} statt. Die Analytik der Konjugate erfolgte mittels UV-Vis Spektrometrie sowie DLS- und NTA-Messung. Es wurde zusätzlich ein Agarosegel angefertigt und die Aptamerdichte auf den Partikeln bestimmt.

8.3.1 Konjugation mittels pH-Erniedrigung

Für diese Methode wurden 10 μL des Thiol-modifizierten Oligonukleotids (100 μM) mit 990 μL der AuNPs-Lösung (5 nM) in einem 2 mL Reaktionsgefäß gemischt und die Suspension rührend unter Lichtausschluss über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden unter starkem Rühren 20 μL Citrat-Puffer (500 mM, pH 3) zugegeben und die Konjugationsansätze wurden für 10 min inkubiert. Die AuNPs-Lösung behielt nach dieser Zeit seine rote Farbe bei. Die Partikel wurden für 30 min bei 16 000 x g zentrifugiert und 950 μL des Überstandes entfernt.

Durch Zugabe eines Resuspensionspuffers, bestehend aus dem Bindepuffer des Aptamers ohne MgCl_2 mit 2 % Saccharose und 0,1 % Tween-20, konnte das Pellet resuspendiert werden. Anschließend wurden die Partikel zweimal gewaschen, indem die Suspension wieder für 30 min bei 16 000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Die Partikel wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

8.3.2 Konjugation mittels *Salt-aging*

Zu Beginn der Konjugation wurden 10 μL des Oligonukleotids mit 990 μL der AuNP-Lösung gemischt und die Suspension rührend über Nacht unter Lichtausschluss inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die schrittweise Zugabe von NaCl. Jede 10 min wurde eine NaCl-Lösung (2 M mit 0,1 % Tween-20) zu der AuNP-Suspension gegeben, bis die finale Konzentration von NaCl 0,7 M betrug (insgesamt 8 Zugaben, s. Tabelle 8.2). Nach jeder NaCl-Zugabe wurde die Suspension für 10 s im Ultraschallbad behandelt. Die Farbe der Suspension blieb nach der letzten Zugabe rot, was auf eine erfolgreiche Konjugation hindeutet. Daraufhin wurden die DNA/AuNPs-Suspensionen über Nacht unter Rühren und lichtgeschützt inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Partikel 30 min bei 16 000 x g zentrifugiert und 950 μL des Überstandes entfernt.

TABELLE 8.2: Im Laufe des Salt-aging Prozesses zugegebene Volumina und resultierende Konzentrationen an NaCl

Zugabe	V_{NaCl}	c_{NaCl} im Konjugationsansatz
1	25,6	0,05
2	27	0,1
3	58,5	0,2
4	65,4	0,3
5	73,5	0,4
6	83,3	0,5
7	95,2	0,6
8	109,9	0,7

Durch Zugabe eines Resuspensionspuffers, bestehend aus dem Bindepuffer des Aptamers ohne MgCl_2 mit 2 % Saccharose und 0,1 % Tween-20, konnte das Pellet resuspendiert werden. Anschließend wurden die Partikel zweimal gewaschen, indem die Suspension wieder für 30 min bei $16\,000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Die Partikel wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

8.3.3 Konjugation mittels *Freezing*

Für das *Freezing* wurden $20\ \mu\text{L}$ des Aptamers ($100\ \mu\text{M}$) mit $980\ \mu\text{L}$ AuNP-Lösung versetzt und bei einer Temperatur von entweder -20°C oder -80°C eingefroren. Die Reaktionszeit lag bei einer Temperatur von -20°C bei 120 min, bei -80°C konnten die Konjugate nach 30 min aufgetaut werden. Sobald die Konjugate aufgetaut waren, wurden die Partikel 30 min bei $16\,000 \times g$ zentrifugiert und $950\ \mu\text{L}$ des Überstandes entfernt.

Durch Zugabe eines Resuspensionspuffers, bestehend aus dem Bindepuffer des Aptamers ohne MgCl_2 mit 2 % Saccharose und 0,1 % Tween-20, konnte das Pellet resuspendiert werden. Anschließend wurden die Partikel zweimal gewaschen, indem die Suspension wieder für 30 min bei $16\,000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Die Partikel wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

8.4 Charakterisierung der Goldnanopartikel

8.4.1 UV-Vis Spektrometrie

Die Analytik der Partikel sollte auf der Publikation von Haiss *et al.* basierend, hauptsächlich über UV-Vis Spektren erfolgen [66]. Aus den Spektren kann sowohl die Größe der Partikel als auch die Konzentration berechnet werden, wofür eine Reihe unterschiedlicher Gleichungen benötigt werden. Für die Ableitung der benötigten Gleichungen wurden von Haiss *et al.* verschiedene Parameter experimentell, durch einen Vergleich zwischen UV-Vis Spektren und TEM Bildern von AuNPs unterschiedlicher Größe, bestimmt.

