



Universität Hamburg
DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

Methoden zum Nachweis von Allergenen im Wein

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

Hauke Wessels

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Chemie, Institut für Lebensmittelchemie

Hamburg, 2017

Erstgutachterin: Dr. Angelika Paschke-Kratzin

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart

Disputation & Druckfreigabe: 06.10.2017

Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Markus Fischer (Vorsitz)

Prof. Dr. Peter Heisig

Prof. Dr. Sascha Rohn

Dr. Angelika Paschke-Kratzin

Dr. Albrecht Sakmann

Die vorliegende Arbeit wurde vom 01.10.2013 – 30.09.2016 unter der Leitung von Frau Dr. Angelika Paschke-Kratzin und Herrn Prof. Dr. Markus Fischer am Fachbereich Chemie, Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg angefertigt.

Zurück ins Licht - der Sonne entgegen,

ist es kalt da wo du stehst, dann fang an dich zu bewegen!

Nicholas Müller

Publikationen

Fischer, C., Wessels, H., Paschke-Kratzin, A. and Fischer, M., 2017. Aptamers: Universal capture units for lateral flow applications. *Analytical biochemistry*, 522, pp.53-60.

Wessels, H. and Paschke-Kratzin, A., 2016. New SPR-based methods for analysis of allergenic agents used in wine treatment. in *BIO web of conferences* (Vol. 7, p. 04002). EDP Sciences.

Fischer, C., Klockmann, S., Wessels, H., Hünninger, T., Schrader, J., Paschke-Kratzin, A. and Fischer, M., 2016. Aptamer-based trapping of phytosphingosine in urine samples. *Journal of biotechnology*, 238, pp.30-34.

Morschheuser, L.*, Wessels, H.*, Pille, C., Fischer, J., Hünninger, T., Fischer, M., Paschke-Kratzin, A. and Rohn, S., 2016. HPTLC-aptastaining–Innovative protein detection system for high-performance thin-layer chromatography. *Scientific reports*, 6, pp.26665.

*These authors contributed equally to this work.

Hünninger, T., Felbinger, C., Wessels, H., Mast, S., Hoffmann, A., Schefer, A., Märtlbauer, E., Paschke-Kratzin, A. and Fischer, M., 2015. Food Targeting: A real-time PCR assay targeting 16S rDNA for direct quantification of *Alicyclobacillus* spp. spores after aptamer-based enrichment. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(17), pp.4291-4296.

Hünninger, T., Fischer, C., Wessels, H., Hoffmann, A., Paschke-Kratzin, A., Haase, I. and Fischer, M., 2015. Food sensing: selection and characterization of DNA aptamers to *Alicyclobacillus* spores for trapping and detection from orange juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(8), pp.2189-2197.

Hünninger, T., Wessels, H., Fischer, C., Paschke-Kratzin, A. and Fischer, M., 2014. Just in time-selection: A rapid semiautomated SELEX of DNA aptamers using magnetic separation and BEAMing. *Analytical chemistry*, 86(21), pp.10940-10947.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Abstract	2
3	Theoretische Grundlagen.....	3
3.1	Wein	3
3.1.1	Herstellung und Einteilung.....	4
3.1.2	Weinschönung und Weinbehandlung.....	7
3.1.2.1	Lysozym	8
3.1.2.2	Ovalbumin und Casein	8
3.1.2.3	Weitere Schönungsmittel.....	9
3.2	Lebensmittelallergien.....	10
3.2.1	Lebensmittelallergene.....	11
3.2.2	Immunsystem.....	14
3.2.2.1	Antikörper	17
3.2.2.2	Antikörperbasierte Analytik	20
3.3	Aptamere.....	23
3.3.1	Entwicklung von Aptameren	25
3.3.2	Verwendung von Aptameren	29
3.4	Biosensoren.....	30
3.4.1	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie	31
3.4.2	Kinetik.....	34
4	Zielsetzung	37
5	Ergebnisse und Diskussion	38
5.1	Antikörper	38
5.1.1	Charakterisierung	38
5.1.2	Antikörperbasierter Biosensor	44
5.1.2.1	Methodenentwicklung.....	44
5.1.2.2	Validierung	48
5.2	Aptamere.....	52
5.2.1	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>	52
5.2.1.1	Vorbereitung	52
5.2.1.2	Durchführung	59
5.2.1.3	Sequenzierung.....	66
5.2.2	Charakterisierung.....	71
5.2.2.1	Sequenzanalyse.....	71
5.2.2.2	Affinität	78
5.2.2.2.1	Fluoreszenzassay.....	78
5.2.2.2.2	<i>Surface Plasmon Resonance</i> -Spektroskopie	82
5.2.3	Aptamerbasierte Methoden	88
5.2.3.1	Aptamerbasierter Biosensor	88
5.2.3.1.1	Methodenentwicklung.....	88
5.2.3.1.2	Anwendung	94
5.2.3.2	Lateral Flow Dipsticks.....	97
5.2.3.3	HPTLC- <i>Aptastaining</i>	101
5.2.3.3.1	Methodenentwicklung.....	102
5.2.3.3.2	Anwendung	107

6	Experimenteller Teil	111
6.1	Materialien	111
6.2	Methoden.....	122
6.2.1	Methoden im Kontext Proteine	122
6.2.1.1	Immobilisierung auf magnetischen Partikeln	122
6.2.1.2	SDS-PAGE.....	123
6.2.1.3	Antikörper- <i>Bead</i> -Assay.....	125
6.2.1.4	MALDI-TOF	126
6.2.2	Methoden im Kontext Nukleinsäuren.....	128
6.2.2.1	PCR	128
6.2.2.2	Schmelztemperaturbestimmung	131
6.2.2.3	CD-Spektroskopie	131
6.2.2.4	Fluoreszenzassay	132
6.2.2.5	LFD.....	133
6.2.2.6	HPTLC- <i>Aptastaining</i>	134
6.2.3	Methoden im Kontext SELEX.....	136
6.2.3.1	FISHing.....	136
6.2.3.2	BEAMing	147
6.2.3.3	Sequenzierung.....	150
6.2.4	SPR.....	152
6.2.5	Formeln	154
7	Literatur.....	157
8	Anhang	168
8.1	Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS.....	168
8.2	Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Antikörper	172
8.3	Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Aptamere	175
8.4	Antikörperbasierter SPR-Biosensor.....	192
8.5	Agarosegelelektrophoreseabbildungen SELEX.....	199
8.6	Agarosegelelektrophoreseabbildungen Klonierung.....	228
8.7	Sekundärstrukturen Aptamere	246
8.8	Aptamerbasierter SPR-Biosensor	253
8.9	Bestimmung der Aptamer 620-LFD-Nachweisgrenze in Wein.....	257
8.10	<i>Aptastaining</i>	258
9	Danksagung	261
10	Eidesstattliche Versicherung	262

Abkürzungsverzeichnis

AGE	Agarosegelelektrophorese
AIC	Akaike Informationskriterium (engl.: <i>Akaike information criterion</i>)
BEAMing	festphasenbasierte Emulsions-PCR (engl.: <i>beads, emulsion, magnetic, amplification</i>)
BLAST	Algorithmus zur Untersuchung von Sequenzen (engl.: <i>basic local alignment search tool</i>)
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
BSA	bovines Serumalbumin
BtuB	Vitamin B12-Transportprotein in äußerer Membran (engl.: <i>outer membrane cobalamin transporter</i>)
BZR	B-Zellrezeptor
CAM	Carbamidomethylierung
Cas	bovine Casein
CD	Circulardichroismus
CD4/CD8	engl.: <i>cluster of differentiation 4</i> und engl.: <i>cluster of differentiation 8</i>
cDNA	komplementäre DNA (engl.: <i>complementary DNA</i>)
CE-SELEX	Kapillarelektrophorese-SELEX (engl.: <i>capillary electrophoresis-SELEX</i>)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DBPCFC-Studien	doppelt blinde, placebokontrollierte orale Nahrungsmittelprovokationstudie (engl.: <i>double-blind, placebo-controlled food challenge</i>)
ddNTPs	Didesoxynukleosidtriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxy ribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Europäische Gemeinschaft
ELASA	engl.: <i>enzyme-linked aptamersorbent assay</i>
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
F _{Ab}	Antigenbindendes Fragment eines Immunoglobuline
FACS	Durchflusszytometrie (engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i>)
F _c	Kristallisierbares Fragment eines Immunoglobulins (engl.: <i>crystallizable</i>)
FDA	Behörde für Lebensmittel- und Arzneimittel der USA, engl.: <i>food and drug administration</i>
FISHing	Akronym gebildet aus der Bezeichnung des magnetischen Separators (KingFisher Duo)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FU	Einheit der Fluoreszenz (engl.: <i>fluorescence units</i>)
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HCCA	α -Cyano-4-hydroxymizsäure
HisTag	Polyhistidin-Tag
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatografie (engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>)
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatografie (engl.: <i>high performance thin layer chromatography</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: <i>horseradish peroxidase</i>)
Ig	Immunoglobulin
Inc	Kapitalgesellschaft (engl.: <i>incorporation</i>)
kJ	Kilojoule

K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LB	Nährmedium, engl.: <i>lysogeny broth</i>
LFD	seitliches Flusstestgerät (engl.: <i>lateral flow device</i>)
LOAEL	engl.: <i>lowest observable adverse effect level</i>
LOD	Nachweisgrenze (engl.: <i>limit of detection</i>)
LOQ	Bestimmungsgrenze (engl.: <i>limit of quantification</i>)
Lys	Lysozym
M	als Konzentrationsangabe: mol/L in der Beschriftung von Gelelektrophoreseabbildung: Marker
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MALDI-TOF	Matrix-assistierte Laser-Desorption-Ionisierung-Flugzeitanalyse (engl.: <i>matrix-assisted laser desorption/ionization-time off light</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: <i>major histocompatibility complex</i>)
mRNA	Boten-RNA (engl.: <i>messenger RNA</i>)
NOAEL	engl.: <i>no observable adverse effect level</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OIV	Internationale Organisation für Rebe und Wein (franz.: <i>Organisation Internationale de la Vigne et du Vin</i>)
Ov	Ovalbumin
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration (lat.: <i>pondus hydrogenii</i>)
ppm	Teile von einer Million (engl.: <i>parts per million</i>), entspricht der SI-Einheit µg/L
QGRS	Quadruplex-bildende guaninreiche Sequenzen (engl.: <i>quadruplex forming G-rich sequences</i>)
R	organischer Rest
R _f	Retentionsfaktor
RL	Richtlinie
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
RP	Umkehrphase (engl.: <i>reversed phase</i>)
RU	Einheit der Änderung des SPR-Winkels (engl.: <i>resonance units</i>)
SDS	Natriumlaurylsulfat (C ₁₂ H ₂₅ SO ₄ Na, engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SELEX	Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (engl.: <i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>)
SOC	Nährmedium (engl.: <i>super optimal broth</i>)
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (engl.: <i>surface plasmon resonance spectroscopy</i>)
SS-PD-SELEX	engl.: <i>structure-switching particle display-SELEX</i>
STD-NMR	Sättigungstransferunterschied-Kernspinresonanzspektroskopie (engl.: <i>saturation-transfer difference nuclear magnetic resonance</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBA	Thrombin-bindendes Aptamer (engl.: <i>thrombin binding aptamer</i>)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLC	Dünnschichtchromatografie (engl.: <i>thin layer chromatography</i>)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
tRNA	Transfer-RNA

UV	Ultraviolettstrahlung ($\lambda=100-380$ nm)
VO	Verordnung
We	durch Wasser benetzbar (engl.: <i>wettable</i>)

Des Weiteren werden im Verlauf der Arbeit die Einheiten des Internationalen Einheitensystem (SI, franz.: *système international d'unités*) sowie die gebräuchlichen Abkürzungen des Einbuchstabencodes für Aminosäuren beziehungsweise Nukleinsäuren genutzt.

