

**Aptamer-basierte Detektion
kleiner, flüchtiger Moleküle
am Beispiel von Ethanolamin**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

M. Sc. Alexandra Heilkenbrinker
geboren am 30.07.1986 in Hannover

2015

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferentin: Prof. Dr. Ursula Rinas

Tag der Promotion: 01.07.2015

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper für die Möglichkeit der Promotion in seinem Arbeitskreis am Institut für Technische Chemie Hannover sowie die freundliche Unterstützung während dieser Zeit bedanken. Ein besonderes Dankeschön auch an Prof. Dr. Ursula Rinas für die Übernahme des Korreferats.

Dr. Frank Stahl danke ich sehr für seine nette Unterstützung und stetige Hilfsbereitschaft, die ein äußerst angenehmes Arbeitsklima in seiner Arbeitsgruppe geprägt haben.

Besonderer Dank gilt Dr. Johanna Walter für ihre engagierte Hilfestellung bei allen auftretenden Problemen und Fragestellungen der letzten Jahre. Vielen Dank für Deine tolle fachliche Unterstützung und die vielen aufbauenden Gespräche und Denkanstöße, nach denen alles plötzlich wieder in einem anderen Licht erschien! Ein ganz besonderes Dankeschön natürlich auch für Deine große Mühe beim Korrekturlesen meiner Dissertation!

Für die erfolgreiche und angenehme Zusammenarbeit bei der Entwicklung eines QCM-basierten Sensorsystems möchte ich mich besonders bei Prof. Dr.-Ing. Stefan Zimmermann und Dipl.-Ing. Sven Fisahn vom Institut für Grundlagen der Elektrotechnik und Messtechnik bedanken.

Ein besonderer Dank geht vor allem an die Minna-James-Heineman-Stiftung für die finanzielle Unterstützung während meines gesamten Promotionsstudiums durch das Dannie-Heineman-Doktorandenstipendium.

All meinen Kollegen danke ich für das gute Miteinander und für diese besondere Zeit am TCI, vor allem meinen Bürokollegen Maren, Fred und Martin, mit denen der Arbeitsalltag immer wieder durch lustige und erfrischende Gespräche und jede Menge Gummibärchen versüßt werden konnte. Ein Dankeschön geht auch an André Jochums für die hilfreiche und engagierte Mitarbeit an meinem Promotionsthema während seiner Masterarbeit. Ich drücke Dir die Daumen für Deine eigene Arbeit!

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester für ihre unendliche Liebe und Unterstützung bedanken, die sie mir in all den Jahren entgegengebracht haben. Ihr ward für mich in jeder Lebenslage immer eine große Stütze. Ich danke euch für alles!

Meinem Bernd danke ich für seine bedingungslose Liebe und Fürsorge. Danke, dass du mir besonders in den letzten Monaten Halt und Kraft gegeben hast und immer für mich da warst.

Kurzfassung

Kleine flüchtige Moleküle, sogenannte VOCs (*volatile organic compounds*), treten auf Grund ihrer geringen Größe ubiquitär in der Umwelt auf. Sie sind als natürlich vorkommende VOCs an wesentlichen biologischen Stoffwechselfvorgängen beteiligt oder werden als Nebenprodukte industrieller Prozesse in die Umwelt emittiert. Ein sensitiver und spezifischer Nachweis dieser VOCs ist daher sowohl im medizinischen Bereich als auch in der Biotechnologie und der Schadstoffanalyse wichtig.

Eine vielversprechende Möglichkeit zur Detektion volatiler Substanzen stellt die Verwendung von Aptameren dar. Diese *in vitro*-selektierten einzelsträngigen Oligonukleotide können in Nachweissystemen, wie z.B. Biosensoren, als Fänger- und Detektionsmoleküle eingesetzt werden. Auf Grund ihrer dreidimensionalen Faltungen sind Aptamere in der Lage, auch besonders kleine Zielmoleküle (< 100 Da) mit hoher Affinität zu binden. Im Gegensatz zu Antikörper-basierten Biosensoren ermöglichen Aptamer-basierte Biosensoren (Aptasensoren) daher auch die Detektion kleiner, gering immunogener Verbindungen und bieten somit optimale Voraussetzungen für einen sensitiven und spezifischen Nachweis volatiler Substanzen.

Zur Realisierung einer sensitiven Detektion kleiner, flüchtiger Moleküle wurden im Rahmen dieser Arbeit Aptamer-basierte Detektionsmethoden entwickelt. Die Entwicklung dieser Detektionsmethoden erfolgte sowohl in der Flüssig- als auch in der Gasphase und wurde unter Verwendung des Modellmoleküls Ethanolamin durchgeführt. Ethanolamin stellt bislang das kleinste, volatile Molekül dar, gegen das ein Aptamer selektiert werden konnte. Zur Detektion volatiler Substanzen in der Flüssigphase konnten sensitive, Fluoreszenz-basierte Detektionsmethoden im Microarray-Format entwickelt werden. Diese Detektionsmethoden nutzen zur Erzeugung des optischen Signals die Strukturveränderungen aus, die das Aptamer bei der Targetbindung durchläuft. Die Detektion des Zielmoleküls in der Gasphase wurde durch eine massensensitive Detektionsmethode unter Verwendung einer Quarzkristall-Mikrowaage realisiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit zum ersten Mal der Einsatz eines Aptamer-basierten Detektionssystems in der Gasphase gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen einen wichtigen Grundstein für die Entwicklung Aptamer-basierter Gassensoren.

Schlagwörter: *Aptamer-Microarray, Aptasensor, Detektion kleiner Moleküle, VOCs, Ethanolamin, Quarzkristall-Mikrowaage*

Abstract

Volatile organic compounds (VOCs) are ubiquitous in environment. They include both naturally occurring and artificial substances. Some of these small molecules play an important role in metabolism. Moreover VOCs are generated as by-products of industrial production processes. A specific and sensitive detection of small, volatile molecules is important for medical diagnostics, monitoring of biotechnological processes and determination of pollutants.

Aptamers are promising candidates for sensitive detection of VOCs. These *in vitro*-selected single-stranded oligonucleotides can be used as recognition elements in aptamer-based biosensors (aptasensors). Due to their three-dimensional folding, aptamers are able to bind their targets with high affinity and selectivity. Especially for small molecule targets, aptamers are promising bioreceptors, because they can be selected for a variety of small analytes including targets with high toxicity or low immunogenicity. Therefore, aptasensors enable a more sensitive and specific detection of small molecules in contrast to antibody-based biosensors.

In this work aptamer-based detection assays were developed to demonstrate the possibility of detection of small, volatile molecules using aptamers. Ethanolamine represents the smallest, volatile aptamer target so far and was therefore used as a model molecule for assay development. The detection methods for small molecule detection were developed in liquid as well as in gaseous phase. In liquid phase sensitive detection was performed using fluorescence-based detection strategies in microarray format. These detection strategies utilize structural changes of aptamers upon target binding to generate an optical signal for analyte detection. For detection of small molecules in gaseous phase a mass sensitive detection strategy was developed using a quartz crystal microbalance. In this thesis the application of an aptamer-based detection system in gaseous phase is published for the first time and therefore provides a basis for development of aptamer-based gas sensors.

Keywords: *aptamer microarray, aptasensor, small molecule detection, VOCs, ethanolamine, quartz crystal microbalance*

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Aufgabenstellung	2
3 Theoretische Grundlagen	3
3.1 Aptamere gegen kleine Moleküle	3
3.1.1 Definition kleiner Moleküle	4
3.1.2 Kleine Aptamer-Targets	5
3.1.3 Ethanolamin: Das kleinste Aptamer-Target	6
3.2 Aptamerfaltung und Targetbindung	7
3.2.1 Faltung von Aptameren	8
3.2.2 Faltungsmechanismen von Aptameren	10
3.2.3 Aptamer-Target-Bindung kleiner Moleküle	12
3.2.4 Aptamer-Ethanolamin-Bindung	15
3.3 Aptamer-basierte Biosensoren zur Detektion kleiner Moleküle	15
3.3.1 Vorteile von Aptameren gegenüber Antikörpern	16
3.3.2 Detektionsprinzipien von Aptasensoren	20
3.3.2.1 Optische Detektion	20
3.3.2.2 Elektrochemische Detektion	21
3.3.2.3 Massensensitive Detektion	22
3.3.3 Sensordesign von Aptasensoren	23
3.3.3.1 Target-induzierte Strukturveränderung	23
3.3.3.2 Target-induzierte Dissoziation	25
3.3.3.3 Kompetitive Bindung	27
4 Ergebnisse und Diskussion	28
4.1 Detektion von Ethanolamin in der Flüssigphase	28
4.1.1 Immobilisierung des Aptamers im Microarray-Format	29
4.1.1.1 Immobilisierungsoberfläche	29
4.1.1.2 Immobilisierungsdichte	31
4.1.1.3 Aptamerfunktionalität nach Immobilisierung	31
4.1.1.4 Zusammenfassung Immobilisierung des Aptamers	33
4.1.2 Detektionsmethode I: Kompetitive Bindung	34

4.1.2.1 Detektion von Ethanolamin.....	34
4.1.3 Detektionsmethode IIa: TID mit FRET-basierter Detektion (TID/FRET).....	36
4.1.3.1 Verwendetes komplementäres Oligonukleotid	37
4.1.3.2 Quenching durch komplementäres Oligonukleotid.....	39
4.1.3.3 Detektion von Ethanolamin.....	42
4.1.3.4 Modifikation der Detektionsmethode.....	45
4.1.3.5 Zusammenfassung Detektionsmethode TID/FRET	49
4.1.4 Detektionsmethode IIb: TID mit FRET-basierter Detektion (Microarray)	49
4.1.4.1 Quenching durch komplementäres Oligonukleotid.....	50
4.1.4.2 Detektion von Ethanolamin.....	51
4.1.4.3 Untersuchung der Reversibilität.....	54
4.1.4.4 Zusammenfassung Detektionsmethode TID/FRET (Microarray).....	57
4.1.5 Detektionsmethode III: TID mit Fluoreszenz-basierter Detektion	57
4.1.5.1 Verwendete komplementäre Oligonukleotide.....	59
4.1.5.2 Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide	60
4.1.5.3 Detektion von Ethanolamin.....	61
4.1.5.4 Untersuchung der Reversibilität.....	64
4.1.5.5 Zusammenfassung TID mit Fluoreszenz-basierter Detektion	67
4.1.6 Vergleich und Beurteilung der Detektionsmethoden für EA in der Flüssigphase...	68
4.1.6.1 Signalanstieg, Sensitivität, Detektionslimit	69
4.1.6.2 Reversibilität	70
4.1.6.3 Spezifität.....	71
4.1.6.4 Anwendung der Detektionsmethoden auf andere Aptamere.....	73
4.1.7 Zusammenfassung: Detektion von Ethanolamin in der Flüssigphase	75
4.2 Detektion von Ethanolamin in der Gasphase	76
4.2.1 Detektionsmethode I: Optische Detektion nach Diffusion in Lösung	77
4.2.1.1 Detektion von Ethanolamin.....	78
4.2.2 Detektionsmethode II: Massensensitive Detektion in der Gasphase	79
4.2.2.1 Messaufbau.....	80
4.2.2.2 Einfluss der Feuchtigkeit.....	81
4.2.2.3 Detektion von Ethanolamin.....	83
4.2.2.4 Regeneration der Schwingquarze.....	86
4.2.3 Zusammenfassung: Detektion von Ethanolamin in der Gasphase.....	88
5 Zusammenfassung und Ausblick	89

A Anhang	93
A.1 Verwendete Materialien.....	93
A.1.1 Chemikalien	93
A.1.2 Aptamere	94
A.1.3 Oligonukleotide.....	94
A.1.4 Lösungen.....	95
A.1.5 Verbrauchsmaterialien	95
A.1.6 Geräte	96
A.1.7 Software	96
A.2 Verwendete Methoden.....	97
A.2.1 Aptamer-Microarray	97
A.2.1.1 Aptamerimmobilisierung auf Microarray-Oberfläche	97
A.2.1.2 SYBR® Green II-Färbung	97
A.2.1.3 Markierung von Ethanolamin mit Quantum Dots.....	98
A.2.1.4 Untersuchung der Aptamerfunktionalität nach Immobilisierung.....	98
A.2.2 Detektion von Ethanolamin in der Flüssigphase.....	99
A.2.2.1 Kompetitive Bindung	99
A.2.2.2 Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide.....	99
A.2.2.3 TID/FRET	100
A.2.2.4 TID/FRETrevers.....	100
A.2.2.5 TID/FRETkompetitiv	101
A.2.2.7 TID/FRETkompetitiv (Microarray)	101
A.2.2.8 TID/Fluoreszenz (Microarray)	101
A.2.2.9 Untersuchung der Reversibilität.....	102
A.2.2.10 Untersuchung der Spezifität	103
A.2.2.11 Scannen und Datenanalyse	103
A.2.3 Detektion von OTA mittels TID/FRETkompetitiv (Microarray)	104
A.2.6 Detektion von Ethanolamin in der Gasphase	104
A.2.6.1 Optische Detektion von gasförmigem EA nach Diffusion in Lösung.....	104
A.2.6.2 Aptamerimmobilisierung auf Quarzoberfläche.....	105
A.2.6.3 Massensensitive Detektion von EA direkt in der Gasphase.....	105
A.2.6.4 Einfluss der Feuchtigkeit auf Schwingquarz.....	106
A.2.6.5 Regeneration des Schwingquarzes	106
A.2.7 Berechnungen.....	106

A.2.7.1 Detektionslimit (LOD)	106
A.2.7.2 Theoretische maximale Aptamer-Immobilisierungsdichte auf Quarz	107
A.2.7.3 Theoretische Gewichtsänderung auf dem Quarz durch EA-Bindung	108
A.3 Betreute Abschlussarbeiten	108
A.4 Förderungen	108
Abkürzungsverzeichnis	109
Abbildungsverzeichnis	110
Tabellenverzeichnis	112
Literaturverzeichnis	113
Publikationsliste	121
Lebenslauf	123

1 Einleitung

Äußerst klein, aber in ihrer Wirkung keineswegs unbedeutend sind volatile organische Verbindungen, sogenannte VOCs (engl. *volatile organic compounds*). Täglich nehmen wir eine Vielzahl dieser kleinen, flüchtigen Moleküle über die Lunge und die Haut in unseren Körper auf. In Innenräumen werden VOCs von zahlreichen Gebrauchsgegenständen des täglichen Bedarfs wie z. B. Möbeln, Polstern oder Kleidungsstücken in die Umgebungsluft abgegeben. Die Außenluft ist vor allem durch volatile Nebenprodukte industrieller Prozesse oder Abgase mit VOCs belastet. In erhöhten Konzentrationen können viele dieser flüchtigen Substanzen zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen. Neben akuten Reizungen der Atemwege und der Augen treten bei langfristiger Belastung mit VOCs häufig chronischen Erkrankungen auf. Für einige VOCs sind sogar karzinogene oder mutagene Wirkungen bekannt. Daher ist der Nachweis dieser kleinen, flüchtigen Moleküle sowohl im medizinischen Bereich als auch in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik äußerst wichtig. An der Entwicklung sensitiver Detektionsmöglichkeiten zur spezifischen Bestimmung dieser volatiler Substanzen wird daher intensiv gearbeitet.

Eine vielversprechende Möglichkeit zur Detektion dieser kleinen und flüchtigen Moleküle stellt die Verwendung von Biosensoren dar, in denen Aptamere als Biorezeptoren eingesetzt werden. Aptamere, *in vitro*-selektierte einzelsträngige Oligonukleotide, sind auf Grund ihrer dreidimensionalen Faltung in der Lage, auch besonders kleine Zielmoleküle mit hoher Affinität und Spezifität zu binden. Durch ihre Fähigkeit zur molekularen Erkennung können Aptamere Detektionsfunktionen ausüben, die in Biosensoren bislang nur Antikörpern zugesprochen wurden. Im Gegensatz zu Antikörpern besitzen Aptamere jedoch ein breites Targetspektrum und binden eine Vielzahl kleiner Moleküle. Sie eignen sich somit ebenfalls zur Detektion gering immunogener und toxischer Verbindungen und stellen daher optimale Fänger- und Detektionsmoleküle für kleine, volatile Substanzen dar.

Bislang wurde jedoch nur eine begrenzte Anzahl an Aptameren zur Detektion besonders kleiner Moleküle selektiert, sodass Aptamere ein äußerst neues Forschungsgebiet in diesem Bereich der Biosensorik darstellen. Aufgrund ihres großen Potentials zur sensitiven und spezifischen Detektion ist in den nächsten Jahren ein deutlicher Anstieg selektierter Aptamere zu erwarten, sodass Aptamer-basierter Biosensoren zukünftig vermehrt zur Bestimmung kleiner und volatiler Substanzen eingesetzt werden können.

2 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Detektion kleiner, flüchtiger Moleküle, sogenannter VOCs (*volatile organic compounds*). Zur Detektion dieser volatilen Moleküle sollen Aptamer-basierte Detektionsmethoden entwickelt werden, da Aptamere eine hochaffine Bindung besonders kleiner Zielmoleküle (< 100 Da) ermöglichen. In der Literatur wurden bereits Aptamer-basierte Detektionsmöglichkeiten zur Bestimmung nicht-flüchtiger, kleiner Targets publiziert. Auf Grundlage dieser Veröffentlichungen sollen Detektionsmethoden zur Bestimmung volatiler Substanzen entwickelt und optimiert werden. Als Modellmolekül wurde hierzu Ethanolamin eingesetzt, da Ethanolamin das bislang kleinste, volatile Molekül darstellt, gegen das ein Aptamer selektiert werden konnte.

Die Detektion des Zielmoleküls sollte in dieser Arbeit sowohl in der Flüssig- als auch zum ersten Mal in der Gasphase erfolgen. Zur Detektion volatiler Substanzen in der Flüssigphase wurden optische, Fluoreszenz-basierte Detektionsmethoden entwickelt. Diese Detektionsmethoden nutzen zur Erzeugung des optischen Signals vor allem die Strukturveränderungen aus, die das Aptamer bei der Targetbindung durchläuft. Die Detektion des Zielmoleküls in der Gasphase wurde durch eine massensensitive Detektionsmethode unter Verwendung einer Quarzkristall-Mikrowaage realisiert. Die optimierten Detektionsmethoden sollten abschließend bezüglich Sensitivität und Reversibilität beurteilt werden.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Aptamere gegen kleine Moleküle

Bei Aptameren handelt es sich um synthetische Oligonukleotide, die spezifische Zielmoleküle mit hoher Affinität binden können. Aptamere bestehen aus einzelsträngigen DNA- oder RNA-Oligonukleotiden mit einer Länge von ca. 20-150 nt [1]. Die Bezeichnung „Aptamer“ leitet sich vom lateinischen Wort *aptus* (passend) und dem griechischen Wort *meros* (Teil) ab. Diese Bezeichnung beschreibt die wesentliche Eigenschaft von Aptameren, eine dreidimensionale Faltung auszubilden, die sich der Struktur des Zielmoleküls anpasst. Auf diese Weise sind Aptamere in der Lage, ihre Zielmoleküle selektiv zu binden.

Mit Hilfe eines iterativen Selektionsprozesses werden die Aptamere aus Oligonukleotid-Bibliotheken *in vitro* selektiert. Der Selektionsprozess wird als SELEX-Verfahren (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) bezeichnet und beruht auf einem zyklischen Prozess bestehend aus den Schritten (a) Bindung des Targets durch die Oligonukleotid-Bibliothek, (b) Elution der gebundenen Oligonukleotide und (c) Amplifikation der eluierten Oligonukleotide. Die amplifizierte Oligonukleotide dienen als Startsequenzen für den nächsten Selektionszyklus. Dieser Prozess wird so oft wiederholt, bis die selektierten Oligonukleotide die gewünschten Bindungseigenschaften gegenüber einem spezifischen Zielmolekül aufweisen [2].

Aptamere sind auf Grund ihrer speziellen dreidimensionalen Strukturen in der Lage, auch besonders kleine Zielmoleküle mit einer Molekülmasse < 100 Da zu erkennen und zu binden [3]. Somit konnte eine Vielzahl von Aptameren gegen niedermolekulare Verbindungen wie Aminosäuren, Nukleotide oder Toxine selektiert werden [4-6]. Neben diesen kleinen Zielmolekülen werden auch komplexere Targets wie Proteine, Viruspartikel, Zellen oder Gewebe von Aptameren gebunden [7-10].

Durch ihre Fähigkeit zur molekularen Erkennung, können Aptamere Funktionen ausüben, die bislang nur Antikörpern zugesprochen wurden. Sie eignen sich genau wie Antikörper als Fänger- und Detektionsmoleküle. Aus diesem Grund werden Aptamere oftmals auch als „synthetische Antikörper“ bezeichnet [11]. Im Bereich der Biosensorik stellen Aptamere eine vielversprechende Alternative zu Antikörpern dar, da sie in der Lage sind, niedermolekulare, Ver-

bindungen, die nur eine geringe Immunogenität aufweisen, mit hohen Affinitäten zu binden [1, 12].

Im Folgenden wird auf die kleinen Zielmoleküle von Aptameren eingegangen und deren Erkennung und Bindung durch Aptamerstrukturen beschrieben. Die Ausbildung dieser dreidimensionalen Aptamerstrukturen wird im Design vieler Aptamer-basierter Biosensoren ausgenutzt, um kleine Moleküle zu detektieren. Diese unterschiedlichen Methoden des Designs Aptamer-basierter Biosensoren und die damit verbundenen Möglichkeiten zur Erzeugung detektierbarer Signale werden abschließend in den Abschnitten 3.3.2 und 3.3.3 näher erläutert.

3.1.1 Definition kleiner Moleküle

Unter dem Begriff der niedermolekularen Verbindungen werden Moleküle mit einem Molekulargewicht < 1000 Dalton zusammengefasst [13]. Im Englischen bezeichnet man diese Substanzen auch mit dem feststehenden Begriff der *small molecules*. Die Definition der kleinen Moleküle wird besonders vom Bereich der Biochemie und Pharmazie geprägt, da die molekulare Größe vieler Wirkstoffe einen entscheidenden Einfluss auf deren Bioverfügbarkeit hat [14]. Derzeitig besteht eine Vielzahl der zugelassenen Arzneimittel aus niedermolekularen Verbindungen, denn viele der kleinen Moleküle sind auf Grund ihrer geringen Größe in der Lage, durch die Zellmembran an intrazelluläre Wirkungsorte zu gelangen.

Der Begriff der *small molecules* umfasst jedoch nicht nur biologisch aktive Wirkstoffe, wie z. B. Zytostatika und Antibiotika, sondern stellt eine äußerst heterogene Substanzgruppe dar. Zu den *small molecules* zählen außerdem eine Großzahl von Primärmetaboliten, wie Kohlenhydrate, Aminosäuren und Fettsäuren sowie eine Vielzahl an Sekundärmetaboliten wie Glykoside, Alkaloide, Polyketide, Cofaktoren, Pestizide und Toxine. Neben diesen natürlich vorkommenden kleinen Molekülen, werden auch synthetisch hergestellte Substanzen, die vor allem als Therapeutika Anwendung finden, zur Stoffklasse der *small molecules* gezählt. Niedermolekulare Verbindungen weisen somit eine Vielzahl verschiedenster biologischer Funktionen auf. Diese kleinen Moleküle zeichnen sich jedoch alle, auf Grund ihrer geringen Molekülgröße, durch eine geringe immunogene Wirkung aus. Einige dieser kleinen Verbindungen weisen, bedingt durch ihre geringe Größe, zudem eine hohe Flüchtigkeit auf. Kleine organische Verbindungen mit einem Dampfdruck $> 0,01$ kPa (bei 20 °C) werden auch als VOCs (*volatile organic compounds*) bezeichnet [15].

3.1.2 Kleine Aptamer-Targets

Die Anzahl der publizierten Aptamere gegen niedermolekulare Verbindungen stieg deutlich an, nachdem der Prozess der *in vitro*-Selektion von Aptameren 2001 automatisiert wurde [16-18]. In den letzten 20 Jahren konnten Aptamere gegen insgesamt mehr als 130 kleine Zielmoleküle selektiert werden (Abb. 3.1 A) [1, 12, 19]. Die kleinen Zielmoleküle lassen sich größtenteils in die folgende Stoffgruppen unterteilen: Antibiotika, Aminosäuren, Hormone, Metallionen, Nukleotide, organische Farbstoffe, Pestizide und Toxine. Die drei Stoffgruppen Antibiotika (z. B. Ampicillin, Kanamycin, Tetracyclin), Aminosäuren (z. B. L-Valin, L-Isoleucin, L-Histidin) und Nukleotide (z. B. ATP, FMN, NADH) umfassen jedoch die größte Anzahl dieser Aptamer-Targets und stellen zusammen über 50 % der kleinen Zielmoleküle dar (Abb. 3.1 B).

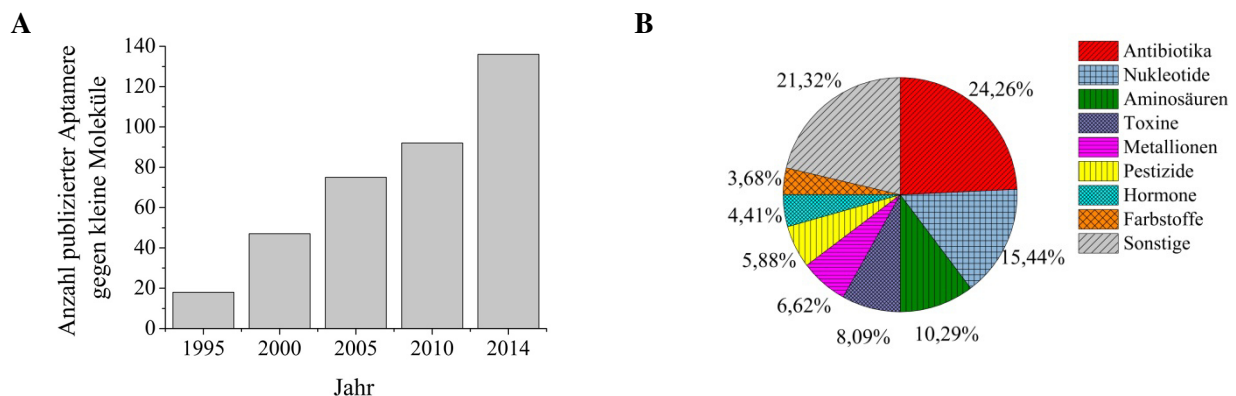


Abb. 3.1 Publierte Aptamere gegen kleine Moleküle. (A) Anzahl publizierter Aptamere gegen kleine Moleküle im Zeitraum 1995-2014. Die Anzahl publizierter Aptamere wurde kumulativ aufgetragen. (B) Unterteilung der kleinen Aptamer-Targets in Stoffgruppen für das Jahr 2014. Die Daten basieren auf der Aptamer-Datenbank Apta-Index™ (Aptagen, LLC) [1].

Ein Großteil dieser kleinen Moleküle, die bereits mit Aptameren detektiert wurden, besitzt eine Molekülmasse zwischen 150 und 500 Da. Es sind jedoch einige Aptamer-Targets bekannt, deren Molekülmasse 150 Da unterschreitet. Darunter befinden sich die Aminosäuren L-Valin und L-Isoleucin sowie die Moleküle Adenin und Acetylcholin. Das kleinste Molekül, gegen das bislang ein Aptamer selektiert wurde, ist Ethanolamin. Dieses kleine Aptamer-Target besitzt eine Molekülmasse von 61,08 Da.

In Tab. 3.1 sind die 15 kleinsten Molekültargets aufgeführt, gegen die bislang Aptamere selektiert wurden. Die Aptamere gegen diese kleinen Zielmoleküle weisen hohe Bindungsaffini-

täten auf. Ein Großteil dieser Aptamere besitzt Dissoziationskonstanten (K_D) im nano- bis pikomolaren Bereich [1, 20, 21].

Der Nachweis kleiner Moleküle ist in der Biotechnologie und der Biomedizin von besonderem Interesse, da diese Moleküle eine Vielzahl biologischer Funktionen im Stoffwechsel ausüben [21, 22]. Als Primär- und Sekundärmetabolite sind kleine Moleküle unter anderen am Zellaufbau oder an der Protein- und Nukleinsäuresynthese beteiligt. Aus diesem Grund dient die Detektion kleiner Moleküle nicht nur der Überwachung biotechnologischer Prozesse, sondern auch dem Nachweis von Krankheiten. Kleine Moleküle wie ATP oder Ethanolamin können als Indikator in der Diagnostik eingesetzt werden [23-25]. Auch in der Umwelt- oder Lebensmittelanalytik ist die Detektion kleiner Moleküle bei der Grenzwertkontrolle oder der Detektion von Toxinen von wesentlicher Bedeutung [22, 26, 27].

Tab. 3.1 Auflistung der 15 kleinsten Aptamer-Targets.

Target	Gewicht [Da]	Aptamer-bezeichnung	Nukleinsäure	Dissoziationskonstante (K_D)	Literatur
Ethanolamin	61,08	EA#14.3	DNA	6 nM	[3]
L-Valin	117,15	n. a.	RNA	12 mM	[28]
L-Tyrosinamid	117,21	pe35	DNA	45 nM	[29]
L-Isoleucin	131,17	IL42-32b	RNA	200 nM	[30]
Adenin	135,13	12E4	RNA	10 nM	[31]
Acetylcholin	146,12	ACh 6R	DNA	n. a.	[32]
Xanthin	152,11	XAB	RNA	3,3 nM	[33]
Dopamin	153,18	dopa 2	RNA	2,8 pM	[34]
L-Histidin	155,16	His945	RNA	12 nM	[35]
Phenylalanin	165,19	n. a.	RNA	34 pM	[36]
Noradrenalin	169,18	Norepi_3932c_Prim	n. a.	188 nM	[22]
L-Argininamid	173,22	12-28	DNA	100 μ M	[37]
L-Arginin	174,2	44Arg11	RNA	60 nM	[4]
L-Citrullin	175,19	44Cit11	RNA	68 nM	[4]
Theopyllin	180,16	TCT8-4	RNA	100 nM	[38]

3.1.3 Ethanolamin: Das kleinste Aptamer-Target

Ethanolamin ist mit einem Molekulgewicht von 61,08 Da das kleinste Molekül, gegen das bislang ein Aptamer selektiert wurde (Abb. 3.2) [3]. Dieses kleine Molekül weist einen

Dampfdruck von 0,5 hPa (bei 20 °C) auf und stellt somit eine flüchtige organische Verbindung (engl. *volatile organic compound*, VOC) dar [39].

Die Detektion dieses kleinen Moleküls ist vor allem von medizinischer Bedeutung, da Ethanolamin mit Krankheiten wie Alzheimer [25], Schizophrenie [40] und der Stoffwechselerkrankung Ethanolaminose [41] in Verbindung gebracht wird.

Ethanolamin wird außerdem in vielen industriellen Prozessen, wie der Textilverarbeitung, der Herstellung von Kosmetika oder der Metallverarbeitung eingesetzt [42, 43]. Für die Sicherheit der Mitarbeiter müssen die vorgeschriebenen Ethanolamin-Grenzwerte bei diesen Prozessen genauestens eingehalten werden, da Ethanolamin zu Reizungen der Haut, der Augen und des Atmungstraktes führen kann [42, 43]. Eine karzinogene Wirkung von Ethanolamin wird derzeit ebenfalls untersucht [44-46]. Die Detektion und die Grenzwertbestimmung von Ethanolamin können somit auch bei industriellen Herstellungs- und Verarbeitungsprozessen von wesentlicher Bedeutung sein.

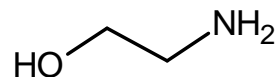


Abb. 3.2 Strukturformel von Ethanolamin. Ethanolamin ist das kleinste Molekül, gegen das bislang ein Aptamer selektiert wurde.

3.2 Aptamerfaltung und Targetbindung

Aptamere sind in der Lage, dreidimensionale Strukturen auszubilden, um ihr Zielmolekül spezifisch zu binden. Durch die Faltung der Aptamersequenz entstehen Bindungstaschen, die der Erkennung und Bindung des Targets dienen. Bei der Bindung kleiner Moleküle weisen Aptamere eine Vielzahl von Faltungs- und Bindungsmechanismen auf. Diese Faltungs- und Bindungsmechanismen werden unter anderem durch Pufferbedingungen (Ionenstärke, pH-Wert), durch die Temperatur und durch die Eigenschaften der Aptamere (Länge, RNA/DNA-Struktur) beeinflusst.

Im Folgenden werden die unterschiedlichen Faltungs- und Bindungsmechanismen von Aptameren zur Erkennung kleiner Zielmoleküle genauer erläutert.

3.2.1 Faltung von Aptameren

Bei der Ausbildung von Faltungselementen zeichnen sich Aptamere durch eine hohe konformative Flexibilität aus. Für ein einzelnes Aptamer können unterschiedliche Faltungen existieren, die aus dreidimensionalen Strukturelementen aufgebaut sind. Diese Faltungen dienen der Targeterkennung und lassen sich in Sekundär- und Tertiärstrukturen unterteilen.

Die Sekundärstrukturelemente der Aptamere werden hauptsächlich durch die Ausbildung von Watson-Crick-Basenpaarungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Nukleinsäurebasen des Aptamers gebildet. Zu diesen Sekundärstrukturelementen zählen: *Stems*, *Loops*, *Hairpins*, *Bulges* und *Junctions* (Abb. 3.3). Diese Strukturelemente werden von der Nukleinsäureabfolge der Aptamersequenz vorgegeben. Sie zeichnen sich durch die Ausbildung einfacher Faltungsmotive aus, bestehend aus einzel- und doppelsträngigen Aptamerbereichen [47, 48].

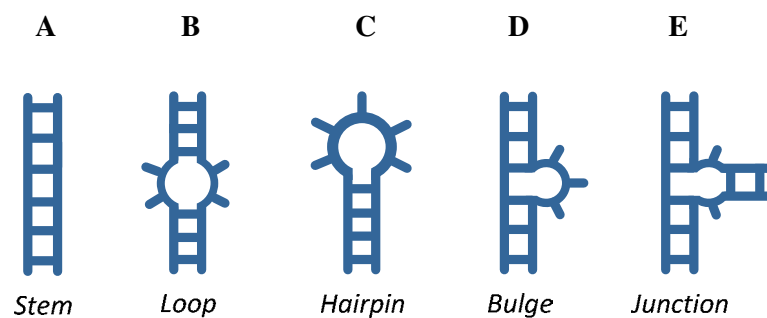


Abb. 3.3 Sekundärstrukturen von Aptameren. (A) *Stem*: tritt in doppelsträngigen Aptamerbereichen auf. (B) *Loop*: Ungepaarte Basen in einem doppelsträngigen Aptamerbereich können einen *Loop* ausbilden. (C) *Hairpin*: Das Aptamer bildet einen doppelsträngigen Bereich (*Stem*) aus, der durch eine Schleife aus ungepaarten Basen begrenzt wird. (D) *Bulge*: Ein *Bulge* entsteht innerhalb eines doppelsträngigen Aptamer-Bereichs, wenn nur ein Strangabschnitt ungepaarte Basen aufweist. (E) *Junction*: *Junctions* entstehen durch die Zusammenlagerung mehrerer doppelsträngiger Aptamerbereiche.

Die Tertiärstrukturen der Aptamere können durch Wechselwirkungen zwischen bereits vorhandenen Sekundärstrukturelementen ausgebildet werden und weisen dadurch komplexe dreidimensionale Faltungen auf. Diese Strukturen ermöglichen den Aptameren, ihre Targets zu erkennen und zu binden. Durch die Ausbildung dieser dreidimensionalen Strukturen, werden die Sekundärstrukturelemente nur geringfügig beeinflusst. Sekundärstrukturen besitzen eine hohe energetische Stabilität, sodass bei der Bildung tertiärer Strukturen ein Großteil der Sekundärelemente weiterhin bestehen bleibt [49]. Zu den Tertiärstrukturelementen zählen:

Pseudoknots, *Kissing Hairpins*, Triplexes und G-Quadruplexes (Abb. 3.4). Die Ausbildung dieser komplexen dreidimensionalen Strukturen wird zum Großteil durch positiv geladene Metallionen begünstigt. Die Metallionen sind in der Lage, Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Phosphatgruppen des Zucker-Phosphatrückgrats einzugehen. Auf diese Weise werden elektrostatische Abstoßungen bei der Ausbildung dreidimensionaler Strukturelemente reduziert. Viele tertiäre Faltungsmotive der Aptamer bilden sich somit erst in Anwesenheit von Metallionen aus. Bei einigen tertiären Strukturelementen hingegen haben die Ionen nur einen stabilisierenden Einfluss auf die Struktur und sind nicht essentiell für die Faltung. Diese stabilisierende Wirkung von Ionen ist zum Beispiel bei der Ausbildung von *Pseudoknots* und G-Quadruplexes zu beobachten [49, 50].

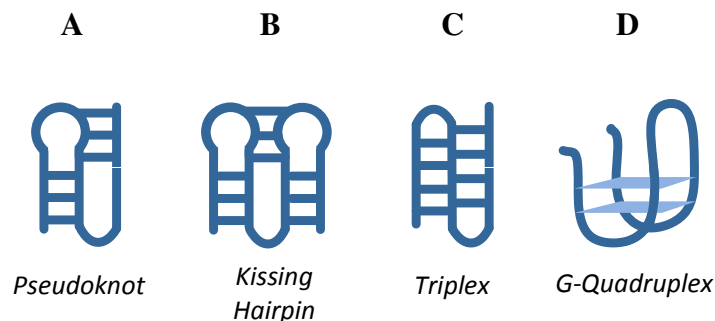


Abb. 3.4 Tertiärstrukturen von Aptameren. (A) *Pseudoknot*: Wird durch zwei *Hairpin*-Strukturen gebildet, wobei die Schleife eines *Hairpins* zugleich am *Stem* des zweiten *Hairpins* beteiligt ist. (B) *Kissing Hairpin*: Entsteht durch die Ausbildung von Basenpaarungen zwischen zwei benachbarten *Hairpin*-Strukturen. (C) *Triplex*: Bilden sich durch die Anlagerung des Aptamerstranges an doppelsträngige Aptamerbereiche. (D) *G-Quadruplex*: Entsteht durch die Ausbildung viersträngiger Aptamer-Strukturen, die durch quadratische Anordnungen von Guaninmolekülen verbunden sind.

Die vollständige dreidimensionale Faltung eines Aptamers entsteht aus Wechselwirkungen einer Vielzahl von Sekundär- und Tertiärstrukturen (Abb. 3.5). Auf diese Weise können die Interaktionen zwischen Aptamer und Target maximiert werden, sodass eine spezifische Erkennung und hochaffine Bindung des Targets durch das Aptamer ermöglicht wird.

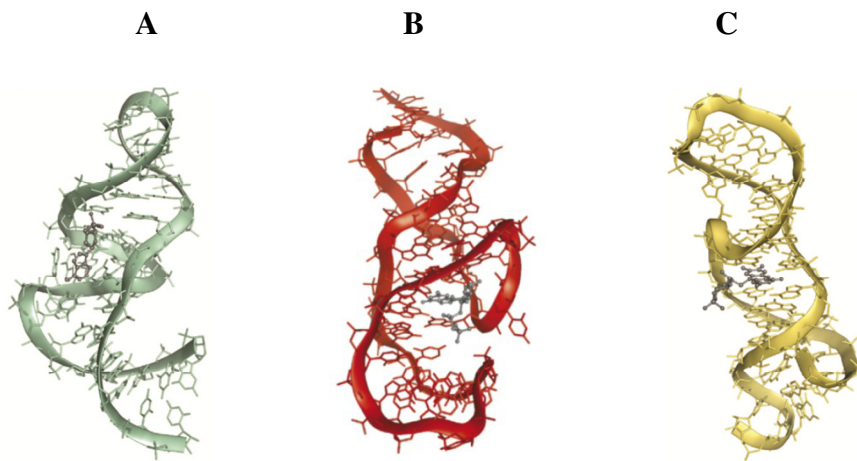


Abb. 3.5 Dreidimensionale Strukturmodelle von Aptameren. (A) Aptamer 1RAW gegen ATP. (B) Aptamer 2AU4 gegen GTP. (C) Aptamer 1FMN gegen FMN. Abbildung von Wakeman *et al.* (2007) übernommen [51].

3.2.2 Faltungsmechanismen von Aptameren

Die dreidimensionale Faltung eines Aptamers ist ausschlaggebend für die molekulare Erkennung eines Zielmoleküls. Durch Pufferbedingungen wie Ionenstärke und pH-Wert und durch die Temperatur lässt sich die Faltung von Aptameren beeinflussen. Die Ausbildung dieser dreidimensionalen Strukturen und die Bindung des Zielmoleküls verläuft hauptsächlich nach zwei unterschiedlichen Mechanismen: dem Schlüssel-Schloss-Mechanismus und dem Mechanismus einer adaptiven Bindung.

Beim Schlüssel-Schloss-Mechanismus bildet das Aptamer die erforderlichen dreidimensionalen Faltungen zur Targetbindung bereits in Abwesenheit des Targets aus (Abb. 3.6 A). Der Schlüssel-Schloss-Mechanismus stellt somit die einfachste Möglichkeit der Aptamerfaltung und Targetbindung dar [52, 53].

Ein Großteil der Aptamer-Target-Bindungen verläuft jedoch nach dem Prinzip der adaptiven Bindung. Bei diesem Faltungs- und Bindungsmechanismus weist das Aptamer in Abwesenheit des Targets nur vorgefaltete Strukturelemente auf. Die dreidimensionale Faltung ist nicht vollständig ausgebildet, sodass die Bindungstaschen des Aptamers nur partiell existieren. Erst bei Anwesenheit des Targets bildet das Aptamer seine endgültigen dreidimensionalen Strukturen aus. Das Zielmolekül initiiert somit die Ausbildung einer stabilen Tertiärstruktur. Aus diesem Grund wird dieser zweistufige Faltungsmechanismus auch als *induced fit*-Mechanismus bezeichnet (Abb. 3.6 B) [53, 54].

Während der Schlüssel-Schloss-Mechanismus vor allem für die Bindung großer Aptamer-Targets publiziert wurde (z. B. Thrombin) [55], konnte für eine Vielzahl kleiner Targets der *induced-fit*-Mechanismus nachgewiesen werden (z. B. Arginin, ATP, Theophyllin) [56, 57].

Neben diesen hauptsächlich auftretenden Faltungs- und Bindungsmechanismen der Aptamere werden in der Literatur weitere Mechanismen publiziert, die jedoch auf dem Schlüssel-Schloss- oder dem *induced fit*-Mechanismus beruhen. Eine Variante des *induced fit*-Mechanismus stellt die konformative Selektion dar. Bei diesem Mechanismus liegt das Aptamer in mehreren dreidimensionalen Strukturen vor, die sich in Lösung ständig umfalten können und miteinander im Gleichgewicht stehen. Zur Ausbildung der Aptamer-Target-Bindung selektiert das Target die Aptamerkonformationen, deren Bindungstaschen sich dem Target am besten anpassen. Die übrigen Aptamerkonformationen unterliegen weiteren Umfaltungsmechanismen, bis die optimalen Bindungstaschen ausgebildet sind und das Target gebunden werden kann [58]. Bei einigen Aptamer-Target-Bindungen ist außerdem nicht nur das Aptamer, sondern auch das Target in der Lage, Strukturveränderungen zu durchlaufen. Diese konformativen Veränderungen werden vor allem bei komplexen Proteintargets beobachtet [59, 60].

Es lässt sich somit feststellen, dass Aptamere keine einheitlichen Faltungs- und Bindungsmechanismen aufweisen. Die unterschiedlichen Eigenschaften (RNA/DNA, Länge, Modifikation) und Faltungsbedingungen (pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur) von Aptameren begünstigen deren vielfältige Faltungsmechanismen bei der Ausbildung der Targetbindung. Die dreidimensionalen Faltungen müssen daher für jeden Aptamer-Target-Komplex erneut untersucht werden.

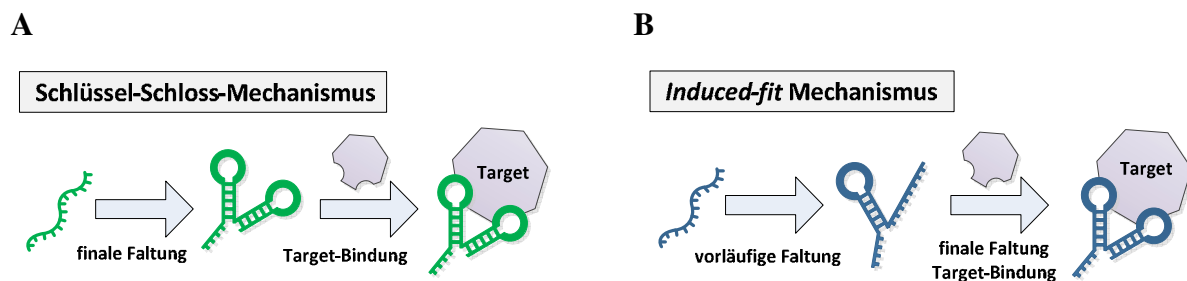


Abb. 3.6 Faltungsmechanismen von Aptameren. (A) Schlüssel/Schloss-Mechanismus: Das Aptamer bildet endgültige Faltung bereits in Abwesenheit des Targets aus. (B) *Induced-fit*-Mechanismus: Die endgültige Faltung des Aptamers wird erst durch das Target initiiert.

3.2.3 Aptamer-Target-Bindung kleiner Moleküle

Kleine Aptamer-Targets werden vor allem durch adaptive Bindungen vom Aptamer gebunden. Das Aptamer bildet seine endgültige dreidimensionale Faltung erst in Anwesenheit des Targets aus, um diese kleinen Moleküle spezifisch binden zu können. Im Gegensatz zu Makromolekülen werden niedermolekulare Targets vor allem von Aptameren umschlossen und von Bindungstaschen im Inneren der Aptamere gebunden. Makromoleküle wie Proteine, werden hingegen auf Grund ihrer Größe oftmals nicht vollständig in das Aptamer eingebettet, sondern binden über die Oberfläche, indem sich intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Aptamer und Target ausbilden [61-63].

Die spezifische Bindung kleiner Moleküle zeichnet sich durch vielfältige Interaktionen zwischen Aptamer und Target aus. Sie entsteht vor allem durch die Ausbildung von Basenstapelungen, Wasserstoffbrücken-Bindungen und elektrostatischen Interaktionen. Bedingt durch ihre strukturellen Eigenschaften wie räumliche Orientierung oder Ladungsverteilung, werden kleine Targets auf unterschiedliche Weise vom Aptamer gebunden. Eine Vielzahl kleiner Aptamer-Targets weist planare, aromatische Strukturen auf, wie Nukleotide (AMP, FMN, etc.) oder einige Antibiotika (Tetracyclin, Daunomycin, etc.). Diese planaren Verbindungen können durch Interkalation in die Aptamerstruktur gebunden werden. Für die planaren Targets AMP, FMN und Theophyllin wurden diese Bindungsmechanismen genau untersucht. Die Interkalation der Liganden wird durch Basenstapelungen innerhalb der Aptamerstruktur stabilisiert. Zusätzlich bilden sich intermolekulare Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen Aptamer und Target aus. Diese Bindungen erhöhen die Affinität und Spezifität gegenüber dem Target (Abb. 3.7 A, B) [62, 64].