Auf Grundlage des Lambert-Beer'schen Gesetzes fand die Berechnung der Konzentration statt (s. Formel 4.3). Die Schichtdicke d wird auf 1 cm festgelegt. Dadurch kann die Extinktion E_λ der Probe in Zusammenhang mit der Konzentration c der Partikel sowie dem Extinktionskoeffizienten ε_λ gesetzt werden. Der Extinktionskoeffizient ε_λ ist von der Größe der AuNPs abhängig, weshalb dieser zuerst aus dem UV-Vis Spektrum ermittelt werden muss. Haiss *et al.* hat dazu die Formel 8.2 verwendet.

$$d_{AuNP} = \exp\left(B_1 \cdot \frac{A_{spr}}{A_{min}} - B_2\right) \quad (8.2)$$

Dabei sind die Parameter $B_1 = 3$ und $B_2 = 2.2$ experimentell aus einer Serie von AuNPs mit einer Größe zwischen 5 nm bis 50 nm bestimmt worden. Neben den Konstanten werden für die Berechnung das Absorptionsmaximum A_{spr} sowie das Minimum A_{min} benötigt. Durch die Bildung des Verhältnisses zwischen A_{spr} und A_{min} wird ein konzentrationsunabhängiger Wert aus dem UV-Vis Spektrum gewonnen. Dies ermöglicht die Berechnung sowohl der Größe- als auch der Konzentration der Partikel. Nach Bestimmung der Größe wird der Extinktionskoeffizient ε_λ mit Hilfe der Formel 8.3 definiert.

$$\ln \varepsilon_{\lambda} = 3,137 \cdot \ln d_{AuNP} + 10,7277 \quad (8.3)$$

Insgesamt lassen sich damit aus dem UV-Vis Spektrum der AuNPs die Größe d_{AuNP} , der Extinktionskoeffizient ε_{λ} sowie die Konzentration c_{AuNP} berechnen. Für die Messung wurden 100 μL der synthetisierten AuNPs in eine 96-Well Platte gegeben und in Dreifachbestimmung gemessen. Die Auswertung erfolgte nach [66].

8.4.2 DLS-Messung

Der hydrodynamische Durchmesser der Citrat-stabilisierten AuNPs wurde mit dem LitesizerTM 500 unter Verwendung der KalliopeTM-Software ermittelt. Dafür wurde die AuNP-Lösung im Verhältnis 1:100 mit deionisiertem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 400 μL verdünnt. Für die Messung der Partikelgröße wurden Einwegküvetten verwendet, da diese eine Messung des Streulichts in einem 90° Winkel erlauben. Die zur Messung der AuNPs verwendeten Parameter sind in Tabelle 8.3 für die Partikelgröße zusammengefasst.

8.4.3 REM-Aufnahmen

Die Aufnahmen zur Bestimmung der Partikelgröße wurden mit einem JEOL JSM-6700F Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop (FE-REM) von Abdelrahim Ahlamad am Institut für Physikalische Chemie erzeugt. Dazu wurden 150 μL der Goldnanopartikel über Nacht auf einem Graphitträger getrocknet und am nächsten Tag vermessen. Es wurde eine Beschleunigungsspannung von 10 kV verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm CoreDRAW 2020 über die parallele Bemaßungsfunktion. Es wurden jeweils 106 Partikel ausgewertet.