1 Zusammenfassung

Potentiell allergene Proteine aus Hühnerei oder auch aus boviner Milch können für sensitive Verbraucher ein Problem darstellen. Da im Rahmen der Weinproduktion Proteine wie Lysozym aus Hühnerei zur Kontrolle der malolaktischen Gärung oder Ovalbumin beziehungsweise Casein zur Schönung eingesetzt werden, können Rückstände auch im Lebensmittel Wein verbleiben. Die Nutzung von Antikörpern für analytische Zwecke ermöglicht aufgrund der hohen Affinität und Spezifität der Bindung zum entsprechenden Antigen auch den Nachweis von Allergenspuren. Da die Produktion dieser Immunglobuline jedoch stets Tiere beziehungsweise tierabhängige Methoden beinhaltet und gemäß der aktuellen Gesetzgebung der Einsatz von Tieren für wissenschaftliche Zwecke reduziert werden soll, wurden in der vorliegenden Arbeit Alternativen entwickelt.

Da in den etablierten Methoden der entsprechende Antikörper lediglich einmal eingesetzt werden kann, wurde zur Reduktion des Verbrauches zunächst ein wiederverwendbares System auf Antikörperbasis entwickelt. Durch den Einsatz der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie und Entwicklung einer Regenerationsprozedur ohne Beeinträchtigung der biologischen Aktivität konnte ein wiederverwendbarer Biosensor zur Detektion von Lysozym und Ovalbumin in Weißwein entwickelt werden. Die gesetzlich vorgeschriebenen Anforderungen (0,25 ppm Nachweisgrenze; 0,5 ppm Bestimmungsgrenze) sind durch eine direkte Messung von Proben und entsprechenden Kalibrierstandards innerhalb kürzester Zeit mit minimalem Personalaufwand realisierbar.

Um eine vollständige Unabhängigkeit von Antikörpern zu erreichen, wurden auch die Einsatzmöglichkeiten von Aptameren zur Detektion von Allergenen im Kontext Wein untersucht. Diese einzelsträngigen Nukleinsäuren sind aufgrund des fehlenden Komplementärstrangs in der Lage mit unterschiedlichsten Zielmolekülen zu interagieren und werden durch einen Selektionsprozess vollständig *in vitro* generiert. Unter Nutzung eines teilautomatisierten Selektionsprozesses konnten in der vorliegenden Arbeit mehrere potentielle Sequenzen mit einer Affinität gegenüber Lysozym, Ovalbumin und den bovinen Caseinen identifiziert und in der Folge charakterisiert werden. Unter Berücksichtigung der nanomolaren Dissoziationskonstanten der Aptamer-Target-Komplexe wurden zunächst in Analogie zu den antikörperbasierten Biosensoren entsprechende Aptameranaloge entwickelt. Es zeigte sich bei der Analyse unterschiedlicher Proben, dass die Lysozym- und Ovalbuminaptamere zwar keine absolute Spezifität aufweisen und der Selektionsprozess diesbezüglich optimiert werden sollte, jedoch eine Detektion in Puffer und Realproben möglich ist.

Die im Vergleich mit den Antikörpern hohe Stabilität der Nukleinsäuren gegenüber äußeren Einflüssen legt einen Einsatz in Vor-Ort-Methoden wie beispielsweise in LFDs (engl.: *lateral flow devices*) nahe. Unter Verwendung der selektierten Aptamere mit einer hohen Affinität zu Lysozym konnten entsprechende Systeme entwickelt und zur Detektion in Wein eingesetzt werden, um so beispielsweise die Einhaltung des gesetzlich vorgeschriebenen Höchstwertes (500 ppm) zu überprüfen. Des Weiteren wurden die genannten Aptamere genutzt, um eine bisher nicht in der Literatur beschriebene Möglichkeit der spezifischen Detektion nach einer HPTLC-Trennung (engl.: *high performance thin layer chromatography*) zu etablieren. Die Detektion unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Aptameren konnte auf unterschiedlichen stationären Phasen erfolgreich durchgeführt werden. Das entwickelte System konnte zur Untersuchung von Realproben und auch zur Beurteilung der Spezifität der Lysozym- und Caseinaptamere genutzt werden, wobei sich zeigte, dass die Lysozymaptamere in diesem Kontext eine hohe Spezifität aufweisen.

2 Abstract

Potentially allergenic proteins like lysozyme and ovalbumin originating from hen's egg or caseins from bovine milk could pose a risk for sensitive individuals. Since these proteins are used during the production of wine for stabilization (fining) or to control malolactic fermentation, residues can also be found in the final product. Multiple analytical methods for the assessment of allergenic risks have been developed under the use of antibodies, since these immunoglobulins are characterized by high affinity and specificity towards the corresponding antigen. A main drawback of antibodies is the production in animals or animal-dependent methods since current legislation demands a minimization of the use of animals for scientific purposes.

In the currently established methods, the antibodies are often only used for one time. Therefore, the development of an analytical method using the biological receptors for multiple times could be a contribution to an overall reduction of antibody consumption. Using surface plasmon resonance spectroscopy and a non-denaturing regeneration procedure, it was possible to develop a biosensor for the detection of lysozyme and ovalbumin in white wine. The legislative requirements (limit of detection = 0.25 ppm, limit of quantification 0.5 ppm) are fulfilled by direct measurements without previous steps and on short notice.

To reach full independence from antibodies, single-stranded nucleic acids, so-called aptamers, were evaluated regarding the possibility of allergen detection in wine. Therefore, a randomized nucleic acid library was used as starting point for *in vitro*-selection under white wine mimicking conditions. The selection processes using lysozyme, ovalbumin, and bovine caseins were performed using a semiautomatic procedure and yielded multiple sequences which were characterized afterwards. Using the aptamers which seem to build up the most stable aptamer-target-complexes, it was possible to establish aptamer-based SPR-biosensors with which detection of lysozyme and ovalbumin in white wine could be implemented.

The comparably high stability of nucleic acids in comparison to antibodies suggests their use in in-field-methods like LFDs (lateral flow devices). Using the aptamers with an affinity towards lysozyme, it was possible to develop a test system which can be used to detect lysozyme exceeding maximum permissible levels (500 ppm). Furthermore, the identified aptamers have been used for the development of a new method for selective detection after separation via HPTLC (high performance thin layer chromatography). Using fluorescence-labelled aptamers it was possible to perform specific detection on various stationary phases. The procedure was named aptastaining and can be used for analysis of wine samples including a semiquantitative estimation and in addition to determine specificity of the used aptamers. Considering the results gained by the aptamer-based SPR-biosensor and the aptastaining procedures, it became apparent, that the specificity of the identified aptamers significantly depends on the operational purpose. This highlights that the field of application should be taken into account before the selection procedure starts.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Wein

Alkoholische Getränke wie Wein sind schon seit langer Zeit bei unterschiedlichsten Völkern verbreitet. Das als Wein bezeichnete Produkt wird aus den Trauben unterschiedlicher Rebsorten der Pflanze *Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera* durch Gärung gewonnen.(1,2) In der europäischen Union wird Wein gemäß Art. 78 (1) lit. b in Verbindung mit Anhang VII Teil II Nr. 1 Satz 1 VO (EU) Nr. 1308/2013 folgendermaßen definiert:

„Der Ausdruck "Wein" bezeichnet das Erzeugnis, das ausschließlich durch vollständige oder teilweise alkoholische Gärung der frischen, auch eingemaischten Weintrauben oder des Traubenmostes gewonnen wird.“(3)

Die historischen Weinanbaugebiete erstrecken sich rund um den Mittelmeerraum, wobei insbesondere Italien, Frankreich und Spanien auch heute noch einen großen Anteil an der Weltmarktproduktion aufweisen.(4) In Deutschland wurden gemäß § 3 (1) Weingesetz die Gebiete Ahr, Baden, Franken, Hessische Bergstraße, Mittelrhein, Mosel, Nahe, Pfalz, Rheingau, Rheinhessen, Saale-Unstrut, Sachsen und Württemberg als Anbaugebiete für Qualitäts- und Prädikatsweine definiert, wobei die exakten geografischen Abgrenzungen nach § 3 (4) Weingesetz durch die jeweiligen Landesregierungen festgelegt werden.(5) Der Import von Wein aus dem Ausland ist jedoch erforderlich, da der Verbrauch von durchschnittlich 28 Litern Wein pro Kopf durch diese inländischen Anbaugebiete nicht gedeckt werden kann. Deutschland trat somit in den Jahren 1995 bis 2012 als Weinimportland auf, wobei der ausländische Anteil über die Jahre immer größer wurde (Steigerung um ca. 70 %). Die Entwicklung des Handels in Deutschland ist in Abbildung 1 anhand von Zahlen der OIV (franz.: *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*) dargestellt.(6)

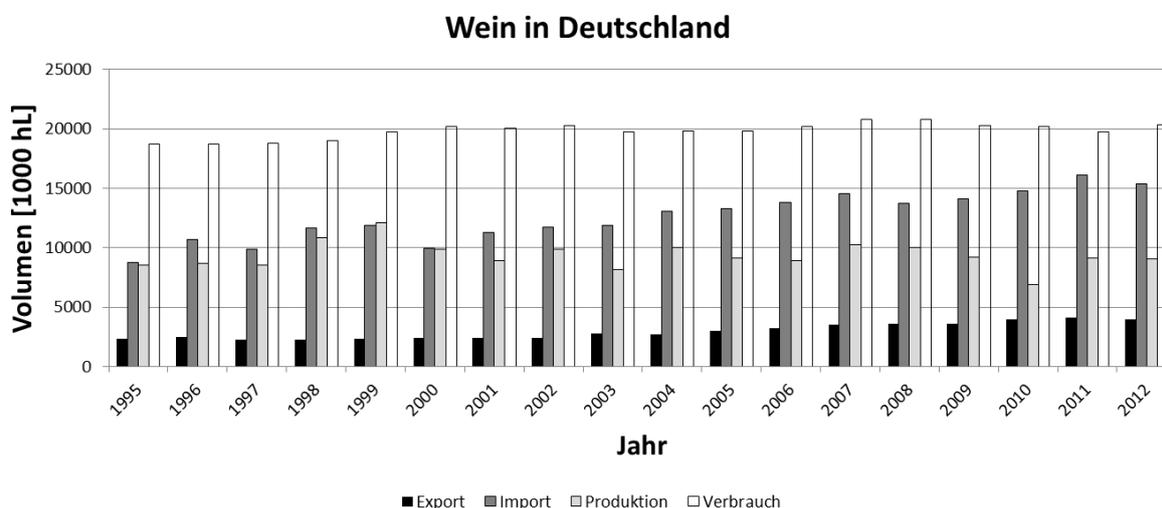


Abbildung 1: Wein in Deutschland.