Besonders kleine Targets, wie Aminosäuren, werden vom Aptamer vollständig umschlossen. Freie Loop-Regionen der Aptamerstruktur falten sich in einem adaptiven Bindungsvorgang um die kleinen Targets. Diese Umhüllung der Targets konnte für die Aminosäuren Arginin und Citrullin gezeigt werden. Die vollständige Einbettung des Targets in die Aptamerstruktur maximiert die Ligandenerkennung und ermöglicht somit eine spezifische Bindung kleiner Moleküle (Abb. 3.7 C, D) [62, 64].

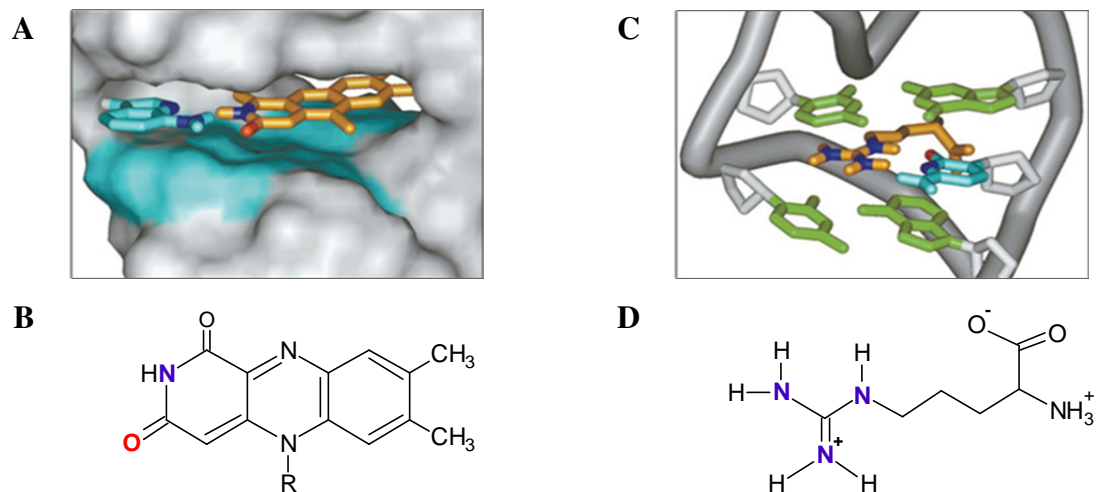


Abb. 3.7 Aptamerbindung der kleinen Targets Flavinmononukleotid (FMN) und Arginin. (A) Das FMN (orange) interkaliert in die planaren Strukturbereiche (hellblau) des Aptamers und wird durch eine angrenzende Base (hellblau) stabilisiert. (B) Struktur des FMN. (C) Das Arginin (orange) wird in der Bindungstasche des Aptamers von angrenzenden Basen (grün) umhüllt und durch eine weitere Base (hellblau) über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. (D) Struktur der Aminosäure Arginin. Bei der Bindung von FMN und Arginin sind polare Sauerstoff- (rot) und Stickstoff-Atome (blau) an der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Aptamer und Target beteiligt. Die Abbildungen (A) und (C) wurden von Hermann und Patel (2000) übernommen [62].

Elektrostatistische Interaktionen zwischen Aptamer und Target spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Aptamer-Target-Bindung. Zur Bindung geladener Targets bilden sich innerhalb des Aptamers dreidimensionale Strukturen aus, deren Ladungsverteilungen komplementär zu denen des Targets sind. Kationische Liganden, wie das aminoglykosidische Antibiotikum Tobramycin, gehen innerhalb der Bindungstasche elektrostatische Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat des Aptamers ein. Die Bindungstasche des Tobramycin-Aptamers weist eine geladene Oberfläche auf, die komplementär zur dreidimensionalen Anordnung der positiv geladenen funktionellen Gruppe des Targets ist. Die Ausbildung dieser elektrostatischen Komplementarität zwischen Ligand und Bindungstasche ist außerdem für die Diskriminierung strukturell ähnlicher Targets verantwortlich [62, 64].

Vor allem durch die Ausbildung von Tertiärstrukturen, sind die Aptamere in der Lage, diese Vielzahl an Wechselwirkungen mit dem Target einzugehen. Dreidimensionale Aptamerstrukturen, die sich als Bindungstasche um das Target falten, erhöhen die Kontaktfläche zwischen Target und Aptamer. Auf diese Weise ermöglicht die dreidimensionale Aptamerfaltung eine

Vielzahl intermolekularer Wechselwirkungen, die zu einer spezifischen Targeterkennung führen.

Ein häufiges Strukturmotiv von Aptameren zur Erkennung kleiner Moleküle ist die G-Quadruplex-Struktur [3, 65-67]. Diese dreidimensionale Faltung bildet sich vor allem in Guanin-reichen Sequenzabschnitten. Eine G-Quadruplex besteht aus quadratisch planaren Anordnungen von vier Guanineinheiten. Diese planaren Strukturen bezeichnet man als Guanintetrade. Durch Stapelung mehrerer Tetraden entsteht eine stabile G-Quadruplex-Struktur (Abb. 3.4 D) [50, 68]. Aptamer-Targets, die planare aromatische Ringstrukturen aufweisen, können zwischen die planaren Guanintetraden interkalieren [69-72]. Einige Aptamertargets sind in der Lage, Loopstrukturen innerhalb der Quadruplex zu erkennen. Die Interaktion mit Loop-Basen oder die Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen ermöglichen eine Bindung an die dreidimensionale Struktur des Aptamers [72-74]. Auch für das kleinste Aptamertarget Ethanolamin werden Interaktionen mit Loopstrukturen innerhalb der Quadruplex vermutet [75].

Die molekulare Erkennung kleiner Targets durch Aptamere beruht somit auf einer Vielzahl an Wechselwirkungen, die eine spezifische Erkennung besonders kleiner Molekülstrukturen ermöglichen. Spezifische Anordnungen von Wasserstoffbrückenbindungen und die Komplementarität der Oberflächenladungen zwischen Aptamer und Target sind die wichtigsten Faktoren zur spezifischen Bindung kleiner Moleküle. Außerdem spielen sterische Hinderungen innerhalb der Bindungstaschen eine entscheidende Rolle zur Diskriminierung ähnlicher Targets, wie dies beim Theophyllin-Aptamer der Fall ist. Das Molekül Coffein unterscheidet sich von Theophyllin nur durch eine zusätzliche Methylgruppe, wird jedoch 10.000-fach schwächer vom Aptamer gebunden. Die Diskriminierung dieser beiden Targets beruht somit ausschließlich auf der zusätzlichen Molekülgruppe [38]. Die Methylgruppe des Coffeins führt zu sterischen Hinderungen innerhalb der Bindungstasche, sodass die Ausbildung wichtiger Wasserstoffbrückenbindungen verhindert wird [62].

Bei der Bindung äußerst kleiner (< 100 Da), ungeladener Targets wie dem Ethanolamin werden dem Aptamer oftmals nicht genügend Möglichkeiten zur Diskriminierung zwischen ähnlichen Targets geboten. Das Target ermöglicht nur die Ausbildung einer begrenzten Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen. Dies kann bei einigen kleinen Molekülen dazu führen, dass strukturell ähnliche Targets ebenfalls vom Aptamer gebunden werden. Man spricht in einem solchen Fall von einer gruppenspezifischen Molekülerkennung durch das Aptamer [76].

3.2.4 Aptamer-Ethanolamin-Bindung

Die von Mann *et al.* (2005) [3] selektierten Aptamere ermöglichen eine hochaffine Bindung des kleinen Targets Ethanolamin mit Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich. Aus der Gruppe der selektierten Ethanolamin-Aptamer weist das Aptamer EA#14.3 mit einer Dissoziationskonstante von 6 nM die höchste Affinität gegenüber Ethanolamin auf. Bei diesem Aptamer handelt es sich um ein ssDNA-Aptamer mit einer Länge von 96 nt. Der Target-bindende Aptamerbereich konnte durch Bindungsstudien mit verkürzten Aptamersequenzen bestimmt werden [77]. Es handelt sich um einen Guanin-reichen Sequenzabschnitt mit einer Länge von 16 Nukleotiden. Sekundärstruktur-Vorhersagen zeigen, dass sich dieser Target-bindende Aptamerbereich in einer *Loop*-Region des Aptamers befindet (Abb. 3.8). Die dreidimensionale Faltung dieses Aptamerbereichs bildet eine G-Quadruplexstruktur aus. Das Target Ethanolamin wird vermutlich durch *Loop*-Strukturen innerhalb der G-Quadruplex gebunden [75].

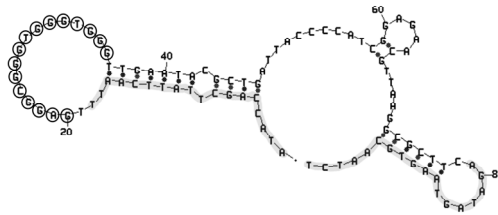


Abb. 3.8 Sekundärstruktur des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3. Der Target-bindende Aptamerbereich (Nukleotide 20-25) ist mit Kreisen markiert. Die Primer-Bindungsregionen (Nukleotide 1-18 und 79-96), die für die Amplifikation des Aptamers während des SELEX-Prozesses erforderlich sind, wurden grau unterlegt [3].

3.3 Aptamer-basierte Biosensoren zur Detektion kleiner Moleküle

Biosensoren sind in der Lage, chemische Vorgänge, wie die Bindung eines Analyten, in detektierbare Signale umzuwandeln. Dazu ist ein Biosensor aus zwei wesentlichen Komponenten aufgebaut: einer biologischen Erkennungseinheit und einem Signalwandler, auch *Transducer* genannt. Die biologische Erkennungseinheit dient der spezifischen Bindung des Analyten. Diesen Bindungsvorgang wandelt der *Transducer* anschließend in ein detektierbares (z. B. optisches oder elektrochemisches) Signal um [20, 21, 63].

Die Wahl einer geeigneten biologischen Erkennungseinheit ist somit ausschlaggebend für die Entwicklung eines sensitiven Biosensors. Eine ideale Erkennungseinheit sollte demnach eine

hohe Spezifität gegenüber dem Analyten aufweisen. Aus diesem Grund sind Antikörper und Aptamere die meistverwendeten Erkennungseinheiten in biologischen Sensorsystemen. Antikörper-basierte Biosensoren werden vor allem zur Detektion von Makromolekülen, wie Proteinen, eingesetzt. Gegenüber vielen kleinen Molekülen weisen Antikörper jedoch nur sehr geringe Affinitäten auf [78]. Aptamer sind hingegen in der Lage, auch besonders kleine, gering immunogene Targets mit hoher Spezifität zu binden. Aptamer-basierte Biosensoren weisen somit eine besonders hohe Targetvielfalt auf und ermöglichen eine sensitive Detektion kleiner Moleküle. Diese Art von Biosensoren, die Aptamere als biologische Erkennungseinheit verwenden, bezeichnet man auch als „Aptasensoren“ [20, 21].

3.3.1 Vorteile von Aptameren gegenüber Antikörpern

Als molekulare Erkennungseinheiten bieten Aptamere im Bereich der Biosensorik eine vielversprechende Alternative zu Antikörpern. Dies beruht auf einer Vielzahl von Vorteilen, die Aptamere gegenüber Antikörpern aufweisen. Ein Großteil der vorteilhaften Eigenschaften von Aptameren, lässt sich auf ihre Nukleinsäurestruktur und die *in vitro*-Herstellung zurückführen. Die Eigenschaften von Aptameren und Antikörpern sind in Tab. 3.2 vergleichend gegenübergestellt.

Tab. 3.2 Vergleich der Eigenschaften von Aptameren und Antikörpern

Eigenschaften	Aptamere	Antikörper
Molekülklasse	Oligonukleotid	Protein
Entwicklung/ Herstellung	<i>in vitro</i> -Herstellungsprozess automatisierte chemische Synthese kostengünstig, schnell hohe Reproduzierbarkeit hohe Reinheit	<i>in vivo</i> -Herstellungsprozess Tier- und Zellkulturversuche teuer, zeitintensiv Batch-zu-Batch-Schwankungen aufwendige Aufreinigung nötig
Zielmoleküle	hohe Targetvielfalt auch kleine, gering immunogene Targets	begrenzte Targetanzahl vor allem Makromoleküle, immunogene Targets
Affinität	K_D im mikro- bis pikomolaren Bereich	K_D im nanomolaren Bereich
Selektivität	hohe Selektivität	bedingte Selektivität
Stabilität	Temperaturstabilität hohe Lagerstabilität (> 12 Monate bei 4 °C)	temperaturempfindlich bedingte Lagerstabilität (3-6 Monate bei 4 °C)
Regenerierbarkeit	ohne Aktivitätsverlust möglich	kann zu Aktivitätsverlust führen
Modifikation	an definierten Positionen kein Aktivitätsverlust	nicht punktgenau kann zu Aktivitätsverlust führen
Molekulargewicht	ca. 10-50 kDa (20-150 nt)	ca. 150-900 kDa

Targetvielfalt: Während die klassische Antikörperherstellung abhängig von Tier- und Zellkulturversuchen ist, können Aptamere chemisch synthetisiert werden. Die chemische Synthese ermöglicht es, Aptamere gegen fast jedes beliebige Zielmolekül zu entwickeln. Auch gegen besonders kleine Moleküle, die toxisch oder nur gering immunogen sind, können Aptamere selektiert werden [79]. Antikörper hingegen weisen gegenüber vielen kleinen Molekülen nur sehr geringe Affinitäten auf. Niedermolekulare Verbindungen müssen daher oftmals mit Makromolekülen, wie Proteinen, gekoppelt werden, um eine Immunreaktion auszulösen und die Antikörperproduktion zu ermöglichen [78].

Nicht-physiologische Bedingungen: Neben der Targetvielfalt bietet die *in vitro*-Selektion von Aptameren den Vorteil, Aptamere an gewünschte Versuchsbedingungen anzupassen. Durch die Variation der Selektionsbedingungen (z. B. pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke) können Aptamere selektiert werden, die ihr Zielmolekül unter speziellen, nicht-physiologischen Bedingungen binden. Antikörper sind hingegen nur unter physiologischen Bedingungen in der Lage, ihre Konformation beizubehalten und Zielmoleküle zu erkennen [80]. Dies erfordert eine zusätzliche Probenvorbereitung, wie z. B. Umpufferung, bei der Detektion mit Antikörpern.

Hohe Reproduzierbarkeit, hoher Reinheitsgrad: Im Vergleich zur Herstellung von Aptameren ist die Produktion monoklonaler Antikörper sehr zeit- und kostenintensiv. Der biologische Herstellungsprozess mit Antikörper-produzierenden Zellen erfordert aufwändige Reinigungsschritte und Qualitätskontrollen, um eine gleichbleibende Antikörperqualität zu gewährleisten. Ein solcher Herstellungsprozess kann einige Wochen bis Monate in Anspruch nehmen. Automatisierte *in vitro*-Herstellungsverfahren ermöglichen hingegen eine kostengünstige und schnelle Synthese von Aptameren innerhalb weniger Tage [11]. Nachdem eine Aptamersequenz selektiert wurde, kann sie jederzeit mit einem hohen Grad an Genauigkeit und Reproduzierbarkeit synthetisiert werden. Durch eine Reinigung unter stringenten, denaturierenden Bedingungen können Aptamere mit einem hohen Reinheitsgrad hergestellt werden, sodass keine Schwankungen zwischen den einzelnen Chargen der Aptamerproduktionen zu erwarten sind [80].

Hohe Target-Affinität und –Spezifität: Aptamere weisen besonders hohe Affinitäten gegenüber ihrem Target auf. Eine Vielzahl der selektierten Aptamere besitzt Dissoziationskonstanten im nano- bis pikomolaren Bereich [1, 20, 21]. Somit weisen Aptamere vergleichbare oder teilweise sogar höhere Affinitäten gegenüber dem Target auf, als Antikörper. Zudem sind Aptamere in der Lage, ihr Target mit hoher Spezifität zu binden. Erfolgte die Aptamerse-

lektion für ein bestimmtes Strukturmotiv des Targets, können Aptamere auch zwischen eng verwandten Molekülen unterscheiden. Das Theophyllin-Aptamer weist eine 10.000-fach höhere Affinität gegenüber Theophyllin als gegenüber Coffein auf, obwohl sich Theophyllin und Coffein nur durch eine einzige Methylgruppe unterscheiden [38]. Neben der Unterscheidung besonders strukturähnlicher Moleküle, ermöglichen Aptamere auch die Differenzierung zwischen chiralen Targets [81].

Antikörpern verfügen oftmals nicht über solch selektive Bindungseigenschaften, sodass bei der Detektion verschiedener Targets Kreuzreaktivitäten zwischen den Antikörpern oder falsch positive Ergebnisse auftreten können [82].

Geringe Molekülmasse: Aptamere weisen im Vergleich zu Antikörpern eine geringere Molekülmasse auf. Sie benötigen nur eine geringe Abfolge von Nukleotiden, um eine stabile dreidimensionale Struktur auszubilden, die Voraussetzung für die molekulare Erkennung ist. Somit besitzen die funktionellen Oligonukleotide eine durchschnittliche Länge von 20-150 nt [1]. Dies entspricht einer Molekülmasse von ungefähr 10-50 kDa. Die durchschnittlichen Antikörpergrößen betragen ein Vielfaches der Aptamergröße und liegen zwischen 150 und 900 kDa.

Die geringe Molekülmasse der Aptamere ist besonders von Vorteil, um Aptamere in hohen Dichten auf Oberflächen zu immobilisieren. Dies nutzt eine Vielzahl Aptamer-basierter Biosensoren, um einen möglichst großen dynamischen Detektionsbereich zu erhalten. In der Biosensorik eignet sich eine hohe Immobilisierungsdichte von Aptameren vor allem zur Detektion kleiner Moleküle. Für große Moleküle, wie z. B. Proteine, würden zu hohe Aptamerdichten zur sterischen Limitierung bedingt durch die Targetgröße führen [83].

Hohe Stabilität, Regenerierbarkeit: Im Vergleich zu Antikörpern können Aptamere über einen längeren Zeitraum ohne Aktivitätsverlust gelagert werden. Während Antikörper sehr temperaturempfindlich sind und bei einer Lagerung bei 4 °C bereits nach 3-6 Monate denaturieren, können Aptamere auch nach 12 Monaten Bindungsaktivitäten aufweisen [11]. Zudem sind Aptamere stabiler gegenüber Temperaturschwankungen. Kommt es dennoch zur Entfaltung des Aptamers, ist dieser Prozess reversibel. Durch die Wiederherstellung der Faltungsbedingungen (Puffer, Temperatur), die während des Selektionsprozesses verwendet wurden, können die dreidimensionalen Strukturen der Aptamere regeneriert werden. Hierdurch ist eine erneute Targetbindung möglich [80, 84]. Die Regenerierbarkeit ist eine wichtige Eigenschaft von Aptameren für den Einsatz in Biosensoren und ermöglicht die Wiederverwendung von Aptasensoren.

Einfache Modifizierung: Die Modifizierung von Aptameren und Antikörpern mit Reporter- und Adaptermolekülen (z. B. Fluorescein, Biotin) ist eine wichtige Voraussetzung, um die Bindungen zum Target detektieren zu können. Bei Antikörpern ist eine chemische Modifizierung der komplexen Proteinstruktur nicht an jeder beliebigen Molekülposition möglich, da nur die Seitenketten auf der Proteinoberfläche für Modifizierungen zur Verfügung stehen. Reporter- und Adaptermoleküle können bei Antikörpern meist nicht an definierten Positionen eingebaut werden [79]. Dies kann häufig zu Aktivitätsverlusten führen, da Faltungsmotive beeinflusst oder Bindungstaschen blockiert werden. Aptamere können hingegen bereits während der Synthese an definierten Positionen mit Linker-Molekülen, Farbstoffen oder funktionellen Gruppen modifiziert werden [80, 85]. Durch kontrollierte Modifizierungen können die Aptamere unter anderem gezielt in Aptamer-basierten Biosensoren eingesetzt werden. Eine kontrollierte Modifikation der Aptamere mit Linker-Molekülen ermöglicht definierte Immobilisierungen der Aptamere auf Biosensoroberflächen ohne die Aktivität der Aptamere zu beeinträchtigen. Gezielte Modifikationen der Aptamersequenzen mit Farbstoffen vereinfachen außerdem die Detektion von Targetbindungen und begünstigen somit die Entwicklung optischer Biosensorsysteme.

Limitierungen: Auf Grund ihrer Nukleinsäurestruktur sind Aptamere empfindlich gegenüber hydrolytischen Spaltungen durch Ribonukleasen. Dies kann die Targetbindung erschweren, wenn Aptamere z. B. in der Biosensorik zur Analyse komplexer Proben eingesetzt werden. Komplexe Proben, in denen die Targets neben einer Vielzahl unterschiedlichster Moleküle vorkommen (z. B. Serum, Lebensmittelproben), sind oftmals mit Nukleasen belastet. Die Verwendung modifizierter Nukleotide bietet eine Möglichkeit, Aptamere vor Nukleaseabbau zu schützen. Substitutionen am Zucker-Phosphat-Rückgrat können bereits während der Aptamersynthese eingeführt werden und erhöhen die Nukleaseresistenz der Aptamere [80]. Werden mehrere Targets parallel aus einer komplexen Probe durch die Verwendung unterschiedlicher Aptamere in einem Multiplexverfahren detektiert, kann dies problematisch für die Realisierung einheitlicher Detektionsbedingungen sein. Unterschiedliche Aptamere werden häufig unter unterschiedlichen Bedingungen selektiert. Sie benötigen diese Bedingungen (z. B. pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur), um Targetbindungen auszubilden. Aus diesem Grund sind einheitliche Detektionsbedingungen in multiplex-fähigen Aptasensoren nur realisierbar, wenn die verwendeten Aptamere unter denselben Selektionsbedingungen selektiert wurden.

Trotz hoher Affinitäten zwischen Aptamer und Target treten bei der Bindung einiger Targets unspezifische Wechselwirkungen mit dem Aptamer auf. Vor allem bei der Bindung positiv

geladener Targets können unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der Aptamere entstehen [62]. Unspezifische Targetbindungen treten zudem bei einigen äußerst kleinen (< 100 Da), ungeladenen Targets, wie dem Ethanolamin, auf. Die Molekülstruktur dieser kleinen Targets bietet dem Aptamer oftmals nicht genügend Möglichkeiten zur Diskriminierung ähnlicher Targets, sodass strukturverwandte Moleküle ebenfalls vom Aptamer erkannt und gebunden werden [76].

3.3.2 Detektionsprinzipien von Aptasensoren

Aptasensoren sind in der Lage, das Bindungsereignis zwischen Aptamer und Target in detektierbare Signale umzuwandeln. Je nach Aufbau und verwendetem Transducer können verschiedene Signale erzeugt und detektiert werden. Die Detektionsprinzipien von Aptasensoren lassen sich daher u. a. in folgende Kategorien unterteilen: optische Detektion, elektrochemische Detektion und massensensitive Detektion, die im Folgenden näher erläutert werden.

3.3.2.1 Optische Detektion

Eine Vielzahl von Aptasensoren basiert auf der optischen Detektion kleiner Targets, da ein optisches Detektionsverfahren eine hohe Sensitivität aufweist. Außerdem ermöglicht eine optische Detektion ein schnelles Antwortverhalten des Aptasensors [21]. Durch die Verwendung optischer Signalmoleküle (z. B. Fluorophore, Nanopartikel) kann das Bindungsereignis zwischen Aptamer und Target in ein optisches Signal umgewandelt werden. Die meisten optischen Aptasensoren erzeugen zur Detektion des Targets Fluoreszenz- oder colorimetrische Signale [61].

Unter den optischen Aptasensoren ermöglichen Fluoreszenz-basierte Aptasensoren die sensitivste Detektion eines Targets. Die große Anzahl der verfügbaren Fluorophore erleichtert zudem die Entwicklung dieser optischen Aptasensors. Außerdem lassen sich Aptamere unkompliziert mit unterschiedlichsten Fluoreszenzfarbstoffen modifizieren, sodass sie als sogenannte Signalaptamere eingesetzt werden können [20, 21, 61]. Neben herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffen wie Fluorescein oder Rhodamin, kommen in Fluoreszenz-basierten Aptasensoren auch Quantum Dots (QDs) zum Einsatz [86]. Diese Nanopartikel besitzen ebenfalls die Eigenschaft, bei optischer Anregung Licht einer definierten Wellenlänge zu emittieren. Quantum Dots weisen im Vergleich zu herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffen jedoch eine höhere Photostabilität auf [20]. Diese Eigenschaft können vor allem Aptasensoren ausnutzen, die auf Grund mehrfacher Detektions- und Regenerationsprozesse über einen längeren Zeitraum eingesetzt werden.

Die colorimetrische Detektion stellt eine weitere Möglichkeit optischer Aptasensoren dar, kleine Targets zu detektieren. Colorimetrische Aptasensoren wurden z. B. zur Detektion der kleinen Targets Adenosin [87-91], Cocain [88, 89, 91] und Oxytetracyclin [92] entwickelt. In vielen colorimetrischen Aptasensoren werden Gold-Nanopartikel (AuNPs) zur Visualisierung der Aptamer-Target-Bindung verwendet. Hierbei wird die Eigenschaft der metallischen Nanopartikel ausgenutzt, bei Aggregation einen Farbumschlag aufzuweisen. Der Vorteil einer colorimetrischen Detektion ist, dass keine kostenintensiven Geräte, wie Fluoreszenzspektrometer oder Fluoreszenzmikroskop, zum Nachweis des Targets benötigt werden. Die Anwesenheit des Targets induziert einen Farbumschlag, der bereits mit bloßem Auge detektiert werden kann. Colorimetrische Aptasensoren weisen jedoch gegenüber Fluoreszenz-basierten Aptasensoren eine geringere Sensitivität auf [20].

Neben Fluoreszenz-basierten und colorimetrischen Aptasensoren sind auch einige Aptasensoren bekannt, die Chemilumineszenzsignale detektieren. Bei diesen Aptasensoren wird durch eine chemische Reaktion ein optisch detektierbares Signal erzeugt. Diese chemische Reaktion kann z. B. enzymatisch ablaufen und durch Spaltung von Substraten optisch aktive Produkte erzeugen. Bislang wurden die kleinen Targets ATP und Cocain mit Chemilumineszenz-basierten Aptasensoren detektiert [86, 93].

3.3.2.2 Elektrochemische Detektion

Elektrochemische Aptasensoren nutzen die Ausbildung der Targetbindung zur Erzeugung elektrischer Signale. Diese Aptasensoren weisen eine hohe Sensitivität und ein schnelles Antwortverhalten auf. Außerdem ermöglicht eine elektrochemische Detektion eine einfache und kosteneffektive Realisierung des Sensoraufbaus [20]. Die Erzeugung elektrischer Signale wird bei diesen Aptasensoren hauptsächlich durch die Verwendung redoxaktiver Signalmolekül (z.B. Ferrocen, Methylenblau) umgesetzt, mit denen das Aptamer modifiziert werden kann. Eine räumliche Annäherung der redoxaktiven Moleküle an eine Elektrode ermöglicht einen Elektronenfluss und somit die Erzeugung eines detektierbaren Signals. Außerdem wird in einigen elektrochemischen Aptasensoren die Ausbildung eines Aptamer-Oligonukleotid-Doppelstranges für die Verwendung interkalierender Redoxmoleküle genutzt [94, 95]. Bislang konnten die kleinen Moleküle ATP [96, 97] Adenosin [95, 98] und Cocain [15, 99, 100] mit elektrochemischen Aptasensoren nachgewiesen werden.

3.3.2.3 Massensensitive Detektion

Eine massensensitive Detektion bietet die Möglichkeit, das Zielmolekül markierungsfrei nachzuweisen. Massenänderungen auf der Sensoroberfläche, die durch die Bindung des Targets an das Aptamer entstehen, werden sensitiv detektiert. Hierzu ist keine zusätzliche Modifikation des Aptamers mit Signalmolekülen notwendig. Es wurde bislang jedoch nur eine geringe Anzahl Aptamer-basierte Biosensoren zur Bestimmung kleiner Moleküle mittels massensensitiver Detektion publiziert. Zu den am meisten verwendeten Methoden massensensitiver Detektion zählen die Oberflächenplasmonresonanz (engl. *surface plasmon resonance*, SPR) und die Quarzkristall-Mikrowaage (engl. *quartz crystal microbalance*, QCM) [20, 61].

Bei einer Aptamer-basierter Detektion mittels Oberflächenplasmonresonanz wird das Aptamer auf einer goldbeschichteten Sensoroberfläche immobilisiert und die Oberfläche mit polarisiertem, monochromatischem Licht bestrahlt. Das Licht wird an der Sensoroberfläche reflektiert. Bindet das Zielmolekül an die immobilisierten Aptamere, ändert dies die Eigenschaften der Oberfläche. Die Ausbildung der Aptamer-Target-Bindung beeinflusst somit die Reflexion des Lichtes. Das Intensitätsminimum des reflektierten Lichtes verschiebt sich proportional zur Masse der gebundenen Moleküle. Diese Oberflächeneigenschaften wurden bei der Entwicklung SPR-basierter Aptasensoren zur Detektion von Adenosin [101] und Ochratoxin A ausgenutzt [66].

Eine massensensitive Detektion ist ebenfalls durch die Verwendung einer Quarzkristall-Mikrowaage (QCM) möglich. Ein QCM-basierter Aptasensor bestimmt die Masseänderung auf der Oberfläche eines schwingenden Quarzes. Hierzu werden die Aptamere auf der Oberfläche dieses piezoelektrischen Schwingquarzes immobilisiert. Der Quarz kann durch elektrische Spannung in Schwingung versetzt werden. Ändert sich die Masse auf der Oberfläche des Quarzes, beeinflusst dies seine Schwingfrequenz. Eine Erhöhung der Masse durch die Bindung des Targets an das Aptamer, führt zu einer Abnahme der Schwingfrequenz. Diese Frequenzänderung wird von QCM-basierten Aptasensoren detektiert [20, 61]. Bislang wurde QCM-basierte Aptasensoren zur Detektion der kleinen Moleküle ATP [102, 103], Adenosin [104] und Theophyllin [105] entwickelt.

Eine Aptamer-basierte massensensitive Detektion besonders kleiner Moleküle (< 100 Da) wurde bislang jedoch noch nicht publiziert, da eine solche Detektion äußerst kleiner Targets, bedingt durch die geringen Masseänderung auf der Sensoroberfläche, nur schwierig zu realisieren ist.

3.3.3 Sensordesign von Aptasensoren

In Aptasensoren kann die Erzeugung detektierbarer Signale durch die Verwendung verschiedener Sensordesigns realisiert werden. Durch das Design eines Aptasensors wird festgelegt, wie die Faltungseigenschaften des Aptamers für die Erzeugung eines detektierbaren Signals ausgenutzt werden. Diese Sensordesigns beruhen vor allem auf der flexiblen Faltung von Aptameren. Bei der Ausbildung einer Targetbindung, geht das Aptamer konformative Strukturveränderungen ein. Diese Strukturveränderungen werden bei der Detektion des Zielmoleküls ausgenutzt. Außerdem können Aptamere auf Grund ihrer Nukleinsäurestruktur mit komplementären Oligonukleotiden hybridisieren. Kompetitive Verdrängungen dieser Oligonukleotide ermöglichen das Design weiterer Aptamer-basierter Biosensoren.

Das Design von Aptasensoren zur Detektion kleiner Moleküle basiert hauptsächlich auf den folgenden drei Methoden: Target-induzierte Strukturveränderung (TIS), Target-induzierte Dissoziation (TID) und kompetitive Bindung [63, 79]. Diese Methoden werden im Folgenden näher erläutert.

3.3.3.1 Target-induzierte Strukturveränderung

Ein Großteil der Aptamer-basierte Biosensoren zur Detektion kleiner Moleküle basiert auf dem Detektionsdesign der Target-induzierten Strukturveränderung (TIS) [79, 106]. Diese Aptasensoren nutzen die adaptiven Bindungsmechanismen vieler Aptamere aus. Bei diesen Bindungsmechanismen durchläuft das Aptamer in Anwesenheit des Targets konformative Strukturveränderungen. Das Target induziert somit Umstrukturierungen innerhalb der Aptamerfaltung. Diese strukturellen Veränderungen des Aptamers werden genutzt, um detektierbare Signale zu erzeugen. TIS-basierte Aptasensoren wandeln die Bindungsereignisse zwischen Aptamer und Target vor allem in elektrochemische und optische Signale um.

Zur Erzeugung elektrochemischer Signale wird das Aptamer auf einer Elektrode immobilisiert und mit Redoxmolekülen wie Methylenblau oder Ferrocen modifiziert (Abb. 3.9 A). Induziert das Target die Umstrukturierung der Aptamerfaltung, ändern sich ebenso die räumliche Positionierung der Redoxmoleküle. Eine räumliche Annäherung der Redoxmoleküle an die Elektrode ermöglicht einen Elektronenfluss und somit die Erzeugung eines detektierbaren Signals. TIS-basierte elektrochemische Aptasensoren wurden unter anderen zur Detektion der kleinen Moleküle ATP [96], Cocain [15, 99, 107, 108] und Tetracyclin [109] eingesetzt.

Aptamere, deren Strukturveränderungen optische Signale hervorrufen, werden auch als *structure switching signaling aptamers* bezeichnet [110]. Zu diesen Signalaptameren zählen unter anderen die Aptamer Beacons. Diese Aptamere bilden eine *Hairpin*-Struktur aus und sind am

5'- und 3'-Terminus mit Fluorophor und Quencher modifiziert. In Abwesenheit des Targets befinden sich Fluorophor und Quencher in direkter Nachbarschaft. Dies führt zu einer Auslöschung des Fluoreszenzsignals. Durch die Target-induzierte Strukturveränderung des Aptamers werden Fluorophor und Quencher räumlich getrennt, wodurch ein Fluoreszenzsignal erzeugt wird [111]. In Abhängigkeit der Aptamerfaltung, können diese Signalaptamere jedoch auch so modifiziert werden, dass die Anwesenheit des Targets eine Fluoreszenzlöschung zur Folge hat (Abb. 3.9 B). Ein TIS-basierter optischer Aptasensor wurde für die Detektion von Cocain entwickelt [112].

Für die Entwicklung TIS-basierter Aptasensoren sind jedoch Kenntnisse über die dreidimensionale Faltung des Aptamers erforderlich. Sind Faltung und Strukturveränderung des Aptamers nicht bekannt, ist eine gezielte Positionierung der Signalmoleküle (Redoxmoleküle, Fluorophore) innerhalb der Aptamersequenz nicht möglich. Der Entwicklung TIS-basierter Aptasensoren sollte somit eine Strukturanalyse der verwendeten Aptamere vorausgehen.

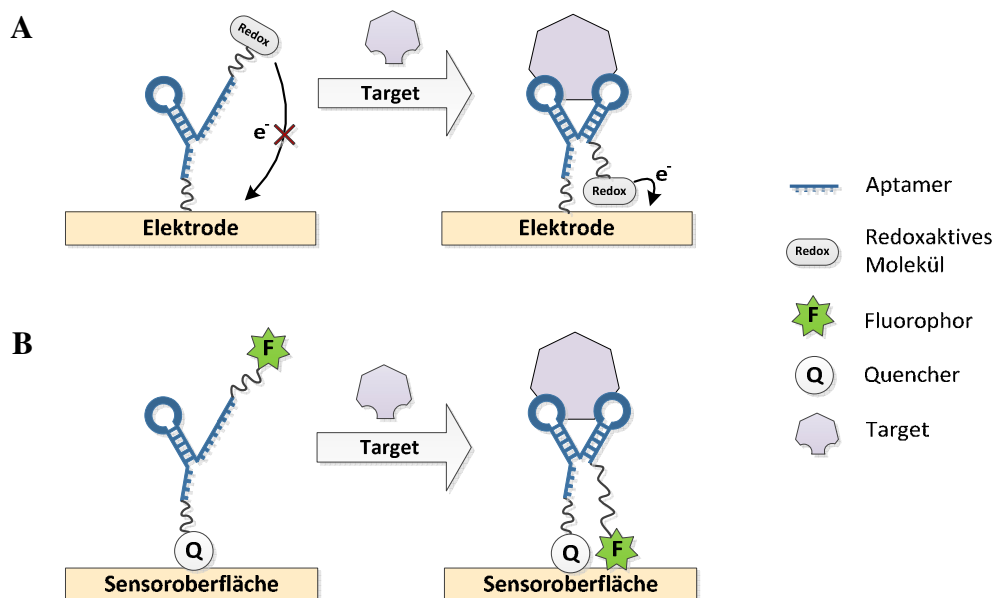


Abb. 3.9 Aptasensor, basierend auf der Methode der Target-induzierten Strukturveränderung (TIS). Die Bindung des Targets induziert konformative Strukturveränderungen innerhalb der Aptamersequenz, die zur Signalerzeugung genutzt werden. (A) Erzeugung eines elektrochemischen Signals mittels TIS. Durch die Strukturveränderung des Aptamers kann das Redoxmolekül Elektronen auf die Elektrode übertragen. (B) Optische Detektion des Targets mittels TIS. Durch die Strukturveränderung des Aptamers gelangen Fluorophor und Quencher in räumliche Nähe, sodass es zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals kommt.

3.3.3.2 Target-induzierte Dissoziation

Bei der Methode der Target-induzierte Dissoziation (TID) werden die Aptamere mit kurzen einzelsträngigen Oligonukleotiden hybridisiert. Diese Oligonukleotide sind komplementär zur Targetbindungsstelle des Aptamers und bilden mit dem Aptamer eine Duplex-Struktur aus. Bei Anwesenheit des Targets wird das Oligonukleotid verdrängt, sodass ein Aptamer-Target-Komplex entstehen kann. Das Target induziert somit die Dissoziation des komplementären Oligonukleotids.

In Aptasensoren wird die Dissoziation des Oligonukleotids vor allem optisch und elektrochemisch nachgewiesen [63, 79]. Optische Signale werden in vielen TID-basierten Aptasensoren durch die Modifikation von Aptamer oder Oligonukleotid mit Fluorophoren oder Quencher-molekülen erzielt [113-116]. Je nach Positionierung der Signalmoleküle, können mit dieser Methode „Signal-on“ oder „Signal-off“ Aptasensoren generiert werden. Die einfachste Methode zur Detektion kleiner Moleküle, ist die Verwendung Fluorophor-modifizierter Oligonukleotide. Aus der Target-induzierte Dissoziation dieser Oligonukleotide resultiert eine Abnahme des Fluoreszenzsignals. Das Target kann somit durch einen „Signal-off“ Aptasensor detektiert werden (Abb. 3.10 A). Eine zusätzliche Verwendung von Quencher-molekülen, ermöglicht außerdem das Design von „Signal-on“ Aptasensoren. Ein solcher Aptasensor wurde zur Detektion von Ochratoxin A entwickelt. Chen *et al.* (2012) verwendeten zur Detektion von Ochratoxin A Fluorophor-modifizierte Aptamere und Quencher-modifizierte Oligonukleotide. Bei der Hybridisierung von Aptamer und Oligonukleotid tritt ein Quenchingeffekt ein. Die Target-induzierte Dissoziation des Oligonukleotids hebt diese Fluoreszenzlöschung jedoch auf. Die Anwesenheit des Targets Ochratoxin A erzeugt auf diese Weise ein optisches Signal [114].

Elektrochemische Signale werden in TID-basierten Aptasensoren durch die Modifikation des Aptamers mit redoxaktiven Molekülen erzielt (Abb. 3.10 B). Die Hybridisierung von Aptamer und komplementärem Oligonukleotid kann die Ausbildung einer dreidimensionalen Aptamerfaltung verhindern. Auf diese Weise werden die Redoxmoleküle räumlich von der Elektrode getrennt, auf der das Aptamer immobilisiert ist. Durch die Target-induzierte Dissoziation des komplementären Oligonukleotids bilden sich jedoch dreidimensionale Strukturen innerhalb der Aptamersequenz aus, sodass sich Redoxmolekül und Elektrode räumlich annähern und Elektronen vom redoxaktiven Molekül auf die Elektrode übertragen werden [98, 117].

Beim Design TID-basierter Aptasensoren hat die Positionierung des Oligonukleotids innerhalb der Aptamersequenz einen entscheidenden Einfluss auf die Sensitivität des Sensors. Bin-

det das Oligonukleotid an Aptamerbereiche, die nicht an der Targetbindung beteiligt sind, induziert das Target in vielen Fällen keine Dissoziation des Oligonukleotids. Das Oligonukleotid sollte aus diesem Grund komplementäre Bereiche zur Targetbindungsstelle des Aptamers aufweisen, um eine sensitive Detektion kleiner Moleküle zu ermöglichen. Neben der Positionierung der Oligonukleotide hat auch deren Länge einen entscheidenden Einfluss auf die Detektion. Besonders kurze Oligonukleotide binden oftmals nicht spezifisch an die Aptamersequenz. Lange Oligonukleotide können hingegen mit dem Aptamer einen äußerst stabilen Komplex bilden, sodass eine Dissoziation des Oligonukleotids kaum induziert werden kann. Je nach Sequenz- und Faltungseigenschaften des Aptamers werden in TID-basierten Aptasensoren aus diesem Grund Oligonukleotide mit einer Länge von 9 bis 27 nt eingesetzt [114, 117].

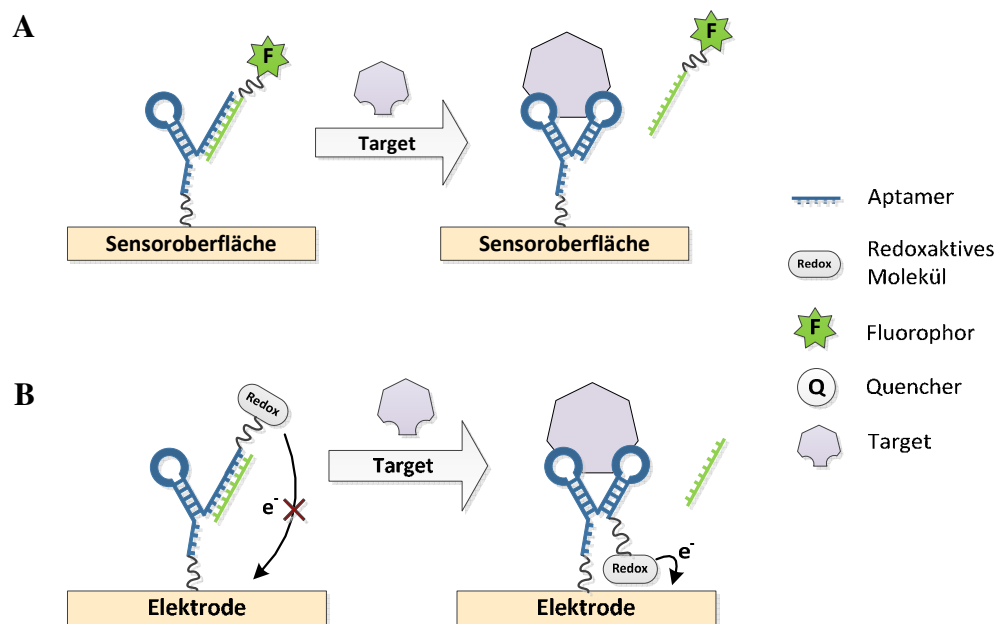


Abb. 3.10 Aptasensor, basierend auf der Methode der Target-induzierten Dissoziation (TID). Die Anwesenheit des Targets induziert die Dissoziation eines zum Aptamer komplementären Oligonukleotids. (A) Optische Detektion des Targets mittels TID: Ist das Oligonukleotid mit einem Fluorophor modifiziert, führt die Dissoziation zu einer Abnahme des optischen Signals. (B) Elektrochemische Detektion des Targets mittels TID: Die Dissoziation des Oligonukleotids ermöglicht die Faltung des Aptamers, sodass das Redoxmolekül in räumliche Nähe zur Elektrode gelangt und auf diese Elektronen übertragen kann.

3.3.3.3 Kompetitive Bindung

In einem Aptasensor, der eine kompetitive Bindungsreaktion zur Detektion des Targets verwendet, wird das Aptamer auf der Sensoroberfläche immobilisiert und das Target mit einem Signalmolekül modifiziert. Das Aptamer bildet einen Aptamer-Target-Komplex mit dem markierten Zielmolekül aus. Durch eine anschließende Inkubation des Aptamers mit unmarkierten Targetmolekülen, kommt es zu einer Kompetition zwischen markiertem und unmarkiertem Target. Die unmarkierten Moleküle binden an das Aptamer und verdrängen die markierten Targets. Diese Verdrängungsreaktion lässt sich mit Hilfe der Signalmoleküle detektieren (Abb. 3.11) [63, 79].

Bei den verwendeten Signalmolekülen kann es sich z. B. um optische Signalmoleküle wie Fluorophore oder Nanopartikel (Quantum Dots) handeln [63]. Außerdem wurden Aptasensoren veröffentlicht, bei denen ein Enzym (HRP, *horseradish peroxidase*) als Signalmolekül eingesetzt wurde. Das Enzym ist in der Lage, seine Substrate in optisch aktive Produkte zu spalten und ermöglicht somit die Detektion des Targets. Auf diese Weise konnten die Antibiotika Tetracyclin A und Oxytetracyclin mit Hilfe von Aptasensoren nachgewiesen werden [118-120].

Bei der Methode der kompetitiven Bindung ist es jedoch auch möglich, nicht das Aptamer, sondern das Target auf der Sensoroberfläche zu immobilisieren. Diese Methode wurde in Aptasensoren zur Detektion von Neomycin B und Tetracyclin angewandt [119, 121, 122].

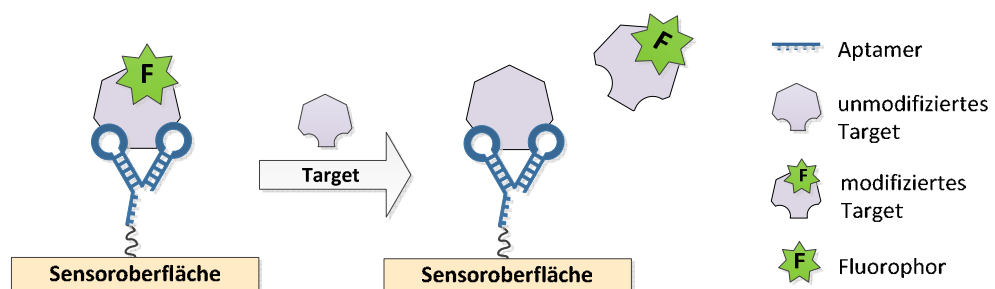


Abb. 3.11 Aptasensor, basierend auf der Methode der kompetitiven Bindung. Das modifizierte Target wird vom unmodifizierten Target verdrängt.

4 Ergebnisse und Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Detektion kleiner, flüchtiger Moleküle, sogenannter VOCs (*volatile organic compounds*). Zur Detektion dieser volatilen Moleküle wurden Aptamer-basierte Detektionsmethoden entwickelt. Aptamere sind auf Grund ihrer dreidimensionalen Faltungen in der Lage, auch besonders kleine Zielmoleküle (< 100 Da) mit hoher Affinität zu binden. Im Vergleich zu Antikörpern eignen sich Aptamere daher optimal als Fänger- und Detektionsmoleküle niedermolekularer, gering immunogener Verbindungen und bieten somit eine vielversprechende Möglichkeit zur Detektion volatiler Substanzen.