TABELLE 8.3: Parameter zur Messung des hydrodynamischen Durchmessers mit dem Litesizer™ 500

Parameter	Einstellung
Messwinkel	Automatisch
Temperatur des Targets	20 °C
Equilibrierungszeit	1 min
Analysemodell	Allgemein
Kumulationsmodell	ISO 22 412
Qualität, Filter, Fokus	Automatisch
Material	Au
	Brechungsindex: 0,1426
	Absorption: 3,628 21
Lösungsmittel	Wasser
	Brechungsindex: 1,33
	Viskosität: 0,001 Pa s

8.4.4 Nanoparticle tracking analysis

Die *Nanoparticle tracking analysis* (NTA) ermöglicht die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers sowie der Konzentration der Nanopartikel in Lösung. Dafür wird die Probe in eine Messkammer überführt und mit einem Laser bestrahlt. Die Streuung des Lichts wird von einem Detektor aufgezeichnet. Mittels Fokussierung auf einen kleinen Bereich innerhalb der Messkammer können die einzelnen Partikel dargestellt und die Molekularbewegung verfolgt werden. Wie bei der DLS Messung wird aus der Bewegung der Partikel die Größe sowie aus der Menge der Partikel die Konzentration abgeleitet. Für die Auswertung wurde das Programm NanoSight2.3 verwendet.

8.4.5 Gelelektrophorese

Für die Analyse der Partikel mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden 3 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle bei 800 W für 2 min erhitzt. Nachdem sich die Agarose vollständig gelöst hat, wurde die Lösung einige Minuten unter Rühren abgekühlt, bevor sie in eine Gelkammer gegossen wurde. Damit später ein Auftragen der Probe möglich ist, wurde ein Kamm

in das Gel eingesetzt. Sobald das Gel fest geworden ist, wurde der Kamm gezogen und das Gel mit TAE-Puffer überschichtet.

12 μL der Probe wurden mit 3 μL GoTaq[®] Green Reaktionspuffer versetzt und in die Kammern des Gels überführt. Der Lauf erfolgte für 1 h bei einer Spannung von 110 V. Ein Vergleich der unterschiedlichen Nanopartikel und Konjugate wurde visuell durchgeführt.

8.4.6 Bestimmung der Aptamerdichte

8.5 Microarrays

Das kontaktlose Drucken der Microarrays wurde mit dem GeSiM Spotter NP2.1 durchgeführt. Die Übertragung der Probe auf den Microarray erfolgt dabei über einen piezoelektrischen Kristall, der durch das Anlegen einer Spannung, das kontaktlose Drucken der Probe ermöglicht. Die Spannung sowie Pulslänge wurden vor jedem Experiment neu eingestellt, um das beste Ergebnis zu bekommen. Dadurch sind auch die Mengen an gespotteter Probe variabel und die Experimente untereinander nicht direkt mit Hilfe der Signalstärke vergleichbar. Zudem wurde, wie in Abschnitt 8.5.5 beschrieben, der PMT-Gain bei der Auswertung variiert, was ebenfalls die Signalstärken beeinflusst. Das Programm des GeSiM Spotter NP2.1 berechnet aus den Bildern einer Stroboskop Kamera das Volumen der gespotteten Probe, was pro Tropfen bei ca. 0,2 μL liegt. Im Laufe dieser Arbeit wurden 6 Drops pro Spot, also etwa 1,2 μL , verwendet.

8.5.1 Immobilisierung von Oligonukleotiden auf Aldehydbeschichteten Microarrays

Für die Immobilisierung auf Aldehyd-funktionalisierten Objektträgern wurden Amino-modifizierte Nukleinsäuren verwendet. Dazu wurde in einer 96-Well Platte, die benötigte Konzentration an Nukleinsäuren in 3x SSC angesetzt und anschließend in 8-facher Replikation auf den Objektträger

gedruckt, welcher über Nacht in einer Feuchtekammer (70 % Luftfeuchtigkeit) getrocknet wurde. Am nächsten Tag wurde der Objektträger zum Blockieren für 10 min mit einer Lösung aus 0,1 g NaBH₄ in 30 ml Wasser und 10 ml EtOH (100 %) blockiert und danach 3 x 1 min mit dest. Wasser gewaschen. Der Objektträger wurde mit Druckluft getrocknet. Allgemein wurde die Inkubation des Microarrays mit den Proben unter Luftausschluss durchgeführt, um ein Verdampfen der Lösung zu verhindern. Zu diesem Zweck wurde eine Klebefolie für Schott-Kammern verwendet.

In der Aufbereitung des Experiments wurden die Inkubationslösung stets verworfen und der Objektträger dreimal mit Bindepuffer in der Schott-Kammer für jeweils 5 min gewaschen. Danach wurde dreimal 2 min ohne Schott-Kammer gewaschen, das letzte Mal mit deionisiertem H₂O, um Salzreste zu entfernen. Der Objektträger wurde in einem Falcon Tube für 3 min bei 16 000 x g getrocknet.