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf zwischen den Jahren 1995 und 2012 von Export, Import, Produktion sowie Verbrauch von Wein in Deutschland.(6)

Wein dient als Grundlage für eine Vielzahl von weiteren Produkten, so werden in Anhang VII Teil II VO(EU) Nr. 1308/2013 beispielsweise Likörwein (Produkt aus Wein, Weindestillat und Traubenmost wie beispielsweise Portwein), Schaumwein (Produkt mit hohem CO₂-Gehalt aus zweifach unter Zusatz von Zucker vergorenem Jungwein wie beispielsweise Champagner) oder Weinessig (durch Essigsäuregärung vergorener Wein)

definiert.(3) Das Produkt Wein ist jedoch abzugrenzen von anderen Produkten wie beispielsweise Fruchtweinen (Most), Malzweinen (Met) oder auch Reisweinen, welche zwar auch Alkohol enthalten und mitunter wie Wein verzehrt oder auf vergleichbare Art und Weise hergestellt werden, rechtlich aber keiner Definition von Wein entsprechen.(4)

Die rechtlichen Anforderungen an Wein sind durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Rechtsnormen geregelt, sowohl auf EU- als auch auf nationaler Ebene. Ein Überblick gestaltet sich insbesondere durch die diversen Änderungen und Aufhebungen einzelner Verordnungen im Kontext der Schaffung einer gemeinsamen Marktordnung als sehr anspruchsvoll (s. a. 3.1.2. zur Einteilung von Wein). Diese Vielfalt ist auch mit den historisch gewachsenen Unterschieden in den einzelnen Weinanbaugebieten zu begründen, wodurch diverse Ausnahmeregelungen und nationale Rechtsnormen beachtet werden müssen. Als zentrale, internationale Rechtsnormen sind insbesondere, aber nicht ausschließlich, die VO (EU) Nr. 1308/2013 über eine gemeinsame Marktorganisation, die VO (EG) Nr. 606/2009 über önologische Verfahren und Behandlungen, die VO (EG) Nr. 607/2009 hinsichtlich Bezeichnungen für Wein und die VO (EG) Nr. 555/2008 hinsichtlich einer gemeinsamen Marktorganisation für Wein zu beachten.(3,7-9) Für Deutschland von besonderer Bedeutung sind unter anderem das Weingesetz und die Weinverordnung.(5,10)

3.1.1 Herstellung und Einteilung

Wie oben erwähnt wird Wein aus den Beeren der Pflanze *Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera* gewonnen, welche durch die Kultivierung aus der Wildform *Vitis vinifera* L. ssp. *sylvestris* gezüchtet wurde.(1,2) Die augenfälligste Unterscheidung zwischen den über 8000 Rebsorten, welche auch immer wieder untereinander gekreuzt werden, ist die Farbe der Trauben. Das Farbspektrum der Trauben reicht von grün bis rot und blau, wobei letztere ihre Farbe durch hohe Gehalte an Polyphenolen, insbesondere Anthocyane, in der Schale erhalten. (11) Auch der Zuckergehalt und das Aroma können sich deutlich voneinander unterscheiden, sodass die Spannbreite der angebauten Sorten groß ist. Da die Ausbildung der Trauben durch hohe sommerliche Temperaturen sowie Sonneneinstrahlung begünstigt wird, und die Pflanzen durch ein weit verzweigtes Wurzelwerk in der Lage sind sich auch bei geringen Niederschlägen zu entwickeln, werden diese in Europa überwiegend in Hanglage kultiviert.(1) In Deutschland werden mit ungefähr 65 % überwiegend Weißweinträumen wie Riesling, Müller-Thurgau oder Silvaner angebaut, wobei regionale Unterschiede oder Spezialitäten wie die Scheurebe auftreten. Im Gegensatz zu Ländern wie Frankreich liegt der Anteil an Rotweinsorten wie Spätburgunder oder Dornfelder in Deutschland bei ungefähr 35 %, sodass Deutschland als Weißweinland gilt.(4,12,13) Die als Lese bezeichnete Ernte der Trauben erfolgt überwiegend im Herbst, wenn der Gehalt an organischen Säuren (hauptsächlich Wein-, Äpfel-, Bernstein- und Citronensäure) verringert ist. Neben dem Verhältnis dieser auch für den Geschmack bedeutsamen Komponenten ist insbesondere der zu diesem Zeitpunkt durch die Reifung erhöhte Gehalt an Zuckern (Glucose und Fructose) von Bedeutung. Die Bestimmung des sogenannten Mostgewichtes (Dichte des Traubenmosts) erfolgt refraktrometrisch oder direkt über eine Bestimmung der Dichte und wird traditionell in Grad Oechsle angegeben (°Oe), wodurch auch eine Berechnung des resultierenden, natürlichen Alkoholgehaltes bei vollständiger Vergärung möglich ist.(4) Umrechnungstabellen sind beispielsweise in Anlage 8 Weinverordnung vorhanden.(10) In Abhängigkeit von der Traube werden zur Weinherstellung unterschiedliche Verfahren angewendet, welche sich insbesondere im Zeitpunkt der Hefezugabe unterscheiden. Der Einsatz von Reinzuchthefen wie *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoides* oder *pastorianus* im Rahmen einer kontrollierten Gärung ist zwar nicht unbedingt erforderlich, da auf der Beerenhaut auch natürlicherweise Hefen wie *Kloeckera apiculata* leben, ermöglicht jedoch eine bessere Kontrolle des Gärungsprozesses. Durch den Einsatz besonders resistenter Hefen kann sowohl eine vollständigere Vergärung auch bei Weinen mit hohem Polyphenolgehalt, als auch eine Steuerung des

gebildeten Aromas erreicht werden.(1,4,14) Zur Herstellung von Weißwein (Abbildung 2, links) werden helle („weiße“) Trauben verwendet, welche nach der Entfernung von Stielen und Rappen durch Walzen zerkleinert werden, um die sogenannte Maische herzustellen. Anschließend werden durch einen manuell oder mechanisch durchgeführten Pressvorgang (Keltern), die festen Bestandteile (Trester) abgetrennt und der Traubensaft (Most) gewonnen. Durch den Zusatz von Hefen wird die Gärung induziert, wodurch über die alkoholische Gärung Alkohol aus den Zuckern gebildet wird. Wenn der Ethanolgehalt einen Wert von 12 bis 15 % vol. erreicht, kommt es zum Absterben der Hefen, welche sich dann zusammen mit Eiweißen, Pektinen, Gerbstoffen und Weinsäure als Bodensatz ablagern. Der Wein wird nach der Abtrennung („Abstich“) des Sedimentes durch Umfüllung als Jungwein bezeichnet. Noch kolloidal im Wein vorhandene Trubstoffe können durch die sogenannte Schönung abgetrennt werden. Im Gegensatz zur beschriebenen Vergärung des Mostes wird bei der Rotweinherstellung (Abbildung 2, rechts) eine Maischegärung durchgeführt. Dabei werden die dunklen Trauben zur Maische verarbeitet, welche nach einer Erwärmung (30 °C), zur Lösung der farbgebenden Bestandteile aus der Beerenschale, durch Zugabe von Hefen vergoren wird. Erst danach wird der Trester abgetrennt und der sogenannte Presswein erhalten, welcher nach einer Klärung zur Abtrennung der Hefe und einer Schönung als Rotwein bezeichnet wird.

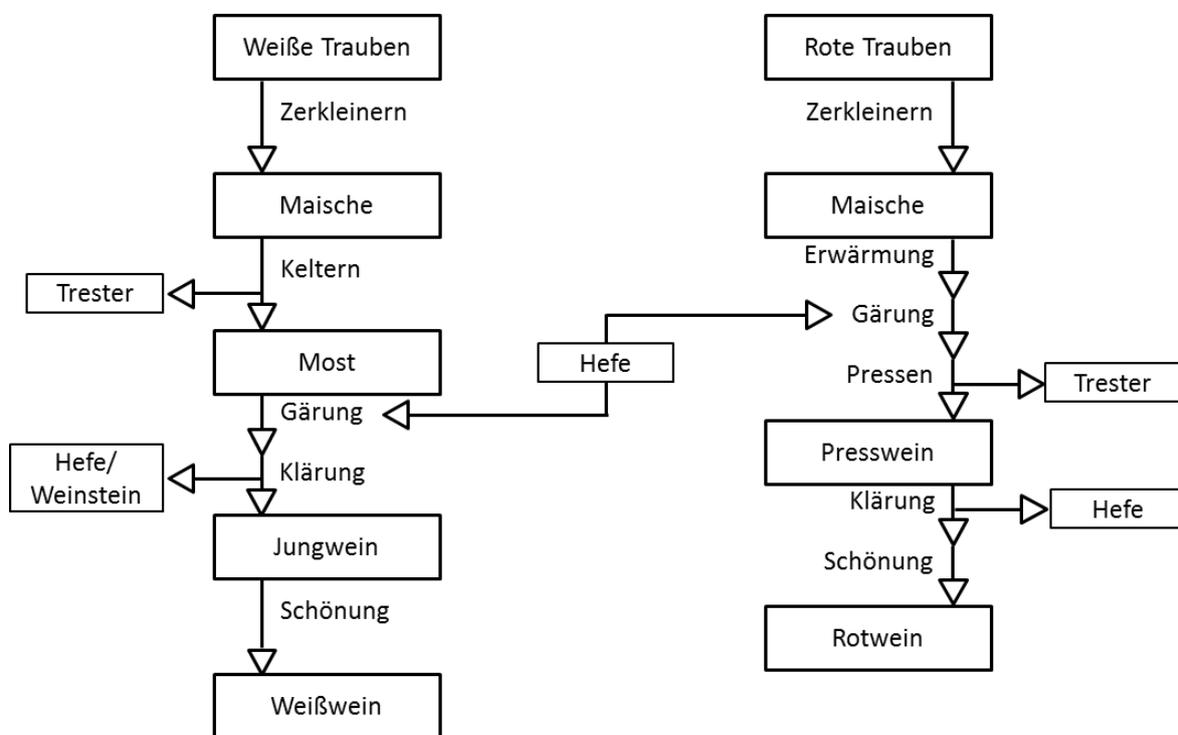


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Weiß- und Rotweinherstellung.

In der Abbildung sind die wesentlichen Arbeitsschritte, Zwischen- und Nebenprodukte bei der Herstellung von Weiß- und Rotwein dargestellt.

Die in Abbildung 2 beschriebenen Vorgehensweisen können in so vielfältiger Art und Weise modifiziert oder durch weitere Schritte ergänzt werden, dass das Forschungsgebiet der Önologie begründet wurde und als eigenständiges Forschungsgebiet an unterschiedlichen Hochschulen gelehrt wird. So können beispielsweise durch die Verwendung von roten Trauben, welche nach der Herstellung der Maische gekeltern und dann, wie im Prozess der Weißweinherstellung, als Mostgärung verarbeitet werden, sogenannte Roséweine hergestellt werden.(4,11) Je nach Jahrgang kann auch eine Optimierung des Mostes oder Weines erforderlich sein, wenn dessen hohe Säure- und niedrige Zuckergehalte nicht den Anforderungen des Winzers genügen. Durch den

Einsatz von Carbonaten wie CaCO_3 und der Zugabe von (rektifiziertem) Traubenmost oder Saccharose können die resultierenden Weine häufig verbessert werden. Auch der sogenannte Verschnitt (Mischung) mehrerer Weine kann eingesetzt werden, um eine gleichbleibende oder sogar gesteigerte Qualität zu gewährleisten.(4)

Wein wird in unterschiedlicher Weise Qualitätsstufen zugeordnet, in Deutschland erfolgt die Einteilung primär anhand des Mostgewichtes beziehungsweise des Alkoholgehaltes.(4) Die deutschen Qualitätsstufen gemäß Weingesetz können nach der Erteilung einer amtlichen Prüfungsnummer auf dem Wein angebracht werden und die gemäß Art. 119 VO (EU) 1308/2013 erforderliche Angabe der Weinkategorie ersetzen. Dabei werden die in Tabelle 1 angegebenen Stufen verwendet, wobei die real zu erreichenden Alkoholgehalte sowohl von der jeweiligen Rebsorte als auch vom Anbaugebiet abhängig sind und durch die entsprechenden Landesregierungen definiert werden können.