Die Aptamer-basierten Detektionsmethoden zur Bestimmung kleiner, flüchtiger Moleküle, wurden unter Verwendung eines Modellmoleküls durchgeführt. Als Modellmolekül wurde Ethanolamin eingesetzt, da Ethanolamin das kleinste, volatile Molekül darstellt, gegen das bisher ein Aptamer selektiert werden konnte.

Die Entwicklung Aptamer-basierter Detektionsmethoden sollte in dieser Arbeit sowohl in der Flüssig- als auch in der Gasphase erfolgen. Dazu wurde zunächst für Ethanolamin eine optische Detektionsmethode zum Nachweis kleiner Moleküle in Flüssigkeit entwickelt (4.1). Zum Nachweis volatiler Targets in der Gasphase wurde außerdem eine massensensitive Detektionsmethode eingesetzt (4.2). Die entwickelten Aptamer-basierten Detektionsmethoden wurden abschließend bezüglich Sensitivität, Detektionslimit und Reversibilität der Detektionsreaktion beurteilt (4.1.6, 4.2.2). Detaillierte Beschreibungen der verwendeten Materialien (A.1) und Methoden (A.2) finden sich im Anhang ab Seite 93.

4.1 Detektion von Ethanolamin in der Flüssigphase

Die Aptamer-basierte Detektion von Ethanolamin in der Flüssigphase wurde mit Hilfe optischer, Fluoreszenz-basierter Detektionsmethoden realisiert, da diese Detektionsmethoden eine hohe Sensitivität aufweisen. Durch die Verwendung optischer Signalmoleküle (Fluorophore, Quantum Dots) konnte das Bindungsereignis zwischen Aptamer und Target in detektierbare Signale umgewandelt werden. Hierzu wurde das Ethanolamin-Aptamer EA#14.3 im Microarray-Format auf einer festen Oberfläche immobilisiert. Die Entwicklung der optischen Detektionsmethoden im Microarray-Format ermöglichte eine schnelle Analyse und Optimierung der Detektionsparameter. Nach Untersuchung von Immobilisierungsschemie und Bindungseigenschaften des immobilisierten Ethanolamin-Aptamers, konnten drei unterschiedliche optische

Detektionsmethoden im Microarray-Format entwickelt werden. Diese Detektionsmethoden beruhen auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung und der Target-induzierten Dissoziation von Oligonukleotiden. Die entwickelten Detektionsmethoden wurden im Folgenden bezüglich Sensitivität, Detektionslimit und Reversibilität der Detektionsreaktion beurteilt, um eine mögliche Anwendung in Aptamer-basierten Biosensoren zur Detektion von Ethanolamin zu bewerten.

4.1.1 Immobilisierung des Aptamers im Microarray-Format

Zur Entwicklung Aptamer-basierter Detektionsmethoden im Microarray-Format, wurde das Ethanolamin-Aptamer EA#14.3 [3] (3.2.4) auf einer Glasoberfläche immobilisiert (*Forward Phase Microarray*). Auf der Glasoberfläche konnten 16 identische Microarrays aufgebracht werden. Auf diese Weise wurde eine parallele Analyse unterschiedlicher Detektionsparameter (z. B. Analytkonzentration, pH-Wert, Ionenstärke) bei geringem Materialverbrauch ermöglicht. Die optimalen Detektionsbedingungen für den Aptamer-basierten Nachweis von Ethanolamin konnten somit bestmöglich bestimmt werden. Die Immobilisierung des Aptamers auf einer festen Oberfläche ermöglicht zudem die Entwicklung regenerierbarer Microarrays. Nach erfolgter Detektion des Targets kann das immobilisierte Aptamer für einen weiteren Detektionsprozess erneut gefaltet werden.

Im Folgenden wird die Immobilisierung des Aptamers auf unterschiedlich modifizierten Oberflächen sowie der Einfluss der Immobilisierung auf Aptamerfaltung und Targetbindung näher untersucht. Diese Untersuchungen ermöglichen eine Charakterisierung und Optimierung der Aptamer-Immobilisierung für die Anwendung immobilisierter Ethanolamin-Aptamere in Microarray-basierten Detektionsmethoden.

4.1.1.1 Immobilisierungsoberfläche

Das Ethanolamin-Aptamer EA#14.3 wurde auf Aldehyd-modifizierten Glasoberflächen im Microarray-Format immobilisiert. Über einen 5'terminale Aminolinker (-NH₂) konnte das Aptamer unter Ausbildung einer Iminbindung an die Aldehydgruppen der Oberfläche gebunden werden (Abb. 4.1 A, B). Um eine effektive Immobilisierung des Aptamers zu erzielen, wurden zwei Oberflächen mit unterschiedlich langen Spacern untersucht. Verwendet wurden eine Aldehyd-modifizierte Oberfläche mit kurz-kettigen, zweidimensionalen Spacern (Arrayit Corporation) sowie eine Oberfläche mit lang-kettigen, dreidimensional verzweigten Spacern (PolyAn GmbH) (Abb. 4.1 C, D).

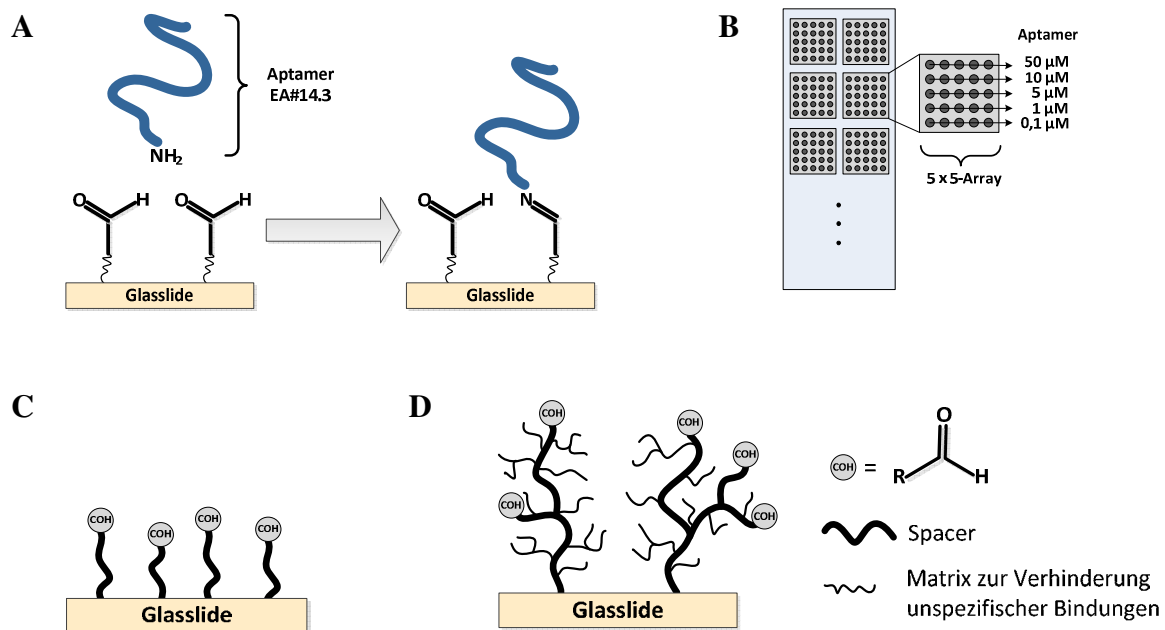


Abb. 4.1 Immobilisierung des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3 auf Aldehyd-modifizierter Glasoberfläche. (A) Immobilisierung des Aptamers über einen 5'terminalen Aminolinker. (B) Das Aptamer wurde in fünf verschiedenen Konzentrationen mit je fünf Replikaten immobilisiert. Der 5 x 5-Array konnte 16-mal auf einem Glasslide platziert werden. (C) Aldehydoberfläche mit kurzkettingen, zweidimensionalen Spacern (2D-Oberfläche). (D) Aldehydoberfläche mit langkettigen, dreidimensional verzweigten Spacern (3D-Oberfläche).

Um die Immobilisierungseffizienzen des Ethanolamin-Aptamers auf den unterschiedlichen Aldehydoberflächen untersuchen zu können, wurden Fluoreszenz-markierte Aptamere immobilisiert. Durch die gemessene Fluoreszenzintensität der Aptamere konnten die Immobilisierungseffizienzen auf den 2D- und 3D-modifizierten Oberflächen bestimmt werden.

Die 3D-Oberflächen mit langkettigen, dreidimensional verzweigten Spacern wiesen eine erhöhte Aptamer-Immobilisierung auf. Für diese Oberflächen könnten bis zu 10-fach höhere Signalintensitäten gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Es ist zu vermuten, dass die 3D-modifizierten Oberflächen auf Grund der langkettigen, verzweigten Spacer, eine erhöhte Anzahl funktioneller Aldehydgruppen pro Immobilisierungsfläche aufweisen. Dies könnte zu einer erhöhte Bindungskapazität der 3D-Oberflächen führen und die Immobilisierungseffizienz des Ethanolamin-Aptamers begünstigen. Aus diesem Grund wurden für die weiteren Microarray-Experimente die 3D-modifizierten Aldehydoberflächen verwendet.

4.1.1.2 Immobilisierungsdichte

Der Detektionsbereich einer Aptamer-basierten Nachweismethode ist abhängig von der Immobilisierungsdichte des Aptamers auf der Sensoroberfläche. Je größer die Dichte des Aptamers auf der Oberfläche, desto größer ist im Allgemeinen der dynamische Bereich eines Aptasensors. Aus diesem Grund sollte eine möglichst hohe Immobilisierungsdichte für das Ethanolamin-Aptamers erzielt werden. Die maximale Bindungskapazität der Oberfläche wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR[®] Green II bestimmt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet spezifisch an die einzelsträngigen Nukleinsäurestrukturen des Aptamers. Die Fluoreszenzintensität des gebundenen SYBR[®] Green II-Farbstoffes kann somit als proportional zur Anzahl der immobilisierten Aptamere angesehen werden. Zur Bestimmung der maximalen Immobilisierungsdichte wurde das Ethanolamin-Aptamer mit Konzentrationen bis zu 100 μM auf dem Glasslide immobilisiert. Bei einer Aptamerkonzentration von 50 μM konnte eine vollständige Sättigung der Glasoberfläche mit immobilisierten Aptameren beobachtet werden (Abb. 4.2). Für die folgenden Microarray-Versuche zur Detektion von Ethanolamin wurden somit Aptamerkonzentrationen bis maximal 50 μM eingesetzt.

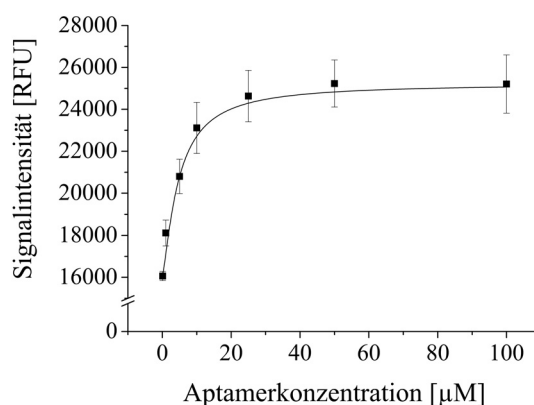


Abb. 4.2 Bestimmung der maximalen Immobilisierungsdichte des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3 auf einer 3D-Aldehyd-Oberfläche. Die Immobilisierungsdichte wurde mit Hilfe des ssDNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR[®] Green II gemessen.

4.1.1.3 Aptamerfunktionalität nach Immobilisierung

Die Sensitivität einer Aptamer-basierten Detektionsmethode ist unter anderem abhängig von der Funktionalität der verwendeten Aptamere. Werden die Aptamere für die Detektion von Ethanolamin auf einer festen Oberfläche immobilisiert, kann dies jedoch ihre Funktionalität beeinträchtigen. Durch eine Aptamerimmobilisierung können sterische Hinderungen zwischen Aptamer und Oberfläche auftreten. Zudem sind bei einer zu hohen Immobilisierungs-

dichte Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Aptermolekülen denkbar. Durch diese sterischen Hinderungen und unspezifischen Wechselwirkungen wird die Ausbildung dreidimensionaler Aptamerstrukturen beeinträchtigt. Diese Aptamerfaltungen sind jedoch essentiell für die Targetbindung. Eine Beeinträchtigung der Aptamerfaltung hat somit eine Verringerung der Aptamerfunktionalität zur Folge.

Aus diesem Grund wurde die Aptamerfunktionalität des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3 nach Immobilisierung auf einer 3D-Aldehydoberfläche untersucht. Es sollte festgestellt werden, ob das Ethanolamin-Aptamer auch nach Immobilisierung in der Lage ist, das Target zu erkennen und zu binden. Hierzu wurde eine Bindungskurve mit Quantum Dot-markiertem Ethanolamin (QD-EA) aufgenommen. Die Aptamere V7t1 gegen VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) [123] und 6H7 gegen His Tags [124] wurden als Negativkontrollen eingesetzt, um die Bindungsspezifität des immobilisierten Ethanolamin-Aptamers EA#14.3 zu verdeutlichen (Abb. 4.3).

Anhand der Aptamer-Target-Bindungskurve konnte eine effektive Bindung von Ethanolamin durch das Aptamer EA#14.3 nachgewiesen werden. Die Aptamere V7t1 und 6H7 zeigten nur geringe unspezifische Bindungen des Targets QD-EA. Wie das Ethanolamin-Aptamer, bildet auch V7t1 eine G-Quadruplexstruktur zur Targetbindung aus [125]. Für das Aptamer 6H7 konnte mit Hilfe des G-Quadruplex Analyse Tools „QGRS Mapper“ [126] ebenfalls ein G-Quadruplex-ausbildender Aptamerbereich ermittelt werden. Die unspezifischen Bindungen von QD-EA an die Aptamere V7t1 und 6H7 könnten auf diese strukturellen Ähnlichkeiten zum Ethanolamin-Aptamer EA#14.3 zurückzuführen sein.

Insgesamt zeigte das Ethanolamin-Aptamer EA#14.3 jedoch die effektivste Bindung von Quantum Dot-modifiziertem Ethanolamin. Die Immobilisierung des Ethanolamin-Aptamers auf einer 3D-modifizierten Aldehydoberfläche hat somit keinen negativen Einfluss auf die Ausbildung der Targetbindung. Das Aptamer wird bei der Ausbildung dreidimensionaler Strukturen von sterischen Hinderungen oder unspezifischen Wechselwirkungen nicht wesentlich beeinträchtigt. Somit ist die Funktionalität des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3 auch nach Immobilisierung gewährleistet.

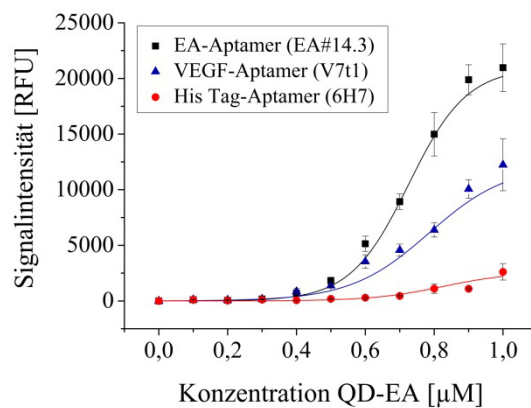


Abb. 4.3 Untersuchung der Aptamerfunktionalität nach Immobilisierung. Zur Bestimmung der Aptamer-Target-Bindung wurde das Target Ethanolamin mit Quantum Dots Fluoreszenzmarkiert (QD-EA) und eine Aptamer-Target-Bindungskurve aufgenommen. Das VEGF-Aptamer (V7t1) und das His Tag-Aptamer (6H7) wurden als Negativkontrolle eingesetzt, um die Bindungsspezifität des immobilisierten Ethanolamin-Aptamers EA#14.3 zu verdeutlichen. Alle Aptamere wurden mit maximal möglicher Immobilisierungsdichte ($50 \mu\text{M}$) auf einem Glsträger immobilisiert.

4.1.1.4 Zusammenfassung Immobilisierung des Aptamers

Die Aptamer-basierten Methoden zur Detektion von Ethanolamin sollten hauptsächlich im Microarray-Format durchgeführt werden, da dieses Format eine bestmögliche Optimierung der Detektionsparameter ermöglicht. Zur Realisierung eines *Forward Phase* Microarrays wurde das Ethanolamin-Aptamer EA#14.3 auf einer Glasoberfläche immobilisiert. Eine besonders effektive Immobilisierung des Aptamers konnte auf einer Aldehyd-modifizierten Oberfläche mit langkettigen, dreidimensional verzweigten Spacern erzielt werden. Um einen möglichst großen dynamischen Detektionsbereich beim Aptamer-basierten Nachweis von Ethanolamin erzielen zu können, wurde die maximale Immobilisierungsdichte des Aptamers auf der Oberfläche bestimmt. Diese Immobilisierungsdichte wird erreicht, wenn das Aptamer mit einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ auf das Trägermaterial aufgebracht wird. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Funktionalität des Aptamers durch die Immobilisierung nicht wesentlich beeinträchtigt wird. Selbst bei maximaler Immobilisierungsdichte wurde die Ausbildung einer Aptamer-Target-Bindung gemessen. Eine Verwendung immobilisierter Ethanolamin-Aptamere zur Detektion von Ethanolamin ist somit realisierbar, sodass im Folgenden drei unterschiedliche optische Detektionsmethoden im Microarray-Format entwickelt und untersucht wurden.

4.1.2 Detektionsmethode I: Kompetitive Bindung

Die Aptamer-basierte Detektion des kleinen Moleküls Ethanolamin wurde zunächst mit Hilfe einer kompetitiven Bindungsreaktion durchgeführt. Diese Detektionsstrategie beruht auf der Verdrängung fluoreszenzmarkierter Ethanolamin-Moleküle durch unmodifiziertes Ethanolamin. Zur Fluoreszenzmarkierung von Ethanolamin wurden Quantum Dots (QD) eingesetzt. QDs weisen im Vergleich zu herkömmlichen Fluorophoren eine höhere Photostabilität auf. Bei der Detektion von Ethanolamin mittels kompetitiver Bindung wurde das immobilisierte Aptamer EA#14.3 zunächst mit QD-modifizierten Ethanolamin-Molekülen (QD-EA) inkubiert, sodass sich ein Aptamer-Target-Komplex ausbilden konnte. Durch Zugabe von unmodifiziertem Ethanolamin (EA) kam es zur kompetitiven Bindungsreaktion der Targets EA und QD-EA am Aptamer. Bei Verdrängung von QD-EA durch unmodifiziertes Ethanolamin konnte das Target Ethanolamin über eine Abnahme in Fluoreszenzintensität detektiert werden (Abb. 4.4)

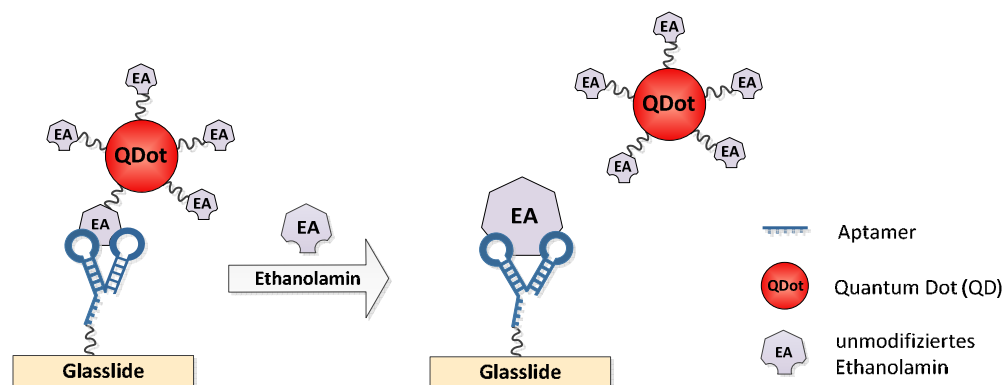


Abb. 4.4 Aptamer-basierte Detektion von Ethanolamin mittels kompetitiver Bindung. QD-modifizierte Ethanolamin-Moleküle (QD-EA) bilden mit dem Aptamer einen Komplex. Die Ausbildung des Komplexes kann über das Fluoreszenzsignal der Quantum Dots detektiert werden. Bei Zugabe von unmodifiziertem Ethanolamin wird das QD-EA verdrängt, sodass Ethanolamin über die Abnahme der Signalintensität detektiert wird.

4.1.2.1 Detektion von Ethanolamin

Mit der Aptamer-basierten Detektionsmethode der kompetitiven Bindung konnte Ethanolamin über die Abnahme der Fluoreszenzintensität bestimmt werden. Bei Anwesenheit von Ethanolamin wurde eine eindeutige Signaländerung durch die Verdrängung Quantum Dot-modifizierter Ethanolamin-Moleküle detektiert (Abb. 4.5). Die ermittelten Signaländerungen konnten jedoch nur mit einer geringen Genauigkeit reproduziert werden. Auf Grund hoher Signalschwankungen bei der Detektion einer definierten Ethanolaminkonzentration

wurden Standardabweichungen von bis zu 20 % der Signalwerte erzielt. Eine quantitative Bestimmung von Ethanolamin ist mit dieser Detektionsmethode bedingt durch eine unzureichende Reproduzierbarkeit der Messergebnisse somit nur begrenzt möglich.

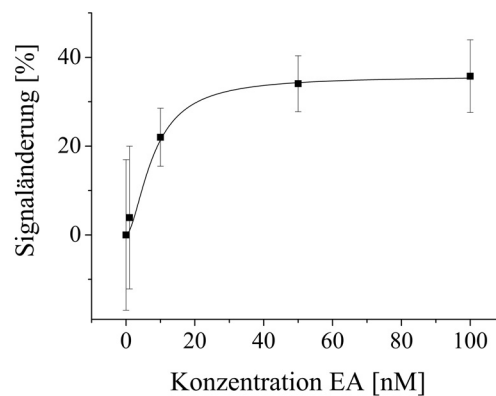


Abb. 4.5 Prozentuale Signaländerung bei der Aptamer-basierten Detektion von Ethanolamin mittels kompetitiver Bindung Quantum Dot-modifizierter Ethanolamin-Moleküle. Die Signaländerung stellt die Abnahme des Fluoreszenzsignals durch die Verdrängung dar.

Die hohen Standardabweichungen bei der Detektion von Ethanolamin sind möglicherweise auf multivalente Bindungen zwischen Aptamer und QD-modifiziertem Ethanolamin zurückzuführen. Auf der Oberfläche eines jeden Quantum Dots wurde eine Vielzahl von Ethanolamin-Molekülen gebunden. Daher ist anzunehmen, dass jedes modifizierte Quantum Dot an der Entstehung mehrerer Aptamer-Target-Komplexen beteiligt ist (Abb. 4.6). Diese multiple Bindung des Quantum Dots an die Ethanolamin-Aptamere erschwert dessen vollständige Dissoziation. Erst bei vollständiger Verdrängung aller auf der Oberfläche des Quantum Dots gebundenen Ethanolamin-Molekülen aus den Aptamer-Target-Komplexen kann das modifizierte Quantum Dot dissoziieren, sodass eine Signaländerung detektiert werden kann. Je höher die Anzahl der multiplen Bindungen eines modifizierten Quantum Dots, desto höhere Konzentrationen unmodifizierten Ethanolamins werden benötigt, um eine vollständige Dissoziation des Quantum Dots zu induzieren. Vermutlich variiert die Anzahl dieser multiplen Bindungen zwischen Aptamer und modifiziertem Quantum Dot je nach Faltung und Orientierung der Aptamere, wodurch die hohen Signalschwankungen bei der Detektion von Ethanolamin zu begründen wären.

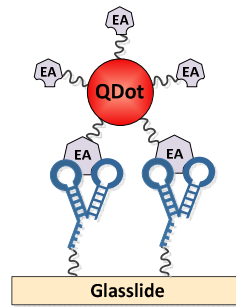


Abb. 4.6 Multiple Ausbildung eines Aptamer-Target-Komplexes bei der Verwendung von Quantum Dot-modifiziertem Ethanalamine bei der kompetitiven Bindung von Ethanalamine.

Ein weiterer Nachteil dieser Aptamer-basierten Detektionsmethode ist die zeitintensive Herstellung und Aufreinigung von QD-modifiziertem Ethanalamine vor dem Detektionsprozess. Ethanalamine-Moleküle, die bei der Herstellung von QD-EA ungebunden bleiben, müssen vollständig aus der Detektionslösung abgetrennt werden, um die kompetitive Bindungsreaktion nicht zu beeinflussen.

Die Aptamer-basierte Detektionsmethode der kompetitiven Bindung eignet sich somit nur bedingt zur Detektion von Ethanalamine. Auf Grund der detektierten Signaländerung bei Anwesenheit von Ethanalamine ist ein qualitativer Nachweis des Zielmoleküls möglich. Quantitative Bestimmungen von Ethanalamine können mit dieser Detektionsmethode jedoch nicht realisiert werden. Aus diesem Grund wurde diese Detektionsmethode nicht weitergehend untersucht.

4.1.3 Detektionsmethode IIa: TID mit FRET-basierter Detektion (TID/FRET)

Für die Detektion von Ethanalamine wurde eine weitere optische Detektionsmethode entwickelt, die auf dem Detektionsdesign der Target-induzierten Dissoziation (TID) (3.3.3.2) von Oligonukleotiden beruht. Die Erzeugung eines optischen Signals wurde mit Hilfe einer FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer)-basierten Detektion realisiert. Diese Detektionsmöglichkeit nutzt die Energieübertragung innerhalb eines Donor/Akzeptor-Paares (Fluorophor/Quencher), um eine Auslöschung des optischen Donorsignals, das sogenannte Quenching, hervorzurufen.

Bei der entwickelten FRET-basierten Detektionsmethode wurden das Ethanalamine-Aptamer EA#14.3 mit einem Fluorophor (Cy3) und das zur TID benötigte komplementäre Oligonukleotid mit einem Quencher-molekül (BHQ-2) modifiziert. Durch die Hybridisierung von Fluorophor-modifiziertem Aptamer und Quencher-modifiziertem Oligonukleotid gelangen Fluorophor-

rophor und Quencher in räumliche Nähe zueinander. Auf diese Weise konnte das Fluoreszenzsignal des Aptamers gequencht werden.

Bei Anwesenheit von Ethanolamin dissoziierte das Oligonukleotid vom Aptamer, sodass sich ein Aptamer-Ethanolamin-Komplex ausbilden konnte. Die Target-induzierte Dissoziation des Quencher-modifizierten Oligonukleotids erzielte somit eine räumliche Trennung von Fluorophor und Quencher-molekül. Auf diese Weise wurde bei Anwesenheit von Ethanolamin vom Fluorophor ein optisch detektierbares Signal emittiert. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals durch die Ausbildung der Aptamer-Target-Bindung konnte somit genutzt werden, um das Target Ethanolamin optisch nachzuweisen (Abb. 4.7).

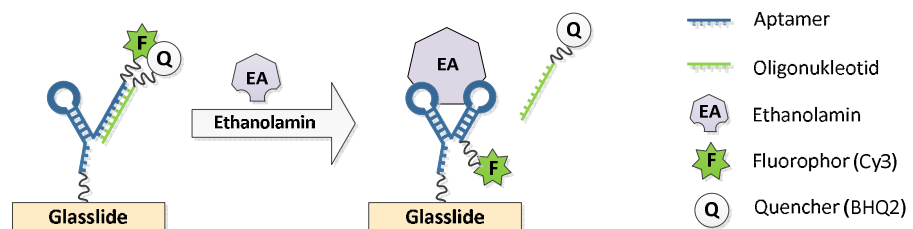


Abb. 4.7 Target-induzierte Dissoziation (TID) mit FRET-basierter Detektion zum Nachweis von Ethanolamin. Die Hybridisierung des Quencher-modifizierten Oligonukleotids an das Fluoreszenz-modifizierte Aptamer führt zu einer Fluoreszenzlöschung. Die Anwesenheit des Targets induziert eine Dissoziation des Oligonukleotids, wodurch die Fluoreszenzlöschung aufgehoben wird. Ein optisches Signal kann detektiert werden.

Die Detektionsmethode der Target-induzierten Dissoziation mit FRET-basierter Detektion zur Bestimmung von Ethanolamin wurde zunächst für nicht-immobilisierte Ethanolamin-Aptamere etabliert. Auf diese Weise konnte das Quenching des Aptamers mit komplementären Oligonukleotiden sowie die Aptamer-Target-Bindung untersucht werden, ohne die Einflüsse der Aptamer-Immobilisierung berücksichtigen zu müssen. Nach Entwicklung der Detektionsmethode wurde diese Methode auf immobilisierte Aptamere angewandt, um eine Detektion von Ethanolamin im Microarray-Format zu ermöglichen.

4.1.3.1 Verwendetes komplementäres Oligonukleotid

Um ein effizientes Quenching zwischen Fluorophor-modifiziertem Aptamer und Quencher-modifiziertem Oligonukleotid erzielen zu können, ist die Wahl des Fluorophor/Quencher-Paares von entscheidender Bedeutung. Für die FRET-basierte Detektion wurde das Donor/Akzeptor-Paar Cy3/BHQ-2 gewählt, da sich das Emissionsspektrum von Cy3 (Emissionsmaximum 570 nm) und das Absorptionsspektrum von BHQ-2 (Absorptionsmaxi-

mum 580 nm) optimal überlagern, sodass ein effizienter Energietransfer und eine optimale Fluoreszenzlöschung möglich sind. Zudem handelt es sich bei dem Quencher BHQ-2 um einen Dark Quencher, der die Energie des Fluorophores nicht-emissiv absorbiert. Der Black Hole Quencher 2 wandelt die übertragene Energie in Wärmeenergie um, sodass eine vollständige Fluoreszenzlöschung herbeigeführt werden kann.

Neben der Wahl eines geeigneten Quencher-moleküls, ist die Effizienz der Fluoreszenzlöschung am Aptamer außerdem von der Länge des Oligonukleotids abhängig. Die Länge des komplementären Oligonukleotids beeinflusst die Bindungsstärke zum Aptamer. Je länger das Oligonukleotid und je höher ist die Anzahl komplementärer Basenpaarungen, desto höher ist die Affinität zwischen Aptamer und Oligonukleotid. Eine hohe Affinität zwischen Aptamer und Oligonukleotid verringert die Dissoziationsrate der Moleküle und begünstigt somit ein effizientes Quenching.

Für die Durchführung der FRET-basierten Detektion von Ethanolamin ist jedoch eine Dissoziation des Oligonukleotids nach der Hybridisierung an das Aptamer erforderlich (Abb. 4.7). Aus diesem Grund sollte für die Durchführung der TID mit FRET-basierter Detektion kein übermäßig langes Oligonukleotid verwendet werden. Laut Literaturangaben ist eine effiziente Bindung und Dissoziation mit einem Oligonukleotid der Länge 12 nt möglich [113, 115, 127]. Aus diesem Grund wurde für die Aptamer-basierte Detektion von Ethanolamin mittels TID-Methode das komplementäre Oligonukleotid 12-BHQ2 mit einer Länge von 12 Nukleotiden gewählt (Abb. 4.8). Für das Ethanolamin-Aptamer EA#14.3 sind Länge und Positionierung der Targetbindungsstelle innerhalb der Aptamersequenz bekannt [77], sodass das komplementäre Oligonukleotid innerhalb des Target-bindenden Aptamerbereichs platziert werden konnte. Dieser 16 Nukleotide lange Aptamerbereich bildet eine G-Quadruplexstruktur zur Targetbindung aus (3.2.4)

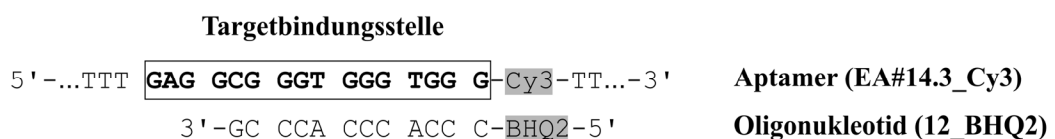


Abb. 4.8 Hybridisierung von Fluorophor-markiertem Aptamer EA#14.3_Cy3 und Quencher-modifiziertem Oligonukleotid 12_BHQ2. Das Oligonukleotid ist komplementär zur Targetbindungsstelle des Aptamers. Das Aptamer wurde mit dem Fluorophor Cyanin 3 (Cy3) und das Oligonukleotid mit einem Black Hole Quencher 2 (BHQ-2) modifiziert.

4.1.3.2 Quenching durch komplementäres Oligonukleotid

Diese Aptamer-basierte Detektion von Ethanolamin beruht auf dem Quenching eines Fluoreszenz-modifizierten Aptamers. Je effektiver das Quenching des Aptamers, desto größer ist der Signalunterschied zwischen gequenchem und ungequenchem Signal. Eine hohe Signaldifferenz zwischen diesen beiden Zuständen ermöglicht eine sensitive Detektion von Ethanolamin. Aus diesem Grund soll für die Entwicklung dieser FRET-basierten Detektionsmethode zunächst das Quenching zwischen Fluorophor-modifiziertem Aptamer (EA#14.3_Cy3) und Quencher-modifiziertem Oligonukleotid (12-BHQ2) optimiert werden.

Einfluss auf die Hybridisierung zwischen Aptamer und Oligonukleotid und somit auch auf das Quenching des Aptamersignals, hat vor allem die ionische Zusammensetzung Bindungspuffers. Die Hybridisierungsversuche wurden zunächst im Bindungspuffer (BP) des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3 durchgeführt. Dieser Puffer wurde von Mann *et al.* [3] für die *in vitro*-Selektion des Aptamers eingesetzt. Unter Verwendung dieses Bindungspuffers konnte das Fluoreszenzsignal des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3_Cy3 durch das Quenching mittels Oligonukleotid 12_BHQ2 lediglich um 25 % verringert werden. Eine Veränderung der ionischen Zusammensetzung des Bindungspuffers BP, ermöglichte jedoch eine deutliche Erhöhung der DNA-Hybridisierung. Die Entfernung der Ionen K^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} aus dem Bindungspuffer ermöglichte eine verbesserte Hybridisierung zwischen Aptamer und Oligonukleotid. Diese Beobachtungen können durch auftretende Aptamerfaltungen begründet werden. Die Ionen K^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} begünstigen und stabilisieren die Ausbildung einer dreidimensionalen Aptamerfaltung, bei der das Ethanolamin-Aptamer EA#14.3 eine G-Quadruplex ausbildet. Diese Faltung beeinträchtigt jedoch die Hybridisierung des Aptamers mit dem komplementären Oligonukleotid. Durch die Reduktion des Bindungspuffer um K^+ -, Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen, wird der ungefaltete Zustand des Ethanolamin-Aptamers begünstigt und somit eine Hybridisierung zwischen Aptamer und Oligonukleotid erleichtert. Unter Verwendung von BP(-) als Reaktionspuffer konnte auf diese Weise die DNA-Hybridisierung um ca. 20 % verbessert werden. Dieser optimierte Bindungspuffer wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit mit BP(-) bezeichnet. Unter Verwendung der Bindungspuffers BP(-) wurde das Fluoreszenzsignal des Ethanolamin-Aptamers mit Hilfe des Oligonukleotids 12_BHQ2 um ~ 43 % gequencht (Abb. 4.9).

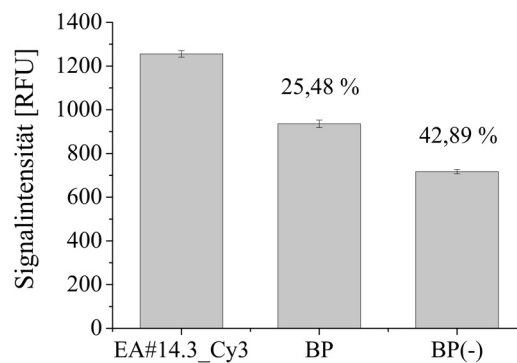


Abb. 4.9 Quenching des Aptamersignals von EA#14.3_Cy3 durch das Quencher-modifizierte Oligonukleotid 12_BHQ2 durchgeführt in Bindungspuffer des Aptamers EA#14.3 (BP) und in Bindungspuffer, reduziert um K^+ , Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen (BP(-)). Das molare Verhältnis von Aptamer und Oligonukleotid beträgt 1:1. Das Fluoreszenzsignal des Aptamers EA#14.3_Cy3 wird als Referenz gezeigt. Die prozentualen Werte des Quenching sind oberhalb des Balkendiagramms angegeben.

Neben der Zusammensetzung des Bindungspuffers ist auch das molare Verhältnis zwischen Aptamer und Oligonukleotid ausschlaggebend für eine effiziente Hybridisierung dieser Moleküle. Ein Überschuss an Oligonukleotid-Molekülen verschiebt das Reaktionsgleichgewicht der Hybridisierungsreaktion in Richtung des Aptamer-Oligonukleotid-Komplexes und erhöht somit das Quenching des Aptamersignals. Zur Optimierung des Quenchings zwischen Fluorophor-modifiziertem Aptamer (EA#14.3_Cy3) und Quencher-modifiziertem Oligonukleotid (12-BHQ2) wurden aus diesem Grund molare Verhältnisse von Aptamer zu Oligonukleotid von 1:1 bis 1:5 untersucht (Abb. 4.10). Durch eine Verdopplung der Oligonukleotidkonzentration (molares Verhältnis 1:2) konnte die Hybridisierung zwischen Aptamer und Oligonukleotid erhöht und somit das Aptamersignal um 55 % gequenchet werden. Weitere Erhöhungen der Oligonukleotidkonzentration (molare Verhältnisse 1:3 bis 1:5) zeigten jedoch keine weitere Optimierung der Quenchingreaktion. Es ist anzunehmen, dass die Ausbildung dreidimensionaler Aptamerstrukturen eine vollständige Hybridisierung der Aptamere mit komplementären Oligonukleotiden verhindert und somit das Aptamersignal nicht vollständig gequenchet wird.

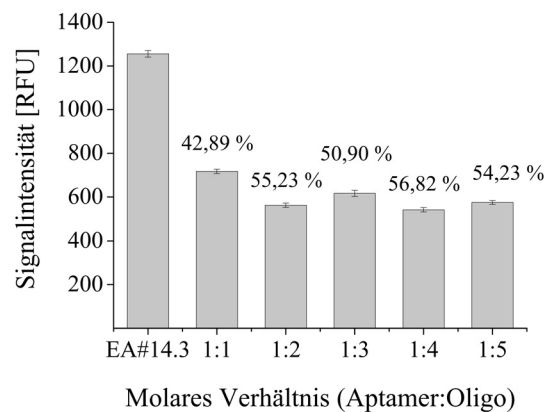


Abb. 4.10 Quenching des Aptamersignals von EA#14.3_Cy3 durch das Quencher-modifizierte Oligonukleotid 12_BHQ2 bei unterschiedlichen molaren Verhältnissen von Aptamer zu Oligonukleotid. Das Fluoreszenzsignal des Aptamers EA#14.3 wird als Referenz gezeigt. Die Messungen wurden mit einer Aptamerkonzentration von 50 nM im Bindungspuffer BP(-) durchgeführt. Die prozentualen Werte des Quenching sind oberhalb des Balkendiagramms angegeben.

Nach Optimierung des Bindungspuffers und des molaren Aptamer-zu-Oligonukleotid-Verhältnisses konnte das Fluoreszenzsignal des Aptamers EA#14.3_Cy3 insgesamt um ~ 55 % gequenchet werden. Ein 100 %-iges Quenching des Aptamersignals wurde durch die Hybridisierung zwischen Aptamer und komplementärem Oligonukleotid 12_BHQ2 jedoch nicht erzielt. Dies ist zum einen durch die Eigenschaften des Oligonukleotids zu begründen. Das komplementäre Oligonukleotid 12_BHQ2 weist mit einer Länge von 12 Nukleotiden nur eine vergleichsweise geringe Affinität zum Aptamer auf. Auf Grund der geringen Länge von 12_BHQ2 sind Dissoziationsreaktionen aus dem Aptamer-Oligonukleotid-Komplex denkbar. Der Einfluss der Oligonukleotidlänge auf das Quenching des Aptamersignals wurde daher mit Hilfe eines verlängerten Quencher-modifizierten Oligonukleotids untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das Aptamersignal unter Verwendung eines um 4 Nukleotiden verlängerten Oligonukleotids 10 % stärker gequenchet wurde, als mit 12_BHQ2.

Bei der Durchführung der FRET-basierten Detektion von Ethanolamin ist die Ausbildung eines äußerst stabilen Aptamer-Oligonukleotid-Komplexes jedoch nicht geeignet, da für die Detektion von Ethanolamin eine Dissoziation des Oligonukleotids nach der Hybridisierung an das Aptamer erforderlich ist. Laut Literaturangaben ist eine effiziente Bindung und Dissoziation mit einem Oligonukleotid der Länge 12 nt möglich [113, 115, 127]. Aus diesem Grund wurde für die FRET-basierte Detektion weiterhin das Oligonukleotid 12_BHQ2 verwendet.

Neben der Länge des Oligonukleotids könnten auch die Aptamereigenschaften Einfluss auf die Effizienz des Quenchings haben. Trotz Optimierung des Bindungspuffers durch Entfernung der Ionen, die interne Aptamerstrukturen stabilisieren, kann das Aptamer dreidimensionale Strukturen ausbilden. Diese Aptamerstrukturen beeinträchtigen die Hybridisierung des komplementären Oligonukleotids und verringern somit das Quenching des Aptamersignals.

4.1.3.3 Detektion von Ethanolamin

Die Target-induzierte Dissoziation mit FRET-basierter Detektion erfolgte in einem zweistufigen Reaktionsprozess: (1) Quenchingreaktion durch Hybridisierung von Aptamer und Oligonukleotid (Entstehung Aptamer-Oligonukleotid-Komplex), (2) Dissoziationsreaktion des Oligonukleotids durch Zugabe von Ethanolamin (Entstehung Aptamer-Ethanolamin-Komplex). Zur Detektion von Ethanolamin wurde bei dieser Detektionsmethode der Signalanstieg zwischen dem Quenching- und Dissoziationsreaktion bestimmt (Abb. 4.11). Auf diese Weise konnte ein Nachweis des Targets Ethanolamin mittels „Signal on“ Detektion realisiert werden. Zur Vereinfachung wird diese Detektionsmethode im weiteren Verlauf der Arbeit mit „TID/FRET“ bezeichnet

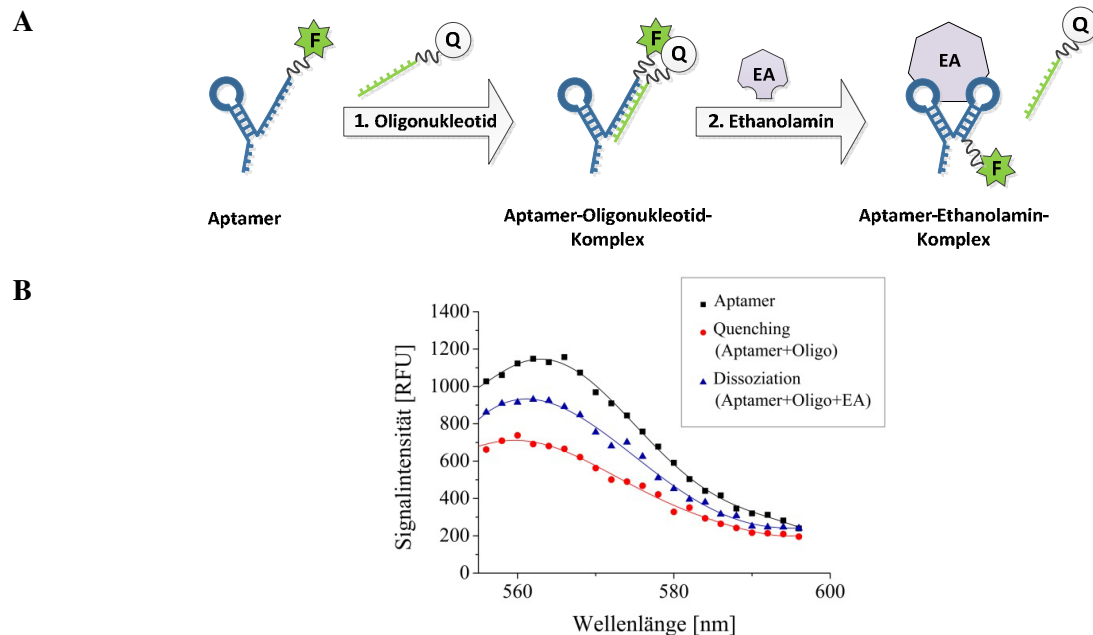


Abb. 4.11 (A) Detektionsmethode der Target-induzierten Dissoziation mit FRET-basierter Detektion (TID/FRET). (B) Fluoreszenzspektren des Aptamers EA#14.3_Cy3 bei Anwesenheit des komplementären Oligonukleotids (Quenching) und bei Anwesenheit von Ethanolamin (Dissoziation). Die molaren Verhältnisse von Aptamer, Oligonukleotid und Ethanolamin betragen 1:1:1 (50 nM).

Die Hybridisierung zwischen Aptamer und Oligonukleotid (Quenching) konnte unter Verwendung des K^+ -, Ca^{2+} - und Mg^{2+} -ionenreduzierten Bindungspuffers BP(-) optimiert werden (4.1.3.2), sodass BP(-) als Reaktionspuffer für den gesamten Detektionsprozess verwendet wurde. Unter diesen Bedingungen wurde mittels TID/FRET-Detektion bei einer Ethanolaminkonzentration von 50 nM ein maximaler Signalanstieg zwischen Quenching- und Dissoziationsreaktion von ~ 27 % detektiert (Abb. 4.12).

Auch bei Erhöhung der Ethanolaminkonzentration auf 500 nM (molares Verhältnis Aptamer:Oligonukleotid:EA 1:1:10) konnte durch Ethanolamin jedoch keine vollständige Dissoziation der Oligonukleotide vom Aptamer induzieren. Diese geringe Dissoziation der Oligonukleotide könnte auf die ionische Zusammensetzung des Reaktionspuffers zurückzuführen sein. Bei der Verwendung des Reaktionspuffers BP(-) ist zu beachten, dass die Entfernung der Ionen K^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} aus dem Bindungspuffer BP die Ausbildung der dreidimensionalen Aptamerfaltung und somit der Targetbindung zwischen Aptamer und Ethanolamin beeinträchtigen könnte. Eine daraus resultierende verminderte Targetbindung würde zu einer geringeren Target-induzierten Dissoziation der Oligonukleotide führen.

Aus diesem Grund wurde die Detektion von Ethanolamin mittels TID/FRET-Methode außerdem bei Anwesenheit von K^+ -, Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen (Reaktionspuffer BP) durchgeführt (Abb. 4.12, Tab. 4.1).