8.5.2 Hybridisierung von Aptameren mit komplementären Oligonukleotiden auf Microarrays

Der getrocknete Objektträger wurde eine Stunde im Bindepuffer des Aptamers inkubiert, um eine korrekte Faltung der immobilisierten Nucleinsäuren zu ermöglichen. Nach der Stunde wurden die Objektträger in Schott-Kammern gespannt und Inkubationslösungen der Cy5-markierten Nucleinsäuren (z.B. 10 nM Cy5-Oligo-C₁) im Bindepuffer des Aptamers zugegeben. Zu jedem Block wurden 100 µL der Inkubations-Lösung gegeben und für jeweils 30 min im Dunklen schüttelnd reagieren lassen. Die Aufbereitung erfolgte wie in Abschnitt 8.5.1 beschrieben.

8.5.3 Verdrängung von komplementären Oligonukleotiden mit Ampicillin auf Microarrays

Die Microarrays wurden, wie in 8.5.1, hergestellt und eine Stunde im Bindepuffer vorinkubiert. Der Objektträger wurde in eine Schott-Kammer

gespannt und zu jedem Block wurden 100 μ L Inkubations-Lösung gegeben, bestehend aus Cy5-markiertem Oligonukleotid (z.B. 10 nM Cy5-Oligo-C₁) sowie Ampicillin in verschiedenen Konzentrationen. Falls nicht anders angegeben, wurden die Oligonukleotid-Sonde und das Target simultan zugegeben. Anschließend wurde der Microarray für 2 h im Dunklen, schüttelnd inkubiert. Die Aufbereitung erfolgte wie in Abschnitt 8.5.1 beschrieben.

8.5.4 Verdrängung von komplementären Oligonukleotiden mit Ampicillin auf Nitrocellulose-Microarrays

Anstelle eines 3D-Aldehyd Microarrays wurde hier eine Nitrocellulose Membran verwendet. Diese ähnelt in ihrer Beschaffenheit der späteren Membran des LFAs. Im Gegensatz zum Aldehyd-Slide wird keine kovalente Bindung des Oligonukleotids auf der Testlinie erreicht, sondern eine Physisorption des Streptavidins angestrebt. Das Oligonukleotid ist Biotin-modifiziert gewesen, wodurch die Immobilisierung auf der Nitrocellulose über die fast kovalente Biotin-Streptavidin Interaktion stattfand.

Es wurden zum Erstellen des Microarrays das Biotin-modifizierte Aptamer bzw. Oligonukleotid in 1 x PBS mit 2 % Trehalose verdünnt und zusammen mit Streptavidin ($1 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$ in 1x PBS) für 2 h bei RT inkubiert. Dabei wurde die Konzentration von Streptavidin konstant bei 25 μ M gehalten, während die Konzentration an Biotin-modifiziertem Aptamer bzw. Oligonukleotid variiert wurde. Dadurch verändert sich das Verhältnis der beiden Komponenten zueinander, bei gleich bleibendem Bedeckungsgrad von Streptavidin auf der Membran. Das Spotten der Lösungen erfolgte analog zu Abschnitt 8.5.1; Blockiert wurde der Microarray hier mit 1 x PBS inklusive 1 % BSA und 0,05 % Tween 20 für 1 h bei RT.

Nach dem Blockieren wurde der Microarray in einer Schott-Kammer fixiert und mit Konjugat versetzt. Dafür wurden die Konjugate 1:50 im Laufpuffer verdünnt und für 2 h mit dem Microarray inkubiert. Die Aufbereitung erfolgte wie in Abschnitt 8.5.1 beschrieben.

8.5.5 Analytik und Auswertung der Microarrays

Der Objektträger wurde mit dem GenePix Scanner 4000B Scanner bei einer Wellenlänge von 635 nm eingescannt. Je nach Objektträger und Intensität der Spots wurde die Laserstärke sowie der PMT-Gain zwischen 400 und 800 angepasst, um ein optimales Signal ohne Sättigung der Spots zu erhalten. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte der Software GenePix Pro 7. Für jede Nukleinsäurekonzentration wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität sowie Standardabweichung der Replikate bestimmt.

8.6 Lateral Flow Assay

8.6.1 Herstellung der Lateral Flow Assays

Vorbehandlung des Conjugate Pads

Das Conjugate Pad wurde in einen 15 x 4 cm langen Streifen geschnitten und für 2 h in einen Blockierungspuffer, bestehend aus 1x PBS, 1 % BSA und 0,05 % Tween 20, gelegt. Nach dem Trocknen über Nacht wurde das Conjugate Pad bis zum Zusammenbau des LFAs gelagert.