Tabelle 1: Qualitätsstufen von Wein.

In der Tabelle sind die Qualitätsstufen von Weinen in Deutschland gemäß Weingesetz den entsprechenden Qualitätsstufen in der EU gegenübergestellt.

Qualitätsstufe nach EU	Bezeichnung in Deutschland
-	(Grund-)Wein
geschützte geografische Angabe	Landwein
geschützte Ursprungsbezeichnung	Qualitätswein
geschützte Ursprungsbezeichnung	Prädikatswein
	— Kabinett
	— Spätlese
	— Auslese
	— Beerenauslese
	— Trockenbeerenauslese
	— Eiswein

Obwohl weit verbreitet, ist die Angabe des Zuckergehaltes eines Weines eine fakultative Angabe gemäß Art. 120 (1) lit. c VO (EU) Nr. 1309/2013 und Art. 64 (1) in Verbindung mit Anhang XIV Teil B VO (EG) Nr. 607/2009. Die möglichen Begriffe und Anforderungen (Fehlertoleranz 1 g/L) sind in Tabelle 2 angegeben, wobei auch die entsprechenden, fremdsprachigen Begriffe gemäß VO (EG) Nr. 607/2009 zulässig sind. Auch die Angabe der eingesetzten Traubensorte ist gemäß Art. 120 (1) lit. b VO (EU) 1308/2013 eine freiwillige Angabe, wobei gemäß Art. 62 (1) lit. c VO (EG) 607/2009 85 % des Weines aus der angegebenen Sorte bestehen müssen, wenn die Angabe in Zusammenhang mit einer geschützten geografischen Angabe oder geschützten Ursprungsbezeichnung (wie beispielsweise Kabinett) erfolgt.

Tabelle 2: Verwendungsbedingungen für die Bezeichnung des Zuckergehaltes in Wein.

Die angegebenen Anforderungen sind Anhang XIV Teil B VO (EG) Nr. 607/2009 entnommen und gelten unter Berücksichtigung einer Fehlertoleranz von 1 g/L gemäß Art. 64 (3) VO (EG) Nr. 607/2009.

Bezeichnung	Verwendungsbedingungen
trocken	Wenn sein Zuckergehalt folgende Werte nicht überschreitet: <ul style="list-style-type: none"> — 4 g je Liter oder — 9 g je Liter, sofern der in g je Liter Weinsäure ausgedrückte Gesamtsäuregehalt höchstens um 2 g je Liter niedriger ist als der Restzuckergehalt.
halbtrocken	Wenn sein Zuckergehalt den vorgenannten Höchstwert überschreitet, folgende Werte aber nicht überschreitet: <ul style="list-style-type: none"> — 12 g je Liter oder — 18 g je Liter, sofern der in g je Liter Weinsäure ausgedrückte Gesamtsäuregehalt höchstens um 10 g je Liter niedriger ist als der Restzuckergehalt.
lieblich	Wenn sein Zuckergehalt den vorgenannten Höchstwert überschreitet, aber nicht mehr als 45 g je Liter beträgt.
süß	Wenn sein Zuckergehalt mindestens 45 g je Liter beträgt.

3.1.2 Weinschönung und Weinbehandlung

Die Schönung und Behandlung von Wein wird in verschiedenen Abschnitten der Herstellung durchgeführt. Seit langer Zeit von großer Bedeutung, im Rahmen der sogenannten Schwefelung, ist der Einsatz von SO₂, Sulfite oder schwefliger Säure. Ein Verzicht auf SO₂ wird jedoch sowohl von Seiten der Verbraucher als auch vom Gesetzgeber gefordert, da die Verbindung mit allergischen Reaktionen (siehe 3.2.2 Immunsystem) in Verbindung gebracht wird.(15)

Durch die Bindung an Proteine werden durch diese Substanz sowohl Enzyme als auch Mikroorganismen inaktiviert.(16,17) SO₂ verhindert somit enzymatische Bräunungsreaktionen und eine einhergehende Beeinträchtigung der sensorischen Eigenschaften genauso wie eine gegebenenfalls unerwünschte Spontangärung durch natürlicherweise auf der Beerenhaut vorkommende Hefen. Auch die im Rahmen der kontrollierten Gärung zugesetzten Reinzuchthefen können durch Schwefelung nach der Hauptgärung abgetötet werden, sodass eine Nachgärung durch noch aktive Zellen nach dem Abstich unterbunden wird und beispielsweise nicht vergorene Zucker im Wein verbleiben. Die Dosierung muss mit Vorsicht und Erfahrung erfolgen, da durch einen zu starken SO₂-Einsatz sowohl ein Fehl aroma (Böckser) durch Umsetzung des SO₂ zu H₂S und Folgereaktionen bis zum Ethylthiol erfolgen können, als auch andere Mikroorganismen abgetötet werden können.(4) So können durch einen exzessiven Einsatz von SO₂ auch im Wein vorhandene Milchsäurebakterien wie *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* oder insbesondere *Oenococcus oeni* (auch: *Leuconostoc oenos*) abgetötet werden. Diese sind im Rahmen der malolaktischen Gärung, welche auf die alkoholische Gärung folgt, durch die Decarboxylierung von Äpfelsäure zu Milchsäure von besonderer Bedeutung. Durch diesen Vorgang werden der Säuregehalt des Weines gesenkt und die organoleptischen

Eigenschaften des Weines positiv beeinflusst.(18) Ein zu geringer SO₂-Einsatz kann jedoch auch das Wachstum von Essigsäurebakterien begünstigen, welche durch die Bildung von Essigsäure einen negativen Einfluss (ab 1,5 g/L) auf das Aroma des Weines haben.(14,19) Auch die Bildung von biogenen Aminen wie Histamin oder aromaaktiven Komponenten wie Ethylacetat kann durch die am biologischen Säureabbau beteiligten Milchsäurebakterien das Aroma des Weines deutlich stören.(20) Die Steuerung der im Wein vorhandenen Mikroflora ist für das schlussendliche Aroma des Weines dementsprechend von entscheidender Bedeutung.(20) Eine bereits auch heute praktizierte Alternative kann möglicherweise der Einsatz von Filtern zur Abtrennung von Mikroorganismen sein.

3.1.2.1 Lysozym

Das 14,4 kDa große Protein Lysozym (Abbildung 3) kann eine Alternative zur Kontrolle des biologischen Säureabbaus darstellen und so die erforderliche Menge an SO₂ verringern.(17,20,21) Durch eine Aktivität gegenüber β -1,4-glykosidischen Bindungen, wie sie in der Zellwand von grampositiven Bakterien auftreten, zeigt das Enzym eine bakteriolytische Wirkung.(22) Die Anwendung ist bei europäischen Weinen gemäß Art. 3 (2) in Verbindung mit Anhang I A Nr. 18 VO (EG) 606/2009 mit einer Höchstmenge von 500 mg/L zulässig.(8) Das im Rahmen der Weinbehandlung eingesetzte Lysozym wird aus Hühnerei isoliert, einem potentiell allergieauslösenden Lebensmittel, woraus sich Anforderungen hinsichtlich der Kennzeichnung ergeben (siehe Allergene aus Milch und Ei). Neben den durch die rechtlichen Anforderungen gesetzten Höchstmengen muss beachtet werden, dass es durch Interaktionen mit den farbgebenden Polyphenolen des Weines zu einer Farbbeeinträchtigung kommen kann.(20)

3.1.2.2 Ovalbumin und Casein

Neben den beschriebenen mikrobiellen Belastungen, welche durch Stoffwechselprodukte einen Einfluss auf das Aroma haben, erfordert die Kombination aus Weinproteinen und Polyphenolen im Wein weitere Behandlung, was als Schönung beschrieben wird.(4,23) Durch die Bildung von unlöslichen Komplexen kann während der Lagerung eine Trübung ausgebildet werden, welche auch auf die organoleptischen Eigenschaften des Weines negativen Einfluss hat. Um diesem Effekt vorzubeugen, werden unter anderem Ovalbumin und Casein eingesetzt. (23)

Bei Ovalbumin handelt es sich um ein 42,8 kDa großes Protein (Abbildung 4), welches im Hühnereieiklar von den Proteinen den größten Anteil (54 %) aufweist und somit den Anteil von Lysozym (3,4 %) deutlich übersteigt.(4) Durch die positive Eigenladung des Proteins kommt es mit den negativ geladenen Polyphenolen zur Bildung von Präzipitaten, welche sich als Sediment am Boden sammeln und in der Folge abgetrennt werden können.(23,24) Die Affinität zur Ausbildung von entsprechenden Komplexen mit den farbgebenden Anthocyanen ist eher gering, was als Vorteil des Ovalbumins anzusehen ist.(23)



Lysozyme C

Abbildung 3: Bändermodell von Lysozym.

Dargestellt ist ein Bändermodell von Lysozym aus Hühnern bei 278 K, entnommen aus Protein Data Bank (Eintrag 5KXO).



Ovalbumin

Abbildung 4: Bändermodell von Ovalbumin.

Dargestellt ist ein Bändermodell von Ovalbumin, entnommen aus Protein Data Bank (Eintrag 1OVA).

Tabelle 3: Informationen über verschiedene, zur Weinbehandlung und –schönung eingesetzte Proteine.

Die Länge der Proteine wurden uniprot.org entnommen, das Gewicht wurde anhand der Sequenz mittels des Rechners auf protcalc.sourceforge.net entnommen.

Protein	Länge [AS]	Gewicht [kDa]
Lysozym C	129	14,313
Ovalbumin	385	42,750
α_{s1} -Casein	199	22,974
α_{s2} -Casein	207	24,348
β -Casein	209	23,583
κ -Casein	169	18,974

Beim Casein handelt es sich nicht um ein einzelnes Protein, sondern um mehrere Proteine (Tabelle 3) aus Milch, welche zusammen ca. 80 % der dort enthaltenen Proteine ausmachen. In Anwesenheit von Ca^{2+} kommt es zur Ausbildung von mehreren Komplexen, von denen nur der entsprechende κ -Casein-Komplex wasserlöslich ist. Der letztgenannte Komplex ist darüber hinaus in der Lage, die anderen Komplexe in Lösung zu halten und so die Mizellen der Milch zu bilden.(4) Dieses anspruchsvolle Löslichkeitsverhalten deutet die Verwendung im Rahmen der Weinschönung an. So werden Caseinpräparate dem Wein zugesetzt, damit sich Trubstoffe wie Polyphenole oder Reaktionsprodukte einer enzymatischen Bräunung an die Proteine anheften und mit diesen als Sediment aus der Lösung entfernt werden.(25) Im Gegensatz zu Ovalbumin kommt es beim Einsatz der Caseine jedoch auch zu einer Beeinträchtigung der Farbe durch Anthocyanbindung.(23)

Die beim Einsatz von Ovalbumin und Casein gebildeten Komplexe können teilweise durch Filtration entfernt werden. Da es sich sowohl bei Ovalbumin als auch bei den Caseinen um potentiell allergieauslösende Proteine handelt, können gegebenenfalls im Produkt verbleibende Rückstände für sensitive Verbraucher ein Problem darstellen (siehe auch 3.2 Lebensmittelallergien).