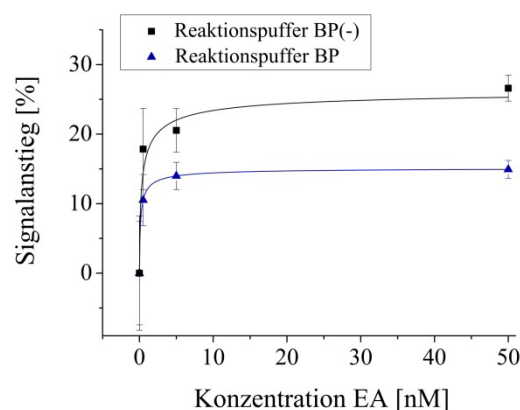


Abb. 4.12 Aptamer-basierte Detektion von Ethanolamin (EA) mittels TID/FRET-Methode durchgeführt in Bindungspuffer des Aptamers EA#14.3 (BP) und in Bindungspuffer, reduziert um K^+ -, Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen (BP(-)). Bei Abwesenheit von Ethanolamin wird das Aptamersignal von EA#14.3_Cy3 durch das komplementäre Oligonukleotid 12_BHQ2 gequenchet. Bei Zugabe von Ethanolamin dissoziiert 12_BHQ2 vom Aptamer. Durchgeführt mit einem molaren Verhältnis zwischen Aptamer und Oligonukleotid von 1:1.

Auch durch die Veränderung der ionischen Zusammensetzung des Reaktionspuffers konnte keine vollständige Verdrängung der Oligonukleotide erzielt werden. Bei Anwesenheit von Ethanolamin wurde ein Signalanstieg zwischen Quenching- und Dissoziationsreaktion von nur 15 % detektiert. Dieser geringe Signalanstieg ist vor allem durch das verringerte Quenching zwischen Aptamer und Oligonukleotid zu begründen. Wie in 4.1.3.2 gezeigt, wurde die Hybridisierung des Oligonukleotids an das Aptamer durch die Verwendung des Reaktionspuffers BP beeinträchtigt. Ist aus diesem Grund nur ein geringer Anteil der eingesetzten Oligonukleotide an ein Aptamer gebunden, fällt die Signaldifferenz zwischen gequenchem und umgequenchem Aptamersignal nur gering aus.

Um die unterschiedlichen Reaktionspuffer BP und BP(-) für die Anwendung bei der Aptamer-basierten Detektion von Ethanolamin eindeutig beurteilen zu können, wurde die Sensitivität der TID/FRET-Detektion betrachtet.

Die Sensitivität beschreibt die Empfindlichkeit einer Detektionsmethode gegenüber kleinen Targetkonzentrationen und wurde in dieser Arbeit für die Aptamer-basierten Detektionsmethoden mit Hilfe des K_{25} -Werts und des K_{75} -Wertes abgeschätzt. Der K_{25} -Wert gibt die Konzentration von Ethanolamin an, bei der 25 % des maximalen Signalanstiegs erreicht wurde. Je geringer der K_{25} -Wert, desto höher die Sensitivität der Detektionsmethode. Der K_{75} -Wert gibt die Konzentration von Ethanolamin an, bei der 75 % des maximalen Signalanstiegs erreicht wurde. Je größer der K_{75} -Wert, desto größer ist der Konzentrationsbereich von Ethanolamin, in dem ein Anstieg der Signalintensität detektiert werden kann. Somit lässt sich mit Hilfe des K_{75} -Wertes der Konzentrationsbereich abschätzen, in dem eine Ethanolamin-Detektion möglich ist.

Tab. 4.1 Vergleich der TID/FRET-basierten Detektion von Ethanolamin im Reaktionspuffer BP (Bindungspuffer des Aptamers EA#14.3) und BP(-) (BP reduziert um K^+ -, Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen).

Detektionspuffer	Max. Signalanstieg [%]	K_{25} [nM]	K_{75} [nM]
BP	14,92 ± 1,29	0,178	1,386
BP(-)	26,60 ± 1,86	0,186	4,012

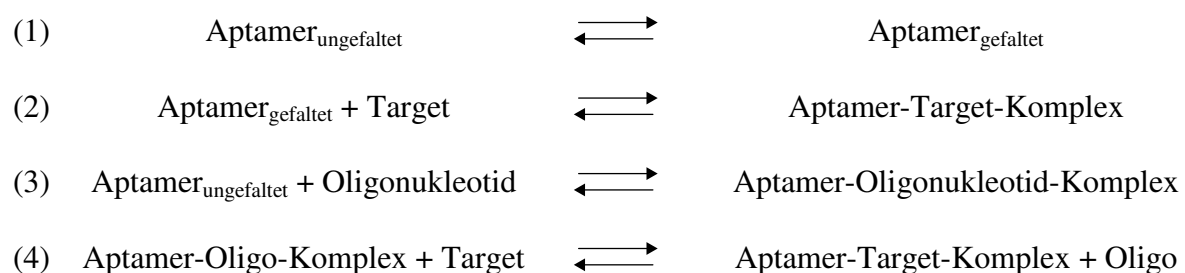
Für die Detektionsmethode TID/FRET konnten unabhängig vom gewählten Reaktionspuffer vergleichbare K_{25} -Werte und somit vergleichbare Sensitivitäten ermittelt werden. Ein höherer

K_{75} -Wert wurde unter Verwendung des Reaktionspuffers BP(-) bestimmt, sodass BP(-) eine sensitive Detektion in einem größeren Detektionsbereich ermöglicht (Tab. 4.1).

Der K^+ -, Ca^{2+} - und Mg^{2+} -ionenreduzierten Bindungspuffers BP(-) bietet sich somit zur Detektion von Ethanolamin mittels TID/FRET-Methode an, da die Detektionsmethode unter Verwendung von BP(-) einen höheren Signalanstieg sowie einen breiteren dynamischen Detektionsbereich aufweist. Trotz hoher Sensitivitäten konnte mit dieser FRET-basierten Detektionsmethode insgesamt jedoch nur ein geringer Signalanstieg und somit eine geringe Targetbindung beim Nachweis von Ethanolamin erzielt werden. Aus diesem Grund wurde im folgenden Kapitel das Detektionsdesign TID/FRET-Detektion unter Berücksichtigung auftretender Reaktionsgleichgewichte modifiziert, um eine erhöhte Targetbindung und somit einen möglichst hohen Signalanstieg bei der Detektion von Ethanolamin erzielen zu können.

4.1.3.4 Modifikation der Detektionsmethode

Bei der Entwicklung und Optimierung der TID-basierten Detektionsmethoden ist zu beachten, dass während des Detektionsprozesses von Ethanolamin eine Überlagerung unterschiedlicher Reaktionsgleichgewichte zwischen Aptamer, Ethanolamin und Oligonukleotid auftritt. In Lösung stellt sich für das Ethanolamin-Aptamer eine Gleichgewichtsreaktion zwischen gefaltetem und entfaltetem Aptamer ein. Je nach Faltungszustand wird das Aptamer durch das Oligonukleotid gebunden oder geht einen Komplex mit dem Target Ethanolamin ein. Für die TID-basierte Detektion von Ethanolamin sind somit vor allem folgende Reaktionsgleichgewichte zwischen Aptamer, Oligonukleotid und Target zu berücksichtigen, die im weiteren Verlauf zusammenfassend als Detektionsreaktion bezeichnet werden:



Auf Grund dieser komplexen Detektionsreaktion entsteht bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ethanolamin und Oligonukleotid in der Reaktionslösung ein Gleichgewicht zwischen der Target-Bindung und der Oligonukleotid-Bindung an das Aptamer. Um zur Detektion von Ethanolamin jedoch die Target-Bindung und somit die Ausbildung des Aptamer-Target-Komplexes zu begünstigen, wurde die Durchführung der TID-basierten Detektion

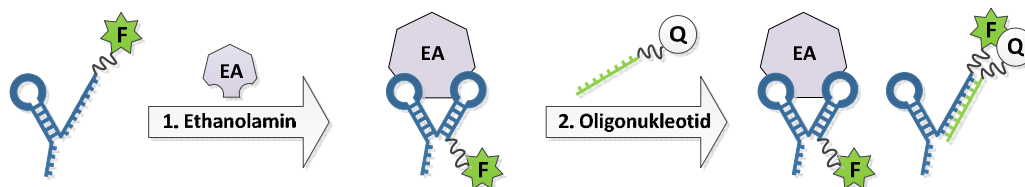
modifiziert, sodass sich zunächst ein Gleichgewicht zwischen Aptamer und Ethanolamin einstellen konnte, bevor das komplementäre Oligonukleotid zu Aptamer und Target hinzugegeben wurde. Hierzu wurde der zweistufige Reaktionsprozess der TID/FRET-Detektion, bestehend aus Hybridisierung des Quencher-modifizierten Oligonukleotids und Ethanolaminbindung, umgekehrt. Eine solche FRET-basierte Detektionsmethode wird aus diesem Grund im weiteren Verlauf als „TID/FRETrevers“ bezeichnet (Abb. 4.13 A). Bei der TID/FRETrevers-Detektion stellt sich im ersten Detektionsschritt zunächst ein Gleichgewicht zwischen Aptamer und Ethanolamin ein, sodass ein Aptamer-Target-Komplex entsteht. Im zweiten Detektionsschritt erfolgt die Zugabe des Quencher-modifizierten Oligonukleotids 12_BHQ2. Dieses hybridisiert bevorzugt mit ungebundenen Aptamermolekülen EA#14.3_Cy3, kann jedoch ebenfalls eine Dissoziation von Ethanolamin aus dem Aptamer-Target-Komplex induzieren. Die Hybridisierung von Aptamer und Oligonukleotid führt zum Quenching des Fluoreszenzsignals von EA#14.3_Cy3.

Diese Detektionsmethode kann ebenfalls als eine „Signal on“ Detektion bezeichnet werden. Ein Ethanolaminüberschuss begünstigt bei dieser Detektionsmethode die Ausbildung des Aptamer-Target-Komplexes, sodass die Hybridisierung zwischen Aptamer und Oligonukleotid verringert wird. Je höher die Konzentration an Ethanolamin in der Detektionslösung, desto geringer das Quenching zwischen Aptamer und Oligonukleotid und desto höher der Signalanstieg.

Die TID-basierte Detektion von Ethanolamin wurde neben der TID/FRET- und der TID/FRETrevers-Methode außerdem direkt als kompetitive Bindungsreaktion durchgeführt. Die Detektion von Ethanolamin erfolgte dabei in einem einstufigen Detektionsprozess. Ethanolamin und komplementäres Oligonukleotid wurden bei dieser Detektionsmethode gleichzeitig mit dem Aptamer inkubiert. Auf diese Weisen konnten sich alle auftretenden Reaktionsgleichgewichte der Detektionsreaktion gleichzeitig einstellen. Diese Detektionsmethode wird im weiteren Verlauf als „TID/FRETkompetitiv“ bezeichnet (Abb. 4.13 B). Ethanolamin und komplementäres Oligonukleotid bilden in einem kompetitiven Bindungsprozess einen Komplex mit dem Aptamer aus. Die Ausbildung eines Aptamer-Komplexes mit Oligonukleotid oder Target kann neben der Affinität auch durch die vorliegende Konzentration von Oligonukleotid und Target beeinflusst werden. Ein Oligonukleotidüberschuss begünstigt bei dieser Detektionsmethode die Ausbildung des Aptamer-Oligonukleotid-Komplexes und ermöglicht somit ein erhöhtes Quenching des Aptamersignals. Ein Überschuss des Targets Ethanolamin verringert die Bindung der Oligonukleotide an das Aptamer, was ein geringeres Quenching hervorruft. Je höher die Konzentration an Ethanolamin in der Detektionslösung, desto gerin-

ger das Quenching zwischen Aptamer und Oligonukleotid und desto höher der Signalanstieg. Die TID/FRETkompetitiv-Detektionsmethode kann somit auch als „Signal on“-Detektion bezeichnet werden.

A: TID/FRETrevers



B: TID/FRETkompetitiv

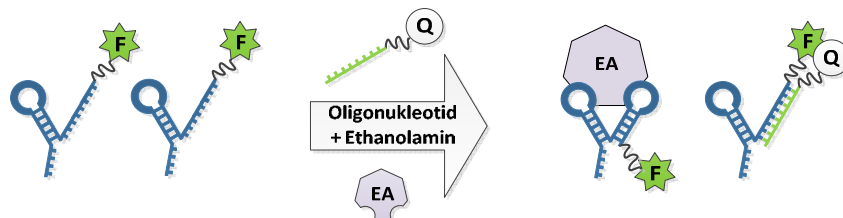


Abb. 4.13 Aptamer-basierte Detektion von Ethanolamin mittels modifizierter TID-Methoden TID/FRETrevers und TID/FRETkompetitiv. (A) TID/FRETrevers: Zweistufiger Detektionsprozess, bei dem sich zuerst ein Aptamer-Ethanolamin-Komplex ausbildet. Ungebundene Aptamere werden im zweiten Reaktionsschritt bevorzugt durch Oligonukleotide gebunden. (B) TID/FRETkompetitiv: Einstufiger Reaktionsprozess, bei dem Ethanolamin und Oligonukleotid kompetitiv an das Aptamer binden. Für (A) und (B) gilt: Je höher die Konzentration an Ethanolamin, desto geringer fällt das Quenching des Aptamersignals durch das Oligonukleotid aus.

Diese beiden Detektionsmethode TID/FRETrevers und TID/FRETkompetitiv wurden der TID/FRET-Methode (4.1.3.3) vergleichend gegenübergestellt. Aus diesem Grund wurde das molare Aptamer-zu-Oligonukleotid-Verhältnis von 1:1 beibehalten. Auch bei diesen beiden Detektionsmethoden zeigte sich, dass unter Verwendung des Reaktionspuffers BP(-) ein größerer Signalanstieg während des Detektionsprozesses erzielt werden konnte. Im Vergleich mit dem Reaktionspuffer BP, wurde durch die Verwendung von BP(-) ein ~ 10 % höherer Signalanstieg bei der Detektion von Ethanolamin bestimmt. Somit begünstigte der ionenreduzierte Reaktionspuffer BP(-) bei allen drei TID-basierten Detektionsmethoden (TID/FRET, TID/FRETrevers, TID/FRETkompetitiv) die Detektion von Ethanolamin.

Beim Vergleich der drei Detektionsmethoden konnte mit der Methode TID/FRETkompetitiv ein geringfügig höherer Signalanstieg ($\sim 32\%$) während des Detektionsprozesses von Ethanolamin beobachtet werden (Abb. 4.14, Tab. 4.2). Möglicherweise wird die Ausbildung aller sich überlagernder Reaktionsgleichgewichte bei dieser Detektionsmethode durch die gleichzeitige Zugabe von Ethanolamin und Oligonukleotid zum Aptamer erleichtert.

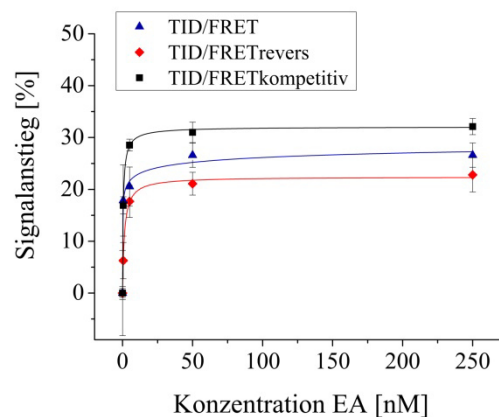


Abb. 4.14 Signalanstieg der drei TID-basierten Detektionsmethoden TID/FRET, TID/FRETrevers und TID/FRETkompetitiv zur Detektion von Ethanolamin (EA).

Tab. 4.2 Vergleich der TID-basierten Detektionsmethoden zur Detektion von Ethanolamin unter Verwendung des nicht-immobilisierten Aptamers EA#14.3_Cy3.

Detektionsmethode	Max. Signalanstieg [%]	K_{25} [nM]	K_{75} [nM]	LOD [pM]
TID/FRET	$26,60 \pm 2,35$	0,292	4,012	714,83
TID/FRETrevers	$22,80 \pm 3,31$	0,442	4,589	217,96
TID/FRETkompetitiv	$32,11 \pm 1,56$	0,226	3,268	110,31

Bei der Beurteilung dieser drei TID-basierten Detektionsmethoden (TID/FRET, TID/FRETrevers, TID/FRETkompetitiv) sind jedoch neben dem Signalanstieg auch die Sensitivität und das Detektionslimit (engl. *limit of detection*, LOD) zu bewerten. Während die Sensitivität die Empfindlichkeit der Detektionsmethode gegenüber kleinen Targetkonzentrationen beschreibt, gibt das Detektionslimit die kleinstmögliche Targetkonzentration an, die mit Hilfe der verwendeten Detektionsmethode sicher nachgewiesen werden kann [128].

Die Sensitivitäten wurden mit Hilfe des K_{25} - und des K_{75} -Wertes abgeschätzt. Für alle drei Detektionsmethoden konnten auf diese Weise vergleichbare Sensitivitäten im nano- bis pikomolaren Bereich ermittelt werden (Tab. 4.2). Die Detektionsmethode TID/FRETkompetitiv weist mit einer LOD von 110 pM (Berechnung siehe Kapitel A.2.7.1) jedoch das geringste Detektionslimit der entwickelten TID-basierten Methoden auf. Mit Hilfe dieser Methode ist somit eine sensitive Detektion von Ethanolaminkonzentrationen im niedrigen pikomolaren Bereich möglich. Im Vergleich zu sequenziell durchgeführten Detektionsmethoden (TID/FRET, TID/FRETrevers) kann mit TID/FRETkompetitiv durch gleichzeitige Inkubation von Ethanolamin und Oligonukleotid mit dem Aptamer außerdem die Detektionszeit um 50 % verringert werden.

4.1.3.5 Zusammenfassung Detektionsmethode TID/FRET

Es wurden drei unterschiedliche Aptamer-basierten Detektionsmethoden unter Verwendung einer Target-induzierten Dissoziation entwickelt, die das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) zur Detektion von Ethanolamin ausnutzen: TID/FRET (Abb. 4.11), TID/FRETrevers und TID/FRETkompetitiv (Abb. 4.13).

Neben einer hohen Sensitivität im pikomolaren Bereich, weist die Detektionsmethode TID/FRETkompetitiv mit einer LOD von 110 pM das geringste Detektionslimit auf. Die Methode TID/FRETkompetitiv ermöglicht somit eine vergleichsweise sensitive Detektion besonders kleiner Ethanolaminkonzentrationen. Zudem konnte die benötigte Zeit zur Detektion von Ethanolamin mittels TID/FRETkompetitiv gegenüber TID/FRET und TID/FRETrevers um 50 % verkürzt werden. TID/FRETkompetitiv stellt somit eine vielversprechende Aptamer-basierte Methode zur Detektion von Ethanolamin unter Verwendung nicht-immobilisierter Ethanolamin-Aptamere dar. Im weiteren Verlauf wird diese Detektionsmethode auf immobilisierte Aptamere angewandt, um eine Detektion von Ethanolamin im Microarray-Format zu ermöglichen.

4.1.4 Detektionsmethode IIb: TID mit FRET-basierter Detektion (Microarray)

Zur Realisierung eines Aptamer-basierten Biosensors bietet sich besonders ein Sensorformat mit immobilisierten Aptameren an. Die Immobilisierung der Aptamere auf der Sensoroberfläche vereinfacht die Entwicklung reversibler Detektionsmethoden und ermöglicht somit eine Regeneration des Aptasensors. Aus diesem Grund wurde die bereits entwickelte TID-basierte Detektion von Ethanolamin ebenfalls unter Verwendung immobilisierter Aptamere durchgeführt. Die Detektionsmethode TID/FRETkompetitiv (4.1.3.4), die bislang die höchste Sensi-

vität und das geringste Detektionslimit bei der Detektion von Ethanolamin aufweisen konnte, wurde hierzu auf ein Microarray-Format mit immobilisierten Aptameren übertragen (Abb. 4.15).

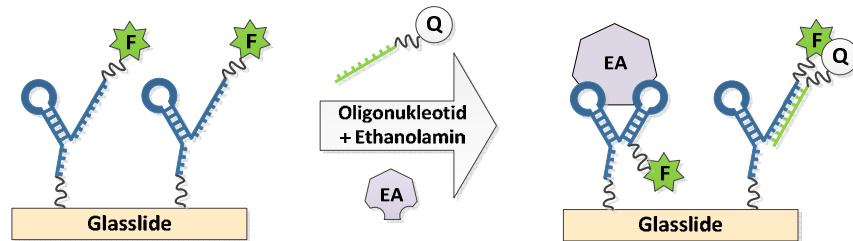


Abb. 4.15 Detektionsmethode TID/FRET-kompetitiv zur Detektion von Ethanolamin mit immobilisierten Aptameren. Das Ethanolamin-Aptamer EA#14.3_Cy3 wurde über einen 5'terminale Aminolinker auf einem Glasträger immobilisiert. Bei Anwesenheit von Ethanolamin bildet sich ein Aptamer-Target-Komplex, der eine vollständige Hybridisierung (Quenching) zwischen Aptamer und Oligonukleotid verhindert. Durch Zugabe von Ethanolamin kommt es somit zum Signalanstieg.

4.1.4.1 Quenching durch komplementäres Oligonukleotid

Das Quenching des Fluorophor-modifizierten Ethanolamin-Aptamers (EA#14.3_Cy3) erfolgte wie in Kapitel 4.1.3.2 durch Hybridisierung des Quencher-modifizierte Oligonukleotids 12_BHQ2 (Abb. 4.8). Um ein effizientes Quenching des Aptamersignals und somit einen maximalen Signalanstieg bei der Bindung des Targets detektieren zu können, ist eine Sättigung der immobilisierten Aptamermoleküle durch das komplementäre Oligonukleotid nötig. Eine Sättigung der Aptamere konnte durch eine Konzentration des komplementären Oligonukleotids von 100 nM erreicht werden (Abb. 4.16). Dies entspricht einem Stoffmengenverhältnis von Aptamer zu Oligonukleotid von 1:20. Unter diesen Bedingungen wurde ein maximales Quenching des Aptamersignals von ~ 70 % erzielt

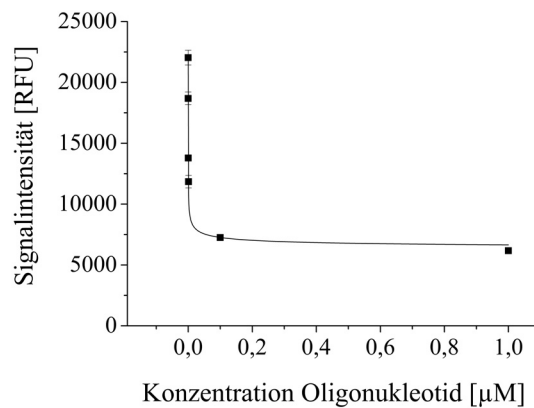


Abb. 4.16 Quenching des immobilisierten Aptamers EA#14.3_Cy3 durch das Oligonukleotid 12_BHQ2 bei einer Aptamerkonzentration von 10 μM .

4.1.4.2 Detektion von Ethanolamin

Um den Einfluss der Aptamerkonzentration auf die Ethanolamin-Detektion zu untersuchen, wurde das Ethanolamin-Aptamer EA#14.3_Cy3 in Konzentrationen von 0,1 μM bis 50 μM auf einem Glaträger immobilisiert. Das Quencher-modifizierte Oligonukleotid wurde mit einer Konzentration von 1 μM eingesetzt, sodass ein maximales Quenching zwischen Aptamer und Oligonukleotid sicher gewährleistet werden konnte (4.1.4.1). Bei einer Aptamerkonzentration von 5 μM konnte die größte Signaldifferenz mit einem Signalanstieg von $\sim 30\%$ detektiert werden. Die Immobilisierung des Aptamers mit maximaler Immobilisierungsdichte (50 μM) erzielte lediglich einen Signalanstieg um $\sim 20\%$. Es ist zu vermuten, dass eine hohe Immobilisierungsdichte zu sterischen Hinderungen bei der Ausbildung der Aptamerfaltung führt und somit die Targetbindung beeinträchtigt. Ähnliche Effekte wurden für immobilisierte DNA-Moleküle bereits in der Literatur beschrieben [129]. Bei der Verwendung einer sehr geringen Immobilisierungsdichte (0,1 μM) sind hingegen unspezifische Wechselwirkungen zwischen Aptamer und Trägeroberfläche zu vermuten, die eine Hybridisierung des Aptamers mit dem komplementären Oligonukleotid sowie die Ausbildung einer Aptamer-Target-Bindung beeinträchtigen. Eine sehr geringe Immobilisierungsdichte des Fluoreszenz-markierten Aptamers erzeugt zudem nur ein geringes Detektionssignal, das durch die Eigenfluoreszenz der Trägeroberfläche überlagert werden kann. Bei Betrachtung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (engl. *signal to noise ratio*, SNR) wird dieser Effekt besonders deutlich. Der SNR-Wert definiert die Qualität des Detektionssignals und berechnet sich wie folgt:

$$\text{SNR} = \frac{\text{Signal-Hintergrundsignal}}{\text{Standardabweichung Hintergrundsignal}}$$

Bei einer Aptamerkonzentration von 0,1 μM konnten nur geringe SNR-Werte erzielt werden. Eine Unterscheidung zwischen Detektionssignal und Eigenfluoreszenz der Trägeroberfläche ist bei dieser niedrigen Aptamerkonzentration nur begrenzt möglich. Bei einer Aptamerkonzentration von 5 μM wurde hingegen ein fast 20-fach höherer SNR-Wert ermittelt. Das Fluoreszenzsignal des Ethanolamin-Aptamers hebt sich bei dieser Aptamerkonzentration erkennbar vom Hintergrundsignal ab und kann dadurch eindeutig detektiert werden (Abb. 4.17).

Für die Detektion von Ethanolamin eignet sich bei dieser Detektionsmethode somit besonders eine mittlere Immobilisierungsdichte des Aptamers (5 μM). Unter Verwendung dieser Immobilisierungsdichte konnte der höchste Signalanstieg bei einem vergleichsweise geringen Hintergrundrauschen bestimmt werden. Aus diesem Grund wurde die nachfolgende Charakterisierung der TID-basierten Detektion TID/FRETkompetitiv bei einer Aptamerkonzentration von 5 μM durchgeführt.

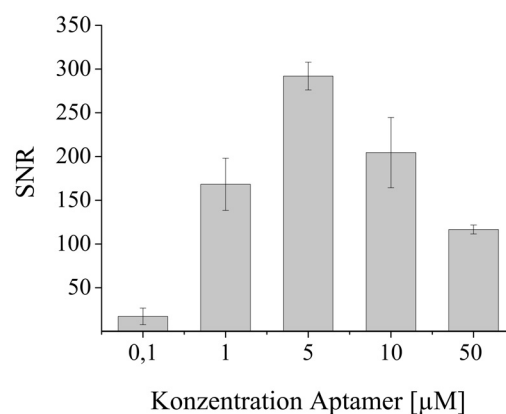


Abb. 4.17 Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) der Detektionsmethode FRET/kompetitiv bei unterschiedlichen Aptamerkonzentrationen, die zur Immobilisierung des Aptamers eingesetzt wurden.

Neben einem maximalen Signalanstieg von $\sim 30\%$ (Abb. 4.18 A) konnte für die Detektionsmethode TID/FRETkompetitiv unter Verwendung einer mittleren Aptamer-Immobilisierungsdichte eine hohe Sensitivität bestimmt werden. Mit Hilfe des K_{25} -Wertes wurden Sensitivitäten im niedrigen pikomolaren Bereich abgeschätzt. Dies übersteigt die Sensitivitäten der Detektionsmethode TID/FRETkompetitiv, bei der die Aptamere

nicht immobilisiert wurden, um das Dreifache. Zudem konnte ein erhöhter K_{75} -Wert ermittelt werden, der einen erweiterten dynamischen Bereich für die TID-basierte Detektionsmethode mit immobilisierten Aptameren angibt.

Die hohe Sensitivität Microarray-basierter Detektionsmethoden wurde bereits von R. P. Ekins (1989) beschrieben [130] und basiert vor allem auf der hohen Dichte der Fänger-moleküle, die durch ein Microarray-Format erzielt werden kann. Auf diese Weise werden selbst geringe Targetkonzentrationen äußerst sensitiv detektiert, sodass Microarray-basierte Detektionsverfahren oftmals besonders niedrige Detektionslimits aufweisen. Auch für die im Microarray-Format durchgeführte Detektionsmethode TID/FRETkompetitiv konnte mit 13 pM ein äußerst niedriges Detektionslimit erzielt werden, sodass mit dieser TID-basierten Methode eine Detektion von Ethanolaminkonzentrationen im niedrigen pikomolaren Bereich möglich ist (Tab. 4.3).

Für eine quantitative Bestimmung unbekannter Ethanolaminkonzentrationen mittels TID/FRETkompetitiv kann der Verlauf der Signalintensität in Abhängigkeit von der Ethanolaminkonzentration als Kalibrationskurve eingesetzt werden. Die Kalibrationskurve lässt sich durch einen sigmoiden Kurvenverlauf beschreiben. In einem Konzentrationsbereich von 0,01 bis 1 nM Ethanolamin konnte ein linearer Kurvenverlauf mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,965 bestimmt werden (Abb. 4.18 B). Eine quantitative Bestimmung von Ethanolamin ist somit in diesem Konzentrationsbereich möglich.

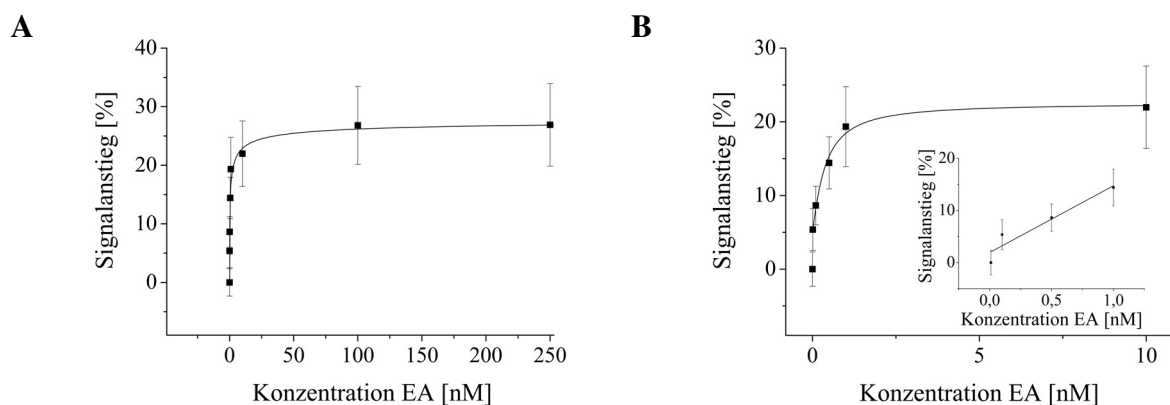


Abb. 4.18 Detektionskurve der Detektionsmethode TID/FRETkompetitiv bei einer Aptamerkonzentration von 5 μ M. (A) Prozentualer Signalanstieg bei Erhöhung der Ethanolaminkonzentration (EA) bis 250 nM. (B) Signalanstieg des Fluorophor-modifizierten Aptamers EA#14.3_Cy3 bei Ethanolaminkonzentrationen (EA) bis 10 nM. Insertion: Linearer Bereich des Signalanstiegs.

Tab. 4.3 Signalanstieg, Sensitivitäten und Detektionslimit (LOD) der FRET-basierten Detektionsmethode TID/FRETkompetitiv unter Verwendung einer Aptamerkonzentration von 5 μ M bei der Immobilisierung.

Signalanstieg [%]	K_{25} [nM]	K_{75} [nM]	LOD [pM]
$29,46 \pm 3,15$	0,065	12,358	13,04

4.1.4.3 Untersuchung der Reversibilität

Die Reversibilität der Detektionsreaktion ist essentiell für die Anwendung der entwickelten Detektionsmethode in Aptamer-basierten Biosensoren. Nur bei vollständiger Reversibilität der Detektionsreaktion, kann ein Biosensor nach erfolgter Detektion des Zielmoleküls regeneriert und für einen erneuten Detektionsprozess eingesetzt werden. Aus diesem Grund wurde die entwickelte Detektionsmethode TID/FRETkompetitiv bezüglich der Reversibilität der Bindung von Ethanolamin an das Aptamer untersucht. Die bei der Detektion von Ethanolamin parallel ablaufenden Reaktionen (siehe Kapitel 4.1.3.4) werden im Folgenden zusammenfassend als Detektionsreaktion bezeichnet.

Um das Ethanolamin-Aptamer für einen erneuten Detektionsprozess einsetzen zu können, ist eine vollständige Regeneration des Aptamers, d.h. Entfernung gebundener Target- und Oligonukleotid-Moleküle, sinnvoll. Bei der Regeneration der Aptamer-Target-Bindung durch Entfernung von Ethanolamin muss jedoch beachtet werden, dass eine Unterscheidung zwischen ungebundenem, regeneriertem Aptamer und Aptamer-Ethanolamin-Komplex anhand des Fluoreszenzsignals des Aptamers nicht erfolgen kann. Da das Target Ethanolamin unmarkiert vorliegt, weisen sowohl das ungebundene Fluoreszenz-markierte Aptamer als auch der Aptamer-Ethanolamin-Komplex ein vergleichbares Fluoreszenzsignal auf. Die Regeneration des Aptamers kann somit vor erneuter Detektion optisch nicht eindeutig nachgewiesen werden, sondern ist nur durch eine Anwendung des regenerierten Aptamers in einem erneuten Detektionsprozess zu überprüfen.

Im Gegensatz zur vollständigen Regeneration des Aptamers kann eine Wiederherstellung des zur Detektion benötigten Aptamer-Oligonukleotid-Komplexes (Quenching) optisch nachgewiesen werden. Durch Wiederherstellung dieses Aptamer-Oligonukleotid-Komplexes kann das Aptamer ebenfalls für einen erneuten Detektionsprozess eingesetzt werden. Aus diesem Grund sollte nach erfolgter Ethanolamin-Detektion das entstandene Reaktionsgleichgewicht zwischen Aptamer-Target- und Aptamer-Oligonukleotid-Komplex vollständig auf die Seite

der Aptamer-Oligonukleotid-Bindung verschoben werden. Dies wurde bei einer Erhöhung der Temperatur bzw. der Oligonukleotidkonzentration untersucht (Abb. 4.19).

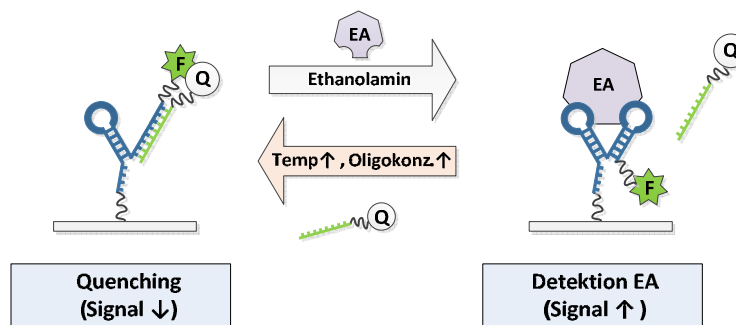


Abb. 4.19 Versuchsablaufes zur Bestimmung der Reversibilität der Ethanolaminbindung unter Verwendung der Detektionsmethode TID/FRETkompetitiv. Durch Erhöhung der Temperatur (95 °C, 10 min) und der Konzentration des Oligonukleotids 12_BHQ2 soll das Gleichgewicht der Detektionsreaktion zurück in Richtung Quenching verschoben werden.

Zum einen wurde die Detektionslösung (bestehend aus Oligonukleotid und Ethanolamin) nach erfolgter Ethanolamin-Detektion kurzzeitig auf 95 °C erhitzt. Durch hitzebedingte Denaturierung und damit verbundener Linearisierung der Aptamersequenz kann die Ausbildung der Targetbindung kurzzeitig verringert werden. Zudem wird eine erneute Hybridisierung der durch Hitzeeinwirkung vom Aptamer dissoziierten Oligonukleotide an eine linearisierte Aptamersequenz begünstigt. Aus diesem Grund kann nach erfolgter Temperaturerhöhung die Gleichgewichtsreaktion möglicherweise in Richtung Aptamer-Oligonukleotid-Komplex verschoben werden. Nach dem erneuten Abkühlen der Detektionslösung wurden ungebundenes Ethanolamin und Oligonukleotid entfernt.

Zum anderen sollte die Ausbildung des Aptamer-Oligonukleotid-Komplexes durch die Erhöhung der Oligonukleotidkonzentration begünstigt werden. Hierzu wurde nach erfolgter Ethanolamin-Detektion die Detektionslösung (bestehend aus ungebundenem Ethanolamin und Oligonukleotid) durch eine Oligonukleotidlösung (100 nM) ersetzt.

Es zeigte sich jedoch keine vollständige Reversibilität der Detektionsreaktion. Mit Hilfe dieser beiden Methoden konnte das Gleichgewicht der Detektionsreaktion nur begrenzt in Richtung Aptamer-Oligonukleotid-Komplex (Quenching) verschoben werden (Abb. 4.20).

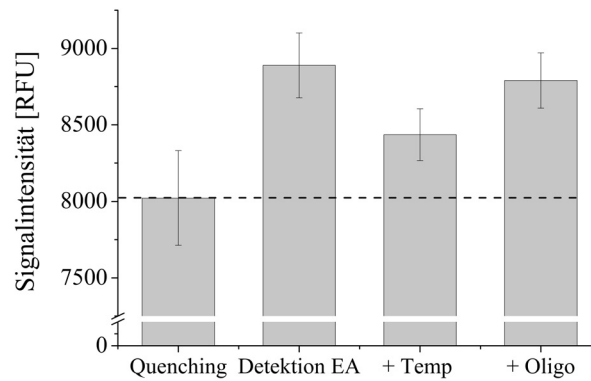


Abb. 4.20 Bestimmung der Reversibilität der Ethanolaminbindung unter Verwendung der Detektionsmethode TID/FRETkompetitiv (Aptamerkonzentration 10 μM). Das Gleichgewicht der Detektionsreaktion wurde durch Erhöhung der Temperatur (+ Temp, 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min) und der Konzentration des Oligonukleotids 12_BHQ2 (+ Oligo) zurück in Richtung Quenching verschoben. Durch die gestrichelte Linie soll die Signalintensität bei vollständiger Wiederherstellung des Aptamer-Oligonukleotid-Komplexes (Quenching) verdeutlicht werden.

Die geringe Reversibilität der Detektionsreaktion ist vermutlich durch die hohe Affinität des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3 zum Target (K_D 6 nM) [3] bedingt. Um das Reaktionsgleichgewicht vollständig auf die Seite des Aptamer-Oligonukleotid-Komplexes verschieben zu können, muss daher die Affinität des Ethanolamin-Aptamers zum Target verringert werden. Dies wurde durch eine hitzebedingte Denaturierung des Aptamers erzielt. Unmittelbar nach dem Erhitzen der Detektionslösung konnte sich während des Abkühlens jedoch vermutlich erneut eine dreidimensionale Aptamerfaltung und somit eine Targetbindung ausbilden, wodurch das Gleichgewicht der Detektionsreaktion nur bedingt auf die Seite des Aptamer-Oligonukleotid-Komplexes (Quenching) verschoben wurde. Zudem wurde nach dem erneuten Abkühlen der Detektionslösung neben dem ungebundenen Ethanolamin auch das ungebundene Oligonukleotid durch Waschschritte entfernt, sodass ein mögliches Quenching des Aptamersignals zusätzlich beeinträchtigt wurde.

Um nach erfolgter Detektion von Ethanolamin das Gleichgewicht der Detektionsreaktion wieder in Richtung Aptamer-Oligonukleotid-Komplex zu verschieben, sollten die beiden durchgeführten Methoden Denaturierung und Inkubation mit Oligonukleotid kombiniert werden. Hierbei ist nach hitzebedingter Denaturierung des Aptamers ein sofortiges Entfernen der Detektionslösung sinnvoll, um eine erneute Targetbindung beim Auskühlen der Lösung zu verhindern. Zudem könnte durch Verringerung des pH-Wertes in der Detektionslösung eine säurebedingte Veränderung der Aptamerfaltung erzielt werden, die eine erneute Targetbin-

dung zusätzlich beeinträchtigt. Nach erfolgter Aptamer-Denaturierung ist die Regeneration des Aptamer-Oligonukleotid-Komplexes durch eine anschließende Inkubation des Aptamers mit komplementären Oligonukleotiden denkbar.

4.1.4.4 Zusammenfassung Detektionsmethode TID/FRET (Microarray)

Es konnte gezeigt werden, dass die Immobilisierungsdichte des Aptamers auf der Microarray-Oberfläche die Ethanolamin-Detektion beeinflusst. Eine hohe Immobilisierungsdichte führt zu sterischen Beeinträchtigungen bei der Ausbildung der Aptamerfaltung. Bei sehr geringen Immobilisierungsdichte treten vermehrt unspezifischen Bindungen auf der Trägeroberfläche auf, die das Detektionssignal überlagern können. Unter Verwendung einer mittleren Immobilisierungsdichte (5 μM) konnte somit der höchste Signalanstieg ($\sim 30\%$) bei einem vergleichsweise geringen Hintergrundrauschen erzielt werden.

Für die TID-basierte Detektionsmethode TID/FRETkompetitiv konnte unter Verwendung immobilisierter Aptamere zudem eine hohe Sensitivität ($K_{25} = 65\text{ pM}$) und ein geringes Detektionslimit ($\text{LOD} = 13,04\text{ pM}$) erzielt werden. Durch die Übertragung des Detektionsdesigns der FRET/kompetitiv-Methode von nicht-immobilisierten auf immobilisierte Aptamer wurde die Sensitivität (K_{25}) sowie das Detektionslimit (LOD) der Ethanolamin-Detektion verbessert (Tab. 4.4). Diese Detektionsmethode konnte somit erfolgreich für eine Microarray-basierte Detektion des kleinen Moleküls Ethanolamin eingesetzt werden. Auf Grund der hohen Affinität des Aptamers EA#14.3 zum Target Ethanolamin wurde eine vollständige Reversibilität der Detektionsreaktion bislang jedoch nicht erzielt.

Tab. 4.4 Vergleich der Detektionsmethode TID/FRETkompetitiv unter Verwendung immobilisierter (Microarray) und nicht-immobilisierter Ethanolamin-Aptamere EA#14.3_Cy3 bezüglich Signalanstieg, Sensitivitäten (K_{25} , K_{75}) und Detektionslimit (LOD).

Aptamer	Signalanstieg [%]	K_{25} [nM]	K_{75} [nM]	LOD [pM]
nicht immobilisiert	$32,11 \pm 1,56$	0,226	3,268	110,31
immobilisiert (Microarray)	$29,46 \pm 3,15$	0,065	12,358	13,04

4.1.5 Detektionsmethode III: TID mit Fluoreszenz-basierter Detektion

Bei der bereits entwickelten Detektionsmethode der Target-induzierten Dissoziation, die den Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zur Erzeugung eines optischen Signals ausnutzt

(TID/FRET), sind Modifizierungen von Aptamer und Oligonukleotid mit Fluorophor und Quencher erforderlich (4.1.3). Durch Reduzierung dieser kostenintensiven Modifizierungen wurde eine weitere Detektionsmethode im Microarray-Format entwickelt, bei der ausschließlich Modifizierungen am Oligonukleotid durchgeführt werden müssen. Diese Detektionsmethode beruht ebenfalls auf dem Detektionsdesign der Target-induzierten Dissoziation komplementärer Oligonukleotide. Das unmodifizierte Ethanolamin-Aptamer wurde hierbei mit einem Fluorophor-modifizierten Oligonukleotid hybridisiert. Wie bereits in Kapitel 4.1.3.4 optimiert, wurde die Target-induzierte Dissoziation des komplementären Oligonukleotids als kompetitive Bindungsreaktion durchgeführt, sodass Ethanolamin und Oligonukleotid kompetitiv an das Aptamer binden konnten. Die Bindung von Ethanolamin bewirkte in eine Dissoziation des Fluoreszenz-markierten Oligonukleotids vom Aptamer und somit eine Abnahme des Fluoreszenzsignals. Die Abnahme dieses optischen Signals wurde zur Detektion des Targets Ethanolamin genutzt (Abb. 4.21).

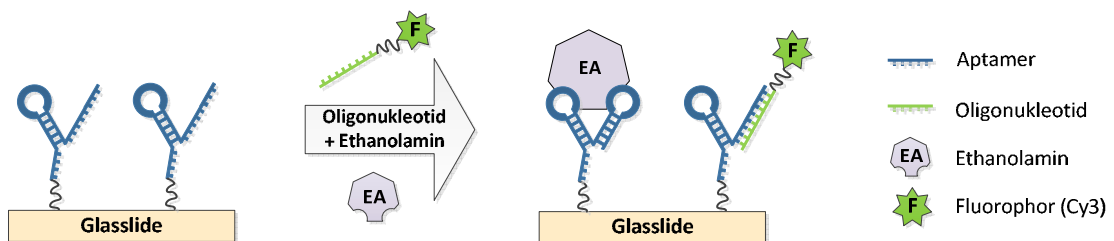


Abb. 4.21 Detektion von Ethanolamin mittels Target-induzierter Dissoziation (TID) mit Fluoreszenzdetektion (TID/Fluoreszenz). Die TID wurde als kompetitive Bindungsreaktion von Ethanolamin und Oligonukleotid an das Aptamer durchgeführt. Bei Bindung von Ethanolamin an das Aptamer wurde eine Dissoziation des Fluoreszenz-markierten Oligonukleotids induziert, sodass ein Signalabfall detektiert werden konnte.

Durch Verwendung eines unmodifizierten Aptamers zur Detektion von Ethanolamin bietet diese weiterentwickelte Detektionsmethode eine Verringerung der Detektionskosten. Eine interne Fluoreszenz-Modifizierung der Aptamersequenz, wie bei der FRET-basierten Detektion durchgeführt (4.1.3.1), kann zudem zu Beeinträchtigungen bei der Ausbildung der Aptamerfaltung und somit der Targetbindung führen. Diese Problematik wurde durch die Verwendung eines unmodifizierten Aptamers zur Detektion des Targets ebenfalls umgangen. Diese Detektionsmethode der Target-induzierten Dissoziation mit Fluoreszenz-basierter Detektion (TID/Fluoreszenz) stellt somit eine Weiterentwicklung der zuvor untersuchten Detektionsmethode TID mit FRET-basierter Detektion (TID/FRET) (4.1.3) dar. (Die Detektionsmethode

TID/Fluoreszenz wurde im Rahmen der Masterarbeit von André Jochums [131] am Institut für Technische Chemie Hannover optimiert.)

4.1.5.1 Verwendete komplementäre Oligonukleotide

Für das Ethanolamin-Aptamer EA#14.3 sind Länge und Positionierung der Targetbindungsstelle innerhalb der Aptamersequenz bekannt [77], sodass zur Targetbindungsstelle komplementäre Oligonukleotide verwendet werden konnten. Dieser 16 Nukleotide lange Aptamerbereich bildet eine G-Quadruplexstruktur zur Targetbindung aus (3.2.4).

Um den Einfluss der Oligonukleotid-Länge auf die Hybridisierung mit dem Aptamer und die kompetitive Bindung mit Ethanolamin zu untersuchen, wurden Oligonukleotide mit unterschiedlichen Längen verwendet. Diese zur Targetbindungsstelle des Aptamers komplementären Oligonukleotide wiesen Längen zwischen 10 und 16 Nukleotiden auf und wurden 5'-terminal mit dem Fluorophor Cyanin 3 (Cy3) modifiziert. Das mit 16 Nukleotiden längste Oligonukleotid deckte die Targetbindungsstelle vollständig ab. Bei den kürzeren Oligonukleotide (Länge 12 nt, 10 nt) handelt es sich um 5'- bzw. 3'-terminal verkürzte Varianten des Oligonukleotids 16. Diese kurzen komplementären Sequenzen wurden verwendet, um zusätzlich den Einfluss der Bindungsposition der Oligonukleotide innerhalb der Targetbindungsstelle zu untersuchen (Abb. 4.22). Die Targetbindungsstelle wurde für das Ethanolamin-Aptamer EA#14.3 bereits identifiziert und zeichnet sich durch die Ausbildung einer G-Quadruplexstruktur bei der Targetbindung aus.