Zusammenbau des Lateral Flow Assays

Der Zusammenbau des LFAs erfolgte, indem zuerst die Nitrocellulose auf einer 15 x 4 cm langen Trägerfolie aus Polyester fixiert wurde. Die Trägerfolie KN-2211TM bestand aus drei 4 mm dicken Streifen, auf denen das Conjugate Pad, die Nitrocellulose Membran und das Absorbent Pad geklebt werden konnten. Der mittlere Streifen war für die Nitrocellulose Membran vorgesehen. Danach wurde das Conjugate Pad auf der Trägerfolie befestigt. Wichtig ist, dass sich die Membranen überlappen, damit ein Fluss der Probe über die verschiedenen Membranen gewährleistet werden kann. Als letztes wurde das Absorbent Pad fixiert.

Auftragung der Testlinie

Es wurden zum Erstellen der Testlinie Biotin-modifiziertes Aptamer bzw. Oligonukleotid in 1 x PBS mit 2 % Trehalose verdünnt und zusammen mit Streptavidin ($1 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$ in 1x PBS) für 2 h bei RT inkubiert. Dabei wurde die Konzentration von Streptavidin konstant bei 25 μM gehalten, während die Konzentration an Biotin-modifiziertem Aptamer bzw. Oligonukleotid variiert wurde. Dadurch verändert sich das Verhältnis der beiden Komponenten zueinander, bei gleich bleibendem Bedeckungsgrad von Streptavidin auf der Membran. Die Auftragung der Testlinie wurde mit dem GeSiM Spotter NP2.1 durchgeführt. Hierzu wurden Punkte auf einer Linie mit einem Abstand von 0,1 mm gedruckt, insgesamt 49 Punkte pro Block, insgesamt 392 pro Testlinie. Es wurden 6 Tropfen pro Punkt aufgetragen. Die Streifen wurden über Nacht getrocknet. Das Zuschneiden der LFAs auf eine Größe von 12 cm x 0,4 cm erfolgte mit Hilfe einer Schneidemaschine.

8.6.2 Durchführung des Lateral Flow Assays

Für die Durchführung des LFAs wurden zunächst 100 μL Laufpuffer in einer 96-Well Platte vorgelegt und für Verdrängung zusätzlich 10 μM Ampicillin zugegeben. 3 μL des Konjugats aus Aptamer und Goldnanopartikel wurden auf das Conjugate Pad gegeben und für 5 min getrocknet. Anschließend wurde der LFA für 15 min in den Laufpuffer gestellt. Der LFA wurde getrocknet und mit einem Flachbettscanner eingescannt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ.

8.7 Untersuchung der Aptamer-Struktur mittels CD-Spektrometrie

Die CD-Spektrometrie ist eine Methode zur Strukturaufklärung chiraler Stoffe, bei der die spezielle Eigenschaft optisch aktiver Moleküle ausgenutzt wird, rechts und links zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark zu absorbieren. Ein CD-Spektrum liefert Aufschluss über die Sekundärstruktur

von Aptameren und die Konformationsänderung der Aptamere bei Targetbindung. Das Maß für die CD-Spektrometrie ist die Elliptizität. Diese gibt an, in welchem Ausmaß, die zu untersuchende Probe linear polarisiertes Licht in elliptisch polarisiertes Licht umwandelt und wird üblicherweise in Milligrad (mdeg) angegeben.

Für das CD-Experiment wurde zunächst das Aptamere mit Bindepuffer auf eine Konzentration von 20 μM verdünnt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Ampicillin (finale Konzentration: 20 μmol) zu einem Gesamtvolumen von 250 μL . Nach einer Inkubation über Nacht bei RT wurde das Aptamer an einem JASCO J-860-Spektrophotometer (JASCO, Tokio, Japan) mit Hilfe einer Quarzküvette (optische Weglänge 10 mm) vermessen. Innerhalb eines Wellenlängenbereiches von 180 nm bis 320 nm wurde die Untersuchung der Aptamerstruktur mit einer Scangeschwindigkeit von 50 $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$ durchgeführt. Für die Aufnahme der CD-Spektren des Puffers, der Aptamer-Lösungen und der Aptamer-Target-Lösungen wurden jeweils drei Messungen akkumuliert und gemittelt.