3.1.2.3 Weitere Schönungsmittel

Neben den genannten Schönungsmitteln werden auch Proteine der getrockneten Hausenblase (Schwimmlase) von Hechten oder Stören, pflanzliche Proteine, PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon) sowie auf Gelatine basierende Produkte eingesetzt, um durch Adsorption eine Klärung von Wein zu erreichen.(23,25)

Zur Entfernung von bestimmten, mitunter toxischen Metallen werden weitere, überwiegend anorganische Verbindungen eingesetzt. Beispielsweise kann zur Entfernung von Eisen, Kupfer und Zink Kaliumhexacyanoferrat ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) eingesetzt werden, wodurch unlösliche Farbstoffkomplexe gebildet werden.(4) Von großer Bedeutung ist auch Bentonit, ein Silikatgestein, welches durch eine hohe Adsorptionskraft in der Lage ist, sowohl noch in Lösung befindliche Proteine zu binden und aus der Lösung zu entfernen, als auch unerwünschte Geschmackstoffe wie die oben erwähnten biogenen Amine zu eliminieren.(21,23,24)

3.2 Lebensmittelallergien

Als Allergie wird eine durch das Immunsystem vermittelte Reaktion auf an sich harmlose Substanzen beschrieben. Stammen diese aus einem Lebensmittel und wird die Reaktion durch bestimmte Antikörper (IgE, Immunglobulin E, siehe 3.2.2.1 Antikörper) vermittelt, so wird von einer Lebensmittelallergie gesprochen.(26) Davon abzugrenzen sind nicht durch das Immunsystem vermittelte Reaktionen, wie beispielsweise die Laktoseunverträglichkeit (Lebensmittelintoleranz) oder die Reaktion auf verdorbene Lebensmittel.(4)

Da es sich bei Allergien um fehlgeleitete Reaktionen des Immunsystems (siehe 3.2.2 Immunsystem) gegenüber normalerweise harmlosen Substanzen handelt, kann prinzipiell jede Substanz Auslöser für eine Allergie sein. Mehrere Lebensmittelallergien treten jedoch in hoher Frequenz oder besonderem Schweregrad auf, sodass der Gesetzgeber für Nahrungsmittel innerhalb der Europäischen Union eine Kennzeichnung verlangt, wenn Allergene in diesen enthalten sind. Gemäß Art. 9 (1) lit. c in Verbindung mit Anhang II VO (EU) Nr. 1169/2011 müssen folgende 14 Substanzen und daraus gewonnene Erzeugnisse bei Anwesenheit in Lebensmitteln deklariert werden:

- Pflanzlich: Glutenhaltiges Getreide, Erdnüsse, Soja, Schalenfrüchte, Sellerie, Senf, Sesam, Lupine
- Tierisch: Krebstiere, Eier, Fisch, Milch, Weichtiere
- Weitere: Schwefeldioxid (Sulfite)

Die in einer Region auftretenden Allergien und deren Häufigkeit variieren mit Geschlecht, dem sozioökonomischen Hintergrund und weiteren Faktoren, sodass, auch aufgrund der diffusen Daten, Abschätzungen schwierig sind.(24,27-29) Es wurde jedoch beobachtet, dass insbesondere Allergien gegen Kuhmilch- und Hühnereiprotein bei Kindern häufiger auftreten und bis zum Erwachsenenalter in geringerem Maße (Faktor 5 bis 10) zu beobachten sind.(27,29) Die Ursache hierfür scheint unter anderem an der zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung noch nicht vollständig ausgeprägten Darmschleimhaut zu liegen, was dazu führt das Allergene diese natürliche Barriere überwinden können und in Kontakt mit den Zellen des Immunsystems kommen.(28)

Des Weiteren ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen, ob eine Allergie durch Eigendiagnose, durch *skin-prick*-Tests oder durch sogenannte DBPCFC-Studien (engl.:*double-blind, placebo-controlled food challenge*) festgestellt wurde. Die oftmals zuerst durchgeführten *skin-prick*-Tests können häufig nur eine Tendenz vorgeben, da bei dieser Untersuchung Faktoren wie der Einfluss der Verdauung oder die Passage durch die Darmschleimhaut unberücksichtigt bleiben.(26,27) Bei DBPCFC-Studien werden dem Patienten die entsprechenden Allergene blind und abwechselnd mit Placebos verabreicht. Wenn bei adversen Reaktionen, wie Urticaria, Juckreiz oder auch anaphylaktischen Schocks, durch parallele Blutuntersuchungen ein erhöhter Gehalt an IgE-Antikörpern festgestellt wird und die Ergebnisse somit in Einklang stehen, wird von einer echten Lebensmittelallergie gesprochen.(26,29) Auch die Abgrenzung einer echten Lebensmittelallergie unter Beteiligung von IgE-Antikörpern von Erkrankungen wie der Glutenunverträglichkeit und Lebensmittelintoleranzen wie der Laktose- oder Fruktoseunverträglichkeit ist für den Laien nur schwer erkennbar.(28) Da zudem die Therapie sowohl bei Lebensmittelallergien als auch bei Unverträglichkeitsreaktionen häufig im Verzicht auf das entsprechende Lebensmittel bestehen und eine Heilung oftmals nicht möglich ist, hat die Unterscheidung für den jeweiligen Patienten eine untergeordnete Bedeutung.(26,27)

3.2.1 Lebensmittelallergene

Die meisten Allergene werden durch Proteine beziehungsweise Protein-Kohlenhydrat-Strukturen, die sogenannten Glykoproteine ausgelöst. Das Immunsystem kann jedoch auch auf andere Stoffklassen wie Polysaccharide oder Lipide reagieren.(30) Proteine nehmen innerhalb von pflanzlichen und tierischen Zellen eine zentrale Rolle ein. Sowohl als Katalysatoren für unterschiedlichste biologische Prozesse, als auch bei der Speicherung, Stabilisierung oder beim Schutz der Zelle sind Proteine von entscheidender Bedeutung.(31) Bei jedem Protein handelt es sich um ein Polymer aus α -Aminosäuren, welche durch die lineare Verknüpfung und Ausbildung von Peptidbindungen miteinander verknüpft sind und das Rückgrat des Makromoleküls bilden (Abbildung 5). Konventionsgemäß wird die freie Aminogruppe (N-Terminus) als Beginn und die freie Carboxylgruppe (C-Terminus) als Ende der Proteinsequenz definiert, in Abhängigkeit von der Länge kann außerdem eine Unterscheidung in Dipeptide ($n=2$), Oligopeptide ($n\leq 100$) oder Proteine ($n>100$) vorgenommen werden. Die einzelnen Monomere können in Abhängigkeit von der jeweiligen Seitenkette (Tabelle 4) in polare, unpolare, saure und basische Aminosäuren unterschieden werden, wobei auch andere Unterscheidungen, beispielsweise anhand der Zugehörigkeit zu funktionellen Gruppen, bestehen. Die dargestellten Aminosäuren (Tabelle 4) werden auch als kanonische Aminosäuren bezeichnet, da sie in allen Lebewesen durch den genetischen Code codiert sind. Weitere proteinogene Aminosäuren wie Selenocystein, 4-Hydroxyprolin oder 5-Hydroxylysin gelangen durch (posttranslationale) Modifikationen in Proteine.(4,31)

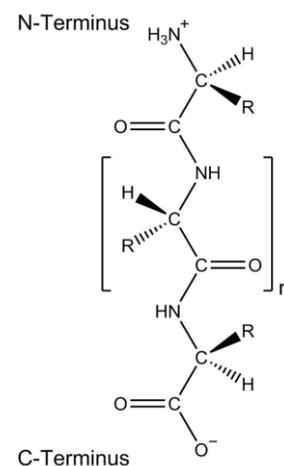


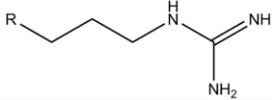
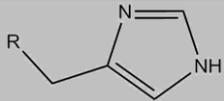
Abbildung 5:
Peptidbindungen.

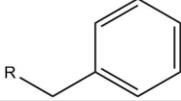
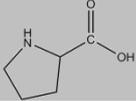
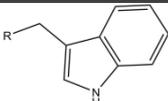
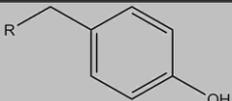
Dargestellt sind Peptidbindungen, welche das Rückgrat von Proteinen bilden. R steht für die unterschiedlichen Seitenketten, n steht für die Anzahl der Wiederholungen.

Während die Proteinsequenz als Primärstruktur bezeichnet wird, kommt es durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen räumlich nahe beieinander liegenden Peptidbindungen zu dreidimensionalen Strukturen wie beispielsweise α -Helices (siehe Abbildung 3), β -Faltblättern oder auch β -Schleifen, welche als Sekundärstrukturen zusammengefasst werden. Die Tertiärstruktur wird durch Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten der Aminosäuren wie beispielsweise van-der-Waals-Kräfte, ionische Interaktionen oder auch durch kovalente Verbindungen wie Disulfidbrücken ausgebildet. Die bei manchen Proteinen für die Funktion erforderliche Zusammenlagerung aus mehreren Untereinheiten wird abschließend als Quartärstruktur bezeichnet. Ausschlaggebend für die ausgebildete dreidimensionale Struktur eines Proteins sind somit die Aminosäuresequenz und die damit einhergehenden Seitenketten, welche durch ihre jeweiligen, physikochemischen Eigenschaften unterschiedlichste Interaktionen eingehen. (31) Die Proteinsynthese erfolgt an den Ribosomen, die gegebenenfalls auftretende, posttranslationale Glykosylierung hingegen erfolgt am endoplasmatischen Retikulum.(31)

Tabelle 4: Seitenketten der kanonischen Aminosäuren.

Angegeben sind die Seitenketten der kanonischen Aminosäuren. Entweder ist eine Halbstruktur oder die vollständige Struktur dargestellt. R steht jeweils für den Rest der Aminosäure. Da es sich bei Prolin um eine sekundäre Aminosäure handelt, ist hier die vollständige Struktur dargestellt.

Name	Seitenkette
Alanin	R-CH ₃
Arginin	
Asparagin	R-CH ₂ CO-NH ₂
Asparaginsäure	R-CH ₂ COOH
Cystein	R-CH ₂ SH
Glutamin	R-CH ₂ CO-NH ₂
Glutaminsäure	R-CH ₂ COOH
Glycin	R-H
Histidin	
Isoleucin	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃

Name	Seitenkette
Leucin	R-CH ₂ CH(CH ₃) ₂
Lysin	R-(CH ₂) ₄ NH ₂
Methionin	R-(CH ₂) ₂ SCH ₃
Phenylalanin	
Prolin	
Serin	R-CH ₂ OH
Threonin	R-CHOHCH ₃
Tryptophan	
Tyrosin	
Valin	R-CH(CH ₃) ₂

Einzelne Proteine treten häufig als Allergene in Erscheinung, sodass für diese Allergen Kürzel eingeführt wurden. Dieses wird aus dem lateinischen Namen des Tieres (beispielsweise *Bos domesticus* als Bezeichnung für das Hausrind (wissenschaftlicher Name: *Bos primigenius taurus*)) und einer ansteigenden Nummer in der Reihenfolge ihrer Entdeckung gebildet. Da insbesondere Produkte aus Kuhmilch und Hühnerei im Rahmen der Weinbehandlung und –schönung eingesetzt werden, sind die entsprechenden Lebensmittelallergene in Tabelle 5 aufgelistet.