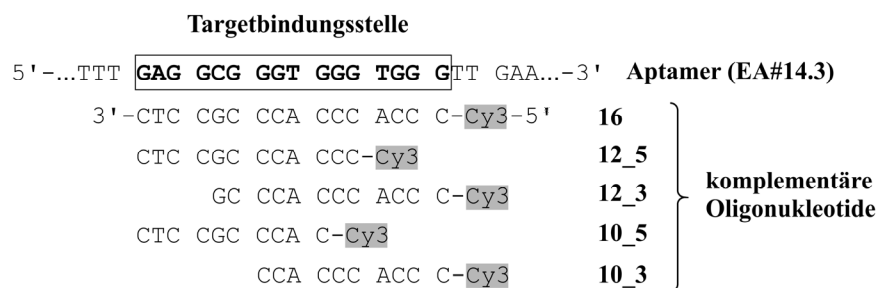


Abb. 4.22 Komplementäre Oligonukleotide für die Detektion von Ethanolamin mittels TID mit Fluoreszenz-basierter Detektion. Die Oligonukleotide wurden 5'-terminal mit Cy3 modifiziert. Das 16 Nukleotide lange Oligonukleotid (16) ist komplementär zur gesamten Targetbindungsstelle. Bei den Oligonukleotiden 12_5 und 10_5 handelt es sich um 5'-terminal verkürzte Varianten des Oligonukleotids 16, bei den Oligonukleotide 12_3 und 10_3 um 3'-terminal verkürzte.

4.1.5.2 Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide

Um einen hohen Signalanstieg bei Hybridisierung der Fluoreszenz-markierten Oligonukleotide an das Ethanolamin-Aptamer zu erhalten und somit den Signalabfall bei Ethanolamin-Bindung zu maximieren, sollte eine Sättigung der Aptamere mit den komplementären Oligonukleotiden erzielt werden. Zur Entwicklung der TID-basierten Detektionsmethode wurde aus diesem Grund zunächst die Bindungskapazität des Aptamers bei der Bindung der komplementären Oligonukleotide untersucht. Zur Hybridisierung wurde der K^+ -, Ca^{2+} -, Mg^{2+} -ionenreduzierte Bindungspuffer BP(-) eingesetzt, für den bereits in Kapitel 4.1.3.2 eine Verbesserung der Bindung zwischen Aptamer und Oligonukleotid gezeigt werden konnte. Unter Verwendung fünf unterschiedlicher Aptamerkonzentrationen (0,1-50 μM) zur Immobilisierung (A.2.1.1), konnte eine maximale Hybridisierung zwischen Ethanolamin-Aptamer EA#14.3 und Oligonukleotid bei einer Oligonukleotidkonzentration von 1 μM bestimmt werden (Abb. 4.23). Diese Konzentration an komplementären Oligonukleotiden wurde daher für die weitere Entwicklung der TID-basierten Detektionsmethode eingesetzt.

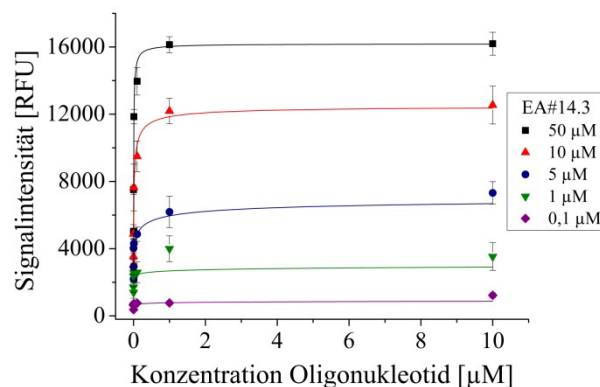


Abb. 4.23 Hybridisierung des komplementären Oligonukleotides 10_5 an das Ethanolamin-Aptamer EA#14.3 bei Verwendung unterschiedlicher Aptamerkonzentrationen zur Immobilisierung.

Um die Affinitäten der unterschiedlich langen Oligonukleotide zum Aptamer zu untersuchen, wurden die Dissoziationskonstanten $K_{D(\text{Oligo})}$ der Oligonukleotide bestimmt. Die Dissoziationskonstanten konnten anhand der Bindungskurven zwischen Aptamer und Oligonukleotiden bei halbmaximalem Signalanstieg abgeschätzt werden (Tab. 4.5). Längere Oligonukleotide wiesen höhere Affinitäten auf, sodass ein Einfluss der Oligonukleotid-Länge auf die Bindungsaffinität zum Aptamer beobachtet werden konnte. Dieser Zusammenhang wurde erwartet, da eine größere Anzahl komplementärer Basenpaarungen und ein Anstieg des

GC-Gehaltes die Stabilität eines Aptamer-Oligonukleotid-Komplexes erhöhen [132, 133]. Aus diesem Grund konnte für den Aptamer-Oligonukleotid-Komplex, der durch Hybridisierung mit dem längsten Oligonukleotid (16 nt) ausgebildet wurde, die höchste Bindungsaffinität und somit der geringste $K_{D(\text{Oligo})}$ -Wert ermittelt werden. Es wurde außerdem beobachtet, dass 5'-terminal verkürzte Oligonukleotide (12_5, 10_5) geringere Dissoziationskonstanten $K_{D(\text{Oligo})}$ aufwiesen, als 3'-terminal verkürzte Oligonukleotide (12_3, 10_3). Die Bindungsaffinität des Aptamer-Oligonukleotid-Komplexes wurde somit nicht nur von der Länge der komplementären Oligonukleotide, sondern auch von der Positionierung der Oligonukleotide innerhalb der Targetbindungsstelle beeinflusst.

Bei der Durchführung der Ethanolamin-Detektion ist jedoch zu berücksichtigen, dass die längeren Oligonukleotide bei Hybridisierung mit dem Aptamer eine äußerst stabile Bindung eingehen, sodass eine Ethanolamin-induzierte Dissoziation dieser komplementären Oligonukleotide möglicherweise nur begrenzt möglich ist. Aus diesem Grund wurde für alle Oligonukleotide die Verdrängung durch Ethanolamin aus dem Aptamer-Komplex untersucht.

Tab. 4.5 Dissoziationskonstanten $K_{D(\text{Oligo})}$ der unterschiedlich langen Oligonukleotide bei Hybridisierung mit dem Ethanolamin-Aptamer EA#14.3. Das 16 Nukleotide lange Oligonukleotid ist komplementär zur gesamten Targetbindungsstelle des Aptamers. Die Oligonukleotide 12_5 und 10_5 wurden 5'-terminal, die Oligonukleotide 12_3 und 10_3 3'-terminal verkürzt.

Oligonukleotide	Länge [nt]	Dissoziationskonstante $K_{D(\text{Oligo})}$ [nM]
16	16	0,28 ± 0,15
12_5	12	0,38 ± 0,45
10_5	10	7,14 ± 4,09
12_3	12	66,18 ± 77,44
10_3	10	230,78 ± 143,22

4.1.5.3 Detektion von Ethanolamin

Um den Einfluss der Aptamerkonzentration auf die Target-induzierte Dissoziation komplementärer Oligonukleotide zu untersuchen, wurden Aptamerkonzentrationen zwischen 0,1 μM und 50 μM zur Immobilisierung des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3 eingesetzt. Bei Verwendung geringer Aptamerkonzentrationen konnte die Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide an das Aptamer am stärksten verringert werden. Die bestmögliche Aptamerkonzentration zur Target-induzierten Dissoziation variierte je nach eingesetztem Oligonukleotid

und lag bei 1 μM bis 5 μM . Bei diesen geringen Aptamerkonzentrationen konnte die Anzahl hybridisierter Oligonukleotide bei Anwesenheit von Ethanolamin um $\sim 70\%$ reduziert werden, sodass eine hohe Signaländerung detektiert wurde. Unter Verwendung hoher Aptamerkonzentrationen (10 μM , 50 μM) wurde die Hybridisierung der Oligonukleotide lediglich um $\sim 40\text{-}50\%$ reduziert. Diese Beobachtungen lassen das Auftreten sterischer Hinderungen bei hohen Aptamerkonzentrationen vermuten, wodurch die Aptamerfaltung und somit ebenfalls die Ethanolamin-Bindung beeinträchtigt werden können [129]. Aus diesem Grund sind bei hohen Aptamerkonzentrationen Beeinträchtigungen der Ethanolamin-induzierten Dissoziation komplementärer Oligonukleotide aus dem Aptamer-Oligonukleotid-Komplex denkbar. Unter Verwendung einer sehr geringen Aptamerkonzentration (0,1 μM) dissoziierten bei Anwesenheit von Ethanolamin lediglich $\sim 25\text{-}40\%$ der komplementären Oligonukleotide vom Aptamer-Komplex. Es ist zu vermuten, dass bei sehr geringen Aptamerkonzentrationen vermehrt unspezifische Wechselwirkungen zwischen Aptamer und Immobilisierungsoberfläche auftreten. Diese Wechselwirkungen können die Ausbildung einer Aptamerfaltung und somit die Targetbindung beeinträchtigen, sodass nur eine geringe Dissoziation komplementärer Oligonukleotide durch das Target Ethanolamin induziert werden kann. Um eine bestmögliche Signaländerung in Anwesenheit von Ethanolamin zu erreichen, eignen sich bei dieser Detektionsmethode somit vor allem geringe Aptamer-Immobilisierungsdichten, die mit Aptamerkonzentrationen zwischen 1 μM und 5 μM erzielt werden können. Diese Beobachtungen konnten auch für die Detektionsmethode TID/FRETkompetitiv in Kapitel 4.1.4.2 gemacht werden. Eine besonders effektive Ethanolamin-Bindung und somit eine besonders geringe Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide wurde bei diesen Immobilisierungsdichten unter Verwendung kurzer Oligonukleotide erreicht. Je kürzer das zur TID-basierten Detektion eingesetzte Oligonukleotid, desto höher die Ethanolamin-induzierte Dissoziation der Oligonukleotide aus dem Aptamer-Oligonukleotid-Komplex. Während die Hybridisierung 10 nt langer Sequenzen bei einer Ethanolaminkonzentration von 1 μM um $\sim 70\%$ reduziert wurde, konnte bei der Hybridisierung des 16 nt lange Oligonukleotid nur eine Verringerung um $\sim 50\%$ erzielt werden (Abb. 4.24, Tab. 4.6). Basierend auf der geringen Affinität kurzer Oligonukleotide zum Aptamer, wurde durch das Target Ethanolamin eine höhere Anzahl dieser kurzen Oligonukleotide aus dem Aptamer-Oligonukleotid-Komplex verdrängt.

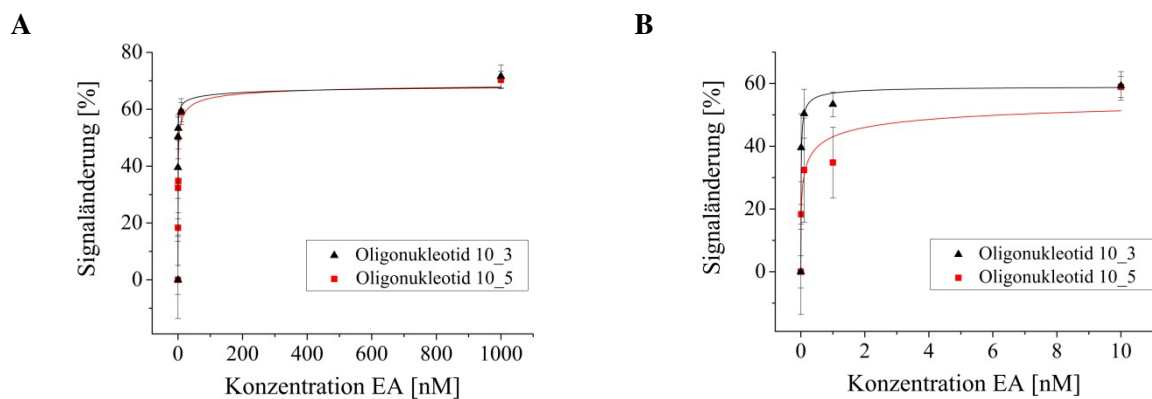


Abb. 4.24 Detektion von Ethanolamin (EA) mit der Detektionsmethode TID/Fluoreszenz basierend auf der Target-induzierten Dissoziation der komplementären Oligonukleotide 10_5 und 10_3. (A) Verlauf der Detektionskurve bis zu einer maximalen Signaländerung (bei 1000 nM Ethanolamin). (B) Verlauf der Signaländerung bis zu einer Ethanolamin-Konzentration von 10 nM.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass neben der Oligonukleotid-Länge auch die Positionierung des Oligonukleotids innerhalb der Targetbindungsstelle die Target-induzierte Dissoziation beeinflusst. Die Positionierung des Oligonukleotids bei der Hybridisierung scheint dabei auch einen Einfluss auf die Sensitivität der Target-induzierten Dissoziation und somit auf die Sensitivität der Ethanolamin-Detektion zu haben. Die Sensitivität der Ethanolamin-Detektion wurde mit Hilfe des K_{25} -Wertes abgeschätzt. Der K_{25} -Wert gibt die Konzentration an Ethanolamin an, bei der 25 % der maximalen Reduzierung der Oligonukleotid-Hybridisierung erreicht wurde. Unter Verwendung der Oligonukleotide 10_3 und 12_3 wurden im Gegensatz zu den Oligonukleotiden 10_5 und 12_5 geringere K_{25} -Werte erzielt. Somit konnte gezeigt werden, dass 3'-terminal verkürzten Sequenzen eine besonders sensitive Detektion von Ethanolamin im pikomolaren Bereich ermöglichen. Diese Beobachtungen sind vermutlich auf das unterschiedliche Bindungs- und Dissoziationsverhalten 3'-terminal und 5'-terminal verkürzter Oligonukleotidsequenzen zurückzuführen. Basierend auf den hohen Werten der Dissoziationskonstanten $K_{D(\text{Oligo})}$ 3'-terminal verkürzter Sequenzen (Tab. 4.5), konnte eine Dissoziation von 25 % dieser Oligonukleotide bereits beim Einsatz geringerer Ethanolamin-Konzentrationen erzielt werden (Tab. 4.6).

Unter Verwendung 3'-terminal verkürzter Oligonukleotide wurde eine sensitive Detektion nur im piko- bis nanomolaren Konzentrationsbereich erzielt. Die Verwendung 5'-terminal verkürzter Sequenzen erhöhte jedoch den Detektionsbereich, sodass eine sensitive Detektion von Ethanolamin im mikromolaren Bereich ermöglicht wurde. Die Sensitivität im mikromolaren

Konzentrationsbereich wurde mit Hilfe des K_{75} -Wertes abgeschätzt. Der K_{75} -Wert gibt die Konzentration an Ethanolamin an, bei der 75 % der maximalen Reduzierung der Oligonukleotid-Hybridisierung erreicht wurde. Je größer der K_{75} -Wert, desto größer ist der Konzentrationsbereich von Ethanolamin, in dem eine Verringerung der Oligonukleotid-Hybridisierung anhand der Signaländerung sensitiv detektiert werden kann.

Die Oligonukleotide 10_3 und 10_5 stellen somit vielversprechende Kandidaten zur Ethanolamin-Detektion mit Hilfe der Detektionsmethode TID/Fluoreszenz dar. Neben einer hohen Signaländerung bei Anwesenheit von Ethanolamin (~ 70 %) durch Verringerung der Oligonukleotid-Hybridisierung, weisen diese Oligonukleotide außerdem ein geringes Detektionslimit um ~ 10 pM auf (Tab. 4.6).

Tab. 4.6 Vergleich der unterschiedlich langen Oligonukleotide zur Detektion von Ethanolamin mit Hilfe der Detektionsmethode TID/Fluoreszenz.

Oligonukleotid	Signaländerung [%]	K_{25} [pM]	K_{75} [pM]	LOD [pM]
10_5	70,34 ± 1,22	94,54	706.455,78	11,27
10_3	71,58 ± 1,28	4,38	585,39	10,32
12_5	60,03 ± 2,17	6,84	979,28	12,00
12_3	62,26 ± 3,91	4,01	78,23	12,89
16	48,90 ± 5,47	3,98	48,38	15,10

Für eine quantitative Bestimmung unbekannter Ethanolaminkonzentrationen kann der Verlauf der Signaländerung in Abhängigkeit von der Ethanolaminkonzentration als Kalibrationskurve eingesetzt werden. Die Kalibrationskurve lässt sich durch einen sigmoiden Kurvenverlauf beschreiben. Zur quantitativen Bestimmung von Ethanolamin müsste die Signaländerung bei Ethanolaminkonzentrationen < 1 nM noch eingehender untersucht werden.

4.1.5.4 Untersuchung der Reversibilität

Die Reversibilität der Aptamer-basierten Detektionsreaktion ist essentiell für die Entwicklung eines regenerierbaren Biosensors. Aus diesem Grund wurde die entwickelte Detektionsmethode TID/Fluoreszenz bezüglich der Reversibilität der Bindung von Ethanolamin an das Aptamer untersucht. Die bei der Detektion von Ethanolamin parallel ablaufenden Reaktionen

(siehe Kapitel 4.1.3.4) werden im Folgenden zusammenfassend als Detektionsreaktion bezeichnet.

Wie bereits in Kapitel 4.1.4.3 beschrieben, sollte nach erfolgter Ethanolamin-Detektion das entstandene Reaktionsgleichgewicht zwischen Aptamer-Target- und Aptamer-Oligonukleotid-Komplex wieder vollständig auf die Seite der Aptamer-Oligonukleotid-Bindung (Hybridisierung) verschoben werden, um eine erneute Ethanolamin-Detektion zu ermöglichen. Nach Erhitzen der Detektionslösung bzw. Verringerung des pH-Wertes in der Detektionslösung wurde die Reversibilität der Detektionsreaktion bei anschließender Erhöhung der Oligonukleotidkonzentration untersucht (Abb. 4.25).

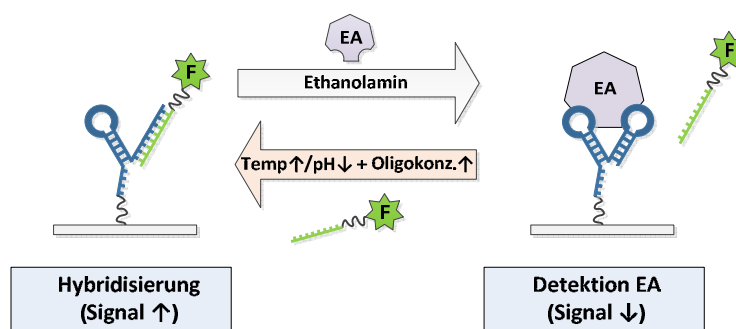


Abb. 4.25 Versuchsablauf zur Bestimmung der Reversibilität der Ethanolaminbindung (Detektionsmethode TID/Fluoreszenz). Durch Erhitzen der Detektionslösung (95 °C) bzw. Verringerung des pH-Wertes (pH 3) in der Detektionslösung und anschließender Erhöhung der Oligonukleotidkonzentration (1 μ M) soll das Gleichgewicht der Detektionsreaktion wieder auf die Seite des Aptamer-Oligonukleotid-Komplexes verschoben werden.

Wie bereits in Kapitel 4.1.4.3 gezeigt, kann nach erfolgter Ethanolamin-Detektion das Reaktionsgleichgewicht nur durch eine Erhöhung der Oligonukleotidkonzentration nicht vollständig auf die Seite des Aptamer-Oligonukleotid-Komplexes verschoben werden. Aus diesem Grund sollte die Hybridisierung zwischen Oligonukleotid und Aptamer sowie die Dissoziation gebundener Target-Moleküle durch eine hitzebedingte Denaturierung des Aptamers bzw. eine säurebedingte Beeinträchtigung der Aptamerfaltung zusätzlich begünstigt werden.

Zum einen wurde die Detektionslösung hierzu nach erfolgter Ethanolamin-Detektion kurzzeitig (10 min) auf 95 °C erhitzt. Das durch diese Hitzeeinwirkung vom Aptamer-Komplex dissoziierte Ethanolamin wurde zusammen mit ungebundenen Oligonukleotiden vor dem Abkühlen der Detektionslösung entfernt, um eine erneute Targetbindung zu verhindern. Das Ethanolamin-Aptamer wurde anschließend mit einer Oligonukleotidlösung (1 μ M) inkubiert, um eine Regeneration des Aptamer-Oligonukleotid-Komplexes zu ermöglichen.

Bei einer weiteren Methode zur Regeneration der Aptamer-Oligonukleotid-Bindung sollte zunächst der pH-Wert verringert werden, um die Aptamerfaltung zu beeinträchtigen [134]. In einer sauren Umgebung kann es zur Protonierung funktioneller Aptamergruppen kommen, die zur Targetbindung erforderlich sind, sodass eine Dissoziation des Targets begünstigt wird. Hierzu wurde die Detektionslösung (mit ungebundenem Ethanolamin und Oligonukleotid) durch Reaktionspuffer BP(-) mit einem pH-Wert von 3 ersetzt und das Aptamer anschließend mit einer Oligonukleotidlösung (1 μM , pH 7,4) inkubiert.

Bei vollständiger Umkehrung der Detektionsreaktion durch Ausbildung des Aptamer-Oligonukleotid-Komplexen mit Fluoreszenz-markiertem Oligonukleotid wurde ein Anstieg des Fluoreszenzsignals erwartet. Es zeigte sich jedoch keine vollständige Reversibilität der Detektionsreaktion. Mit Hilfe dieser untersuchten Methoden konnte das Gleichgewicht der Detektionsreaktion nur begrenzt zurück in Richtung Aptamer-Oligonukleotid-Komplex (Hybridisierung) verschoben werden, sodass nur ein geringer Signalanstieg detektiert wurde (Abb. 4.26).

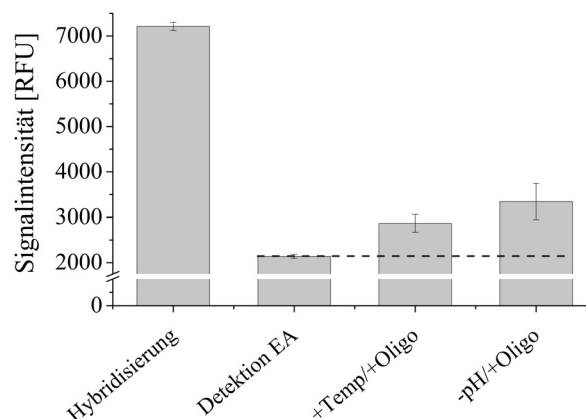


Abb. 4.26 Bestimmung der Reversibilität der Ethanolaminbindung unter Verwendung der Detektionsmethode TID/Fluoreszenz (Aptamerkonzentration 5 μM). Das Gleichgewicht der Detektionsreaktion wurde durch Temperaturerhöhung (+ Temp, 95 °C) bzw. pH-Wert-Senkung (-pH, pH 3) und anschließender Erhöhung der Oligonukleotidkonzentration von 10₋₅ (+ Oligo, 1 μM) zurück in Richtung Oligonukleotidhybridisierung verschoben. Bei erneuter Hybridisierung des Fluoreszenz-markierten Oligonukleotides an EA#14.3 wird nach Detektion von EA ein Signalanstieg erwartet. Durch die gestrichelte Linie soll der detektierte Signalanstieg verdeutlicht werden.

Die geringe Reversibilität der Detektionsreaktion wird vermutlich durch die hohe Affinität des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3 zum Target (K_D 6 nM) [3] hervorgerufen. Trotz hitzebedingter Denaturierung des Aptamers und säurebedingter Beeinflussung der Aptamerfaltung,

konnte dennoch keine vollständige Reversibilität der Detektionsreaktion erzielt werden. Es ist somit anzunehmen, dass das Ethanolamin-Aptamer auch unter Temperatur- und pH-Bedingungen, die nicht den optimalen Faltungsbedingungen (Bedingungen des Selektionsprozesses) entsprechen, dreidimensionale Strukturen ausbilden kann. Diese Eigenschaft des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3 ist vermutlich auf die G-Quadruplex-Struktur zurückzuführen, für die eine besonders hohe Stabilität bekannt ist [68].

Bei der Durchführung der Reversibilitätsuntersuchungen wurde außerdem die pH- und Temperaturstabilität des Fluoreszenzfarbstoffes Cy3 am Oligonukleotid berücksichtigt. Sollte es zu einer pH- bzw. Temperatur-bedingten Beeinträchtigung des Fluorophors kommen, könnte die Ausbildung des Aptamer-Oligonukleotid-Komplexes nur bedingt detektiert werden. Der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 weist jedoch eine hohe pH-Toleranz (pH 3-10) und Photostabilität auf [135], sodass Beeinflussungen des Fluoreszenzsignals durch die Änderungen von pH-Wert und Temperatur ausgeschlossen werden können.

Für die Entwicklung einer vollständig reversiblen Detektionsreaktion sollte das Aptamer bei der *in vitro*-Selektion den gewünschten Versuchsbedingungen angepasst werden. Auf diese Weise könnten Aptamere selektiert werden, die eine vollständige Denaturierung und eine langsame Rückfaltung innerhalb bestimmter Temperatur- oder pH-Wert-Bereiche aufweisen. Somit könnte eine hohe Reversibilität der Detektionsreaktion nach erfolgter Targetbindung ermöglicht werden.

4.1.5.5 Zusammenfassung TID mit Fluoreszenz-basierter Detektion

Durch Reduzierung kostenintensiver Fluoreszenz-Modifizierungen am Ethanolamin-Aptamer wurde aus der bereits in Kapitel 4.1.4 untersuchten Detektionsmethode TID/FRET eine weitere Methode zur Detektion von Ethanolamin entwickelt. Auch diese Detektionsmethode beruht auf der Target-induzierten Dissoziation (TID) Fluoreszenz-modifizierter Oligonukleotide (Abb. 4.21). Bei Entwicklung dieser Detektionsmethode (TID/Fluoreszenz) wurde der Einfluss der Aptamerkonzentration sowie die Länge und Positionierung der komplementären Oligonukleotide auf die Target-induzierte Dissoziation und somit auf die Detektion von Ethanolamin untersucht.

Unter Verwendung geringer Aptamerkonzentrationen (1-5 μM) zur Immobilisierung des Aptamers sowie kurzer Oligonukleotidsequenzen (10 nt) zur Realisierung der TID konnte bei Anwesenheit von Ethanolamin eine maximale Signaländerung ($\sim 70\%$) detektiert werden.

Unter diesen Detektionsbedingungen wurde mit Hilfe der entwickelten Detektionsmethode TID/Fluoreszenz eine hohe Sensitivität im pikomolaren Bereich ($K_{25} = 4,38 \text{ pM}$) und ein geringes Detektionslimit ($\text{LOD} = 10,32 \text{ pM}$) erzielt.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Positionierung des Oligonukleotids innerhalb der Targetbindungsstelle den Detektionsbereich der Target-induzierten Dissoziation beeinflusst. Unter Verwendung 3'-terminal verkürzter Oligonukleotide wurde eine sensitive Detektion im pikomolaren Konzentrationsbereich erzielt. 5'-terminal verkürzte Sequenzen erhöhten den Detektionsbereich, sodass eine sensitive Detektion von Ethanolamin im mikromolaren Bereich ermöglicht wurde.

Diese Detektionsmethode TID/Fluoreszenz konnte somit erfolgreich für eine Aptamer-basierte Detektion des kleinen Moleküls Ethanolamin eingesetzt werden. Auf Grund der hohen Affinität des Aptamers EA#14.3 zum Target Ethanolamin sowie den Faltungseigenschaften des Aptamers wurde eine vollständige Reversibilität der Detektionsreaktion jedoch nicht erzielt.

4.1.6 Vergleich und Beurteilung der Detektionsmethoden für EA in der Flüssigphase

Zur Detektion kleiner Moleküle in der Flüssigphase wurden unter Verwendung des Modellmoleküls Ethanolamin drei unterschiedliche Aptamer-basierte Detektionsmethoden im Microarray-Format entwickelt. Diese Detektionsmethoden „Kompetitive Bindung“, „TID/FRET“ und „TID/Fluoreszenz“ ermöglichen eine optische Detektion des Targets Ethanolamin.

Die Detektionsmethode der kompetitiven Bindung beruht auf einer Kompetition zwischen Quantum Dot-markiertem und unmarkiertem Ethanolamin bei der Bindung an das Aptamer. Bei Verdrängung von QD-EA durch unmodifiziertes Ethanolamin konnte das Target Ethanolamin über eine Abnahme in Fluoreszenzintensität detektiert werden (4.1.2).

Die Detektionsmethode TID/FRET beruht auf der Target-induzierten Dissoziation komplementärer Oligonukleotide. Durch Fluorophor-Modifizierung des Aptamers und Quencher-Modifizierung des komplementären Oligonukleotids konnte das FRET-Prinzip zur Detektion des Targets ausgenutzt werden. Bei Anwesenheit von Ethanolamin wurde eine Dissoziation des Quencher-modifizierten Oligonukleotids von Aptamer induziert, sodass das Target Ethanolamin über einen Anstieg des Fluoreszenzsignals detektiert werden konnte (4.1.3, 4.1.4).

Die Detektionsmethode TID/Fluoreszenz basierte ebenfalls auf der Target-induzierten Dissoziation. Diese Detektionsmethode benötigt im Gegensatz zur Methode TID/FRET jedoch kei-

ne Fluoreszenz-Modifizierung des Aptamers, da das Target Ethanolamin durch Dissoziation Fluoreszenz-markierter Oligonukleotide nachgewiesen wird (4.1.5).

Im Folgenden werden diese drei entwickelten Detektionsmethoden vergleichend gegenübergestellt und bezüglich einer möglichen Anwendung in einem Aptamer-basierten Biosensor zur Detektion kleiner Moleküle beurteilt.

4.1.6.1 Signalanstieg, Sensitivität, Detektionslimit

Bei der Anwendung der optischen Detektionsmethoden sollte die Anwesenheit von Ethanolamin in der Detektionslösung durch eine möglichst hohe Änderung des optischen Signals (Signalanstieg oder Signalverringern) angezeigt werden. Sehr geringe Signaldifferenzen zwischen den unterschiedlichen Detektionszuständen können von vielen optischen Detektoren (z.B. Microarray Scanner) nur mit unzureichender Genauigkeit bestimmt werden. Aus diesem Grund sollte die Signaländerung bei der Entwicklung der Detektionsmethode maximiert werden. Unter Verwendung der Detektionsmethode TID/Fluoreszenz konnte bei Anwesenheit von Ethanolamin die größte Signaländerung ($\sim 70\%$) erzielt werden. Die Detektionsmethoden Kompetitive Bindung und TID/FRET wiesen lediglich prozentuale Änderungen des Fluoreszenzsignals von $\sim 30\text{-}40\%$ auf (Abb. 4.27, Tab. 4.7).

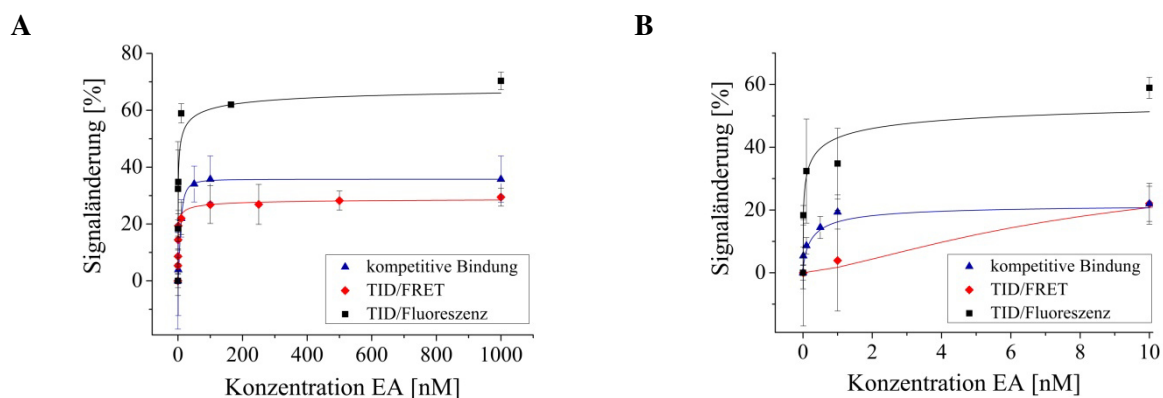


Abb. 4.27 Vergleich des prozentualen Signalanstiegs der entwickelten Detektionsmethoden Kompetitive Bindung, TID/FRET, TID/Fluoreszenz bei Anwesenheit von Ethanolamin. (A) Maximale Signaländerung bis 1000 nM Ethanolamin. (B) Signaländerung bis 10 nM Ethanolamin.

Neben der Signaländerung wurden auch die Sensitivität und das Detektionslimit der entwickelten Detektionsmethoden beurteilt. Die Sensitivitäten konnten mit Hilfe der K_{25} - und K_{75} -Werte abgeschätzt werden. Diese Werte geben die Konzentration an Ethanolamin an, bei der 25 % bzw. 75 % der maximal detektierbaren Signaländerung erzielt wurde. Je geringer

der K_{25} -Wert, desto höher die Sensitivität der Detektionsmethode. Je größer der K_{75} -Wert, desto größer ist der Konzentrationsbereich von Ethanolamin, in dem eine Änderung der Signalintensität detektiert werden kann. Somit lässt sich mit Hilfe des K_{75} -Wertes der Konzentrationsbereich abschätzen, in dem eine Ethanolamin-Detektion möglich ist.

Für die TID-basierten Detektionsmethoden TID/FRET und TID/Fluoreszenz konnten vergleichbar hohe Sensitivitäten (K_{25}) und LOD-Werte im pikomolaren Konzentrationsbereich erzielt werden. Mit der Detektionsmethode der Kompetitiven Bindung wurden Sensitivität und Detektionslimit lediglich im nanomolaren Konzentrationsbereich bestimmt. Die vergleichbar geringe Sensitivität der Detektionsmethode Kompetitive Bindung lässt sich vermutlich auf die Entstehung multipler Bindungen zwischen Quantum Dot-modifiziertem Ethanolamin und Aptamer zurückführen (Abb. 4.6), wodurch eine Dissoziation des Targets erschwert wird.

Die Detektionsmethoden basierend auf der Target-induzierten Dissoziation komplementärer Oligonukleotide (TID/FRET, TID/Fluoreszenz) bieten bezüglich Sensitivität und Detektionslimit die vielversprechendsten Methoden zur Detektion von Ethanolamin. TID/FRET ermöglicht eine sensitive Detektion von Ethanolamin jedoch nur im piko- bis nanomolaren Konzentrationsbereich, während TID/Fluoreszenz eine sensitive Detektion bis in den mikromolaren Konzentrationsbereich (K_{75}) gewährleistet (Tab. 4.7).

Tab. 4.7 Vergleich der entwickelten Aptamer-basierten Detektionsmethoden zur Bestimmung von Ethanolamin bezüglich Signaländerung, Sensitivität (K_{25} , K_{75}), Detektionslimit (LOD).

Detektionsmethode	Signaländerung [%]	K_{25} [nM]	K_{75} [nM]	LOD [pM]
Kompetitive Bindung	37,75 ± 8,18	3,50	26,04	681,45
TID/FRET	29,46 ± 3,15	0,065	12,358	13,04
TID/Fluoreszenz	70,34 ± 1,22	0,095	706,46	11,27

4.1.6.2 Reversibilität

Die entwickelten Aptamer-basierten Detektionsmethoden sollen ebenfalls bezüglich Reversibilität der Detektionsreaktion verglichen werden. Nur bei vollständiger Reversibilität der Targetbindung kann das Aptamer nach erfolgter Detektion für einen erneuten Detektionsprozess eingesetzt werden.

Die Reversibilität der Detektionsreaktion wurde lediglich für die Detektionsmethoden durchgeführt, deren Detektionsdesign auf der Target-induzierten Dissoziation komplementärer Oli-

gonukleotide basiert (TID/FRET, TID/Fluoreszenz). Die Detektionsmethode der Kompetitiven Verdrängung zeigte bereits bei der Detektion von Ethanolamin eine unzureichende Reproduzierbarkeit der Messergebnisse (4.1.2.1) sowie eine hohe LOD, sodass auf eine Untersuchung der Reversibilität verzichtet wurde. Durch Temperatur- und pH-bedingte Denaturierung des Aptamers sowie einer Beeinflussung des Reaktionsgleichgewichts durch Konzentrationsveränderungen (Erhöhung Oligonukleotidkonzentration) zeigte sich jedoch keine vollständige Reversibilität der Detektionsreaktion von TID/FRET und TID/Fluoreszenz. Die geringe Reversibilität der Detektionsreaktionen wurde vermutlich durch die hohe Affinität des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3 (K_D 6 nM) zum Target Ethanolamin hervorgerufen.

Die entwickelten Aptamer-basierten Detektionsmethoden zur Bestimmung von Ethanolamin eignen sich somit hauptsächlich für eine einmalige Detektion des Targets.

Es wurden jedoch TID-basierte Aptasensoren publiziert, bei denen eine Regeneration durch Temperatur-bedingte Denaturierung des Aptamers [113, 117] bzw. Konzentrationserhöhung des Oligonukleotids [136, 137] erzielt werden konnte. Somit wird die Reversibilität einer Aptamer-basierten Detektionsreaktion vor allem durch die unterschiedlichen Faltungs- und Bindungseigenschaften der Aptamere beeinflusst. Um Aptamere mit hohen Bindungsaffinitäten (wie das Ethanolamin-Aptamer EA#14.3) in regenerierbaren Aptasensoren einsetzen zu können, ist eine Beeinflussung der Aptamereigenschaften während des Selektionsprozesses sinnvoll. Eine Möglichkeit ist die Selektion spezieller Aptamere, deren Faltung von zweiwertigen Ionen abhängt. Bei solchen Aptameren könnte eine EDTA-induzierte Entfaltung zu einer vollständigen Regenerierung des Aptamers führen.

4.1.6.3 Spezifität

Um eine spezifische Detektion des kleinen Targets Ethanolamin mit Hilfe der entwickelten Aptamer-basierten Detektionsmethoden gewährleisten zu können, wurde die Detektion ebenfalls unter Verwendung von Targets durchgeführt, die eine strukturelle Ähnlichkeit zu Ethanolamin aufweisen. Hierzu wurden die kleinen Moleküle Propylamin, Ethanol und die Aminosäure Arginin eingesetzt. Die Spezifität der Detektion wird vor allem durch die Bindungseigenschaften des Aptamers beeinflusst und ist unabhängig vom Detektionsdesign (kompetitive Bindung, TID) der entwickelten Detektionsmethode. Aus diesem Grund werden die Untersuchungen zur Spezifität stellvertretend für die entwickelten Detektionsmethoden anhand der Methode TID/Fluoreszenz gezeigt.

Obwohl Ethanolamin unter Verwendung der Detektionsmethode TID/Fluoreszenz die größte Reduzierung der Oligonukleotid-Hybridisierung und somit die größte Signaländerung indu-

zierte (~ 70 %), konnte auch durch Propylamin eine Signaländerung von ~ 40 % hervorgerufen werden. Die Anwesenheit von Ethanol und Arginin erzielte lediglich eine geringe Reduzierung der Oligonukleotid-Hybridisierung (~ 20 % und ~ 3 %) (Abb. 4.28, Tab. 4.8).

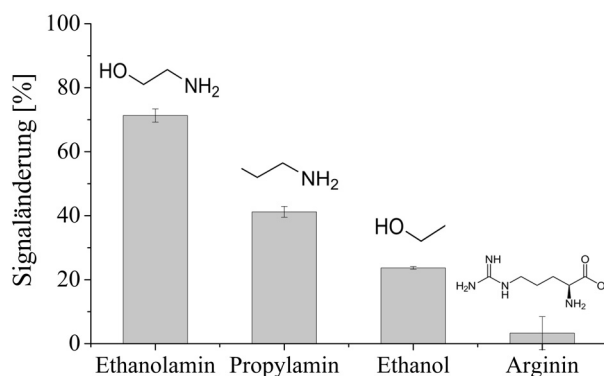


Abb. 4.28 Spezifität der Ethanolamindetektion unter Verwendung der Detektionsmethode TID/Fluoreszenz (komplementäres Oligonukleotid 10_5). Die Targets Propylamin, Ethanol und Arginin wurde eingesetzt, um die Spezifität der Ethanolamin-Bindung zu untersuchen. Ethanolamin, Propylamin, Ethanol und Arginin wurden mit einer Konzentration von 1 μM eingesetzt.

Tab. 4.8 Vergleich von Signaländerung und Sensitivität (K_{25}) bei der Detektion strukturähnlicher Targets mittels Detektionsmethode TID/Fluoreszenz zur Bestimmung der Spezifität der Ethanolamin-Bindung.

Target	Signaländerung [%]	K_{25} [nM]
Ethanolamin	70,34 ± 1,22	0,095
Propylamin	41,21 ± 1,68	0,086
Ethanol	23,69 ± 0,40	2,87
Arginin	3,30 ± 5,16	719.880,12

Die Sensitivität der Propylamin-, Ethanol- und Arginin-induzierten Reduzierung der Oligonukleotid-Hybridisierung wurde anhand des K_{25} -Wertes abgeschätzt. Die Propylamin- und Ethanol-Detektion erzielten, vergleichbar zur Ethanolamin-Detektion, Sensitivitäten im piko- bis nanomolaren Bereich. Die Detektion der Aminosäure Arginin wies hingegen eine deutlich geringere Sensitivität im hohen mikromolaren Konzentrationsbereich auf (Tab. 4.8).

Neben der Bindung von Ethanolamin durch das Aptamer EA#14.3, konnte somit auch eine molekulare Erkennung des kleinen Moleküls Propylamin durch das Ethanolamin-Aptamer nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen lassen sich auf strukturelle Ähnlichkeiten zwischen den Targets Ethanolamin und Propylamin zurückführen. Reinemann *et al.* (2009) zeigten, dass Ethyl- und Methylamin-Gruppen essentiell für die Targeterkennung und -bindung kleiner Moleküle durch das Aptamer EA#14.3 sind [76]. Diese Struktur motive treten sowohl bei Ethanolamin als auch bei Propylamin auf, wodurch eine molekulare Erkennung beider Moleküle zu begründen ist. Somit weist das Ethanolamin-Aptamer EA#14.3 eine hohe Gruppenspezifität, jedoch eine geringe Spezifität gegenüber einer einzelnen Substanz innerhalb dieser Targetgruppe auf.

Werden die entwickelten Aptamer-basierten Detektionsmethoden unter Verwendung des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3 eingesetzt, können neben Ethanolamin daher noch weitere strukturverwandte Targets gruppenspezifisch detektiert werden. Sollen die entwickelten Detektionsmethoden zur Detektion weiterer kleiner Targets jedoch auf andere Aptamere übertragen werden, ist eine substanzspezifische Detektion kleiner Moleküle durchaus denkbar.

4.1.6.4 Anwendung der Detektionsmethoden auf andere Aptamere

Die Aptamer-basierten Detektionsmethoden wurden unter Verwendung des Modellmoleküls Ethanolamin entwickelt, sollen jedoch ebenfalls bei der Detektion weiterer kleiner, flüchtiger Targets zum Einsatz kommen. Aus diesem Grund soll die Übertragbarkeit der entwickelten Detektionsmethoden auf unterschiedlichen Aptamere zur Detektion kleiner Targets beurteilt werden. Unter Verwendung der TID-basierten Detektionsmethoden (TID/FRETkompetitiv, TID/Fluoreszenz) konnte eine besonders sensitive Detektion des Targets Ethanolamin erzielt werden, sodass das entwickelte Detektionsdesign der Target-induzierte Dissoziation ebenfalls zur Detektion eines weiteren kleinen Targets eingesetzt wurde. Verwendet wurde das kleine Molekül Ochratoxin A (OTA, 403,81 Da), dessen korrespondierendes Aptamer [6], wie auch das Ethanolamin-Aptamer EA#14.3, eine G-Quadruplex-Struktur bei der Targetbindung ausbildet. Beim verwendeten OTA-Aptamer 1.12.2 ist die vollständige Aptamersequenz an der Ausbildung der G-Quadruplex beteiligt. Zur Durchführung der Target-induzierten Dissoziation wurde ein zum 3'-Ende des OTA-Aptamers komplementäres Oligonukleotid mit einer Länge von 10 nt entworfen (Abb. 4.29).

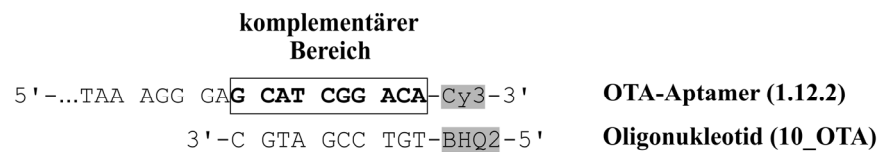


Abb. 4.29 OTA-Aptamer 1.12.2 und komplementäres Oligonukleotid 10_OTA (Länge 10 nt) zur TID-basierten Detektion von OTA im Microarray-Format.

Die entwickelte TID-basierte Detektionsmethode TID/FRETkompetitiv konnte erfolgreich zur Detektion dieses kleinen Targets OTA eingesetzt werden. Die OTA-induzierte Dissoziation komplementärer Oligonukleotide erzielte eine Signaländerung von ~ 80 %, die zur optischen Detektion von OTA genutzt wurde. Wie Ethanolamin konnte auch das Target Ochratoxin A mit Sensitivitäten (K_{25} , K_{75}) im nanomolaren Konzentrationsbereich detektiert werden (Abb. 4.30, Tab. 4.9).

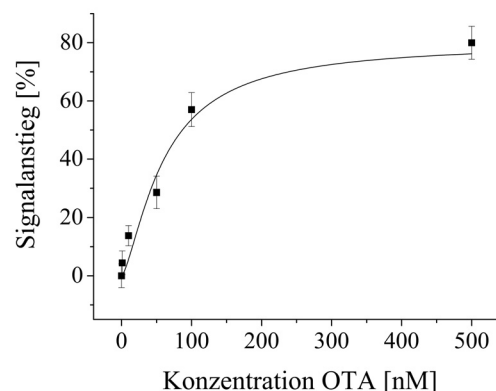


Abb. 4.30 Detektion von Ochratoxin A (OTA) mittels entwickelter TID-basierter Detektionsmethode (TID/FRET) unter Verwendung des OTA-Aptamers 1.12.2 (1 μ M zur Immobilisierung eingesetzt) und eines 10 nt langen komplementären Oligonukleotids (1 μ M).

Tab. 4.9 Signaländerung, Sensitivität (K_{25} , K_{75}) und Detektionslimit (LOD) der TID-basierten Detektionsmethode TID/FRET bei Detektion des kleinen Targets Ochratoxin A.