8.8 MST

Die *Microscale Thermophoresis* (MST) wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) verwendet. Das für die Messungen verwendete Gerät Monolith NT. 115 wird von der Firma NanoTemper entwickelt und vertrieben. Das Besondere bei der MST ist, dass beide Partner in Lösung vorliegen und die Bindung nicht durch eine Immobilisierung eines Bindungspartners gestört werden kann. Dafür wird ein Fluoreszenzfarbstoff benötigt, hier wird Cyanin 5 Farbstoff verwendet, der eine Anregungswellenlänge bei 649 nm und eine Emissionswellenlänge von 670 nm besitzt. Es wurden immer 16 Verdünnungen in einer Standardreihe angesetzt. Diese wurden mit den anderen Komponenten vermischt und in eine Glaskapillare überführt. Dabei erhitzt ein IR-Laser punktuell die Lösung und ein LED-Laser sorgt für die Anregung des Fluorophors. So kann eine Messung der Änderung der Fluoreszenzintensität stattfinden. Die Auswertung erfolgte

im thermischen Gleichgewicht, etwa 30 s nach Einschalten des IR-Lasers mit einer mittleren LED-Laserstärke.

8.8.1 Bindungsstudien zwischen Aptamer und Ampicillin

Für die Charakterisierung der Bindung und der Ermittlung der Dissoziationskonstante (K_D) zwischen Aptamer und Ampicillin wurde eine Standardreihe vom Ampicillin mit einem Volumen von jeweils 10 μ L und einer Konzentration zwischen 0,31 nM bis 10 000 nM angefertigt, indem eine 1:1 Verdünnung in Bindepuffer mit 0,05 % Tween 20 als Additiv angesetzt wurde. Dazu wurde das Cy5-markierte Amp4- bzw. A4-Aptamer (10 μ L, finale Konz.: 25 nM) gegeben und für 30 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Messung bei einer Temperatur von 23 °C.

8.8.2 Bindungsstudien zwischen Oligonukleotid und Aptamer

Die Untersuchung der Hybridisierung zwischen Oligonukleotid und Aptamer wurden analog zu Abschnitt 8.8.1 durchgeführt, allerdings wurde eine maximale Konzentration von 5 μ M verwendet.

8.8.3 Studien zur Reaktion zwischen Aptamer und Ampicillin bzw. Oligonukleotid

Hier wurde der EC_{50} von Ampicillin bestimmt. Dazu wurden Aptamer und Cy5-markiertes Oligonukleotid 1:1 im Bindepuffer des Aptamers auf eine Konzentration von 25 nM verdünnt und anschließend zu einer Standardreihe von Ampicillin, angesetzt im BP des Aptamers, in einem Konzentrationsbereich von 5000 nM bis 0,15 nM gegeben. Die Lösung wurde für 1,5 h bei RT inkubiert, bevor sie in Glaskapillaren überführt und mit der MST Monolith NT.115 gemessen wurde. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm MO.Affinity Analysis.

Kapitel 9

Publikationsliste

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

1) **Torsten Schüling** (70 %, Alina Eilers, Thomas Scheper, and Johanna Walter; Aptamer-based lateral flow assays, *AIMS Bioeng.*, vol. 5, no. 2, pp. 78 - 102, 2018.

2) Marc Prante, **Torsten Schüling** (20 %), Bernhard Wilhelm Roth, Kort Bremer, and Johanna Walter; Characterization of an aptamer directed against 25-hydroxyvitamin D for the development of a competitive aptamer-based assay, *Biosensors*, vol. 9, no. 4, 2019.

3) Martin Witt, **Torsten Schüling** (10 %), Christopher Heuer, Lina Miethke, John-Alexander Preuß, Johanna Sophie Rehfeld, Cornelia Blume, Stefanie Thomas, und Frank Stahl; Nachweismethoden von SARS-CoV-2, *Chemie in unserer Zeit*, vol. 54, no. 6, 2020.