Warum die genannten Proteine beziehungsweise Lebensmittel häufiger als Auslöser von Allergien auftreten, ist noch Stand der Forschung.(29) Eine Persistenz gegenüber einem enzymatischen Verdau in Magen (Pepsin) oder Darm (Trypsin, Chymotrypsin) wird diskutiert und kann durch Matrixeffekte begünstigt werden.(27) Viele der bisher bekannten Allergene sind auch stabil gegenüber Hitze und sauren pH-Werten, wasserlöslich oder werden aus repetitiven Untereinheiten gebildet und durch Disulfidbrücken stabilisiert (beispielsweise Amandin

(Pru du 6) aus Mandeln).(28) Auch das Glykosylierungsmuster bestimmter Glykoproteine kann einen Einfluss auf die Allergenität oder das Auftreten von Kreuzreaktivitäten haben, wobei auch unglykosylierte Proteine wie Amandin als Allergene auftreten können. Gemeinsame Strukturmerkmale konnten bisher nicht über alle Allergene hinweg identifiziert werden, sodass allein anhand von Struktur- beziehungsweise Sequenzinformationen kaum Vorhersagen getroffen werden können.(28) Genetische Prädispositionen hinsichtlich der Barrierefunktionen von Epithelgeweben (Haut, Darm), Störungen bei den regulatorisch agierenden T-Helferzellen des Immunsystems oder eine allgemein übermäßige Antikörperproduktion durch das Immunsystem können ebenfalls individuelle Ursachen für die Ausbildung einer Lebensmittelallergie sein.(27,28)

Tabelle 5: Lebensmittelallergene aus Kuhmilch und Hühnerei.

Aufgelistet sind die Allergene mit ihrem jeweiligen Namen, Allergenkürzel und der Proteinfraktion des jeweiligen Lebensmittels, in dem die Proteine hauptsächlich vorkommen. Bos d 8 wird als Bezeichnung für alle Caseine gebraucht. (27,28) Bov. = Bovines.

Tier	Allergen	Allergenkürzel nach WHO/IUIS	Proteinfraktion
Bos domesticus (Rind)	α -Lactalbumin	Bos d 4	Molke
	β -Lactoglobulin	Bos d 5	
	Bov. Serum Albumin	Bos d 6	
	Immunoglobulin G	Bos d 7	
	α_{s1} -Casein	Bos d 9	Casein
	α_{s2} -Casein	Bos d 10	
	β -Casein	Bos d 11	
κ -Casein	Bos d 12		
Gallus gallus domesticus (Haushuhn)	Ovomucoid	Gal d 1	Eiweiß
	Ovalbumin	Gal d 2	
	Ovotransferrin	Gal d 3	
	Lysozym C	Gal d 4	
	Serum albumin	Gal d 5	Eigelb
	YGP42	Gal d 6	

Als Hauptallergen der Caseinfraktion wird das α_{s1} -Casein beschrieben, ein Protein welches auch in der Milch anderer milchproduzierender Säugetiere auftritt. Es wurde in mehreren Studien gezeigt, dass bereits wenige Milligramm Milchprotein allergische Reaktionen auslösen können, darüber hinaus kann es durch Hitzebehandlungen wie Pasteurisierung oder Sterilisation zur Steigerung der Allergenität kommen.(27) Sowohl Ovalbumin als auch Lysozym gehören zu den Hauptallergenen des Hühnereis, Kreuzreaktivitäten zu anderen Vogeleiern oder auch zu Proteinen aus den Federn (α -Livetin) sind bekannt. Zwar kann es durch thermische oder enzymatische Behandlung zu einer Reduktion der Allergenität kommen, es resultieren jedoch Einbußen hinsichtlich der Verwendbarkeit.(27,28)

Weine, die nach dem 1. Juli 2012 in den Verkehr gebracht wurden und im Rahmen der Herstellung mit Proteinen aus Milch oder Ei geschönt oder behandelt wurden, müssen entsprechend den Anforderungen der LMIV (Lebensmittelinformationsverordnung, VO (EU) Nr. 1169/2011) gekennzeichnet werden. Eine vormals geltende Ausnahmeregelung wurde durch die RL 2007/68/EG aufgehoben, sodass gemäß Art. 9 (1) lit. c in Verbindung mit Anhang II Nr. 4 lit. b VO (EU) Nr. 1169/2011 nur noch aus Fischprotein bestehende Schönungsmittel von dieser Regelung ausgenommen sind. Der Einsatz von Casein und Ovalbumin zur Klärung

ist gemäß Art. 3 (1) in Verbindung mit Anhang I Nr. 10 VO (EG) Nr. 606/2009 zulässig. Ebenso ist der Einsatz von Lysozym gemäß Art. 3 (1) in Verbindung mit Anhang I Nr. 18 VO (EG) Nr. 606/2009 bis zu einer Menge von 500 mg/L zulässig. Gemäß Art. 75 (3) lit. a VO (EU) Nr. 1308/2013 werden die von der OIV veröffentlichten Analysemethoden berücksichtigt, welche im Hinblick auf allergene Proteine im Rahmen der Resolutionen OIV/OENO 427/2010 und OIV-COMEX 502-2012 definiert wurden.(32,33) Es wurde eine Nachweisgrenze von 0,25 ppm und eine Bestimmungsgrenze von 0,5 ppm für die Bestimmung von potentiell allergenen Rückständen aus Schönungsmitteln in Wein festgelegt, sodass ein entsprechender Gehalt in Wein als Grenzwert für die Deklaration angesehen werden kann (Anmerkung: Aufgrund der Verwendung dieser üblicherweise durch die SI-Einheit µg/L zu ersetzenden Einheit im Kontext der entsprechenden rechtlichen Regelungen wird auch innerhalb der vorliegenden Arbeit auf die Einheit ppm zurückgegriffen). Es handelt sich zwar sowohl bei den Caseinen, als auch bei (denaturiertem) Ovalbumin um schwerlösliche Proteine, was auch ihren Einsatz im Rahmen der Weinklärung vorteilhaft macht, geringe Anteile gehen jedoch in Lösung und können dort verbleiben.(34) Insbesondere ohne den Einsatz von weiteren önologischen Verfahren, wie dem Zusatz von Bentonit zur Ausfällung von Proteinen oder Sterilfiltrationen zur Entfernung kleinster Partikel, verbleiben Anteile in Lösung und könnten für sensitive Verbraucher ein Problem darstellen.(23,24) Rückstände von Lysozym konnten auch nach dem Einsatz von Bentonit noch im Wein nachgewiesen werden, was insbesondere bei Überdosierungen zu Risiken für Allergiker führen kann.(21,23)

3.2.2 Immunsystem

Proteine sind auch von besonderer Bedeutung beim Schutz des Menschen vor körperfremden Stoffen im Rahmen der Immunantwort. Diese wird unterschieden in eine angeborene und eine adaptive Immunantwort, wobei insbesondere letztere durch ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Faktoren ihre Wirkung entfaltet.(35) Bei der angeborenen Immunantwort (siehe Abbildung 6 links unten und Mitte) handelt es sich um eine verhältnismäßig unspezifische Abwehr, an welcher neben den natürlichen Barrieren wie der Haut, verschiedene Zellen wie neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen und Makrophagen beteiligt sind. Auch das bereits beschriebene Lysozym (siehe 3.1.2.1 Lysozym) kommt in verschiedenen Sekreten vor und ist durch die bakteriolytische Wirkung gegenüber gram-positiven Bakterien an der angeborenen Immunantwort beteiligt.(35)

Die adaptive Immunantwort, welche wiederum in die zelluläre und die humorale Immunantwort unterschieden wird, wird durch ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Zelltypen gebildet (siehe Abbildung 6). Die sogenannte zelluläre Immunantwort (siehe Abbildung 6 oben) ist im Wesentlichen für die Tötung von Zellen verantwortlich, welche durch Bakterien oder Viren infiziert wurden. Zur Unterscheidung von gesunden und erkrankten Zellen, werden durch die Zelle permanent Proteine aus dem Inneren enzymatisch verdaut und mittels sogenannter MHC-I-Proteine (engl.: *major histocompatibility complex*-Proteine) auf der Außenseite der Zellmembran präsentiert. Handelt es sich um körperfremde Proteine kommt es zu einer Anlagerung von T-Lymphozyten durch membranständige Proteine (CD8, engl.: *cluster of differentiation*), welche dann durch die Initiierung von Signalkaskaden im Inneren der Zelle die Apoptose derselben auslösen.(31,35) Die apoptotischen Zellfragmente werden im Anschluss von Makrophagen aufgenommen und verdaut.(35)

Bei der humoralen Immunantwort stehen die B-Lymphozyten im Mittelpunkt, welche in der Lage sind freie Fremdproteine zu erkennen und Gegenmaßnahmen einzuleiten (siehe Abbildung 6 unten). Diese Zellen weisen innerhalb der Zellmembran sogenannte B-Zell-Rezeptoren (BZR) auf, welche unter anderem aus einem zentralen, in der Membran verankerten, Antikörper gebildet werden.(35) Für die Aktivierung eines B-

Lymphozyten ist es erforderlich, dass das entsprechende Antigen mehrmals an die BZR bindet, welche innerhalb einer Zelle immer aus dem gleichen zentralen Antikörper gebildet werden.(31) Durch Anhäufung kommt es nach einer Endozytose zum intrazellulären enzymatischen Verdau, in dessen Anschluss Proteinfragmente mittels der MHCII-Proteine auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Diese Membranproteine werden nur von den T-Helferzellen erkannt, welche im Gegensatz zu den oben genannten T-Lymphozyten das Membranprotein CD4 exprimieren und durch die Bindung zur Ausschüttung einer Reihe von Interleukinen angeregt werden. Diese Cytokine stimulieren wiederum die B-Lymphozyten, sodass es im lymphatischen Gewebe zu einer Proliferation kommt und in erster Instanz die vormals membrangebundenen Antikörper sezerniert werden.(35) Die Aktivierung der T-Helferzellen kann auch durch Zellen der angeborenen Immunantwort induziert werden, da es auch in diesen Zellen nach der Aufnahme von Fremdmaterial zu einer enzymatischen Hydrolyse und anschließenden Präsentation durch MHCII-Proteine kommt.(35)

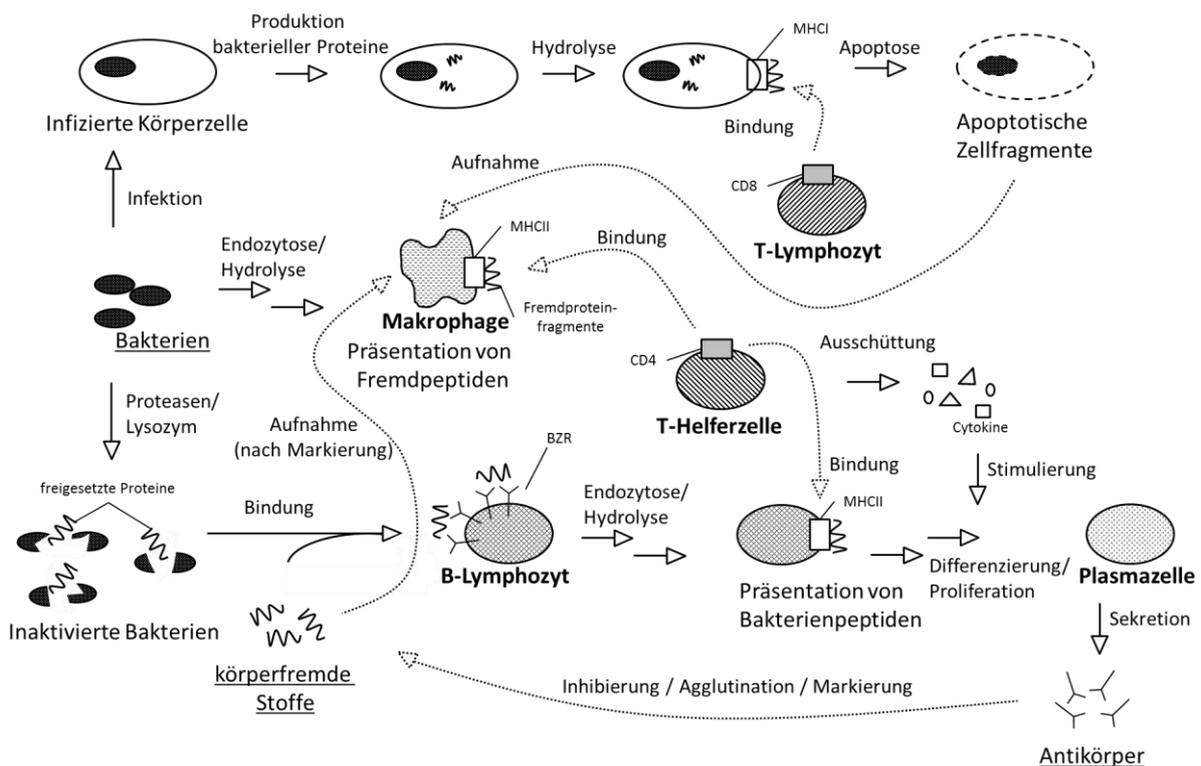


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Sensibilisierung und Immunantwort.