Signaländerung [%]	K_{25} [nM]	K_{75} [nM]	LOD [nM]
79,97 \pm 5,67	26,91	151,83	3,14

Die entwickelten TID-basierten Detektionsmethoden konnten somit ebenfalls erfolgreich für die Detektion des kleinen Moleküls Ochratoxin A eingesetzt werden. Durch die Positionierung der komplementären Oligonukleotide innerhalb der Targetbindungsstelle am Aptamer kann die Sensitivität der Detektionsmethode für die unterschiedlichen Targets zusätzlich optimiert werden. Eine Anwendung der TID-basierten Detektionsmethoden zur Detektion verschiedenster kleiner Targets erfordert jedoch eine Identifizierung der Targetbindungsstelle der verwendeten Aptamere, um die benötigten komplementären Oligonukleotide entwerfen zu können. Zur Detektion kleiner Moleküle mittels TID-basierter Detektionsmethoden ist aus diesem Grund vor allem die Anwendung von Aptameren sinnvoll, die mittels Capture-SELEX [138] selektiert wurden. Für diese Aptamere ist auf Grund der speziellen Selektionsmethode automatisch ein komplementäres Oligonukleotid bekannt, das bei Targetbindung vom Aptamer dissoziiert. Auf diese Weise können notwendige Untersuchungen der Aptamersequenz zur Identifizierung der Targetbindungsstelle vermieden werden, um ein komplementäres Oligonukleotid zu entwickeln.

Ist die Targetbindungsstelle der Aptamere bekannt bzw. ein komplementäres Oligonukleotide zur Dissoziation vorhanden, ist eine Anwendung der entwickelten Detektionsmethoden zur Detektion weiterer kleiner und flüchtiger Moleküle neben Ethanolamin und Ochratoxin A somit denkbar. Eine parallele Detektion verschiedenster kleiner, flüchtiger Targets unter Verwendung der TID-basierten Detektionsmethoden könnte durch die Entwicklung eines Multiarray-Aptasensors realisiert werden.

4.1.7 Zusammenfassung: Detektion von Ethanolamin in der Flüssigphase

Zur Detektion kleiner Moleküle in der Flüssigphase wurden unter Verwendung des Modellmoleküls Ethanolamin drei unterschiedliche Aptamer-basierte Detektionsmethoden im Microarray-Format entwickelt. Diese Detektionsmethoden „Kompetitive Bindung“, „TID/FRET“ und „TID/Fluoreszenz“ ermöglichen eine optische Detektion des Targets Ethanolamin. Während die Detektionsmethode „Kompetitive Bindung“ auf einer Konkurrenz zwischen markiertem und unmarkiertem Ethanolamin bei der Bindung an das Aptamer beruht (4.1.2), basieren „TID/FRET“ (4.1.4) und „TID/Fluoreszenz“ (4.1.5) auf einer Target-induzierten Dissoziation komplementärer Oligonukleotide.

Unter Verwendung der TID-basierten Detektionsmethoden (TID/FRET, TID/Fluoreszenz) konnten Sensitivitäten und Detektionslimits im pikomolaren Konzentrationsbereich erzielt werden, sodass diese beiden Detektionsmethoden eine besonders sensitive Detektion des Targets ermöglichen. Die Detektionsmethode TID/Fluoreszenz stellt aufgrund eines erweiterten

dynamischen Detektionsbereichs bis in den mikromolaren Konzentrationsbereich sowie einer Reduzierung der Detektionskosten durch Verringerung der Aptamer-Modifizierung jedoch die vielversprechendste Methode zur Detektion des kleinen Targets Ethanolamin dar.

Auf Grund der hohen Affinität des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3 gegenüber dem Target Ethanolamin und der hohen Stabilität der G-Quadruplex, die für die Bindung von Ethanolamin verantwortlich ist, konnte nach erfolgter Targetbindung jedoch keine vollständige Regeneration des Aptamers erzielt werden. Zudem wurde eine hohe Gruppenspezifität des Ethanolamin-Aptamers gegenüber Targets mit Ethyl- und Methylamin-Gruppen beobachtet.

Es konnte jedoch festgestellt werden, dass eine Übertragung der entwickelten TID-basierten Detektionsmethode auf weitere Aptamere möglich ist. Neben der Detektion von Ethanolamin ist mittels entwickelter TID-basierter Detektionsmethode daher eine Detektion verschiedenster kleiner und flüchtiger Moleküle denkbar. Es bietet sich somit die Entwicklung eines Multiarray-Aptasensors an, bei dem unter Verwendung unterschiedlicher Aptamere mehrere Targets parallel in der Flüssigphase detektiert werden können.

4.2 Detektion von Ethanolamin in der Gasphase

Neben der Detektion des Zielmoleküls in Flüssigkeiten, soll das Aptamer-basierte Sensorsystem auch zur Detektion flüchtiger Substanzen (VCO, *volatile organic compounds*) in der Gasphase eingesetzt werden können. Aus diesem Grund wurde die Aptamer-basierte Detektion des volatilen Modellmoleküls Ethanolamin ebenfalls an der Grenzfläche gasförmig/flüssig sowie in der Gasphase untersucht.

Die Detektion von Ethanolamin an der Grenzfläche gasförmig/flüssig erfolgte mit der optischen Detektionsmethode der Target-induzierten Dissoziation, mit der das Target Ethanolamin bereits erfolgreich in der Flüssigphase detektiert werden konnte. Durch Diffusion gelangte gasförmiges Ethanolamin in eine flüssige Detektionsumgebung und konnte dort durch Ausbildung der Aptamer-Ethanolamin-Bindung nachgewiesen werden.

Für das Ethanolamin-Aptamer wird eine Funktionalität zur Targetbindung auch in der Gasphase vermutet. Es ist bekannt, dass dreidimensionale G-Quadruplex-Strukturen, die auch das Ethanolamin-Aptamer zur Target-Bindung ausbildet, nicht nur in Lösung stabil sind. Auch in der Gasphase behalten solche Strukturen die G-Quadruplex-Faltung bei [139, 140]. Aus diesem Grund konnte die Aptamer-basierte Detektion von Ethanolamin ebenfalls in der Gasphase untersucht werden. Die Detektion von Ethanolamin in der Gasphase wurde mit Hilfe einer massensensitiven Detektionsmethode realisiert. Hierzu wurde das Ethanolamin-Aptamer auf

einer Quarzkristall-Mikrowaage (QCM, *quartz crystal microbalance*) immobilisiert und mit gasförmigem Ethanolamin überströmt.

Im Folgenden werden die Möglichkeiten einer Aptamer-basierten Detektion volatiler Zielmoleküle mit Hilfe der beschriebenen optischen und massensensitiven Detektionsmethoden untersucht.

4.2.1 Detektionsmethode I: Optische Detektion nach Diffusion in Lösung

Die Aptamer-basierte Detektion von Ethanolamin an der Grenzfläche gasförmig/flüssig erfolgte mit einer optischen Detektionsmethode. Hierzu wurde die Methode der Target-induzierten Dissoziation komplementärer Oligonukleotide eingesetzt, mit der das Target Ethanolamin bereits erfolgreich in der Flüssigphase detektiert werden konnte (4.1.4, 4.1.5). Diese Detektionsmethode zeichnet sich durch ein Detektionslimit im pikomolaren Bereich aus und eignet sich somit zur Detektion geringer Ethanolaminkonzentrationen.

Zur Detektion von Ethanolamin an der Grenzfläche gasförmig/flüssig wurde eine abgeschlossene Messkammer verwendet. Die Detektion wurde bei Raumtemperatur (21 °C) und unter Umgebungsdruck (1 bar) durchgeführt. In der Messkammer gelangte gasförmiges Ethanolamin durch Diffusion in eine flüssige Detektionsumgebung und konnte dort durch Ausbildung der Aptamer-Ethanolamin-Bindung nachgewiesen werden. Die Detektion von Ethanolamin erfolgte durch die Verwendung Fluorophor-modifizierte Aptamere und Quencher-modifizierte Oligonukleotide. Vor Zugabe von Ethanolamin konnte ein Quenching des Aptamersignals durch Hybridisierung von Aptamer und Oligonukleotid erzielt werden. Nach Diffusion von Ethanolamin in die Detektionslösung induzierte die Ausbildung der Aptamer-Ethanolamin-Bindung eine Dissoziation der Oligonukleotide. Das Target Ethanolamin konnte somit durch einen Anstieg des Fluoreszenzsignals am Aptamer detektiert werden konnte (Abb. 4.31).

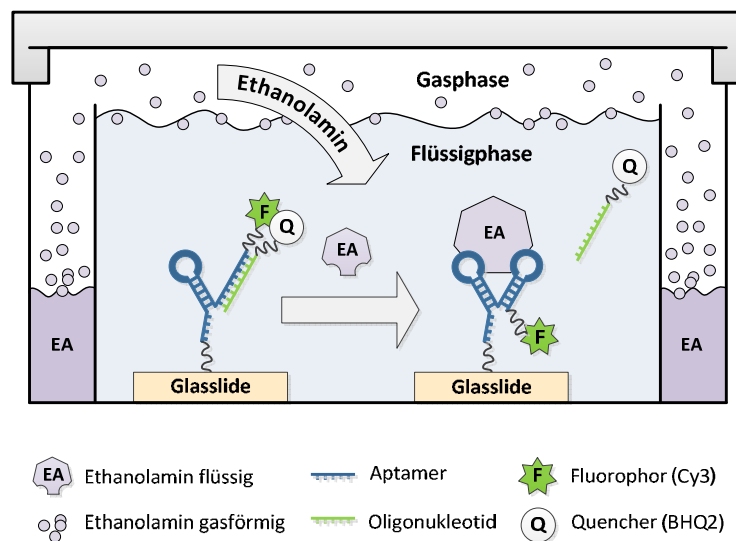


Abb. 4.31 Schematische Darstellung des Messaufbaus zur Aptamer-basierten Detektion von Ethanolamin an der Grenzfläche gasförmig/flüssig. Die Detektion wurde mittels Target-induzierter Dissoziation (TID) bei Raumtemperatur (21 °C) und unter Umgebungsdruck (1 bar) durchgeführt. Durch die Verdrängung Quencher-modifizierter Oligonukleotide konnte bei Anwesenheit von Ethanolamin ein optischer Signalanstieg detektiert werden.

4.2.1.1 Detektion von Ethanolamin

Die Aptamer-basierte Detektion von Ethanolamin an der Grenzfläche gasförmig/flüssig erfolgte bei einer mittleren Immobilisierungsdichte des Aptamers EA#14.3_Cy3 (10 μM) auf der Sensoroberfläche. Für eine solche Immobilisierungsdichte konnte ein optimaler Signalanstieg zur Detektion von Ethanolamin mittels Target-induzierter Dissoziation bereits in Kapitel 4.1.4.2 festgestellt werden. Um den Einfluss der Länge des komplementären Oligonukleotids auf die Target-induzierte Dissoziation zu untersuchen, wurden verschiedene, zum Aptamer komplementäre, Oligonukleotide mit einer Länge von 10-16 Nukleotiden eingesetzt.

Mit Hilfe der Detektionsmethode der Target-induzierten Dissoziation konnte nach Diffusion von gasförmigem Ethanolamin (16 h) in die flüssige Detektionsumgebung ein Signalanstieg von bis zu 15 % detektiert werden. Der stärkste Signalanstieg wurde unter Verwendung eines Oligonukleotids mit einer Länge von 10 Nukleotiden beobachtet (Abb. 4.32). Es ist anzunehmen, dass die Dissoziation dieses kurzen Oligonukleotids auf Grund der geringen Anzahl komplementärer Basenpaarungen zum Aptamer begünstigt wurde. Anhand des detektierten Signalanstiegs wurde eine Ethanolaminkonzentration von $\sim 0,2$ nM in der Detektionslösung abgeschätzt. Diese Abschätzung basiert auf der in Kapitel 4.1.4.2 (Abb. 4.18 B) erstellten Kalibrationsgeraden zur Detektion von Ethanolamin in der Flüssigphase. Durch Diffusion von

Ethanolamin in die Detektionslösung stellte sich somit eine Ethanolaminkonzentration in der Flüssigphase ein, mit der das Detektionslimit der TID-Methode (4.1.4.2, LOD 13 pM) nicht unterschritten wurde. Eine Aptamer-basierte Detektion von Ethanolamin an der Grenzfläche gasförmig/flüssig konnte somit realisiert werden.

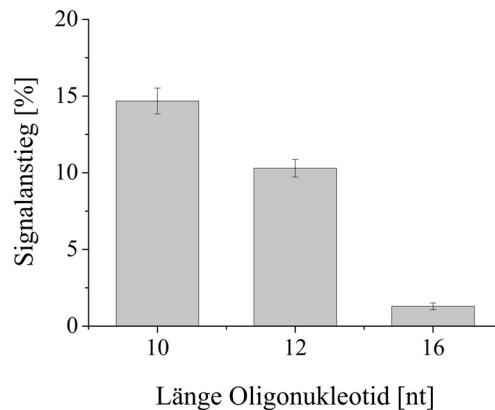


Abb. 4.32 Prozentualer Signalanstieg bei Aptamer-basierter Detektion von Ethanolamin (Target-induzierte Dissoziation) an der Grenzfläche gasförmig/flüssig. Das gasförmige Target gelangte durch Diffusion in eine flüssige Detektionsumgebung und konnte dort durch Ausbildung der Aptamer-Ethanolamin-Bindung nachgewiesen werden. Die Detektion wurde bei einer Aptamerkonzentration von 10 μM mit Oligonukleotiden zwischen 10 bis 16 Nukleotiden Länge durchgeführt.

Bislang ist diese Methode zur Detektion von gasförmigem Ethanolamin jedoch sehr zeitintensiv, da Diffusionszeiten von mehreren Stunden eingehalten werden müssen. Ob eine sensitive Detektion des volatilen Targets auch bei geringeren Diffusionszeiten möglich ist, muss weiter untersucht werden. Hierzu sind eine Bestimmung des Detektionslimits sowie eine Untersuchung der Druck- und Temperatureinflüsse auf das Diffusionsverhalten von Ethanolamin sinnvoll.

4.2.2 Detektionsmethode II: Massensensitive Detektion in der Gasphase

Für die Detektion von Ethanolamin in der Gasphase wurde eine Aptamer-basierte Quarzkristall-Mikrowaage (QCM, *quartz crystal microbalance*) entwickelt. Die Entwicklung dieses Detektionssystems wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr.-Ing. Stefan Zimmermann und Dipl.-Ing. Sven Fisahn am Institut für Grundlagen der Elektrotechnik und Messtechnik der Leibniz Universität Hannover durchgeführt.

Die QCM-basierte Detektionsmethode bestimmt die Masseänderung auf der Oberfläche eines schwingenden Quarzes. Hierzu wurde das Ethanolamin-Aptamer auf der Oberfläche eines piezoelektrischen Schwingquarzes (SiO_2) immobilisiert. Bei piezoelektrischen Quarzen induziert eine elektrische Spannung eine Ladungsverschiebung, die eine Verformung des Materials hervorruft. Beim Anlegen einer Wechselspannung kann ein piezoelektrischer Quarz somit in Schwingung versetzt werden. Ändert sich die Masse auf der Oberfläche des Quarzes, beeinflusst dies seine Schwingfrequenz. Eine Erhöhung der Masse durch die Bindung von Ethanolamin an das Aptamer führt zu einer Abnahme der Schwingfrequenz. Diese Frequenzänderung wurde zur Detektion von Ethanolamin bestimmt (Abb. 4.33 A).

Die elektrische Wechselspannung kann an zwei Goldelektroden am Quarz angelegt werden, die sich auf der Vorder- und Rückseite des Quarzes befinden. Zur Detektion von Ethanolamin wurde das Aptamer über einen terminalen Thiol-Linker auf den Goldelektroden des Schwingquarzes immobilisiert und vor der Anwendung in der Gasphase in Lösung gefaltet (Abb. 4.33 B).

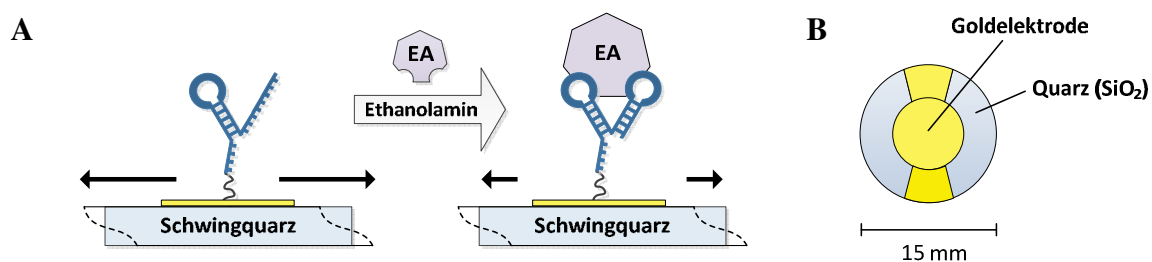


Abb. 4.33 Massensensitive Detektion von Ethanolamin mittels Aptamer-basierter Quarzkristall-Mikrowaage (QCM). (A) Quarzkristall-Mikrowaage (QCM): Vergrößert sich die Masse auf der Quarzoberfläche durch die Bindung von Ethanolamin an das Aptamer, verringert sich die Schwingfrequenz des Quarzes. (B) Schwingquarz (SiO_2) mit Goldelektroden auf Vorder- und Rückseite zum Anlegen der elektrischen Spannung. Das Ethanolamin-Aptamer wird über einen Thiol-Linker auf der Goldoberfläche des Quarzes immobilisiert.

4.2.2.1 Messaufbau

Die Aptamer-beschichteten Schwingquarze wurden zur Detektion von Ethanolamin in einer Messkammer mit gasförmigem Ethanolamin überströmt. Zur Erzeugung eines gasförmigen Ethanolaminstroms wurde trockene Luft (Taupunkt $-80\text{ }^\circ\text{C}$) durch eine mit Ethanolamin gefüllte Gaswaschflasche geleitet. Um die Aptamerfaltung in der Gasphase zu begünstigen, ermöglichte der Messaufbau ein zusätzliches Anreichern des Gasstroms mit feuchter Luft. Hier-

zu wurde ein trockener Luftstrom durch eine mit Wasser gefüllte Gaswaschflasche geleitet. Die Verwendung von Massenflusscontrollern ermöglichte es, das Verhältnis der Volumenströme von trockener und angefeuchteter Luft zu regulieren, um definierte Luftfeuchtigkeiten einzustellen. Die mit Ethanolamin und Wasser angereicherten Luftströme wurden vor der Messkammer zusammengeführt und mit einem Volumenstrom von 50 mL/min durch die Messkammer geleitet.

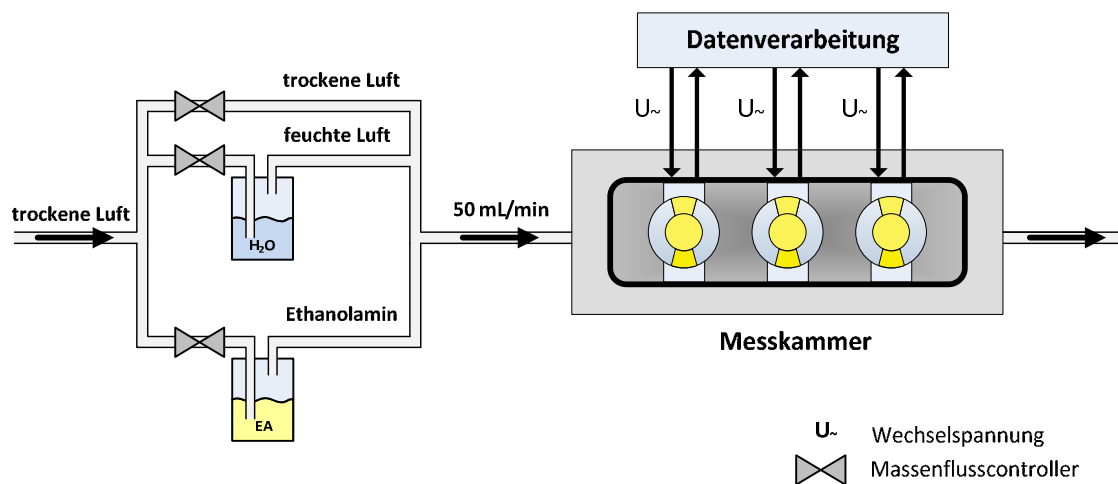


Abb. 4.34 Schematische Darstellung des Messaufbaus einer Aptamer-basierten Quarzkristall-Mikrowaage zur Bestimmung gasförmigen Ethanolamins. In der Messkammer kann das Schwingverhalten von drei Quarzen parallel vermessen werden.

Innerhalb dieser Messkammer konnten drei Schwingquarze parallel vermessen werden. Über Goldelektroden auf Ober- und Unterseite wurden die Quarze mit einer Wechselspannung zur mechanischen Schwingung angeregt. Die entstehende Resonanzfrequenz f_r der Quarze konnte mit Hilfe einer Datenverarbeitungssoftware (Auflösung 0,1 Hz) bestimmt werden. In Abb. 4.34 ist der Messaufbau der Aptamer-basierten Quarzkristall-Mikrowaage schematisch dargestellt.

4.2.2.2 Einfluss der Feuchtigkeit

Voraussetzung für eine möglichst sensitive Detektion von Ethanolamin mittels Quarzkristall-Mikrowaage ist eine geringe Dämpfung des Schwingquarzes durch Wassermoleküle auf der Quarzoberfläche. Aus diesem Grund wurde zunächst der Einfluss des Feuchtegehalts im zu analysierenden Gasstrom auf das Schwingverhalten des Quarzes untersucht. Hierbei sollte festgestellt werden, ob eine definierte Anreicherung der gasförmigen Detektionsumgebung mit feuchter Luft möglich ist, ohne dabei die Sensitivität des Schwingensystems zu beeinträchti-

gen. Durch die Erhöhung des Feuchtigkeitsgehalts könnte die Stabilität der Aptamerfaltung in der Gasphase begünstigt werden.

Zur Analyse des Schwingverhaltens wurde der Feuchtegehalt des Gasstroms in 5%-Schritten auf eine relative Luftfeuchte von 50 % erhöht (Abb. 4.35). Es konnte beobachtet werden, dass die Resonanzfrequenz eines unmodifizierten Schwingquarzes bei einem Feuchtegehalt von 50 % nur geringfügig gedämpft wurde. Während die Wassermoleküle bei einem unbeschichteten Quarz lediglich auf der Quarzoberfläche adsorbieren, können bei Aptamer-modifizierten Quarzen ebenfalls Wechselwirkungen mit den DNA-Strängen entstehen. Diese Wechselwirkungen führen zu einer erhöhten Massenablagerung auf dem Quarz. Die Schwingfrequenz eines Aptamer-beschichteten Quarzes wurde bei einer relativen Luftfeuchte von 50 % somit deutlich stärker gedämpft, als die Frequenz eines unmodifizierten Quarzes. Vermutlich fördert die dreidimensionale Faltung des Aptamers eine zusätzliche Einlagerung von Wassermolekülen in die DNA-Struktur. Diese Annahme wurde durch die Modifikation eines Schwingquarzes mit einem Oligonukleotid, welches keine G-Quadruplex ausbildet, bestätigt. Der Oligonukleotid-modifizierte Quarz zeigte eine geringere Dämpfung der Schwingungsfrequenz durch die Ablagerung von Wassermolekülen, als ein Aptamer-beschichteter Quarz.

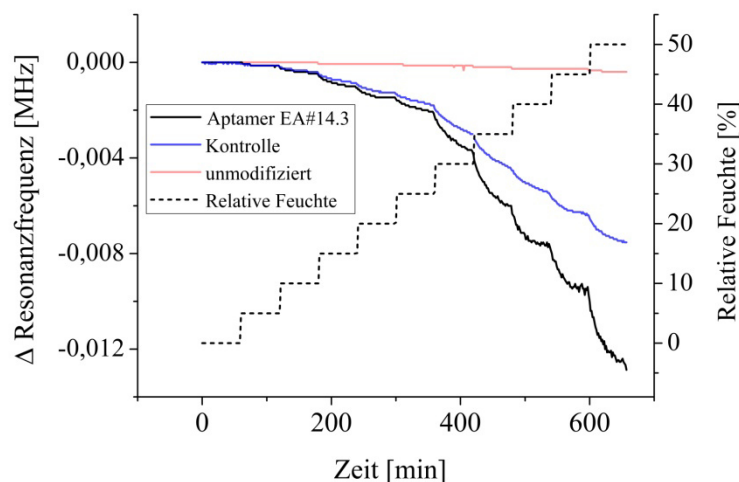


Abb. 4.35 Änderung der Resonanzfrequenz f_r von Schwingquarzen bei steigender Luftfeuchte. Gemessen wurde das Schwingverhalten eines unmodifizierten, eines Aptamer-modifizierten (EA#14.3) und eines Oligonukleotid-modifizierten (Kontrolle) Quarzes [141].

Insgesamt konnte für alle untersuchten Quarze jedoch ermittelt werden, dass ein Feuchtegehalt von bis zu 10 % keinen erheblichen Einfluss auf die Schwingfrequenz eines Quarzes ausübt. Bei einer relativen Luftfeuchte von 10 % wurde die Resonanzfrequenz eines mit Ethano-

lamin-Aptameren beschichteten Quarzes um ~ 450 Hz gedämpft. Dies entspricht einer Frequenzverringerng um 0,005 %. Für die weitere Entwicklung eines Aptamer-basierten QCM-Sensors konnten somit relative Luftfeuchtigkeiten von bis zu 10 % eingesetzt werden, ohne das Schwingssystem wesentlich zu beeinträchtigen.

4.2.2.3 Detektion von Ethanolamin

Zur Detektion von Ethanolamin wurden das Aptamer EA#14.3 mit einer maximal möglichen Dichte ($17 \cdot 10^9$ Aptamere/mm²) (Berechnung siehe A.2.7.2) auf dem Schwingquarz immobilisiert. Werden die Aptamere bei dieser maximal möglichen Immobilisierungsdichte vollständig von Ethanolamin-Molekülen gebunden, entspricht dies einer theoretischen Gewichtsänderung auf der Quarzoberfläche von $0,97 \cdot 10^{-10}$ g (Berechnung siehe A.2.7.3). Laut Literatur kann mit Hilfe eines QCM-Sensors eine Gewichtsänderung von 10^{-10} g mit hoher Genauigkeit detektiert werden [142]. Eine Detektion des kleinen Moleküls Ethanolamin mittels QCM ist somit theoretisch möglich.

Um das Schwingverhalten der Quarze bei Anwesenheit von Ethanolamin zu analysieren, wurden die Quarze in der Messkammer mit gasförmigem Ethanolamin überströmt. Der Anteil der Ethanolamin-gesättigten Luft am gesamten Gasstrom durch die Messkammer wurde hierbei in 5 %-Schritten bis zu einem maximalen Anteil von 20 % erhöht. Bei Anwesenheit von Ethanolamin zeigten die Quarze eine deutliche Änderung des Schwingverhaltens (Abb. 4.36). Für den unbeschichteten Quarz konnte nur eine geringe Resonanzveränderung beobachtet werden, die auf adsorptive Ablagerungen von Ethanolamin auf der Quarzoberfläche zurückzuführen ist. Eine deutliche Verringerung der Resonanzfrequenz zeigte hingegen der Aptamer-beschichtete Quarz. Je höher der Anteil von Ethanolamin im Gasstrom, desto stärker wurde die Schwingung des Aptamer-beschichteten Quarzes gedämpft. Der beschichtete Quarz wies gegenüber einem unbeschichteten Quarz somit ein erhöhtes Bindungsvermögen von Ethanolamin auf. Es ist jedoch zu vermuten, dass es sich hierbei vor allem um unspezifische Bindungen zwischen Ethanolamin und Aptamer handelte, da bei Verwendung eines Kontrollquarzes (beschichtet mit einem Oligonukleotid ohne Affinität zu Ethanolamin) ebenfalls eine starke Verringerung der Resonanzfrequenz erzielt werden konnte. Sowohl beim Überströmen der Quarze mit einer geringen Ethanolamin-Konzentrationen (5 % EA-gesättigte Luft im Gasstrom) als auch mit einer maximal eingesetzten Ethanolaminkonzentration (20 % EA-gesättigte Luft im Gasstrom) zeigte der Kontrollquarz die stärkste Schwingungsdämpfung. Ethanolamin lagerte sich somit vermutlich durch die Entstehung adsorptiver Effekte und elektrostatischer Wechselwirkungen unspezifisch auf allen DNA-beschichteten Quarzen ab.

Es ist anzunehmen, dass die Massenänderung auf der Quarzoberfläche, die durch eine spezifische Ethanolamin-Bindung entstehen konnte, von unspezifischen Bindungen des Ethanolamins überlagert wurde. Die entwickelte Methode zur Detektion gasförmigen Ethanolamins ermöglicht somit eine Detektion des Targets nur durch unspezifische Ethanolamin-DNA-Bindungen. Ein quantitativer Nachweis von aufgereinigtem Ethanolamin könnte mit einer solchen Detektionsmethode allerdings realisiert werden. Um Ethanolamin jedoch auch in komplexen Gasgemischen spezifisch detektieren zu können, wurde im Folgenden eine geringere Ethanolaminkonzentration eingesetzt. Dies sollte die unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Aptamer und Ethanolamin verringern.

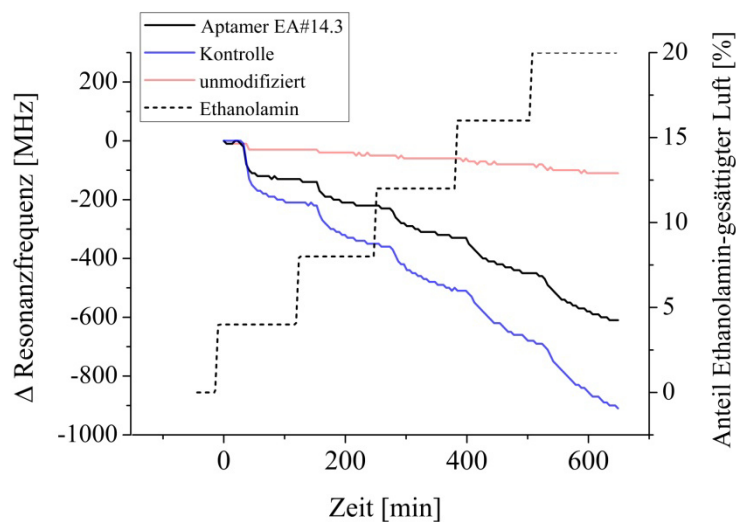


Abb. 4.36 Detektion von gasförmigem Ethanolamin mittels Aptamer-basierter Quarzkristall-Mikrowaage. Die Änderung der Schwingfrequenz wird bei einem 5-20 %-igen Anteil Ethanolamin-gesättigter Luft am gesamten Gasstrom durch die Messkammer untersucht. Gemessen wurde das Schwingverhalten eines unmodifizierten, eines Aptamer-modifizierten (EA#14.3) und eines Oligonukleotid-modifizierten (Kontrolle) Quarzes [141].

Zur Verringerung des Ethanolamin-Anteils im Gasstrom wurden während der Messung stoßweise 10 μ L bzw. 100 μ L Ethanolamin in eine mit 100 mL Wasser befüllte Gaswaschflasche gegeben und mit trockener Luft durchströmt. Durch eine Anreicherung des Gasstroms mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 10 % sollte die Aptamerfaltung zusätzlich begünstigt und somit die Ausbildung einer spezifischen Aptamer-Ethanolamin-Bindung gefördert werden.

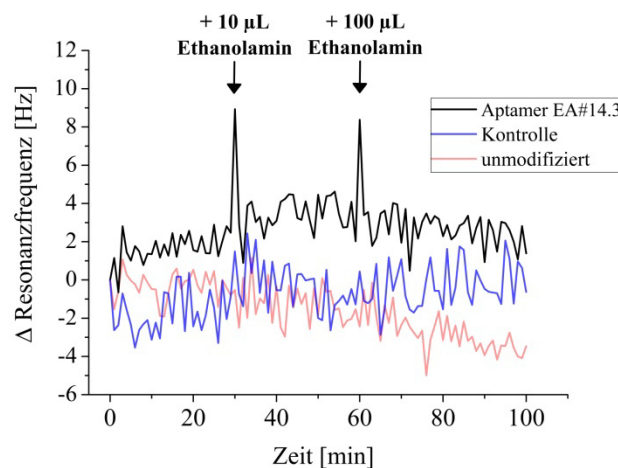


Abb. 4.37 Detektion von Ethanolamin mittels QCM bei einem geringen Ethanolamin-Anteil am Gasstrom. Während der Messung wurden stoßweise 10 μ L bzw. 100 μ L Ethanolamin in eine mit 100 mL Wasser befüllte Gaswaschflasche gegeben und mit trockener Luft durchströmt. Der Gasstrom wurde zusätzlich mit einem Feuchtegehalt von 10 % angereichert. Gemessen wurde das Schwingverhalten eines unmodifizierten, eines Aptamer-modifizierten (EA#14.3) und eines Oligonukleotid-modifizierten (Kontrolle) Quarzes [141].

Bei Anwesenheit von Ethanolamin zeigte der Aptamer-beschichtete Quarz eine deutliche Änderung der Schwingfrequenz (Abb. 4.37). Eine Frequenzänderung wurde für den Quarz, der mit einem Oligonukleotid (ohne Affinität zu Ethanolamin) modifiziert war, nicht beobachtet. Diese Unterschiede in der Schwingfrequenz waren ein erster Hinweis auf die Bindung des Targets an das Aptamer. Entgegen theoretischer Vermutungen konnte nach Ethanolaminzugabe jedoch keine Verringerung der Schwingfrequenz beobachtet werden. Bei Anwesenheit von Ethanolamin reagierte der Aptamer-beschichtete Schwingquarz mit einem kurzzeitigen Anstieg der Resonanzfrequenz. Eine mögliche Erklärung für das Schwingverhalten des Aptamer-modifizierten Quarzes ist die Überlagerung verschiedener Effekte, die einen Einfluss auf die Schwingfrequenz des Quarzes ausüben können. Die Resonanzfrequenz kann neben Massenänderungen auf der Quarzoberfläche auch durch die Flexibilität und das Schwingverhalten des Aptamers beeinflusst werden. Es ist möglich, dass sich die stabile G-Quadruplex-Struktur des Aptamers bei der Targetbindung in der Gasphase teilweise öffnet und umstrukturiert [139]. Eine temporäre Umstrukturierung der Aptamerfaltung könnte dem Ethanolamin-Aptamer kurzzeitig eine höhere Flexibilität verleihen und somit die Schwingfrequenz des Quarzes beeinflussen. Nach erfolgreicher Targetbindung nimmt das Aptamer hingegen vermutlich wieder eine weniger flexible G-Quadruplex-Struktur ein. Findet durch die Ethanolamin-

min-Bindung zudem eine Erhöhung der Masse auf der Quarzoberfläche statt, dämpfen diese Effekte die Schwingung des Quarzes.

Das Verhalten eines kurzzeitigen Anstiegs der Schwingfrequenz wurde bei beiden untersuchten Ethanolaminzugaben (10 μ L, 100 μ L) mit vergleichbarer Änderung der Schwingfrequenz beobachtet. Möglicherweise müssen die Schwingquarze jedoch mit einer größeren Stoffmenge Ethanolamin überströmt werden, um eine eindeutige Abnahme der Schwingfrequenz aufzuweisen. Es ist jedoch ebenfalls denkbar, dass eine vollständige Sättigung aller immobilisierten Aptamere mit Ethanolamin bereits bei einer geringen Zugabe an Ethanolamin zum Gasstrom erfolgte. Die Prozesse der Aptamer-Target-Bindung in der Gasphase müssen daher noch eingehender untersucht werden, um die Aptamer-basierte Quarzkristall-Mikrowaage zur Detektion von Ethanolamin zielgerichtet optimieren zu können.

4.2.2.4 Regeneration der Schwingquarze

Zur Entwicklung eines QCM-basierten Detektionssystems, das eine Targetbindung in mehreren aufeinanderfolgenden Detektionszyklen ermöglicht, ist eine erneute Verwendung der Schwingquarze nötig. Aus diesem Grund wurde die Regeneration der Schwingquarze nach Massenablagerung auf der Oberfläche untersucht.

Ein mit Wassermolekülen beladener Schwingquarz konnte durch Überströmen mit trockener Luft (Taupunkt -80 °C) fast vollständig regeneriert werden. Die ursprüngliche Resonanzfrequenz eines Aptamer-modifizierten Quarzes (10,0065 MHz) wurde nach mehrstündigem Regenerationsprozess vollständig wiederhergestellt. Somit konnten 100 % der Wassermoleküle von der Quarzoberfläche verdrängt werden (Abb. 4.38 A).

Beim Überströmen eines Ethanolamin-beladenen Schwingquarzes mit trockener Luft, konnte jedoch keine vollständige Regeneration des Quarzes erzielt werden. Nach einem sechsstündigen Regenerationsprozess eines Aptamer-modifizierten Quarzes konnten nur 77 % der gebundenen Ethanolamin-Moleküle von der Oberfläche entfernt werden. Die ursprüngliche Resonanzfrequenz des Quarzes wurde mit einer Abweichung von 140 MHz wiederhergestellt (Abb. 4.38 B). Bei einer Bindung von Ethanolamin auf der Quarzoberfläche müssen jedoch Frequenzänderungen im niedrigen Hertz-Bereich detektiert werden. Eine Dämpfung des Schwingsystems um 140 MHz durch noch gebundenes Ethanolamin ist für eine erneute sensitive Detektion von Ethanolamin jedoch hinderlich.

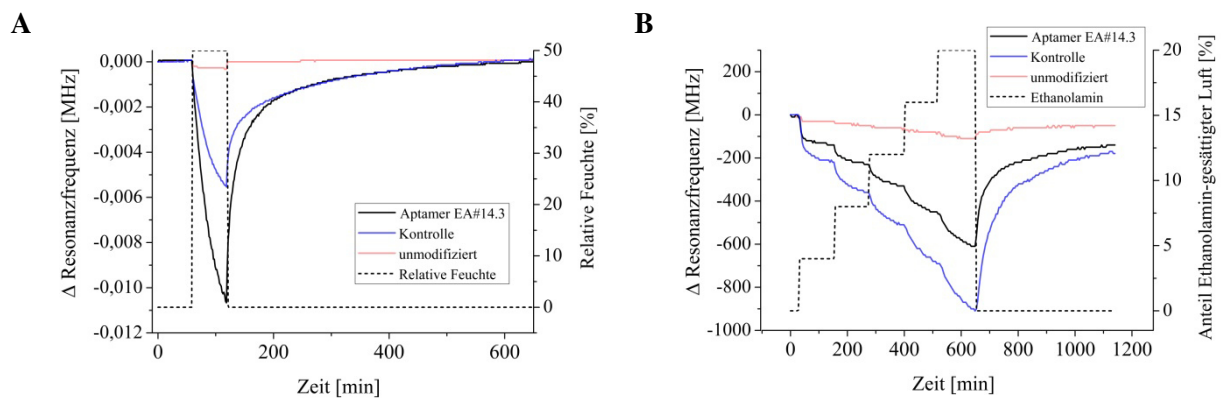


Abb. 4.38 Regeneration beladener Schwingquarze durch Überströmen mit trockener Luft. (A) Regeneration mit Wassermolekülen beladener Quarze. (B) Regeneration mit Ethanolamin beladener Quarze. Gemessen wurde das Schwingverhalten eines unmodifizierten, eines Aptamer-modifizierten (EA#14.3) und eines Oligonukleotid-modifizierten (Kontrolle) Quarzes [141].

Aufgrund der niedrigen Dissoziationskonstante K_D des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3 (K_D 6 nM) ist anzunehmen, dass eine vollständige Regeneration des Aptamers nach erfolgter Targetbindung besonders zeitintensiv ist. Die Dissoziationskonstante einer Aptamer-Target-Bindung ist definiert als $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$, wobei k_{off} die Dissoziationsrate und k_{on} die Bindungsrate des Targets darstellt. Mit Hilfe dieser Formel ist abzuschätzen, dass das Ethanolamin-Aptamer bei einem geringen K_D -Wert ebenfalls eine niedrige Dissoziationsrate (k_{off}) des Targets aufweist. Bei K_D -Werten im pikomolaren Konzentrationsbereich wurden für Aptamer-Target-Bindungen k_{off} -Raten von 10^{-4} bis 10^{-3} s^{-1} publiziert. Diese k_{off} -Raten bedingen Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) eines Aptamer-Target-Komplexes von Minuten bis Stunden [143]. Es ist daher abzuschätzen, dass eine vollständige Regeneration des Ethanolamin-Aptamers durch Überströmen mit trockener Luft Stunden bis Tage dauern kann.

Möglicherweise könnte der Regenerationsprozess der Ethanolamin-Aptamer-beschichteten Quarze durch Überströmen mit Wasser anstatt mit trockener Luft optimiert werden, da Ethanolamin eine hohe Löslichkeit in Wasser aufweist. Bei einem solchen Regenerationsprozess ist jedoch eine anschließende Trocknung des Quarzes erforderlich, um nach der Regeneration des Quarzes die Schwingfrequenz durch noch gebundene Wassermoleküle nicht zu verringern. Zur Verkürzung eines solchen zeitintensiven Trocknungsprozesses bietet sich möglicherweise das Überströmen des Quarzes mit heißem Wasserdampf zur Regeneration der Aptamere an. Es ist jedoch zu untersuchen, ob eine vollständige Entfernung Aptamer-gebundener Ethanolamin-Moleküle mit heißem Wasserdampf möglich ist.

Um Aptamere in regenerierbaren Aptasensoren einsetzen zu können, ist neben der Selektion hochaffiner Aptamere auch eine Beeinflussung der Dissoziationsrate eines Aptamer-Target-Komplexes während des Selektionsprozesses sinnvoll. Eine gezielte Selektion von Aptameren mit definierten Bindungsparametern (K_D , k_{on} , k_{off} , $t_{1/2}$) wurde bereits publiziert [144]. Solch eine gezielte Aptamerselektion ermöglicht eine optimale Anpassung der Aptamer-eigenschaften an die gewünschten Versuchsbedingungen, sodass eine vollständige Regeneration der Aptamer-Target-Bindung erfolgen kann.

4.2.3 Zusammenfassung: Detektion von Ethanolamin in der Gasphase

Die Detektion von Ethanolamin an der Grenzfläche gasförmig/flüssig wurde mit der optischen Detektionsmethode der Target-induzierten Dissoziation komplementärer Oligonukleotide durchgeführt. Durch Diffusion gelangte gasförmiges Ethanolamin in eine flüssige Detektionsumgebung und konnte dort durch Ausbildung der Aptamer-Ethanolamin-Bindung nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieser Detektionsmethode konnte nach Diffusion von Ethanolamin in die Flüssigphase ein Signalanstieg von 15 % detektiert werden. Ob eine sensitive Detektion des volatilen Targets auch bei geringeren Diffusionszeiten möglich ist, muss weiter untersucht werden.

Für die Detektion von Ethanolamin in der Gasphase wurde eine Aptamer-basierte Quarzkristall-Mikrowaage (QCM, *quartz crystal microbalance*) entwickelt. Die QCM-basierte Detektionsmethode bestimmt die Masseänderung (Bindung von Ethanolamin an das Aptamer) auf der Oberfläche eines schwingenden Quarzes. Beim Überströmen mit gasförmigem Ethanolamin reagiert der Aptamer-modifizierte Schwingquarz mit einem kurzzeitigen Anstieg der Schwingfrequenz. Die Prozesse der Aptamer-Target-Bindung in der Gasphase müssen jedoch noch eingehender untersucht werden, um die Aptamer-basierte Quarzkristall-Mikrowaage zur Detektion von Ethanolamin zielgerichtet optimieren zu können.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden Aptamer-basierte Methoden zur Detektion kleiner, flüchtiger Moleküle entwickelt. Die Entwicklung und Optimierung dieser Detektionsmethoden erfolgte unter Verwendung des Modellmoleküls Ethanolamin sowohl in der Flüssig- als auch zum ersten Mal in der Gasphase.

Detektion von Ethanolamin in der Flüssigphase

Zur Detektion kleiner Moleküle in der Flüssigphase wurden drei unterschiedliche Aptamer-basierte Detektionsmethoden im Microarray-Format entwickelt. Die drei verwendeten Detektionsmethoden „Kompetitive Bindung“, „TID/FRET“ und „TID/Fluoreszenz“ ermöglichen eine optische Detektion des Targets Ethanolamin.

Die Detektionsmethode der kompetitiven Bindung beruht auf einer Konkurrenz zwischen Quantum Dot-markiertem (QD-EA) und unmarkiertem Ethanolamin (EA) bei der Bindung an das Aptamer. Bei Verdrängung von QD-EA durch unmarkiertes Ethanolamin konnte das Target Ethanolamin über eine Abnahme der Fluoreszenzintensität detektiert werden (4.1.2).

Die Detektionsmethode TID/FRET beruht auf dem Detektionsdesign der Target-induzierten Dissoziation komplementärer Oligonukleotide. Durch Fluorophor-Modifizierung des Aptamers und Quencher-Modifizierung des komplementären Oligonukleotids konnte das FRET-Prinzip (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) zur Detektion des Targets ausgenutzt werden. Bei Anwesenheit von Ethanolamin wurde eine Dissoziation des Quencher-modifizierten Oligonukleotids von Aptamer induziert, sodass das Target Ethanolamin über einen Anstieg des Fluoreszenzsignals detektiert werden konnte (4.1.3, 4.1.4).

Die Detektionsmethode TID/Fluoreszenz basierte ebenfalls auf dem Detektionsdesign der Target-induzierten Dissoziation. Diese Detektionsmethode benötigt im Gegensatz zur Methode TID/FRET jedoch keine Fluoreszenz-Modifizierung des Aptamers, da das Target Ethanolamin durch Dissoziation Fluoreszenz-markierter Oligonukleotide nachgewiesen wird (4.1.5).

Mit der Detektionsmethode der Kompetitiven Bindung wurden Sensitivität und Detektionslimit im nanomolaren Konzentrationsbereich bestimmt. Die vergleichbar geringe Sensitivität der Detektionsmethode Kompetitive Bindung lässt sich vermutlich auf die Entstehung multipler Bindungen zwischen Quantum Dot-modifiziertem Ethanolamin und Aptamer zurückführen (Abb. 4.6), wodurch eine Dissoziation des Targets erschwert wird.

Unter Verwendung der TID-basierten Detektionsmethoden (TID/FRET, TID/Fluoreszenz) konnten hingegen Sensitivitäten (K_{25}) und Detektionslimits (LOD) im pikomolaren Konzentrationsbereich erzielt werden, sodass diese beiden Detektionsmethoden eine besonders sensitive Detektion des Targets ermöglichen. Die meisten publizierten Target-induzierten Dissoziationsmethoden, die bereits zur optischen Detektion kleiner Moleküle eingesetzt wurden, besitzen Detektionslimits im mikromolaren Konzentrationsbereich (0,01-400 μM) [112, 113, 145]. Somit weisen die beiden entwickelten TID-basierten Detektionsmethoden (TID/FRET, TID/Fluoreszenz) eine hohe Sensitivität im Vergleich zu bereits veröffentlichten Target-induzierten Dissoziationsstrategien auf.