Abbildungsverzeichnis

3.1	Struktur von Penicillin Antibiotika	4
3.2	Schema: SELEX	9
3.3	Veröffentlichungen zum Thema LFA	13
3.4	Schema: TID-LFA	14
3.5	Schema: Funktionsweise eines LFAs auf Basis des Sandwich-Modus	19
3.6	Schema: Funktionsweise eines kompetitiven LFAs	20
3.7	Schema: Funktionsweise eines LFAs auf Basis des TID-Mechanismus	20
4.1	Sekundärstrukturen der Ampicillin Aptamere	24
4.2	Schema: Verlauf einer MST-Kurve	25
4.3	MST Experimente zur Überprüfung der Bindung zwischen AMP4-Aptamer und Ampicillin	26
4.4	MST Experimente zur Überprüfung der Bindung zwischen A4 Aptamer und Ampicillin	28
4.5	A) Sekundärstruktur des Amp4 Aptamers inklusive gekennzeichnete komplementärer Bereiche, B) Tabelle mit den Sequenzen der getesteten Oligonukleotide	30
4.6	MST Kurven zur Bestimmung der K_D der Hybridisierungen der Aptamere mit den Oligonukleotiden	31
4.7	MST Kurve der Hybridisierung von dem AMP4-Aptamer und Oligo-C ₃	32
4.8	MST Kurven der Konkurrenzreaktion zwischen Ampicillin und Oligonukleotid um die Bindung zum Aptamer	34
4.9	CD-Spektroskopie: Bindung von Aptamer und Ampicillin	37

4.10	Sekundärstruktur des AMP4-Aptamers durch intermolekulare Wechselwirkungen	40
4.11	Schematische Darstellung eines Microarrays	41
4.12	Reaktionsweg zur Immobilisierung von Amino-modifiziertem Aptamer	41
4.13	Microarray: Hybridisierung von Cy5-markiertem Oligo-C ₁ mit immobilisiertem AMP4-Aptamer	42
4.14	Strukturformeln der verwendeten Spacermotive, A: Thymin-Nukleotid, B: Dekan (C ₁₀), C: Hexaethylglykol	45
4.15	Vergleich verschiedener Spacer zwischen Aptamer und Microarray Oberfläche durch Inkubation des immobilisierten Aptamers mit Oligo-C ₁ und Ampicillin	46
4.16	Vergleich der Verdrängungseffizienz durch Zugabe von Ampicillin und Oligo-C ₁ zum immobilisierten AMP4-Aptamer	47
4.17	Verdrängungseffizienz der drei Oligonukleotide vom AMP4-Aptamer durch Zugabe von 10 µM Ampicillin aufgetragen gegen die Spacervarianten des Aptamers	49
4.18	A) Sekundärstruktur des AMP4-Aptamers inklusive gekennzeichnete komplementärer Bereiche, B) Sequenzen der getesteten Varianten von Oligo-C ₃	51
4.19	A-C: Auftragung der Signalstärke gegen die Konzentration an Ampicillin. A: Oligo-C ₃ , B: Oligo-C _{3a} , Oligo-C _{3b} , D: Verdrängungseffizienzen ermittelt nach Formel 4.2	52
4.20	UV-Vis Spektren der beiden Synthesemethoden, die Spektren wurden auf eine Wellenlänge von 450 nm normiert	57
4.21	REM-Aufnahmen und Größenverteilung der AuNPs nach unterschiedlicher Synthese	59
4.22	Agarosegel (3 %) der synthetisierten Konjugate	66
4.23	Vergleich der verschiedenen Spacer für die Konjugation auf AuNPs, Werte normiert auf die Absorption bei 450 nm, A-D: UV-Vis Spektren der Konjugation mittels: A: Salt-Aging, B: pH-Erniedrigung, C: Freezing bei -20 °C, D: Freezing bei -80 °C	67

4.24	Hybridisierung und Verdrängung von Oligo-C ₃ bzw. -C _{3b} durch Ampicillin auf LFAs, 1 und 2: Hybridisierung von Aptamer-AuNPs an Biotin-Oligo-C ₃ auf der Testlinie; 3 und 4: Inkubation wie 1 und 2 plus Ampicillin 10 µM; 5 und 6: Hybridisierung von Aptamer-AuNPs an Biotin-Oligo-C _{3b} auf der Testlinie; 7 und 8: Inkubation wie 5 und 6 plus Ampicillin 10 µM	75
4.25	Kompetition des Oligonukleotids durch Ampicillin auf LFAs, $n = 2$	76
4.26	Nitrocellulose Microarray Ausschnitt als 16 bit Greyscale Bild gescannt, ursprünglich waren die Punkte durch die Konjugate rot gefärbt, Gespottete Verhältnisse: A: 1 zu 2, B: 5 zu 1, C: 25 zu 1, links: ohne Zugabe von Ampicillin, rechts: mit Zugabe von 10 µM Ampicillin	79
4.27	Signalstärken der eingesetzten Biotin-Aptamer/Streptavidin Verhältnisse, ausgewertet mit ImageJ	80
6.1	Microarray-Blöcke des Vergleiches zwischen NH ₂ -AMP4-Aptamer und NH ₂ -T ₉ -C ₁₀ -Aptamer, A) ohne Ampicillin; B) mit 10 µM Ampicillin	92
6.2	LFAs zur Bestimmung der optimalen Aptamerkonzentration für die Konjugation	93