Dargestellt sind Teile der angeborenen Immunantwort (Zerstörung von Bakterien durch Proteasen und Lysozym (unten links) sowie Endozytose und Hydrolyse durch Makrophagen (Mitte)), sowie die adaptive Immunantwort. Diese wird unterteilt in die zelluläre Antwort, welche durch T-Lymphozyten vermittelt wird (oben), und die humorale Immunantwort, welche durch B-Lymphozyten vermittelt wird (unten). Die Rolle der T-Helferzellen als Verbindung zwischen den unterschiedlichen Immunantworten wird durch die zentrale Position angedeutet. Zugunsten der Übersichtlichkeit wurde überwiegend auf Zwischenschritte (beispielsweise Bildung von Zentrozyten, anschließende Antikörperproduktion und -selektion) und die dabei ausgeschütteten interzellulären Botenstoffe verzichtet. Zell-Zell-Interaktionen und Folgeaktionen der durch T- und B-Lymphozyten vermittelten Reaktionen, sind durch gestrichelte Pfeile angedeutet. BZR = B-Zell-Rezeptor, MHC = *major histocompatibility complex*, CD4 und CD8 = *cluster of differentiation* 4 und 8.

Die aktivierten B-Lymphozyten durchlaufen im lymphatischen Gewebe eine Vielzahl an Zellteilungen, wodurch mehrere sogenannte Zentrozyten gebildet werden. Da diese Zellen durch Variationen der für den bindenden Bereich des Antikörpers (siehe 3.2.2.1 Antikörper) codierenden Gen-Abschnitte Antikörper mit unterschiedlicher Affinität produzieren, ist eine Selektion erforderlich.(31) Nur die Zentrozyten, welche einen Antikörper mit hoher Affinität bilden, können durch Bindung an das Antigen der direkten Apoptose

entkommen und im Folgenden zu einer antikörperproduzierenden Plasmazelle heranreifen. Da die Mutationen auch im konstanten Bereich des Antikörpers (siehe 3.2.2.1 Antikörper) auftreten, kommt es zur Bildung von unterschiedlichen Antikörperklassen.(35) Die nach der Differenzierung vorhandenen Plasmazellen produzieren zwar immer den gleichen Antikörper einer Klasse mit einer Affinität zu einem Epitop, es erreichen aber im Normalfall mehrere Plasmazellen das Reifestadium.

Ein Teil der im Verlauf der humoralen Immunantwort gebildeten Zentrozyten wird zu B-Gedächtniszellen und auch ein geringer Teil der im Rahmen der zellulären Immunantwort aktivierten T-Lymphozyten verbleibt im Körper, sodass es bei einem erneuten Kontakt mit dem entsprechenden Antigen zu einer deutlich schnelleren Reaktion kommt. Diese Ausbildung eines Gedächtnisses ist neben der spezifischen Herstellung von Antikörpern der wesentlichste Unterschied zum angeborenen Immunsystem.(31,35) Der gesamte Vorgang der Immunabwehr stellt ein sehr komplexes Zusammenspiel unterschiedlichster Zelltypen und interzellulärer Botenstoffe dar, deren Erforschung im Laufe der Zeit unter anderem mit mehreren Nobelpreisen für Medizin (1908, 1919, 1960, 1980, 1984, 1996, 2011) ausgezeichnet wurde. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde deswegen an dieser Stelle nicht auf alle Teilaspekte eingegangen.

Bei einer allergischen Reaktion kommt es zur Ausbildung von Antikörpern gegen normalerweise harmlose, körperfremde Substanzen. So kommt es durch die Passage von nicht vollständig degradierten Proteinen oder Peptiden, welche durch die Darmschleimhaut Eingang in das Blutsystem gefunden haben, zum Kontakt mit den Zellen des Immunsystems. Sowohl durch den direkten Kontakt mit B-Lymphozyten als auch nach Aufnahme durch antigenpräsentierende Zellen werden T-Helferzellen aktiviert.(35) Durch Ausschüttung von Interleukinen kommt es zur Proliferation von B-Lymphozyten, welche in der Folge IgE-Antikörper (siehe 3.2.2.1 Antikörper) sezernieren. Diese werden durch eine hochaffine Wechselwirkung mit bestimmten Membranproteinen (FcεRI) der sogenannten Mastzellen und basophilen Granulozyten aus dem Serum entfernt und an diese gebunden.(26,28) Bei einem erneuten Kontakt mit dem entsprechenden Allergen und einer daraus folgenden Quervernetzung von Antikörpern auf der Oberfläche der genannten Zellen kommt es zur sofortigen Ausschüttung von Histamin und verschiedenen Cytokinen. Die Cytokine induzieren eine Proliferation von *memory*-B-Lymphozyten, wodurch weitere IgE-Antikörper produziert werden. Die typischen Akutphase-Symptome einer allergischen Reaktion, wie Erweiterung der Blutgefäße, Verengung der Bronchien, Hautrötungen oder Juckreiz, werden durch das Histamin vermittelt und treten bereits nach wenigen Minuten auf. Darüber hinaus kommt es durch die Histamin-vermittelte Adhäsion von zirkulierenden Immunzellen aus dem Blut zu weiteren, sogenannten Spätphase-Symptomen, infolge derer es durch Cytokin-Ausschüttung von T-Helferzellen zur verstärkten Antikörperproduktion und Bildung von *memory*-B-Lymphozyten kommt.(26,28) Die durch IgE-Antikörper vermittelte Reaktion wird als Typ I-Allergie oder auch als echte Lebensmittelallergie bezeichnet und ist abzugrenzen von den Typen II-IV. Neben einem zeitlich stärker verzögerten Auftreten der Symptome sind andere Antikörper vom Typ IgG und IgM beteiligt. So kommt es bei Typ II-Allergien zur Bindung von membranständigen Proteinen, Aktivierung des Immunsystems und anschließender Zytolyse körpereigener Zellen. Bei Typ III-Allergien werden durch die Antikörper und Antigene Komplexe gebildet, die durch Phagozytose in Granulozyten gelangen, welche so aktiviert werden. Ein typisches Beispiel für Typ IV-Allergien sind Kontaktallergien, infolge derer es durch die Aktivierung von T-Lymphozyten und Häufung von Zellen des Immunsystems zur Ausbildung von lokalen Entzündungen kommt.(26)

3.2.2.1 Antikörper

Die von den Plasmazellen produzierten Antikörper haben, wie beschrieben, mehrere Aufgaben im Rahmen der Immunabwehr und sind in der Grundstruktur ähnlich einem Y aufgebaut (siehe Abbildung 7). Einige Antikörper bestehen aus mehreren Monomeren, welche wiederum immer aus zwei Proteinketten, einer leichten (ca. 25 kDa) und einer schweren (ca. 50 kDa) Kette zusammengesetzt sind. Die Bindung aneinander erfolgt insbesondere über intermolekulare Disulfidbrücken, aber auch durch nicht-kovalente Wechselwirkungen.(35) Darüber hinaus können alle Antikörper durch die Protease Papain in das sogenannte F_c -Fragment (von engl.: *crystallisable*) und zwei F_{ab} -Fragmente (von engl.: *antigen-binding*) geschnitten werden, welche dann alle ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa aufweisen (siehe Abbildung 7). Die leichten Ketten und N-Termini der schweren Ketten liegen dabei im Bereich der F_{ab} -Fragmente, während die C-Termini der schweren Ketten am anderen Ende der Quartärstruktur im F_c -Fragment aufzufinden sind. Durch eine hohe Variabilität von 7-12 Aminosäuren in drei Schleifen der N-terminalen Domänen der Proteinketten und eine flexible Struktur im Bereich der Papainschnittstelle wird eine hohe Spezifität der Antigen-Antikörper-Bindung erreicht.(31) Die durch den Antikörper gebundenen Bereiche des Antigens werden als Epitope bezeichnet, wobei zwischen Konformations- und Sequenzepitopen unterschieden wird. Letztere werden durch die Primärstruktur der Proteine und die gegebenenfalls vorhandenen Glykosylierungen definiert, während die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen für Konformationsepitope von Bedeutung sind.(35) Da die mit der Nahrung aufgenommenen Proteine durch die Verdauung meist stark degradiert beziehungsweise durch die Prozessierung der Lebensmittel verändert werden und somit ein Großteil der dreidimensionalen Konformationsepitope nicht mehr intakt sind, sind bei den Lebensmittelallergien häufig Sequenzepitope entscheidend.(28)

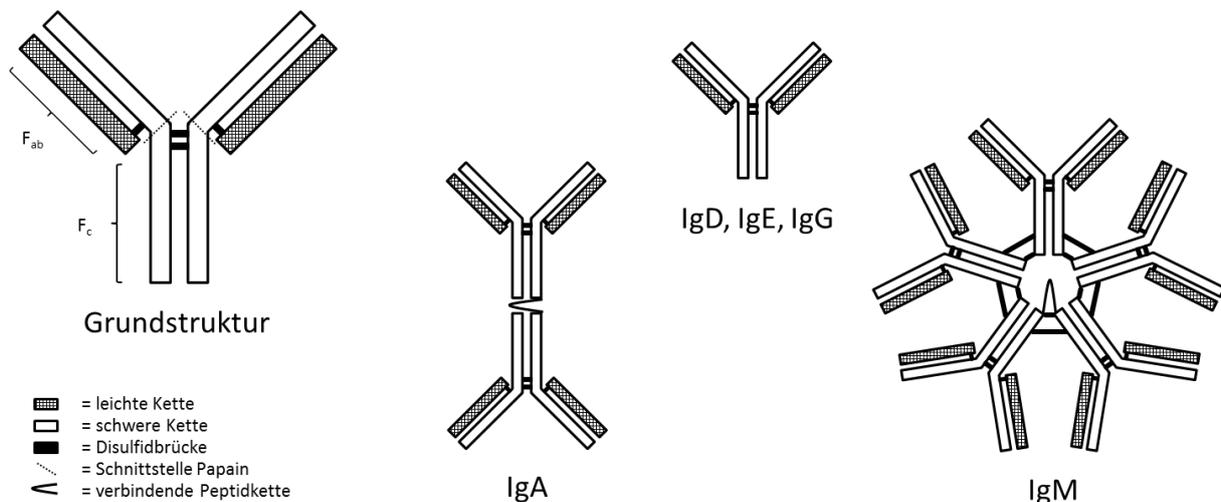


Abbildung 7: Grundstrukturen der humanen Antikörper.