Bei der Beurteilung dieser beiden Detektionsmethoden stellt TID/Fluoreszenz aufgrund eines breiten dynamischen Bereichs bis in den mikromolaren Konzentrationsbereich sowie einer Reduzierung der Detektionskosten durch Verringerung der Aptamer-Modifizierung jedoch die vielversprechendste Methode zur Detektion des kleinen Targets Ethanolamin dar.

Die wichtigsten Ergebnisse zur Bewertung der entwickelten und optimierten Detektionsmethoden sind in Tab. 5.1 zusammengefasst.

Tab. 5.1 Sensitivität (K_{25}), LOD und Detektionskosten der entwickelten Detektionsmethoden zur Bestimmung von Ethanolamin in der Flüssigphase.

Detektionsmethode	Sensitivität (K_{25}) [pM]	LOD [pM]	Detektionskosten [€]**
Kompetitive Bindung	3504,40	681,45	~ 100
TID/FRETkompetitiv *	65,10	13,04	~ 30
TID/Fluoreszenz **	94,54	11,27	~ 10

* Bezeichnung der optimierten TID/FRET-Detektionsmethode

** Bei Verwendung des Oligonukleotids 10_5 (Länge 10 nt)

*** Materialkosten unter Verwendung eines Microarrays mit 16 Feldern

Auf Grund der hohen Affinität des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3 gegenüber dem Target Ethanolamin sowie der Stabilität der G-Quadruplex-Struktur konnte nach erfolgter Targetbindung jedoch keine vollständige Regeneration des Aptamers erzielt werden. Es wurde jedoch festgestellt, dass eine Übertragung der entwickelten TID-basierten Detektionsmethode TID/FRET auf weitere Aptamere möglich ist. Neben der Detektion von Ethanolamin ist mittels entwickelter TID-basierter Detektionsmethode daher eine Detektion verschiedenster kleiner und flüchtiger Moleküle denkbar. Es bietet sich somit die Entwicklung eines Multiar-

ray-Aptasensors an, bei dem unter Verwendung unterschiedlicher Aptamere mehrere Targets parallel in der Flüssigphase detektiert werden können. Hierzu sollten die Parameter der entwickelten Detektionsmethode (z.B. Länge Oligonukleotid, Positionierung des Oligonukleotids an der Targetbindungsstelle des Aptamers) auch für die übrigen verwendeten Aptamere optimiert werden, um eine möglichst sensitive Detektion aller parallel bestimmter kleiner Moleküle mittels Multiarray-Aptasensor gewährleisten zu können. Durch Immobilisierung der Aptamere auf einer Glasfaser könnte auch ein faseroptischer Aptasensor entwickelt. Im Bereich der Biotechnologie würde ein solcher Aptasensor unter anderem ein nicht-invasives Monitoring der Stoffwechselfvorgänge in Bioreaktoren ermöglichen und somit eine Möglichkeit zur online Prozess- und Qualitätskontrolle darstellen.

Detektion von Ethanolamin in der Gasphase

Die Ausgangshypothese dieses Teils der Arbeit war, dass das Ethanolamin-Aptamer auch in der Gasphase seine Fähigkeit zur Bindung von Ethanolamin beibehält. Es ist bekannt, dass dreidimensionale G-Quadruplex-Strukturen, die auch das Ethanolamin-Aptamer zur Target-Bindung ausbildet, nicht nur in Lösung, sondern auch in der Gasphase stabil sind [139, 140]. Aus diesem Grund konnte die Aptamer-basierte Detektion von Ethanolamin ebenfalls in der Gasphase untersucht werden. Die Detektion gasförmigen Ethanolamins erfolgte sowohl durch eine optische Detektion an der Grenzfläche gasförmig/flüssig nach Diffusion von Ethanolamin in Lösung sowie einer massensensitiven Detektion direkt in der Gasphase.

Die Detektion von Ethanolamin an der Grenzfläche gasförmig/flüssig wurde unter Verwendung der Detektionsmethode TID/FRET durchgeführt, mit der das Target Ethanolamin bereits erfolgreich in der Flüssigphase detektiert werden konnte (4.2.1). Durch Diffusion gelangte gasförmiges Ethanolamin in eine flüssige Detektionsumgebung und konnte dort durch Ausbildung der Aptamer-Ethanolamin-Bindung über ein Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieser Detektionsmethode konnte nach Diffusion von Ethanolamin in die Flüssigphase (16 h) ein Signalanstieg von 15 % bestimmt und somit Ethanolamin eindeutig detektiert werden. Ob eine sensitive Detektion des volatilen Targets auch bei geringeren Diffusionszeiten möglich ist, muss weiter untersucht werden. Bislang konnte mit dieser Detektionsmethode das Target nur qualitativ nachgewiesen werden. Somit bieten sich weiterführende Untersuchungen zur quantitativen Bestimmung von Ethanolamin nach Diffusion in Lösung an. Durch Überströmen der Flüssigphase mit einem definierten Ethanolamin-Gasstrom könnten solche Untersuchungen realisiert werden.

Die Detektion von Ethanolamin in der Gasphase wurde mit Hilfe einer massensensitiven Detektionsmethode realisiert (4.2.2). Hierzu wurde das Ethanolamin-Aptamer auf einer Quarz-

kristall-Mikrowaage (QCM, *quartz crystal microbalance*) immobilisiert. Die Entwicklung dieses Detektionssystems wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr.-Ing. Stefan Zimmermann und Dipl.-Ing. Sven Fisahn am Institut für Grundlagen der Elektrotechnik und Messtechnik der Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Die QCM-basierte Detektionsmethode bestimmt die Masseänderung (Bindung des Targets an das Aptamer) auf der Oberfläche eines schwingenden Quarzes. Eine Erhöhung der Masse führt zu einer Änderung der Schwingfrequenz des Quarzes. Diese Frequenzänderung wurde zur Detektion von Ethanolamin verwendet.

Beim Überströmen mit gasförmigem Ethanolamin reagiert der Aptamer-modifizierte Schwingquarz mit einem kurzzeitigen Anstieg der Schwingfrequenz. Diese Frequenzänderung wurde auf mögliche Strukturänderungen der G-Quadruplex während der Targetbindung zurückgeführt. Die Prozesse der Aptamer-Target-Bindung in der Gasphase müssen jedoch noch eingehender untersucht werden, um die Aptamer-basierte Quarzkristall-Mikrowaage zur Detektion von Ethanolamin zielgerichtet optimieren und für eine quantitative Detektion gasförmigen Ethanolamins einsetzen zu können.

In ersten Experimenten zur Aptamer-basierten Detektion mittels Quarzkristall-Mikrowaage konnte am Beispiel von Ethanolamin gezeigt werden, dass eine qualitative Detektion kleiner, flüchtiger Moleküle mit dieser Methode durchaus möglich sein kann. Diese Ergebnisse müssen in der Zukunft genauer validiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde somit zum ersten Mal ein Aptamer-basiertes Detektionssystem in der Gasphase eingesetzt. Nach Optimierung dieser massensensitiven Detektionsmethode unter Verwendung des Modellaptamers gegen Ethanolamin ist zukünftig eine Übertragung dieser Detektion auf weitere Aptamere sinnvoll. Die Verwendung von Aptameren als biologische Erkennungseinheit in QCM-basierten Detektionssystemen ermöglicht die Entwicklung äußerst sensitiver und spezifischer Gassensoren. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen somit einen wichtigen Grundstein sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der Gassensorik. Außerdem weisen die Anwendungsmöglichkeiten von Aptameren in der Gasphase ein hohes wissenschaftliches und wirtschaftliches Potential auf. Ein Aptamer-basierter Biosensor zur Detektion kleiner, flüchtiger Moleküle könnte unter anderem bei der Gasanalytik biotechnologischer Prozesse Anwendung finden. Zudem sind medizinische Atemgasanalysen für diagnostische Zwecke sowie die Anwendung im Bereich der Umweltanalytik zur Bestimmung der Luftqualität weitere denkbare Einsatzgebiete eines solchen Aptasensors.

A Anhang

A.1 Verwendete Materialien

A.1.1 Chemikalien

Arginin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, CH)
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)
Essigsäure	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, CH)
Ethanol (EtOH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)
Ethanolamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, CH)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	AppliChem GmbH (Darmstadt, DE)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)
Ochratoxin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)
Propylamin	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, CH)
Quantum Dots Qdot 655 [®] ITK [™]	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA)
SYBR [®] Green II	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA)
Tris	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)

Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, CH)

A.1.2 Aptamere

Die verwendeten Aptamer wurden von BioSpring GmbH (Frankfurt/Main, DE) synthetisiert.

EA#14.3 (Ethanolamin)	5'-ATA CCA GCTTAT TCA ATT TGA GGC GGG TGG GTG GGT TGA ATA CGC TGA TTA CCC CAT CGG AGA ACG TTA AGG CGC TTC AGA TAG TAA GTG CAA TCT-3'
V7t1 (VEGF)	5'-TGT GGG GGT GGA CGG GCC GGG TAG A-3'
6H7 (Hi-Tag)	5'-GCT ATG GGT GGT CTG GTT GGG ATT GGC CCC GGG AGC TGG C-3'
1.12.2 (OTA)	5'-GAT CGG GTG TGG GTG GCG TAA AGG GAG CAT CGG ACA-3'

A.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Biomers.net GmbH (Ulm, DE) synthetisiert.

12_BHQ2	5'-CCC ACC CAC CCG-3'
10_5	5'-CAC CCG CCT C-3'
10_3	5'-CCC ACC CAC C-3'
12_5	5'-CCC ACC CGC CTC-3'
12_3	5'-CCC ACC CAC CCG-3'
16	5'-CCC ACC CAC CCG CCT C-3'
10_OTA	5'-TGT CCG ATG C-3'
Kontrolle EA#14.3	5'-ATA CCA GCT TAT TCA ATT AGC TAC TCG ATG GGC GAT TAG CTT GAC CCG CTC TGT AGG GTC GCG ACT ACG TGA A GCT AGG AGA TAG TAA GTG CAA TCT-3'

A.1.4 Lösungen

Die Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser (dH₂O) hergestellt (Arium 611, Sartorius AG, Göttingen, DE) und vor der Verwendung sterilfiltriert.

Bindungspuffer für EA#14.3 (BP)	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , 0,02 % Tween (pH 7,6)
BP(-)	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0,02 % Tween (pH 7,6)
BP(-) _{OTA}	10 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl (pH 8,5)
3 x SSC	450 mM NaCl, 45 mM Natriumcitrat (pH 7,0)
TAE	40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure (pH 8,5)
Waschpuffer 1 (WP1)	300 mM NaCl, 30 mM Natriumcitrat, 0,1 % SDS (pH 7)
Waschpuffer 2 (WP2)	150 mM NaCl, 15 mM Natriumcitrat (pH 7)
Waschpuffer 3 (WP3)	75 mM NaCl, 7,5 mM Natriumcitrat (pH 7)

A.1.5 Verbrauchsmaterialien

2D-Aldehyd-modifizierter Glasslide	Arrayit Corp. (Sunnyvale, CA)
3D-Aldehyd-modifizierter Glasslide	PolyAn GmbH (Berlin, DE)
Hybridisierungskammer NEXTERION [®] IC-16	SCHOTT AG (Mainz, DE)
Superstructure für NEXTERION [®] IC-16	SCHOTT AG (Mainz, DE)
12-Lochplatte	Nunc A/S (Roskilde, DK)
96-Lochplatte (schwarz) Nunclon [™] Δ Surface	Nunc A/S (Roskilde, DK)
96-Lochplatte SuperPlate	Thermo Fisher Inc. (Glasgow, UK)
Schwingquarze XA 1608 (10 MHz)	KVG GmbH Quartz Crystal Technology, (Neckarbischofsheim, DE)
Klebefolien für 96-Lochplatten	Nunc A/S (Roskilde, DK)
Schweißfolie für 96-Lochplatten	Thermo Fisher Inc. (Glasgow, UK)
Filter Sartolab BT 180C5 (0,22 μm)	Sartorius AG (Göttingen, DE)
Vivaspin 500 (MWCO 50 kDa)	Sartorius AG (Göttingen, DE)

A.1.6 Geräte

Arrayer Nano-Plotter NP2.1	GeSiM GmbH (Großerkmannsdorf, DE)
Feinwaage JL-180	Chymo Balance Corp. (Kyoto, J)
Fluoreszenz-Spektrophotometer F-7000	Hitachi High-Technologies Corp. (Tokyo, Japan)
Inkubator Serie BD	Binder GmbH (Tuttlingen, DE)
Microarray-Scanner GenePix 4000B	Molecular Devices LLC (Sunnyvale, CA)
Microzentrifuge	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Multifuge Heraeus™ X 1R	Thermo Scientific Inc. (Waltham, MA)
NanoDrop ND-1000	NanoDrop Technologies Inc. (Wilmington, DE)
NanoDrop ND-3300	NanoDrop Technologies Inc. (Wilmington, DE)
pH-Meter HI 221 Calibration Check	HANNA instruments (Kehl, DE)
Plattenschweißgerät ALPS™ 50V	Thermo Scientific Inc. (Waltham, MA)
Reinstwasseranlage Arium 611	Sartorius AG (Göttingen, DE)
Schüttler	IKA® GmbH & Co. KG (Staufen, DE)
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Vortex-Schüttler	VWR International LLC. (Darmstadt, DE)
Zentrifuge Micro Star 17R	VWR International LLC. (Darmstadt, DE)

A.1.7 Software

Arrayer: NPC16	GeSiM GmbH, Großerkmannsdorf, DE
Datenanalyse: OriginPro 8.6	OriginLab® Corporation, Northampton, MA
Fluoreszenz-Spektrophotometer: SL Solutions	Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan
NanoDrop: ND-1000 V3.8.1	NanoDrop Technologies Inc. (Wilmington, DE)
NanoDrop: ND-3300 V2.8.0	NanoDrop Technologies Inc. (Wilmington, DE)
Scanner: GenePix® Pro 6.0	Molecular Devices, Sunnyvale, CA

A.2 Verwendete Methoden

A.2.1 Aptamer-Microarray

A.2.1.1 Aptamerimmobilisierung auf Microarray-Oberfläche

Das Ethanolamin-Aptamer EA#14.3 wurde auf 3D-Aldehyd-modifizierten Glasslides (PolyAn GmbH, Berlin, DE) im Microarray-Format immobilisiert. Für die Immobilisierung wurde der Nano-Plotter NP2.1 (GeSiM GmbH, Großerkmannsdorf, DE) verwendet und das Aptamer in 3 x SSC-Puffer auf die Glasoberfläche gespottet. Pro Aptamer-Spot wurden 6 Tropfen Aptamerlösung auf dem Glasträger platziert. Die folgenden Parameter der piezoelektrischen Spitze Nano-Tip A-J (GeSiM GmbH, Großerkmannsdorf, DE) wurden für das Spotten des Aptamers verwendet: Frequenz 100 Hz, Spannung 90 V. Das Spotting-Muster bestand aus 5 x 5-Arrays (5 Aptamerkonzentrationen, je Konzentration 5 Replikate), die 16-mal auf dem Glasträger platziert wurden (Abb. A.1). Ein solcher 5 x 5-Array wird im Folgenden als Subarray bezeichnet. Der Aptamer-basierte Microarray wurde vor der Verwendung 16 h bei Raumtemperatur getrocknet.

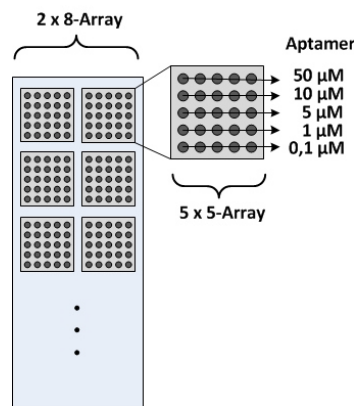


Abb. A.1 Immobilisierungsmuster des Aptamer-Microarrays. Die Aptamere wurden in Konzentrationen von 0,1 µM bis 50 µM mit dem Nano-Plotter NP2.1 (GeSiM GmbH, Großerkmannsdorf, DE) auf den Glasträger gespottet.

A.2.1.2 SYBR® Green II-Färbung

Die Immobilisierung des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3 wurde durch eine SYBR® Green II-Färbung überprüft, die spezifisch für einzelsträngige Nukleinsäuren ist. Vor der Färbung wurde der Aptamer-modifizierte Microarray zweimal 5 min mit dH₂O (50 mL) gewaschen, um ungebundene Aptamere zu entfernen. Anschließend wurde der Microarray 1,5 min in kochendem dH₂O inkubiert, um das Aptamer zu entfalten. Um eine erneute Aus-

bildung der Aptamerfaltung zu verhindern, wurde der Aptamer-modifizierte Microarray vor der Färbung durch Zentrifugation ($130 \cdot g$, 15 min) getrocknet und anschließend 8 min in einer 1:10.000 verdünnten Lösung aus SYBR[®] Green II in TAE inkubiert. Nach jeweils zweimaligem Waschen mit TAE (3 min) und dH₂O konnte der Microarray erneut durch Zentrifugation getrocknet und anschließend gescannt werden (GenePix 4000B, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

A.2.1.3 Markierung von Ethanolamin mit Quantum Dots

Das Ethanolamin wurde mit carboxylmodifizierten Quantum Dots Qdot 655[®] ITK[™] unter Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) fluoreszenzmarkiert. Hierzu wurden 12 μL Ethanolamin in einer Lösung bestehend aus 50 μL 10 mM Natriumbor-
rat-Puffer (SBB, pH 7,4), 6,25 μL Quantum Dots (8 μM) und 1,425 μL EDC (10 mg/mL in dH₂O) inkubiert. Die Reaktion wurde für 3 h bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (300 rpm, IKA[®] shaker, Staufen, DE) durchgeführt. Anschließend konnte ungebundenes Ethanolamin durch intensives Waschen mit 50 mM SBB (pH 8,0) unter Verwendung von Spin Columns (50 kDa MWCO, VIVASPIN 500, Sartorius AG, Göttingen, DE) entfernt werden. Die Konzentration der Ethanolamin-modifizierten Quantum Dots wurde mit Hilfe des NanoDrop ND-3300 Spektrophotometers (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE) bei 655 nm bestimmt.

A.2.1.4 Untersuchung der Aptamerfunktionalität nach Immobilisierung

Durch Bestimmung der Aptamer-Ethanolamin-Bindung mit Quantum Dot-modifiziertem Ethanolamin sollte die Aptamerfunktionalität nach Immobilisierung überprüft werden. Hierzu wurden die Aptamer-modifizierten Microarrays zunächst dreimal 1 min in dH₂O (50 mL) gewaschen, um ungebundene Aptamere zu entfernen. Nach Erhitzen in BP bei 90 °C (10 min) (im Inkubator) wurden die Microarrays auf Eis abgekühlt (15 min) und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, um die Aptamerfaltung zu begünstigen. Um die Aptamer-Ethanolamin-Bindung detektieren zu können, wurde Ethanolamin mit Quantum Dots Qdot 655[®] ITK[™] fluoreszenzmarkiert (A.2.1.3). Anschließend wurde jeder der 16 vorhandenen 5 x 5-Arrays (Abb. A.1) mit 20 μL modifiziertem Ethanolamin (in BP) unter Verwendung einer NEXTERION[®] IC-16 Hybridisierungskammer (SCHOTT AG, Mainz, DE) für 2 h inkubiert. Hierbei variierte die Konzentration der Ethanolamin-modifizierten Quantum Dots von 100 nM bis 1 μM . Die Inkubation wurde unter ständigem Schütteln (400 rpm, IKA[®] shaker, Staufen, DE) durchgeführt. Nach der Inkubation wurde jeder einzelne Subarray dreimal mit 200 μL BP (3 min) und anschließend der gesamte Microarray dreimal in 50 mL BP (3 min)

gewaschen. Vor dem Scannen erfolgte eine Trocknung des Microarrays durch Zentrifugation (130 · g, 15 min).

A.2.2 Detektion von Ethanolamin in der Flüssigphase

A.2.2.1 Kompetitive Bindung

Zur Durchführung der kompetitiven Bindung zwischen unmarkiertem und markiertem Ethanolamin an das Aptamer EA#14.3 wurde Ethanolamin mit Quantum Dots Qdot 655[®] ITK[™] fluoreszenzmarkiert (A.2.1.3). Anschließend wurden die mit EA#14.3 modifizierten Microarrays (A.2.1.1) dreimal 1 min in dH₂O (50 mL) gewaschen, um ungebundene Aptamere zu entfernen. Nach Erhitzen in BP bei 90 °C (10 min) und abkühlen auf Eis (15 min) und erfolgte eine Inkubation der Microarrays für 1 h bei Raumtemperatur, um die Aptamerfaltung zu begünstigen. Zur Detektion von Ethanolamin mittels kompetitiver Bindung wurde jeder Subarray zunächst mit 20 µL Ethanolamin-modifizierten Quantum Dots (600 nM) für 2 h inkubiert. Anschließend wurde die Lösung verworfen und jeder Subarray nach dreimaligem Waschen mit 200 µL BP erneut für 2 h mit 20 µL unmodifiziertem Ethanolamin (0,01-100 nM) inkubiert. Die Inkubationen erfolgten unter Verwendung einer NEXTERION[®] IC-16 Hybridisierungskammer (SCHOTT AG, Mainz, DE) in BP unter ständigem Schütteln (300 rpm, IKA[®] shaker, Staufen, DE). Nach der Inkubation wurde jeder einzelne Subarray dreimal mit 200 µL BP (3 min) und anschließend der gesamte Microarray dreimal in 50 mL BP (3 min) gewaschen. Vor dem Scannen erfolgte eine Trocknung des Microarrays durch Zentrifugation (130 · g, 15 min).

A.2.2.2 Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide

In Lösung (Aptamer nicht immobilisiert): Zur Hybridisierung von Ethanolamin-Aptamer und Oligonukleotid wurde eine Lösung bestehend aus 50 µL Aptamer (100 nM) und 50 µL komplementärem Oligonukleotid (100 nM) in BP(-) für 5 min bei 90 °C im Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, DE) erhitzt, um Aptamer- und Oligonukleotidsequenz zu linearisieren. Anschließend wurde die Lösung 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss abgekühlt und in einer schwarzen 96-Lochplatte am Fluoreszenz-Spektrophotometer F-7000 (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) bei einer Anregungswellenlänge von 515 nm und einer Emissionswellenlänge von 565 nm vermessen.

Auf dem Microarray (Aptamer immobilisiert): Zunächst wurde der Aptamer-modifizierte Microarray (A.2.1.1) dreimal 1 min in dH₂O (50 mL) gewaschen, um ungebundene Aptamere

zu entfernen. Vor der Hybridisierung erfolgte ein Erhitzen des Microarrays in kochendem dH₂O (2 min) sowie ein Erhitzen der Oligonukleotide im Thermomixer bei 95 °C (2 min), um die Sequenzen zu linearisieren. Anschließend wurden die Subarrays mit 100 µL der komplementären Oligonukleotide (0,1 nM-100 µM) für 16 h inkubiert. Die Inkubation erfolgte unter Verwendung einer NEXTERION[®] IC-16 Hybridisierungskammer (SCHOTT AG, Mainz, DE) in BP(-) unter ständigem Schütteln (300 rpm, IKA[®] shaker, Staufen, DE). Nach der Inkubation wurde jeder einzelne Subarray dreimal mit 200 µL BP(-) (3 min) und anschließend der gesamte Microarray zweimal in jeweils 50 mL WP1, WP2 und WP3 (3 min) gewaschen. Vor dem Scannen erfolgte eine Trocknung des Microarrays durch Zentrifugation (130 · g, 15 min). Unter Verwendung der erhaltenen Daten wurde die Oligonukleotid-Bindungskurve durch ein nicht-lineares *curve fitting* (OriginPro 8.6, Kategorie: *growth/sigmoidal*, Funktion: *Hill*) angenähert und die $K_{D(\text{Oligo})}$ -Werte bei halbmaximalem Signalwert des *fittings* abgeschätzt.

A.2.2.3 TID/FRET

Zur Detektion von Ethanolamin mittels Detektionsmethode TID/FRET wurde zunächst eine Lösung aus 34 µL Ethanolamin-Aptamer EA#14.3_Cy3 (150 nM) und 34 µL komplementäres Oligonukleotid 12_BHQ2 (150 nM) in BP(-) erhitzt, um die Sequenzen zu linearisieren. Das Erhitzen erfolgte in einem Thermomixer bei 90 °C (5 min). Nach Abkühlen der Lösung für 15 min bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss wurden 34 µL Ethanolamin (1,5-1500 nM) in BP(-) hinzugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation dieser Lösung unter Schütteln (300 rpm, IKA[®] shaker, Staufen, DE) und Lichtausschluss für 15 min. Abschließend wurden 100 µL in eine schwarze 96-Lochplatte überführt und am Fluoreszenzspektrophotometer F-7000 (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) bei einer Anregungswellenlänge von 515 nm und einer Emissionswellenlänge von 565 nm vermessen. Unter Verwendung der erhaltenen Daten wurde die Detektionskurve durch ein nicht-lineares *curve fitting* (OriginPro 8.6, Kategorie: *growth/sigmoidal*, Funktion: *Hill*) angenähert.

A.2.2.4 TID/FRETrevers

Die Detektionsmethode TID/FRETrevers zur Bestimmung von Ethanolamin wurde wie die Detektionsmethode TID/FRET (A.2.2.3) durchgeführt, mit dem einzigen Unterschied, dass die Reihenfolge der Oligonukleotid- und Ethanolamin-Zugabe zum Aptamer vertauscht wurde.

A.2.2.5 TID/FRETkompetitiv

Zur Detektion von Ethanolamin mittels Detektionsmethode TID/FRET wurden eine Lösung aus 34 μL Ethanolamin-Aptamer EA#14.3_Cy3 (150 nM), 34 μL komplementärem Oligonukleotid 12_BHQ2 (150 nM) und 34 μL Ethanolamin (1,5-1500 nM) in BP(-) erhitzt. Das Erhitzen erfolgte in einem Thermomixer bei 90 °C (5 min). Nach dem Erhitzen erfolgte eine Inkubation der Lösung für 2 h unter Schütteln (300 rpm, IKA® shaker, Staufen, DE) und Lichtausschluss. Abschließend wurden 100 μL in eine schwarze 96-Lochplatte überführt und am Fluoreszenz-Spektrophotometer F-7000 (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) bei einer Anregungswellenlänge von 515 nm und einer Emissionswellenlänge von 565 nm vermessen. Unter Verwendung der erhaltenen Daten wurde die Detektionskurve durch ein nicht-lineares *curve fitting* (OriginPro 8.6, Kategorie: *growth/sigmoidal*, Funktion: *Hill1*) angenähert.

A.2.2.7 TID/FRETkompetitiv (Microarray)

Der mit dem Aptamer EA#14.3_Cy3 modifizierte Microarray (A.2.1.1) wurde zunächst dreimal 1 min in dH_2O (50 mL) gewaschen, um ungebundene Aptamere zu entfernen. Zur Linearisierung des Aptamers folgte ein Erhitzen des Microarrays in kochendem dH_2O (2 min). Anschließend wurden die Subarrays mit 100 μL einer Lösung, bestehend aus 50 μL Oligonukleotid (2 μM) und 50 μL Ethanolamin (0,02 nM-20 μM), für 3 h unter Lichtausschluss inkubiert. Während der Inkubation betrug die Oligonukleotidkonzentration somit 1 μM und die Ethanolaminkonzentration 0,01 nM-10 μM . Die Inkubation erfolgte unter Verwendung einer NEXTERION® IC-16 Hybridisierungskammer (SCHOTT AG, Mainz, DE) in BP(-) unter ständigem Schütteln (300 rpm, IKA® shaker, Staufen, DE). Nach der Inkubation wurde jeder einzelne Subarray dreimal mit 200 μL BP(-) (3 min) und anschließend der gesamte Microarray zweimal in jeweils 50 mL WP1, WP2 und WP3 (3 min) gewaschen. Vor dem Scannen erfolgte eine Trocknung des Microarrays durch Zentrifugation (130 · g, 15 min). Unter Verwendung der erhaltenen Daten wurde die Detektionskurve durch ein nicht-lineares *curve fitting* (OriginPro 8.6, Kategorie: *growth/sigmoidal*, Funktion: *Hill1*) angenähert.

A.2.2.8 TID/Fluoreszenz (Microarray)

Der mit dem Aptamer EA#14.3 modifizierte Microarray (A.2.1.1) wurde zunächst gewaschen und erhitzt, wie bereits für die Detektionsmethode TID/FRET (Microarray) in A.2.2.7 beschrieben. Anschließend wurden die Subarrays mit 100 μL einer Lösung, bestehend aus 50 μL Oligonukleotid (2 μM) und 50 μL Ethanolamin (0,02 nM-200 μM) in BP(-) inkubiert. Während der Inkubation betrug die Oligonukleotidkonzentration somit 1 μM und die Ethano-

laminkonzentration 0,01 nM-100 μ M. Die Inkubation erfolgte unter Verwendung einer NEXTERION[®] IC-16 Hybridisierungskammer (SCHOTT AG, Mainz, DE) unter ständigem Schütteln (300 rpm, IKA[®] shaker, Staufen, DE) und unter Lichtausschluss für 18 h. Nach der Inkubation wurde jeder einzelne Subarray gewaschen, wie bereits in A.2.2.7 beschrieben. Vor dem Scannen erfolgte eine Trocknung des Microarrays durch Zentrifugation (130 · g, 15 min). Unter Verwendung der erhaltenen Daten wurde die Detektionskurve durch ein nicht-lineares *curve fitting* (OriginPro 8.6, Kategorie: *growth/sigmoidal*, Funktion: *Hill1*) angenähert.

A.2.2.9 Untersuchung der Reversibilität

Bei Untersuchung der Reversibilität sollte der Aptamer-Oligonukleotid-Komplex wiederhergestellt werden, um einen erneuten Einsatz des Aptamers für die Detektion von Ethanolamin zu ermöglichen. Die Reversibilität wurde bei unterschiedlichen Bedingungen untersucht.

Erhöhung Temperatur: Nach einer Detektion von 100 nM Ethanolamin unter Verwendung von 100 nM Oligonukleotid (A.2.2.7) wurde der gesamte Microarray 10 min bei 95 °C erhitzt. Nach einer Abkühlzeit von 3 h bei Raumtemperatur wurde die Detektionslösung, bestehend aus ungebundenem Oligonukleotid und Ethanolamin, abgenommen und jeder einzelne Subarray gewaschen, wie bereits in A.2.2.7 beschrieben. Vor dem Scannen erfolgte eine Trocknung des Microarrays durch Zentrifugation (130 · g, 15 min).

Erhöhung Oligonukleotidkonzentration: Nach einer Detektion von 100 nM Ethanolamin unter Verwendung von 100 nM Oligonukleotid (A.2.2.7) wurde die Detektionslösung, bestehend aus ungebundenem Ethanolamin und Oligonukleotid, durch 150 μ L Oligonukleotid in BP(-) (100 nM) ersetzt und unter ständigem Schütteln (300 rpm, IKA[®] shaker, Staufen, DE) und unter Lichtausschluss für 1 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde jeder einzelne Subarray gewaschen, wie bereits in A.2.2.7 beschrieben. Vor dem Scannen erfolgte eine Trocknung des Microarrays durch Zentrifugation (130 · g, 15 min).

Erhöhung Oligonukleotidkonzentration nach Temperaturanstieg: Nach der Detektion von 1 μ M Ethanolamin unter Verwendung von 1 μ M Oligonukleotid (A.2.2.8) wurde der gesamte Microarray 10 min bei 95 °C erhitzt und die Lösung nach Erhitzen sofort durch 100 μ L Oligonukleotid (1 μ L) in BP(-) ersetzt. Der Microarray wurde anschließend unter ständigem Schütteln (300 rpm, IKA[®] shaker, Staufen, DE) bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss für 20 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde jeder einzelne Subarray gewaschen, wie bereits in A.2.2.7 beschrieben. Vor dem Scannen erfolgte eine Trocknung des Microarrays durch Zentrifugation (130 · g, 15 min).

Erhöhung Oligonukleotidkonzentration nach pH-Wert-Senkung: Nach der Detektion von 1 μM Ethanolamin unter Verwendung von 1 μM Oligonukleotid (A.2.2.8) wurde die Detektionslösung, bestehend aus ungebundenem Ethanolamin und Oligonukleotid, entfernt und jeder Subarray mit 100 μL Reaktionspuffer BP(-) pH 3 inkubiert. Nach einer Inkubation von 30 min wurde jeder Subarray zweimal mit 200 μL BP(-) für 3 min gewaschen. Es erfolgte eine weitere Inkubation der Subarrays mit 100 μL Oligonukleotid (1 μM) für 19 h in BP(-) pH 7,4. Die Inkubation wurde unter ständigem Schütteln (300 rpm, IKA[®] shaker, Staufen, DE) bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss durchgeführt. Nach der Inkubation wurde jeder einzelne Subarray gewaschen, wie bereits in A.2.2.7 beschrieben. Vor dem Scannen erfolgte eine Trocknung des Microarrays durch Zentrifugation (130 · g, 15 min).

A.2.2.10 Untersuchung der Spezifität

Die Untersuchung der Spezifität des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3 erfolgte unter Verwendung der Detektionsmethode TID/Fluoreszenz. Neben Ethanolamin wurden die Targets Propylamin, Ethanol und Arginin eingesetzt, um die Spezifität der Ethanolamin-Bindung zu analysieren. Der EA#14.3-modifizierte Microarray (A.2.1.1) wurde zunächst gewaschen und erhitzt, wie bereits in A.2.2.7 beschrieben. Anschließend wurden die Subarrays mit 100 μL einer Lösung, bestehend aus Oligonukleotid 10_5 und Target (Ethanolamin/Propylamin/Ethanol/Arginin) in BP für 18 h inkubiert. Während der Inkubation betrug die Oligonukleotidkonzentration 1 μM und die Targetkonzentration variierte von 0,01 nM bis 100 μM . Die Inkubation erfolgte unter Verwendung einer NEXTERION[®] IC-16 Hybridisierungskammer (SCHOTT AG, Mainz, DE) unter ständigem Schütteln (300 rpm, IKA[®] shaker, Staufen, DE) und unter Lichtausschluss. Nach der Inkubation wurde jeder einzelne Subarray gewaschen, wie bereits in A.2.2.7 beschrieben. Vor dem Scannen erfolgte eine Trocknung der Microarrays durch Zentrifugation (130 · g, 15 min).

A.2.2.11 Scannen und Datenanalyse

Die in Lösung mit nicht-immobilisierten Aptameren durchgeführten Versuche wurden am Fluoreszenz-Spektrophotometer F-7000 (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) bei einer Anregungswellenlänge von 515 nm und einer Emissionswellenlänge von 565 nm vermessen. Folgende Einstellungen wurden bei der Messung verwendet: Integration time 0,1 s, Delay 2 s, EX Slit 5 nm, EM Slit 5 nm, PMT Voltage 1000 V. Die Software SL Solutions (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) wurde zur Datenanalyse verwendet.

Die Aptamer-modifizierten Microarray wurden unter Verwendung eines GenePix 4000B Microarray-Scanners (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) gescannt. Die Software GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) wurde zur Analyse der Scanning-Bilder verwendet. Die Datenanalyse erfolgte mit OriginPro 8.6 (OriginLab® Corporation, Northampton, MA).

A.2.3 Detektion von OTA mittels TID/FRETkompetitiv (Microarray)

Der mit dem OTA-Aptamer 1.12.2 modifizierte Microarray (A.2.1.1) wurde zunächst gewaschen und erhitzt, wie bereits für die Detektionsmethode TID/FRET (Microarray) in A.2.2.7 beschrieben. Anschließend wurden die Subarrays mit 100 μL einer Lösung, bestehend aus 50 μL Oligonukleotid (2 μM) und 50 μL OTA (0,002-2 μM) in $\text{BP}(-)_{\text{OTA}}$ (Selektionspuffer des OTA-Aptamers reduziert um die Ionen K^+ und Ca^{2+}) inkubiert. Während der Inkubation betrug die Oligonukleotidkonzentration somit 1 μM und die OTA-Konzentration 0,001-1 μM . Die Inkubation erfolgte unter Verwendung einer NEXTERION® IC-16 Hybridisierungskammer (SCHOTT AG, Mainz, DE) unter ständigem Schütteln (300 rpm, IKA® shaker, Staufen, DE) und unter Lichtausschluss für 30 min. Nach der Inkubation wurde jeder einzelne Subarray gewaschen, wie bereits in A.2.2.7 beschrieben. Vor dem Scannen erfolgte eine Trocknung des Microarrays durch Zentrifugation (130 \cdot g, 15 min). Unter Verwendung der erhaltenen Daten wurde die Detektionskurve durch ein nicht-lineares *curve fitting* (OriginPro 8.6, Kategorie: *growth/sigmoidal*, Funktion: *Hill1*) angenähert.

A.2.6 Detektion von Ethanolamin in der Gasphase

A.2.6.1 Optische Detektion von gasförmigem EA nach Diffusion in Lösung

Der mit dem Aptamer EA#14.3_Cy3 modifizierte Microarray (A.2.1.1) wurde zunächst gewaschen und erhitzt, wie bereits in A.2.2.7 beschrieben. Anschließend wurden die Subarrays mit 100 μL einer Lösung, bestehend aus 100 μL Oligonukleotid (100 nM) für 1 h unter Lichtausschluss inkubiert. Die Inkubation erfolgte unter Verwendung einer NEXTERION® IC-16 Hybridisierungskammer (SCHOTT AG, Mainz, DE) in $\text{BP}(-)$ unter ständigem Schütteln (300 rpm, IKA® shaker, Staufen, DE). Anschließend wurde der Microarray in eine abgeschlossene Reaktionskammer (Petrischale aus Glas) gestellt und innerhalb der Reaktionskammer 6 Gefäße mit jeweils 1,5 mL Ethanolamin platziert. Während einer Inkubationszeit von 18 h sollte das flüchtige Ethanolamin in die Gasphase übergehen und in die Lösung dif-

fundieren. Zur Kontrolle der Detektionsreaktion wurde ein weiterer Microarray in einer zweiten Reaktionskammer ohne Ethanolamin platziert. Nach der Inkubation wurde jeder einzelne Subarray gewaschen, wie bereits in A.2.2.7 beschrieben. Vor dem Scannen erfolgte eine Trocknung des Microarrays durch Zentrifugation (130 · g, 15 min).

A.2.6.2 Aptamerimmobilisierung auf Quarzoberfläche

Vor der Immobilisierung des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3 auf der goldbeschichteten Quarzoberfläche wurden die Quarze zunächst mit Peroxomonoschwefelsäure (Piranha-Lösung) gereinigt. Zur Herstellung von Peroxomonoschwefelsäure wurden 3 mL 30 %-iges Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und 9 mL konzentrierte Schwefelsäure (H_2SO_4) in ein Becherglas gegeben. Bei Herstellung immer erst H_2O_2 vorlegen und dann H_2SO_4 hinzugeben. Vorsicht Hitzeentwicklung! Achtung: Peroxomonoschwefelsäure ist eine sehr stark oxidierende Säure! Keine organischen Lösungsmittel wie z.B. Aceton hinzufügen – Explosionsgefahr!

Zur Reinigung wurden die Quarze 20 min in Peroxomonoschwefelsäure inkubiert und anschließend vier- bis achtmal mit 20 mL dH_2O gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Quarze in einer 12-Lochplatte mit 0,5 mL Ethanolamin-Aptamer EA#14.3 in MES (pH 6). Das 5'-Thiol-modifizierte Ethanolamin-Aptamer wies in der Lösung eine Konzentration von 1 μM auf. Die Herstellung der Kontrollquarze erfolgte durch Immobilisierung einer Oligonukleotidsequenz (Sequenz bezeichnet mit Kontrolle EA#14.3) (1 μM) mit gleicher Oligonukleotid-Abfolge wie EA#14.3, jedoch einer Zufallssequenz anstatt der G-Quadruplex. Die Inkubation der Quarze mit EA#14.3 bzw. dem Oligonukleotid wurde für 19 h bei ständigem Schütteln (300 rpm, IKA[®] shaker, Staufen, DE) durchgeführt. Anschließend wurde die Quarze dreimal in 1 mL dH_2O für jeweils 3 min gewaschen. Um die Aptamerfaltung zu begünstigen, wurde die Quarze nach Erhitzen in 2 mL kochendem dH_2O (2 min) für 15 min auf Eis in BP abgekühlt und anschließend 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Trocknung der Quarze durch Druckluft.

A.2.6.3 Massensensitive Detektion von EA direkt in der Gasphase

Die Aptamer-beschichteten Schwingquarze wurden zur Detektion von Ethanolamin in eine abgeschlossene Messkammer aus PEEK (Polyetheretherketon) eingespannt und mit gasförmigem Ethanolamin überströmt. Zur Erzeugung eines gasförmigen Ethanolaminstroms wurde trockene Luft (Taupunkt $-80\text{ }^\circ C$) durch eine mit Ethanolamin gefüllte Gaswaschflasche geleitet. Der Gasstrom wurde zusätzlich mit feuchter Luft angereichert, um die Aptamerfaltung in der Gasphase zu begünstigen. Hierzu wurde ein trockener Luftstrom durch eine mit Wasser gefüllte Gaswaschflasche geleitet. Die Verwendung von Massenflusscontrollern ermöglichte

es, das Verhältnis der Volumenströme von trockener und angefeuchteter Luft zu regulieren, um definierte Luftfeuchtigkeiten einzustellen. Die mit Ethanolamin und Wasser angereicherten Luftströme wurden durch Teflonschläuche geleitet, vor der Messkammer zusammengeführt und mit einem Volumenstrom von 50 mL/min durch die Messkammer geleitet. Über Goldelektroden auf Ober- und Unterseite wurden die Quarze mit einer Wechselspannung zur mechanischen Schwingung angeregt und nacheinander vermessen. Die entstehende Resonanzfrequenz f_r der Quarze konnte mit Hilfe einer Datenverarbeitungssoftware (Auflösung 0,1 Hz) bestimmt werden. Alle 30 s wurde ein Schwingquarz vermessen, sodass nach 90 s ein Datensatz für alle drei Quarze in der Messkammer vorlag. Eine detaillierte Darstellung des elektrotechnischen Messaufbaus sowie der Entwicklung der benötigten Software ist in [141] zu finden.

A.2.6.4 Einfluss der Feuchtigkeit auf Schwingquarz

Das Schwingverhalten unmodifizierter sowie Oligonukleotid-modifizierter Quarze wurde bei unterschiedlichen Luftfeuchten untersucht. Um den Luftstrom, der durch die Messkammer mit den Quarzen geleitet wurde, anzufeuchten, wurde ein trockener Luftstrom (Taupunkt - 80 °C) durch eine mit Wasser gefüllte Gaswaschflasche geleitet. Die Verwendung von Massenflusscontrollern ermöglichte es, das Verhältnis der Volumenströme von trockener und angefeuchteter Luft zu regulieren, um definierte Luftfeuchtigkeiten einzustellen. Während der Messung erfolgte eine Erhöhung des Feuchtegehalts des Gasstroms in 5%-Schritten bis zu einer relativen Luftfeuchte von 50 %. Jede Luftfeuchte wurde für 1 h eingestellt und die Quarze in der Messkammer mit 50 mL/min überströmt.

A.2.6.5 Regeneration des Schwingquarzes

Die Regeneration der Schwingquarze nach der Ethanolamin-Detektion erfolgte mit trockener Luft (Taupunkt - 80 °C). Hierzu wurden die Quarze in der Messkammer 8-10 h mit trockener Luft (50 mL/min) überströmt.

A.2.7 Berechnungen

A.2.7.1 Detektionslimit (LOD)

Das Detektionslimit der Detektionsmethoden wurde unter Verwendung der Standardabweichung des Nullwerts SD_{Null} sowie der Sensitivität der Detektionsmethode (S) bestimmt. Zur Berechnung wurde folgende Formel verwendet $LOD = 3 \cdot SD_{\text{Null}}/S$. Die Sensitivität der De-

tektionsmethode wurde durch Δ Signal in RFU/ Δ Ethanolaminkonzentration innerhalb des Konzentrationsbereichs von 0 bis 0,01 nM berechnet.

A.2.7.2 Theoretische maximale Aptamer-Immobilisierungsdichte auf Quarz

Die maximale Immobilisierungsdichte des Aptamers EA#14.3 auf der Quarz-Oberfläche wurde mit Hilfe der Kreisfläche abgeschätzt, die ein Aptamer nach Immobilisierung beansprucht. Der Radius (R_{Aptamer}) dieser Kreisfläche lässt sich unter Berücksichtigung der Anzahl der Nukleotide des Aptamers (N_{Aptamer}) wie folgt berechnen: $R_{\text{Aptamer}} = 0,38 \cdot N_{\text{Aptamer}}^{1/2}$ nm [146, 147]. Für das Ethanolamin-Aptamer mit einer Länge von 96 Nukleotiden ergibt sich ein Kreisradius von 3,723 nm und somit eine Kreisfläche (A_{Aptamer}) von 43,55 nm².

Die Immobilisierung des Aptamers erfolgte auf der goldbeschichteten Oberfläche des Schwingquarzes (Abb. A.2).

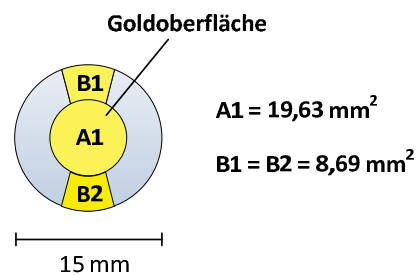


Abb. A.2 Goldbeschichtete Oberfläche des Schwingquarzes, auf der das Aptamer über einen Thiol-Linker immobilisiert wurde. Der Quarz weist eine Goldbeschichtung auf Vorder- und Rückseite auf. Die Goldoberfläche auf einer Seite des Quarzes beträgt 37,01 mm².

Unter Berücksichtigung der dichtesten Kugelpackung werden $\pi/(3\sqrt{2}) \approx 74$ % der Fläche genutzt. Bei einer gesamten Immobilisierungsfläche von 37,01 mm² ($A_{\text{Quarz gesamt}}$) auf einer Seite des Quarzes beansprucht das Aptamer somit 27,39 mm² ($A_{\text{Quarz Aptamer}}$).