Tabellenverzeichnis

3.1	Möglichkeiten der Detektion von Ampicillin, LOD = <i>limit of detection</i> , HPLC = <i>high pressure liquid chromatography</i> , PBS = phosphatgepufferte Salzlösung, BP = Bindepuffer des Aptamers während der Selektion, SPR = <i>surface plasmon resonance</i>	6
4.1	Zusammensetzung des Aptamer-Bindepuffers sowie die Funktion der einzelnen Komponenten	23
4.2	Dissoziationskonstanten der getesteten Oligonukleotide . . .	31
4.3	EC ₅₀ -Werte sowie Amplituden der MST Ergebnisse der Verdrängung des Cy5-markierten Oligonukleotids vom Aptamer	35
4.4	Wellenlängen der Maxima, Minima und <i>Cross-over</i> repräsentativer Struktur motive von Nukleinsäuren in der CD-Spektrometrie, nach [60]	38
4.5	Tabelle mit den verwendeten Spacern	45
4.6	Microarray-Experiment: Bestimmung des optimalen Spacers für die Immobilisierung des AMP4-Aptamers	48
4.7	Microarray Experiment zur Optimierung der Verdrängung durch Bindung des Aptamers an Ampicillin. Dazu wurden die Oligonukleotide mit den unterschiedlichen Spacervarianten inkubiert. Angegeben wurden die mit Hilfe von Formel 4.2 ermittelten Verdrängungseffizienzen in %	50
4.8	Durchführung der Synthese von AuNPs mittels Frens und <i>Seeding Growth</i> Methode, Schritt 5 wird beim <i>Seeding Growth</i> wiederholt bis die gewünschte Partikelgröße erreicht ist	55
4.9	Größe und Konzentration der synthetisierten AuNPs	58

4.10	Verwendete Nukleinsäuresequenzen für die Konjugation auf AuNPs, alle Sequenzen besitzen eine Thiol-Modifizierung am 5'-Ende	63
4.11	Durchführung der Konjugation nach den getesteten Methoden	64
4.12	Ergebnisse der Konjugation. Bei fehlenden Werten sind die AuNPs agglomeriert, weshalb sie nicht weiter analysiert wurden.	69
4.13	Konzentrationen der verwendeten Substrate für die Fixierung des Oligonukleotids auf der Nitrocellulose Membran	79
4.14	Verdrängungseffizienzen und Signalstärken der AuNPs Konjugate auf Nitrocellulose Microarrays	81
6.1	Verdrängungseffizienzen des Versuches aus Abbildung 6.1	93
6.2	Bestimmung der optimalen Aptamerkonzentration für die Konjugation	94
8.1	Sequenzen der verwendeten Aptamer und Oligonukleotide [9]	99
8.2	Im Laufe des Salt-aging Prozesses zugegebene Volumina und resultierende Konzentrationen an NaCl	103
8.3	Parameter zur Messung des hydrodynamischen Durchmessers mit dem Litesizer TM 500	106

Kapitel 10

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Torsten Schüling
Geburtsdatum, -ort 24.10.1992, Hannover

Beruflicher Werdegang

09/2017 - 02/2021 Wissenschaftlicher Mitarbeiter

Akademischer Werdegang

seit 09/2017 Promotionsvorhaben im Fach Chemie
Institut für Technische Chemie
LUH, Hannover, Deutschland

2015 - 2017 Masterstudium, M. Sc. im Fach Wirk- und
Naturstoffchemie
LUH, Hannover, Deutschland
Thema: Untersuchungen zum Zell-Targeting
und zur zellulären Aufnahme von Aptamer
modifizierten Nanopartikeln

2011 - 2015 Bachelorstudium, B. Sc. im Fach Chemie
LUH, Hannover, Deutschland

2003 - 2011 Allgemeine Hochschulreife
Bischöfliches Gymnasium Josephinum
Hildesheim, Deutschland