Die theoretische maximale Immobilisierungsdichte des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3 auf dem Schwingquarz ($Dichte_{\text{Imm}}$) lässt sich wie folgt berechnen:

$$\begin{aligned} Dichte_{\text{Imm}} &= A_{\text{Quarz Aptamer}}/A_{\text{Aptamer}}/A_{\text{Quarz gesamt}} \\ &= 27,39 \text{ mm}^2/4,355 \cdot 10^{-11} \text{ mm}^2/37,01 \text{ mm}^2 \\ &= 16,99 \cdot 10^9 \text{ Aptamere/mm}^2 \end{aligned}$$

A.2.7.3 Theoretische Gewichtsänderung auf dem Quarz durch EA-Bindung

Unter der Annahme, dass bei einer maximalen Immobilisierungsdichte von $16,99 \cdot 10^9$ Aptameren/mm² (A.2.7.2) jedes auf dem Schwingquarz immobilisierte Aptamer ein Ethanolamin-Molekül bindet, lässt sich die maximal mögliche Gewichtsänderung auf dem Schwingquarz wie folgt berechnen: $\Delta\text{Gewicht}_{\text{max}} = \text{Anzahl Aptamere} \cdot \text{Masse eines Ethanolamin-Moleküls}$. Die Anzahl immobilisierter Aptamere auf Vorder- und Rückseite des Quarzes ergibt sich aus: $\text{Anzahl}_{\text{Aptamer}} = 2 \cdot A_{\text{Quarz Aptamer}}/A_{\text{Aptamer}}$ mit $A_{\text{Quarz Aptamer}}$ als einseitige Fläche des Quarzes, die zur Immobilisierung des Aptamers genutzt wird (A.2.7.2) und mit A_{Aptamer} als Fläche, die ein einzelnes immobilisiertes Aptamer beansprucht (A.2.7.2). Somit ergibt sich bei der Masse eines Ethanolamin-Moleküls $m_{\text{Ethanolamin}}$ von $1,01 \cdot 10^{-22}$ g folgende theoretische maximale Gewichtsänderung $\Delta\text{Gewicht}_{\text{max}}$ auf dem Schwingquarz:

$$\begin{aligned} \Delta\text{Gewicht}_{\text{max}} &= \text{Anzahl}_{\text{Aptamer}} \cdot m_{\text{Ethanolamin}} \\ &= 2 \cdot A_{\text{Quarz Aptamer}}/A_{\text{Aptamer}} \cdot m_{\text{Ethanolamin}} \\ &= 2 \cdot 27,39 \text{ mm}^2/4,355 \cdot 10^{-11} \text{ mm}^2 \cdot 1,01 \cdot 10^{-22} \text{ g} \\ &= 0,97 \cdot 10^{-10} \text{ g} \end{aligned}$$

A.3 Betreute Abschlussarbeiten

Im Rahmen dieser Dissertation wurden folgende Abschlussarbeiten betreut, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

André Jochums. Aptamerbasierte Detektion von Ethanolamin. Masterarbeit am Institut für Technische Chemie Hannover, Leibniz Universität Hannover (2013).

Alina Mehl. Aptamer-basierter Microarray zur Detektion von Ethanolamin. Bachelorarbeit am Institut für Technische Chemie Hannover, Leibniz Universität Hannover (2013).

A.4 Förderungen

Das Promotionsstudium zur Erstellung dieser Dissertationsarbeit wurde von Oktober 2011 bis September 2014 von der Minna-James-Heineman-Stiftung durch das Dannie-Heineman-Doktorandenstipendium finanziell gefördert.

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
AuNP	Gold-Nanopartikel
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EA	Ethanolamin
FMN	Flavinmononukleotid
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
K_D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LOD	Detektionslimit (engl. <i>limit of detection</i>)
n. a.	Nicht vorhanden (engl. <i>not available</i>)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
nt	Nukleotide
OTA	Ochratoxin A
PEEK	Polyetheretherketon
QCM	Quarzkristall-Mikrowaage (engl. <i>quartz crystal microbalance</i>)
QD	Quantum Dot
RFU	Relative Fluoreszenz-Units
RNA	Ribonukleinsäure
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>
TID	Target-induzierte Dissoziation
TIS	Target-induzierte Strukturveränderung
VOC	Flüchtige organische Verbindung (engl. <i>volatile organic compound</i>)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1	Publizierte Aptamere gegen kleine Moleküle	5
Abb. 3.2	Strukturformel von Ethanolamin	7
Abb. 3.3	Sekundärstrukturen von Aptameren	8
Abb. 3.4	Tertiärstrukturen von Aptameren	9
Abb. 3.5	Dreidimensionale Strukturmodelle von Aptameren	10
Abb. 3.6	Faltungsmechanismen von Aptameren.....	11
Abb. 3.7	Aptamerbindung der kleinen Targets Flavinmononukleotid und Arginin.....	13
Abb. 3.8	Sekundärstruktur des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3.....	15
Abb. 3.9	Aptasensor, basierend auf der Target-induzierten Strukturveränderung (TIS)	24
Abb. 3.10	Aptasensor, basierend auf der Methode der Target-induzierten Dissoziation (TID)	26
Abb. 3.11	Aptasensor, basierend auf der Methode der kompetitiven Verdrängung	27
Abb. 4.1	Immobilisierung des Ethanolamin-Aptamers EA#14.3.....	30
Abb. 4.2	Bestimmung der maximalen Immobilisierungsdichte des Ethanolamin-Aptamers	31
Abb. 4.3	Untersuchung der Aptamerfunktionalität nach Immobilisierung	33
Abb. 4.4	Aptamer-basierte Detektion von Ethanolamin mittels kompetitiver Bindung.	34
Abb. 4.5	Signaländerung bei der Detektion von Ethanolamin mittels kompetitiver Bindung	35
Abb. 4.6	Multiple Ausbildung eines Aptamer-Target-Komplexes	36
Abb. 4.7	Target-induzierte Dissoziation mit FRET-basierter Detektion.....	37
Abb. 4.8	Hybridisierung von Aptamer EA#14.3_Cy3 und Oligonukleotid 12_BHQ2.....	38
Abb. 4.9	Quenching von EA#14.3_Cy3 durch 12_BHQ2 in BP und BP(-)	40
Abb. 4.10	Quenching des Aptamersignals bei unterschiedlichen molaren Verhältnissen	41
Abb. 4.11	Detektionsmethode der Target-induzierten Dissoziation TID/FRET	42
Abb. 4.12	Aptamer-basierte Detektion von Ethanolamin (EA) mittels TID/FRET-Methode	43
Abb. 4.13	Aptamer-basierte Detektion von Ethanolamin mittels modifizierter TID-Methoden ...	47
Abb. 4.14	Signalanstieg der drei TID-basierten Detektionsmethoden.....	48
Abb. 4.15	Detektionsmethode TID/FRETkompetitiv zur Detektion von Ethanolamin	50
Abb. 4.16	Quenching des immobilisierten Aptamers EA#14.3_Cy3 durch 12_BHQ2	51
Abb. 4.17	Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) der Detektionsmethode FRET/kompetitiv	52
Abb. 4.18	Detektionskurve der Detektionsmethode TID/FRETkompetitiv	53
Abb. 4.19	Versuchsablaufes zur Bestimmung der Reversibilität.....	55

Abb. 4.20	Bestimmung der Reversibilität der Ethanolaminbindung.....	56
Abb. 4.21	Detektion von Ethanolamin mittels TID/Fluoreszenz	58
Abb. 4.22	Komplementäre Oligonukleotide	59
Abb. 4.23	Hybridisierung des komplementären Oligonukleotides 10_5 EA#14.3	60
Abb. 4.24	Detektion von Ethanolamin mit der Detektionsmethode TID/Fluoreszenz.....	63
Abb. 4.25	Versuchsablaufes zur Bestimmung der Reversibilität der Ethanolaminbindung	65
Abb. 4.26	Bestimmung der Reversibilität der Ethanolaminbindung.....	66
Abb. 4.27	Vergleich des prozentualen Signalanstiegs der entwickelten Detektionsmethoden.....	69
Abb. 4.28	Spezifität der Ethanolamindetektion	72
Abb. 4.29	OTA-Aptamer 1.12.2 und komplementäres Oligonukleotid 10_OTA.....	74
Abb. 4.30	Detektion von Ochratoxin A (OTA) mittels TID/FRET	74
Abb. 4.31	Messaufbaus zur Detektion von Ethanolamin an der Grenzfläche gasförmig/flüssig... ..	78
Abb. 4.32	Signalanstieg bei Detektion von Ethanolamin an der Grenzfläche gasförmig/flüssig ..	79
Abb. 4.33	Massensensitive Detektion von Ethanolamin mittels QCM.....	80
Abb. 4.34	Darstellung des Messaufbaus einer Aptamer-basierten Quarzkristall-Mikrowaage	81
Abb. 4.35	Änderung der Resonanzfrequenz f_r von Schwingquarzen bei steigender Luftfeuchte..	82
Abb. 4.36	Detektion von gasförmigem Ethanolamin mittels Quarzkristall-Mikrowaage.....	84
Abb. 4.37	Detektion von Ethanolamin mittels QCM bei einem geringen Ethanolamin-Anteil.....	85
Abb. 4.38	Regeneration beladener Schwingquarze.....	87
Abb. A.1	Immobilisierungsmuster des Aptamer-Microarrays	97
Abb. A.2	Goldbeschichtete Oberfläche des Schwingquarzes	107

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1	Auflistung der 15 kleinsten Aptamer-Targets.	6
Tab. 3.2	Vergleich der Eigenschaften von Aptameren und Antikörpern	16
Tab. 4.1	Vergleich der TID/FRET-basierten Detektion im Reaktionspuffer BP und BP(-).....	44
Tab. 4.2	Vergleich der TID-basierten Detektionsmethoden zur Detektion von Ethanolamin.....	48
Tab. 4.3	Signalanstieg, Sensitivitäten und Detektionslimit der TID/FRETkompetitiv	54
Tab. 4.4	Vergleich der Detektionsmethode TID/FRETkompetitiv	57
Tab. 4.5	Dissoziationskonstanten $K_{D(Oligo)}$ der unterschiedlich langen Oligonukleotide	61
Tab. 4.6	Vergleich der unterschiedlich langen Oligonukleotide zur Detektion von Ethanolamin ..	64
Tab. 4.7	Vergleich der entwickelten Aptamer-basierten Detektionsmethoden	70
Tab. 4.8	Signaländerung und Sensitivität bei der Detektion strukturähnlicher Targets	72
Tab. 4.9	Signaländerung, Sensitivität und Detektionslimit bei Detektion des Ochratoxin A.....	74
Tab. 5.1	Sensitivität (K_{25}), LOD und Detektionskosten der entwickelten Detektionsmethoden.....	90

Literaturverzeichnis

- [1] Aptagen. Aptamer-Database Aptam-Index™. <http://www.aptagen.com/aptamer-index/aptamer-list.aspx>. zitiert 05.11.2014.
- [2] F. Radom, P.M. Jurek, M.P. Mazurek, J. Otlewski, and F. Jelen. Aptamers: Molecules of Great Potential. *Biotechnol Adv*, **2013**. 31(8), 1260-1274.
- [3] D. Mann, C. Reinemann, R. Stoltenburg, and B. Strehlitz. In vitro Selection of DNA Aptamers Binding Ethanolamine. *Biochem Biophys Res Commun*, **2005**. 338(4), 1928-1934.
- [4] M. Famulok. Molecular Recognition of Amino-Acids by RNA-Aptamers - an L-Citrulline Binding RNA Motif and Its Evolution into an L-Arginine Binder. *J Am Chem Soc*, **1994**. 116(5), 1698-1706.
- [5] D.E. Huizenga and J.W. Szostak. A DNA Aptamer That Binds Adenosine and ATP. *Biochemistry*, **1995**. 34(2), 656-665.
- [6] J.A. Cruz-Aguado and G. Penner. Determination of Ochratoxin A with a DNA Aptamer. *J Agric Food Chem*, **2008**. 56(22), 10456-10461.
- [7] D.M. Tasset, M.F. Kubik, and W. Steiner. Oligonucleotide Inhibitors of Human Thrombin that Bind Distinct Epitopes. *J Mol Biol*, **1997**. 272(5), 688-698.
- [8] M. Wongphatcharachai, P. Wang, S. Enomoto, R.J. Webby, M.R. Gramer, A. Amonsin, and S. Sreevatsan. Neutralizing DNA Aptamers against Swine Influenza H3N2 Viruses. *J Clin Microbiol*, **2013**. 51(1), 46-54.
- [9] M.N. Ara, M. Hyodo, N. Ohga, K. Hida, and H. Harashima. Development of a Novel DNA Aptamer Ligand Targeting to Primary Cultured Tumor Endothelial Cells by a Cell-Based SELEX Method. *Plos One*, **2012**. 7(12).
- [10] J. Liu, H.X. Liu, K. Sefah, B. Liu, Y. Pu, D. Van Simaey, and W.H. Tan. Selection of Aptamers Specific for Adipose Tissue. *Plos One*, **2012**. 7(5).
- [11] S. Kedzierski, M. Khoshnejad, and G.T. Caltagirone. Synthetic Antibodies: The Emerging Field of Aptamers. *BioProcess J*, **2012**.
- [12] M. Famulok. Oligonucleotide Aptamers that Recognize Small Molecules. *Curr Opin Struct Biol*, **1999**. 9(3), 324-329.
- [13] R. Ganellin, S. Roberts, and R. Jefferis. Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development. *Elsevier*, **2013**.
- [14] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, and P.J. Feeney. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv Drug Deliv Rev*, **2001**. 46(1-3), 3-26.
- [15] J.S. Swensen, Y. Xiao, B.S. Ferguson, A.A. Lubin, R.Y. Lai, A.J. Heeger, K.W. Plaxco, and H.T. Soh. Continuous, Real-time Monitoring of Cocaine in Undiluted Blood Serum via a Microfluidic, Electrochemical Aptamer-based Sensor. *J Am Chem Soc*, **2009**. 131(12), 4262-4266.
- [16] J.C. Cox and A.D. Ellington. Automated Selection of Anti-protein Aptamers. *Bioorg Med Chem*, **2001**. 9(10), 2525-2531.
- [17] J.C. Cox, M. Rajendran, T. Riedel, E.A. Davidson, L.J. Sooter, T.S. Bayer, M. Schmitz-Brown, and A.D. Ellington. Automated Acquisition of Aptamer Sequences. *Comb Chem High Throughput Screen*, **2002**. 5(4), 289-299.

- [18] J.C. Cox, A. Hayhurst, J. Hesselberth, T.S. Bayer, G. Georgiou, and A.D. Ellington. Automated Selection of Aptamers Against Protein Targets Translated in vitro: from Gene to Aptamer. *Nucleic Acids Res*, **2002**. 30(20), e108.
- [19] L. Gold, B. Polisky, O. Uhlenbeck, and M. Yarus. Diversity of Oligonucleotide Functions. *Annu Rev Biochem*, **1995**. 64, 763-797.
- [20] A.B. Iliuk, L. Hu, and W.A. Tao. Aptamer in Bioanalytical Applications. *Anal Chem*, **2011**. 83(12), 4440-4452.
- [21] C. Feng, S. Dai, and L. Wang. Optical Aptasensors for Quantitative Detection of Small Biomolecules: a Review. *Biosens Bioelectron*, **2014**. 59, 64-74.
- [22] M.N. Kammer, I.R. Olmsted, A.K. Kussrow, M.J. Morris, G.W. Jackson, and D.J. Bornhop. Characterizing Aptamer Small Molecule Interactions with Backscattering Interferometry. *Analyst*, **2014**. 139(22), 5879-5884.
- [23] Y. Eguchi, S. Shimizu, and Y. Tsujimoto. Intracellular ATP Levels Determine Cell Death Fate by Apoptosis or Necrosis. *Cancer Res*, **1997**. 57(10), 1835-1840.
- [24] C. Ma, X. Yang, K. Wang, Z. Tang, W. Li, W. Tan, and X. Lv. A Novel Kinase-based ATP Assay Using Molecular Beacon. *Anal Biochem*, **2008**. 372(1), 131-133.
- [25] A.A. Farooqui, S.I. Rapoport, and L.A. Horrocks. Membrane Phospholipid Alterations in Alzheimer's Disease: Deficiency of Ethanolamine Plasmalogens. *Neurochem Res*, **1997**. 22(4), 523-527.
- [26] X. Liu and X. Zhang. Aptamer-Based Technology for Food Analysis. *Appl Biochem Biotechnol*, **2014**.
- [27] L. Fan, G. Zhao, H. Shi, M. Liu, Y. Wang, and H. Ke. A Femtomolar Level and Highly Selective 17beta-estradiol Photoelectrochemical Aptasensor Applied in Environmental Water Samples Analysis. *Environ Sci Technol*, **2014**. 48(10), 5754-5761.
- [28] I. Majerfeld and M. Yarus. An RNA Pocket for an Aliphatic Hydrophobe. *Nat Struct Biol*, **1994**. 1(5), 287-292.
- [29] E. Vianini, M. Palumbo, and B. Gatto. In vitro Selection of DNA Aptamers that Bind L-tyrosinamide. *Bioorg Med Chem*, **2001**. 9(10), 2543-2548.
- [30] I. Majerfeld and M. Yarus. Isoleucine: RNA Sites with Associated Coding Sequences. *RNA-A Publication of the RNA Society*, **1998**. 4(4), 471-478.
- [31] M. Meli, J. Vergne, J.L. Decout, and M.C. Maurel. Adenine-aptamer Complexes: a Bipartite RNA Site that Binds the Adenine Nucleic Base. *J Biol Chem*, **2002**. 277(3), 2104-2111.
- [32] J.G. Bruno, M.P. Carrillo, T. Phillips, and B. King. Development of DNA Aptamers for Cytochemical Detection of Acetylcholine. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **2008**. 44(3-4), 63-72.
- [33] D. Kiga, Y. Futamura, K. Sakamoto, and S. Yokoyama. An RNA Aptamer to the Xanthine/Guanine Base with a Distinctive Mode of Purine Recognition. *Nucleic Acids Res*, **1998**. 26(7), 1755-1760.
- [34] C. Mannironi, A. Di Nardo, P. Fruscoloni, and G.P. Tocchini-Valentini. In vitro Selection of Dopamine RNA Ligands. *Biochemistry*, **1997**. 36(32), 9726-9734.
- [35] I. Majerfeld, D. Puthenvedu, and M. Yarus. RNA Affinity for Molecular L-histidine; Genetic Code Origins. *J Mol Evol*, **2005**. 61(2), 226-235.
- [36] M. Illangasekare and M. Yarus. Phenylalanine-binding RNAs and Genetic Code Evolution. *J Mol Evol*, **2002**. 54(3), 298-311.
- [37] K. Harada and A.D. Frankel. Identification of Two Novel Arginine Binding DNAs. *EMBO J*, **1995**. 14(23), 5798-5811.
- [38] R.D. Jenison, S.C. Gill, A. Pardi, and B. Polisky. High-resolution Molecular Discrimination by RNA. *Science*, **1994**. 263(5152), 1425-1429.

- [39] R.d.E. Union. RICHTLINIE 1999/13/EG des Rates vom 11.März 1999 über die Begrenzung von Emissionen flüchtiger organischer Verbindungen, die bei bestimmten Tätigkeiten und in bestimmten Anlagen bei der Verwendung organischer Lösungsmittel entstehen. **1999**, L 85/81-22.
- [40] D.F. Horrobin. The Membrane Phospholipid Hypothesis as a Biochemical Basis for the Neurodevelopmental Concept of Schizophrenia. *Schizophr Res*, **1998**. 30(3), 193-208.
- [41] K.W. Vietor, B. Havsteen, D. Harms, H. Busse, and K. Heyne. Ethanolaminosis. A Newly Recognized, Generalized Storage Disease with Cardiomegaly, Cerebral Dysfunction and Early Death. *Eur J Pediatr*, **1977**. 126(1-2), 61-75.
- [42] A.O. Gamer, R. Rossbacher, W. Kaufmann, and B. van Ravenzwaay. The Inhalation Toxicity of Di- and Triethanolamine upon Repeated Exposure. *Food Chem Toxicol*, **2008**. 46(6), 2173-2183.
- [43] J.B. Knaak, H.W. Leung, W.T. Stott, J. Busch, and J. Bilsky. Toxicology of Mono-, Di-, and Triethanolamine. *Rev Environ Contam Toxicol*, **1997**. 149, 1-86.
- [44] H.W. Leung, L.M. Kamendulis, and W.T. Stott. Review of the Carcinogenic Activity of Diethanolamine and Evidence of Choline Deficiency as a Plausible Mode of Action. *Regul Toxicol Pharmacol*, **2005**. 43(3), 260-271.
- [45] T. Kano-Sueoka and J.E. Errick. Effects of Phosphoethanolamine and Ethanolamine on Growth of Mammary Carcinoma Cells in Culture. *Exp Cell Res*, **1981**. 136(1), 137-145.
- [46] P. National Toxicology. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Diethanolamine (CAS No. 111-42-2) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Dermal Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*, **1999**. 478, 1-212.
- [47] P. Brion and E. Westhof. Hierarchy and Dynamics of RNA Folding. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **1997**. 26, 113-137.
- [48] J.R. Wyatt, J.D. Puglisi, and I. Tinoco, Jr. RNA Folding: Pseudoknots, Loops and Bulges. *Bioessays*, **1989**. 11(4), 100-106.
- [49] I. Tinoco, Jr. and C. Bustamante. How RNA Folds. *J Mol Biol*, **1999**. 293(2), 271-281.
- [50] A. Sigel, H. Sigel, and R.K. Sigel, *Interplay between Metal Ions and Nucleic Acids*. Metal Ions in Life Sciences. Vol. 10. 2012, Springer Verlag.
- [51] C.A. Wakeman, W.C. Winkler, and C.E. Dann, 3rd. Structural Features of Metabolite-sensing Riboswitches. *Trends Biochem Sci*, **2007**. 32(9), 415-424.
- [52] E. Fischer. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Bericht der deutschen chemischen Gesellschaft*, **1894**. 27(3), 2985-2993.
- [53] I. Bertini, K.S. McGreevy, and G. Parigi. NMR of Biomolecules. *Wiley-VCH Verlag & Co.KGaA, Weinheim*, **2012**.
- [54] D.E. Koshland. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1958**. 44(2), 98-104.
- [55] L.R. Paborsky, S.N. Mccurdy, L.C. Griffin, J.J. Toole, and L.L.K. Leung. The Single-Stranded-DNA Aptamer-Binding Site of Human Thrombin. *J Biol Chem*, **1993**. 268(28), 20808-20811.
- [56] G.R. Zimmermann, C.L. Wick, T.P. Shields, R.D. Jenison, and A. Pardi. Molecular Interactions and Metal Binding in the Theophylline-binding Core of an RNA Aptamer. *RNA-A Publication of the RNA Society*, **2000**. 6(5), 659-667.
- [57] J. Feigon, T. Dieckmann, and F.W. Smith. Aptamer Structures from A to Zeta. *Chemistry & Biology*, **1996**. 3(8), 611-617.
- [58] H.R. Bosshard. Molecular Recognition by Induced Fit: How Fit is the Concept? *News Physiol Sci*, **2001**. 16, 171-173.

- [59] J.R. Williamson. Induced Fit in RNA-protein Recognition. *Nat Struct Biol*, **2000**. 7(10), 834-837.
- [60] P. Csermely, R. Palotai, and R. Nussinov. Induced Fit, Conformational Selection and Independent Dynamic Segments: an Extended View of Binding Events. *Trends Biochem Sci*, **2010**. 35(10), 539-546.
- [61] S. Song, L. Wang, J. Li, J. Zhao, and C. Fan. Aptamer-based Biosensors. *Trends Analyt Chem*, **2008**. 27(2), 108-117.
- [62] T. Hermann and D.J. Patel. Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers. *Science*, **2000**. 287(5454), 820-825.
- [63] K. Han, Z. Liang, and N. Zhou. Design Strategies for Aptamer-based Biosensors. *Sensors (Basel)*, **2010**. 10(5), 4541-4557.
- [64] D.J. Patel, A.K. Suri, F. Jiang, L. Jiang, P. Fan, R.A. Kumar, and S. Nonin. Structure, Recognition and Adaptive Binding in RNA Aptamer Complexes. *J Mol Biol*, **1997**. 272(5), 645-664.
- [65] H. Fujita, Y. Imaizumi, Y. Kasahara, S. Kitadume, H. Ozaki, M. Kuwahara, and N. Sugimoto. Structural and Affinity Analyses of G-quadruplex DNA Aptamers for Camptothecin Derivatives. *Pharmaceuticals (Basel)*, **2013**. 6(9), 1082-1093.
- [66] J.H. Park, J.Y. Byun, H. Mun, W.B. Shim, Y.B. Shin, T. Li, and M.G. Kim. A Regeneratable, Label-free, Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) Aptasensor for the Detection of Ochratoxin A. *Biosens Bioelectron*, **2014**. 59, 321-327.
- [67] J.C. Wang, Y.S. Wang, J.H. Xue, B. Zhou, Q.M. Qian, Y.S. Wang, J.C. Yin, H. Zhao, H. Liu, and S.D. Liu. An Ultrasensitive Label-free Assay of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine Based on the Conformational Switching of Aptamer. *Biosens Bioelectron*, **2014**. 58, 22-26.
- [68] A.N. Lane, J.B. Chaires, R.D. Gray, and J.O. Trent. Stability and Kinetics of G-quadruplex Structures. *Nucleic Acids Res*, **2008**. 36(17), 5482-5515.
- [69] A. Paul and S. Bhattacharya. Chemistry and Biology of DNA-binding Small Molecules. *Current Science*, **2012**. 102(2), 212-230.
- [70] S.M. Haider, G.N. Parkinson, and S. Neidle. Structure of a G-quadruplex-ligand Complex. *J Mol Biol*, **2003**. 326(1), 117-125.
- [71] N.H. Campbell, G.N. Parkinson, A.P. Reszka, and S. Neidle. Structural Basis of DNA Quadruplex Recognition by an Acridine Drug. *J Am Chem Soc*, **2008**. 130(21), 6722-6724.
- [72] N.H. Campbell, M. Patel, A.B. Tofa, R. Ghosh, G.N. Parkinson, and S. Neidle. Selectivity in Ligand Recognition of G-quadruplex Loops. *Biochemistry*, **2009**. 48(8), 1675-1680.
- [73] I. Gomez-Pinto, E. Vengut-Climent, R. Lucas, A. Avino, R. Eritja, C. Gonzalez, and J.C. Morales. Carbohydrate-DNA Interactions at G-quadruplexes: Folding and Stability Changes by Attaching Sugars at the 5'-End. *Chemistry*, **2013**. 19(6), 1920-1927.
- [74] G.N. Parkinson, F. Cuenca, and S. Neidle. Topology Conservation and Loop Flexibility in Quadruplex-drug Recognition: Crystal Structures of Inter- and Intramolecular Telomeric DNA Quadruplex-drug Complexes. *J Mol Biol*, **2008**. 381(5), 1145-1156.
- [75] X. Cheng, X. Liu, T. Bing, R. Zhao, S. Xiong, and D. Shangguan. Specific DNA G-quadruplexes Bind to Ethanolamines. *Biopolymers*, **2009**. 91(10), 874-883.
- [76] C. Reinemann, R. Stoltenburg, and B. Strehlitz. Investigations on the Specificity of DNA Aptamers Binding to Ethanolamine. *Anal Chem*, **2009**. 81(10), 3973-3978.
- [77] A. Heilkenbrinker, C. Reinemann, R. Stoltenburg, J.G. Walter, A. Jochums, F. Stahl, S. Zimmermann, B. Strehlitz, and T. Scheper. Identification of the Target Binding Site of Ethanolamine-Binding Aptamers and Its Exploitation for Ethanolamine Detection. *Anal Chem*, **2014**.

- [78] K.V. Singh, J. Kaur, G.C. Varshney, M. Raje, and C.R. Suri. Synthesis and Characterization of Hapten-protein Conjugates for Antibody Production against Small Molecules. *Bioconjug Chem*, **2004**. 15(1), 168-173.
- [79] J.G. Walter, A. Heilkenbrinker, J. Austerjost, S. Timur, F. Stahl, and T. Scheper. Aptasensors for Small Molecule Detection. *Zeitschrift für Naturforschung Section B - A Journal of Chemical Sciences*, **2012**. 67(10), 976-986.
- [80] S.D. Jayasena. Aptamers: an Emerging Class of Molecules that Rival Antibodies in Diagnostics. *Clin Chem*, **1999**. 45(9), 1628-1650.
- [81] M. Michaud, E. Jourdan, A. Villet, A. Ravel, C. Grosset, and E. Peyrin. A DNA Aptamer as a New Target-specific Chiral Selector for HPLC. *J Am Chem Soc*, **2003**. 125(28), 8672-8679.
- [82] M. Pla-Roca, R.F. Leulmi, S. Tourekhanova, S. Bergeron, V. Laforte, E. Moreau, S.J. Gosline, N. Bertos, M. Hallett, M. Park, and D. Juncker. Antibody Colocalization Microarray: a Scalable Technology for Multiplex Protein Analysis in Complex Samples. *Mol Cell Proteomics*, **2012**. 11(4), M111 011460.
- [83] K. Stadtherr, H. Wolf, and P. Lindner. An Aptamer-based Protein Biochip. *Anal Chem*, **2005**. 77(11), 3437-3443.
- [84] S.Y. Toh, M. Citartan, S.C. Gopinath, and T.H. Tang. Aptamers as a Replacement for Antibodies in Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Biosens Bioelectron*, **2014**. 64C, 392-403.
- [85] S. Shigdar, J. Macdonald, M. O'Connor, T. Wang, D.X. Xiang, H. Al Shamaileh, L. Qiao, M. Wei, S.F. Zhou, Y.M. Zhu, L.X. Kong, S. Bhattacharya, C.G. Li, and W. Duan. Aptamers as Theranostic Agents: Modifications, Serum Stability and Functionalisation. *Sensors*, **2013**. 13(10), 13624-13637.
- [86] H. Huang, Y. Tan, J. Shi, G. Liang, and J.J. Zhu. DNA Aptasensor for the Detection of ATP Based on Quantum Dots Electrochemiluminescence. *Nanoscale*, **2010**. 2(4), 606-612.
- [87] W. Zhao, W. Chiuman, M.A. Brook, and Y. Li. Simple and Rapid Colorimetric Biosensors Based on DNA Aptamer and Noncrosslinking Gold Nanoparticle Aggregation. *Chembiochem*, **2007**. 8(7), 727-731.
- [88] J. Liu, D. Mazumdar, and Y. Lu. A Simple and Sensitive "Dipstick" Test in Serum Based on Lateral Flow Separation of Aptamer-linked Nanostructures. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2006**. 45(47), 7955-7959.
- [89] F. Li, J. Zhang, X. Cao, L. Wang, D. Li, S. Song, B. Ye, and C. Fan. Adenosine Detection by Using Gold Nanoparticles and Designed Aptamer Sequences. *Analyst*, **2009**. 134(7), 1355-1360.
- [90] W. Zhao, W. Chiuman, J.C. Lam, S.A. McManus, W. Chen, Y. Cui, R. Pelton, M.A. Brook, and Y. Li. DNA Aptamer Folding on Gold Nanoparticles: From Colloid Chemistry to Biosensors. *J Am Chem Soc*, **2008**. 130(11), 3610-3618.
- [91] J. Liu and Y. Lu. Fast Colorimetric Sensing of Adenosine and Cocaine Based on a General Sensor Design Involving Aptamers and Nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2005**. 45(1), 90-94.
- [92] Y.S. Kim, J.H. Kim, I.A. Kim, S.J. Lee, J. Jurng, and M.B. Gu. A Novel Colorimetric Aptasensor Using Gold Nanoparticle for a Highly Sensitive and Specific Detection of Oxytetracycline. *Biosens Bioelectron*, **2010**. 26(4), 1644-1649.
- [93] Y. Li, X. Ji, and B. Liu. Chemiluminescence Aptasensor for Cocaine Based on Double-functionalized Gold Nanoprobes and Functionalized Magnetic Microbeads. *Anal Bioanal Chem*, **2011**. 401(1), 213-219.
- [94] I. Willner and M. Zayats. Elektronische Aptasensoren. *Angew Chem*, **2007**. 119, 6528-6538.

- [95] K.J. Feng, C.H. Sun, Y. Kang, J.W. Chen, J.H. Jiang, G.L. Shen, and R.Q. Yu. Label-free Electrochemical Detection of Nanomolar Adenosine Based on Target-induced Aptamer Displacement. *Electrochem Commun*, **2008**. 10(4), 531-535.
- [96] R.J. White, A.A. Rowe, and K.W. Plaxco. Re-engineering Aptamers to Support Reagentless, Self-reporting Electrochemical Sensors. *Analyst*, **2010**. 135(3), 589-594.
- [97] X. Zuo, S. Song, J. Zhang, D. Pan, L. Wang, and C. Fan. A Target-responsive Electrochemical Aptamer Switch (TREAS) for Reagentless Detection of Nanomolar ATP. *J Am Chem Soc*, **2007**. 129(5), 1042-1043.
- [98] J.L. Wang, F. Wang, and S.J. Dong. Methylene Blue as an Indicator for Sensitive Electrochemical Detection of Adenosine Based on Aptamer Switch. *J Electroanal Chem*, **2009**. 626(1-2), 1-5.
- [99] B.R. Baker, R.Y. Lai, M.S. Wood, E.H. Doctor, A.J. Heeger, and K.W. Plaxco. An Electronic, Aptamer-based Small-molecule Sensor for the Rapid, Label-free Detection of Cocaine in Adulterated Samples and Biological Fluids. *J Am Chem Soc*, **2006**. 128(10), 3138-3139.
- [100] R.J. White, N. Phares, A.A. Lubin, Y. Xiao, and K.W. Plaxco. Optimization of Electrochemical Aptamer-based Sensors via Optimization of Probe Packing Density and Surface Chemistry. *Langmuir*, **2008**. 24(18), 10513-10518.
- [101] J. Wang, A. Munir, and H.S. Zhou. Au NPs-aptamer Conjugates as a Powerful Competitive Reagent for Ultrasensitive Detection of Small Molecules by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. *Talanta*, **2009**. 79(1), 72-76.
- [102] W. Song, Z. Zhu, Y. Mao, and S. Zhang. A Sensitive Quartz Crystal Microbalance Assay of Adenosine Triphosphate via DNAzyme-activated and Aptamer-based Target-triggering Circular Amplification. *Biosens Bioelectron*, **2014**. 53, 288-294.
- [103] V.C. Ozalp. Acoustic Quantification of ATP Using a Quartz Crystal Microbalance with Dissipation. *Analyst*, **2011**. 136(23), 5046-5050.
- [104] B. Zheng, S. Cheng, W. Liu, M.H. Lam, and H. Liang. Small Organic Molecules Detection Based on Aptamer-modified Gold Nanoparticles-enhanced Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Biosensor. *Anal Biochem*, **2013**. 438(2), 144-149.
- [105] Z.M. Dong and G.C. Zhao. A Theophylline Quartz Crystal Microbalance Biosensor Based on Recognition of RNA Aptamer and Amplification of Signal. *Analyst*, **2013**. 138(8), 2456-2462.
- [106] K. Sefah, J.A. Phillips, X. Xiong, L. Meng, D. Van Simaey, H. Chen, J. Martin, and W. Tan. Nucleic Acid Aptamers for Biosensors and Bio-analytical Applications. *Analyst*, **2009**. 134(9), 1765-1775.
- [107] M. Hua, M. Tao, P. Wang, Y. Zhang, Z. Wu, Y. Chang, and Y. Yang. Label-free Electrochemical Cocaine Aptasensor Based on a Target-inducing Aptamer Switching Conformation. *Anal Sci*, **2010**. 26(12), 1265-1270.
- [108] X.X. Li, H.L. Qi, L.H. Shen, Q. Gao, and C.X. Zhang. Electrochemical Aptasensor for the Determination of Cocaine Incorporating Gold Nanoparticles Modification. *Electroanalysis*, **2008**. 20(13), 1475-1482.
- [109] Y.J. Kim, Y.S. Kim, J.H. Niazi, and M.B. Gu. Electrochemical Aptasensor for Tetracycline Detection. *Bioprocess Biosyst Eng*, **2010**. 33(1), 31-37.
- [110] R. Nutiu and Y. Li. Structure-switching Signaling Aptamers: Transducing Molecular Recognition into Fluorescence Signaling. *Chemistry*, **2004**. 10(8), 1868-1876.
- [111] C.K. O'Sullivan. Aptasensors - The Future of Biosensing? *Anal Bioanal Chem*, **2002**. 372(1), 44-48.
- [112] M.N. Stojanovic, P. de Prada, and D.W. Landry. Aptamer-based Folding Fluorescent Sensor for Cocaine. *J Am Chem Soc*, **2001**. 123(21), 4928-4931.

- [113] J.W. Chen, X.P. Liu, K.J. Feng, Y. Liang, J.H. Jiang, G.L. Shen, and R.Q. Yu. Detection of Adenosine Using Surface-enhanced Raman Scattering Based on Structure-switching Signaling Aptamer. *Biosens Bioelectron*, **2008**. 24(1), 66-71.
- [114] J.H. Chen, Z.Y. Fang, J. Liu, and L.W. Zeng. A Simple and Rapid Biosensor for Ochratoxin A Based on a Structure-switching Signaling Aptamer. *Food Control*, **2012**. 25(2), 555-560.
- [115] P.J.J. Huang and J.W. Liu. Flow Cytometry-Assisted Detection of Adenosine in Serum with an Immobilized Aptamer Sensor. *Anal Chem*, **2010**. 82(10), 4020-4026.
- [116] D.W. Huang, C.G. Niu, G.M. Zeng, and M. Ruan. Time-resolved Fluorescence Biosensor for Adenosine Detection Based on Home-made Europium Complexes. *Biosens Bioelectron*, **2011**. 29(1), 178-183.
- [117] Y. Lu, X. Li, L. Zhang, P. Yu, L. Su, and L. Mao. Aptamer-based Electrochemical Sensors with Aptamer-complementary DNA Oligonucleotides as Probe. *Anal Chem*, **2008**. 80(6), 1883-1890.
- [118] S. Wang, J. Liu, W. Yong, Q. Chen, L. Zhang, Y. Dong, H. Su, and T. Tan. A direct competitive assay-based aptasensor for sensitive determination of tetracycline residue in honey. *Talanta*, **2015**. 131, 562-569.
- [119] S. Wang, W. Yong, J. Liu, L. Zhang, Q. Chen, and Y. Dong. Development of an Indirect Competitive Assay-based Aptasensor for Highly Sensitive Detection of Tetracycline Residue in Honey. *Biosens Bioelectron*, **2014**. 57, 192-198.
- [120] C.H. Kim, L.P. Lee, J.R. Min, M.W. Lim, and S.H. Jeong. An Indirect Competitive Assay-based Aptasensor for Detection of Oxytetracycline in Milk. *Biosens Bioelectron*, **2014**. 51, 426-430.
- [121] N. de-los-Santos-Alvarez, M.J. Lobo-Castanon, A.J. Miranda-Ordieres, and P. Tunon-Blanco. Modified-RNA Aptamer-based Sensor for Competitive Impedimetric Assay of Neomycin B. *J Am Chem Soc*, **2007**. 129(13), 3808-3809.
- [122] N. de-los-Santos-Alvarez, M.J. Lobo-Castanon, A.J. Miranda-Ordieres, and P. Tunon-Blanco. SPR Sensing of Small Molecules with Modified RNA Aptamers: Detection of Neomycin B. *Biosens Bioelectron*, **2009**. 24(8), 2547-2553.
- [123] Y. Nonaka, K. Sode, and K. Ikebukuro. Screening and Improvement of an Anti-VEGF DNA aptamer. *Molecules*, **2010**. 15(1), 215-225.
- [124] S.A. Doyle, Murphy, M.B. Aptamers and Methods for their in vitro Selection and Uses thereof. **2012**. US8105982 B2.
- [125] M. Marusic, R.N. Veedu, J. Wengel, and J. Plavec. G-rich VEGF Aptamer with Locked and Unlocked Nucleic Acid Modifications Exhibits a Unique G-quadruplex Fold. *Nucleic Acids Res*, **2013**. 41(20), 9524-9536.
- [126] L. D'Antonio, Bagga, P.S. QGRS Mapper. <http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/index.php>, **2006**. zitiert 25.02.2015.
- [127] Y. Du, B. Li, F. Wang, and S. Dong. Au Nanoparticles Grafted Sandwich Platform Used Amplified Small Molecule Electrochemical Aptasensor. *Biosens Bioelectron*, **2009**. 24(7), 1979-1983.
- [128] C.o.S.a.O.O.P.f. Analysis. International Union of Pure and Applied Chemistry. Nomenclature, Symbols and their Usage in Spectrochemical Analysis II. Data interpretation. (Rules approved 1975). *Pure Appl Chem*, **1976**. 45, 99-103.
- [129] A.N. Rao and D.W. Grainger. Biophysical Properties of Nucleic Acids at Surfaces Relevant to Microarray Performance. *Biomater Sci*, **2014**. 2(4), 436-471.
- [130] R.P. Ekins. Multi-analyte Immunoassay. *J Pharm Biomed Anal*, **1989**. 7(2), 155-168.
- [131] A. Jochums. Aptamerbasierte Detektion von Ethanolamin. *Masterarbeit, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover*, **2013**.

- [132] R. Nutiu and Y. Li. Structure-switching Signaling Aptamers. *J Am Chem Soc*, **2003**. 125(16), 4771-4778.
- [133] R. Nutiu and Y. Li. Aptamers with Fluorescence-signaling Properties. *Methods*, **2005**. 37(1), 16-25.
- [134] T. Hianik, V. Ostatna, M. Sonlajtnerova, and I. Grman. Influence of Ionic Strength, pH and Aptamer Configuration for Binding Affinity to Thrombin. *Bioelectrochemistry*, **2007**. 70(1), 127-133.
- [135] Bio-Imaging: Marker. *BIOspektrum*, **2007**. 05(13. Jahrgang), 529-539.
- [136] B. Li, Y. Du, H. Wei, and S. Dong. Reusable, Label-free Electrochemical Aptasensor for Sensitive Detection of Small Molecules. *Chem Commun (Camb)*, **2007**(36), 3780-3782.
- [137] J. Wang, Wang, F., Dong, S. Methylene blue as an indicator for sensitive electrochemical detection of adenosine basen on aptamer switch. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2009**. 626(1-2), 1-5.
- [138] R. Stoltenburg, N. Nikolaus, and B. Strehlitz. Capture-SELEX: Selection of DNA Aptamers for Aminoglycoside Antibiotics. *J Anal Methods Chem*, **2012**. 2012, 415697.
- [139] M. Rueda, F.J. Luque, and M. Orozco. G-quadruplexes Can Maintain Their Structure in the Gas Phase. *J Am Chem Soc*, **2006**. 128(11), 3608-3619.
- [140] V. Gabelica, F. Rosu, M. Witt, G. Baykut, and E. De Pauw. Fast Gas-phase Hydrogen/Deuterium Exchange Observed for a DNA G-quadruplex. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **2005**. 19(2), 201-208.
- [141] A.V. Gehl. Entwicklung einer Plattform zur Charakterisierung künstlicher Rezeptoren mit Quarzmikrowaagen. *Bachelorarbeit, Institut für Grundlagen der Elektrotechnik und Messtechnik, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover*, **2014**.
- [142] G. Sauerbrey. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik*, **1959**. 155(2), 206-222.
- [143] S. Klussmann. The Aptamer Handbook. Functional Oligonukleotides and Their Applications. *Functional Oligonukleotides and Their Applications. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim*, **2006**, 518.
- [144] A.P. Drabovich, M. Berezovski, V. Okhonin, and S.N. Krylov. Selection of Smart Aptamers by Methods of Kinetic Capillary Electrophoresis. *Anal Chem*, **2006**. 78(9), 3171-3178.
- [145] C. Carrasquilla, Y. Xiao, C.Q. Xu, Y. Li, and J.D. Brennan. Enhancing Sensitivity and Selectivity of Long-period Grating Sensors Using Structure-switching Aptamers Bound to Gold-doped Macroporous Silica Coatings. *Anal Chem*, **2011**. 83(20), 7984-7991.
- [146] B. Tinland, Pluen, A., Sturm, J., Weill, G. Persistence Length of Single-Stranded DNA. *Macromolecules*, **1997**. 30, 5763-5765.
- [147] A.B. Steel, R.L. Levicky, T.M. Herne, and M.J. Tarlov. Immobilization of Nucleic Acids at Solid Surfaces: Effect of Oligonucleotide Length on Layer Assembly. *Biophys J*, **2000**. 79(2), 975-981.

Publikationsliste

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

A. Heilkenbrinker, C. Reinemann, R. Stoltenburg, J.G. Walter, A. Jochums, F. Stahl, S. Zimmermann, B. Strehlitz, and T. Scheper. Identification of the Target Binding Site of Ethanolamine-Binding Aptamers and Its Exploitation for Ethanolamine Detection. *Anal Chem*, **2015**. 87(1), 677-685.

A. Neumann, A. Lavrentieva, A. Heilkenbrinker, M. Lönne, C. Kasper. Characterization and Application of a Disposable Rotating Bed Bioreactor for Mesenchymal Stem Cell Expansion. *Bioengineering*, **2014**. 1(4), 231-245.

K.O. Mutz, A. Heilkenbrinker, M. Lönne, J.G. Walter, F. Stahl. Transcriptome Analysis Using Next-Generation Sequencing. *Curr Opin Biotechnol*, **2013**. 24(1), 22-30.

J.G. Walter, A. Heilkenbrinker, J. Austerjost, S. Timur, F. Stahl, T. Scheper. Aptasensors for Small Molecule Detection. *Zeitschrift für Naturforschung Section B - A Journal of Chemical Sciences*, **2012**. 67(10), 976-986.

Internationale Vorträge

A. Heilkenbrinker. Aptamer-based Detection of Small Molecules. 5th Potsdam Days on Bioanalysis, Potsdam, **2013**.

Kongressbeiträge

A. Heilkenbrinker, J.G. Walter, F. Stahl, T. Scheper. Aptamer-based Microarray for Biosensing of Small Molecules. DECHEMA Frühjahrstagung, Frankfurt/Main, **2013**.

A. Heilkenbrinker, J.G. Walter, F. Stahl, T. Scheper. Development of an Aptamer-based Biosensor for Detection of Small Molecules. *Functional Genomics and Proteomics*, Frankfurt/Main, **2013**.

A. Heilkenbrinker, J.G. Walter, F. Stahl, T. Scheper. Entwicklung eines Aptamer-basierten Biosensors zur Detektion kleiner und flüchtiger Moleküle. ProcessNet-Jahrestagung und 30. Jahrestagung der Biotechnologen, Karlsruhe. *Chemie Ingenieur Technik*, **2012**. 84(8), 1206.

A. Lavrentieva, S. Kress, A. Heilkenbrinker, M. Lönne, C. von Kaisenberg, R. Hass. C. Kasper. GMP-conform Expansion of Umbilical Cord derived Mesenchymal Stem Cells. World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, **2011**.

A. Lavrentieva, S. Kress, A. Heilkenbrinker, M. Lönne, C. von Kaisenberg, R. Hass. C. Kasper. Expansion of Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells with Regards to GMP-conform Production Process. 5th Mesenchymal Stem Cell Meeting, Birmingham, **2011**.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Alexandra Heilkenbrinker
Geburtsdatum	30.07.1986
Geburtsort	Hannover
Nationalität	deutsch

Ausbildung

2011-2015	Promotion Chemie am Institut für Technische Chemie Hannover, Leibniz Universität Hannover, Betreuung: Prof. Dr. Thomas Scheper
2009-2011	Masterstudiengang Life Science, Leibniz Universität Hannover, Abschluss: Master of Science (M. Sc.), Abschlussnote: ausgezeichnet
2006-2009	Bachelorstudiengang Life Science, Leibniz Universität Hannover, Abschluss: Bachelor of Science (B. Sc.), Abschlussnote: ausgezeichnet
1999-2006	Gymnasium Mellendorf/Wedemark, Abschluss: Abitur

Auszeichnungen und Förderungen

2011-2014	Dannie-Heineman-Doktorandenstipendium (Minna-James-Heineman-Stiftung)
2009-2010	Studienstipendium für herausragende Studienleistungen (Ernest-Solvay-Stiftung, Solvay GmbH)
2008-2011	Studienstipendium für herausragende Studienleistungen (Leibniz Universität Hannover)