Dargestellt sind die Grundstrukturen der Antikörper (links) mit der Anordnung der schweren und leichten Ketten sowie die intermolekularen Disulfidbrücken zwischen den einzelnen Makromolekülen. Außerdem sind die Schnittstellen der Protease Papain eingezeichnet und die daraus resultierenden Bezeichnungen (F_{ab} & F_c) der Fragmente. Die Immunglobuline D, E und G weisen eine monomere Struktur auf (Mitte rechts). Die aus mehreren Monomeren zusammengesetzten Immunglobuline A (Mitte links) und M (rechts) werden durch eine Peptidkette (engl.: *joining*-Peptid) und weitere Disulfidbrücken stabilisiert.(35) Ig = Immunglobulin.

Die Bindung zwischen Antigen und Antikörper ist hochspezifisch, da Zentrozyten, welche Antikörper mit nur einer geringen Affinität zum Antigen produzieren, im Rahmen der Immunantwort durch Apoptose entfernt werden. Die Bildung von Antikörpern mit einer Affinität zu körpereigenen Proteinen wird auch bereits während der Reifung der B-Lymphozyten unterdrückt.(31,35) Eine Bindung zwischen einem Antikörper und

anderen Proteinen kann jedoch trotzdem auftreten, wenn diese das entsprechende Epitop ganz oder teilweise (Paratop) ebenfalls aufweisen. Dies wird als Kreuzreaktivität bezeichnet und kann beispielsweise zwischen Proteinen aus häufig verwandten Pflanzen auftreten, ist aber nicht auf diesen Zusammenhang limitiert.(26)

Innerhalb der Immunantwort nehmen die Antikörper eine zentrale Rolle ein, sodass sich im Laufe der Evolution unterschiedliche Antikörper entwickelt haben. Die Art des Antikörpers wird im Wesentlichen durch die exprimierten Genabschnitte für die schweren Ketten und das im F_c -Bereich auftretende Glykosylierungsmuster definiert, welches auch für die Aktivierung des Immunsystems von entscheidender Bedeutung ist.(35) Während die monomeren IgD, IgE und IgG zwei Bindungsstellen für Antigene aufweisen, sind durch die Zusammenlagerung von mehreren Antikörpern entsprechend mehr Möglichkeiten bei IgA und IgM gegeben (siehe auch Abbildung 7). Letztgenannte sind so in der Lage durch die Bindung an Mikroorganismen im Blut (IgM) oder auf Schleimhäuten (IgA) zu verhindern, dass diese sich anlagern können. IgM sorgt durch die hohe Anzahl an Bindungsstellen auch für eine starke Agglutination und Markierung von Antigenen, sodass diese in der ersten Phase der Immunabwehr durch Phagozytose von anderen Zellen des Immunsystems (Makrophagen, dendritische Zellen) aufgenommen werden und weitere Schritte in der Immunabwehr aktiviert werden.(35) IgG ist das am häufigsten auftretende Immunoglobulin mit einer Konzentration von ungefähr 10 mg/mL Serum und schützt den Körper durch Markierung, Quervernetzung und die daraus folgende Inaktivierung vor Bakterien und deren Toxinen.(31,35) IgE kommt dagegen in ungebundener Form im Blut nur in sehr geringen Konzentrationen vor, da membranständige Proteine der Mastzellen eine hohe Affinität zum F_c -Teil des IgE aufweisen. Wie oben beschrieben, kommt es durch Bindung an Allergene und die folgende Quervernetzung zur Ausschüttung verschiedener Mediatoren und den typischen, allergischen Symptomen. Neben dieser fehlgeleiteten Reaktion sind die IgE an der Abwehr von Parasiten beteiligt.(26,31,35) Die Funktion von IgD ist noch nicht geklärt, es wird jedoch zusammen mit IgM in entsprechenden B-Lymphozyten gebildet und agiert möglicherweise durch andere Signalwege als Regulativ. Auch eine Funktion ähnlich der von IgA oder eine Beteiligung an der Initiation von Entzündungen wird diskutiert.(36)

Durch die hohe Spezifität und Affinität sind Antikörper auch außerhalb ihrer Funktion im Immunsystem von Interesse, weswegen diese isoliert und je nach Herstellung in polyklonale und monoklonale Antikörper unterschieden werden.(31,37) Erstere werden unter direkter Nutzung des Immunsystems von Wirtstieren (beispielsweise Kaninchen, Mäuse, Ziegen) durch Immunisierung mit dem entsprechenden Antigen gewonnen (siehe Abbildung 8 links). Dafür wird die möglichst hoch aufgereinigte Substanz mehrmals direkt in das Tier injiziert, sodass die Epithelbarrieren und Verdauungsenzyme nicht überwunden werden müssen. (30) Eine weitere Möglichkeit ist die Transfizierung von einigen Körperzellen durch Vektoren, welche die Gensequenz für das gewünschte Antigen übertragen, sodass es in der Folge zur *in vivo*-Expression kommt. Im Gegensatz zur gegebenenfalls erforderlichen rekombinanten Expression in Bakterien ist bei dieser Vorgehensweise die Isolierung des Proteins nicht erforderlich und das posttranslationale Glykosylierungsmuster entspricht dem eines Säugetiers.(30) Wie oben beschrieben kommt es nach dem Kontakt mit dem adaptiven Immunsystem zur Differenzierung von B-Lymphozyten und zur Produktion von Antikörpern. Substanzen, die keine Immunantwort induzieren, werden als Haptene bezeichnet. Um dennoch Antikörper gegen diese oft zu kleinen Substanzen (<1500 Da) zu generieren, werden diese an größere Makromoleküle (beispielsweise Hämocyanin, Polyaminosäuren, Agarose) gebunden. Durch diese Vorgehensweise wird die Antikörperoligomerisierung deutlich vereinfacht, sodass die Substanzen an Immunogenität gewinnen und Antikörper generiert werden.(30,31) Aus dem Blut des Tieres können bei ausreichend immunogenen Substanzen bereits nach wenigen Wochen IgG-Antikörper isoliert werden. Durch Zentrifugation wird das (Anti-)Serum isoliert, welches

alle Antikörper enthält, die das Wirtstier bisher produziert hat. Durch verschiedene Aufreinigungsmethoden wie beispielsweise Affinitätschromatografie (immobilisierte Antigene auf Festphase, Antikörper werden retardiert) können die entsprechenden Antikörper isoliert und gegebenenfalls durch Methoden wie isoelektrische Fokussierung oder Größenausschlusschromatografie weiter aufgereinigt werden.(30,38) Die auf diese Art und Weise isolierten Antikörper werden als polyklonal bezeichnet, da es sich um eine Mischung einer Vielzahl von Immunglobulinen handelt, welche Affinitäten gegenüber unterschiedlichen Epitopen eines Antigens aufweisen.(31)

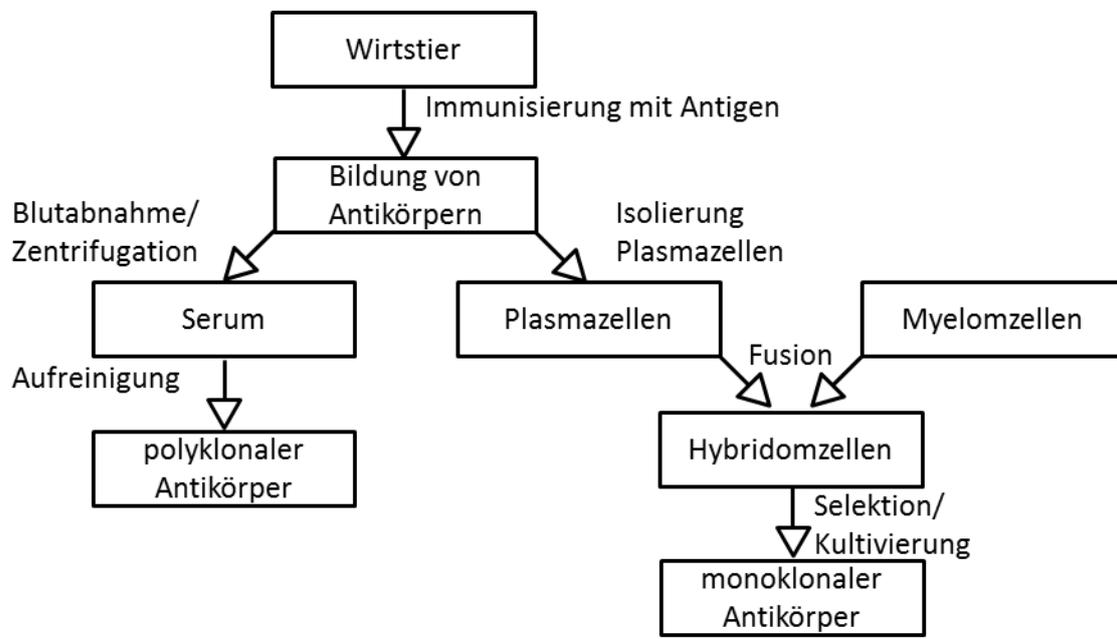


Abbildung 8: Schema Antikörperherstellung.

Dargestellt sind die wichtigsten Schritte bei der Herstellung von polyklonalen (links) und monoklonalen (rechts) Antikörpern.

Monoklonale Antikörper hingegen sind gegen genau ein Epitop gerichtet und werden in Zellkulturen gewonnen.(38) Nach der Immunisierung eines Wirtstieres werden die antikörperproduzierenden Plasmazellen isoliert und mit sogenannten Myelomzellen in Polyethylenglykol oder im elektrischen Feld fusioniert (siehe Abbildung 8 rechts).(35) Es handelt sich bei den Myelomzellen um Zelllinien, die aus einem Tumor gewonnen wurden und somit im Gegensatz zu den Plasmazellen nahezu unendlich in Kultur gehalten werden können.(31) Diese Eigenschaft geht zusammen mit der Fähigkeit der Plasmazelle genau einen bestimmten Antikörper zu produzieren, auf die gebildete Hybridomzelle über. Durch Vereinzelung und Untersuchung der jeweils gebildeten Antikörper werden die Zellen identifiziert, welche Antikörper mit den gewünschten Eigenschaften produzieren.(35) Die Zellen können zur Produktion weiter kultiviert oder kryokonserviert und zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgetaut werden. Durch diese Vorgehensweise können die Antikörper immer wieder in größerer Menge hergestellt werden.(31) Außerdem wird es durch die nur ein Epitop bindenden Antikörper mit sehr viel höherer Genauigkeit möglich, beispielsweise Veränderungen im Antigen zu detektieren oder auch das Immunglobulin für therapeutische Zwecke einzusetzen.(35)

3.2.2.2 Antikörperbasierte Analytik

Durch die strenge Selektion der Zentrozyten, welche nach der Aktivierung aus den B-Lymphozyten gebildet werden, und die hohe Anpassbarkeit der Antikörper, durch die variablen Aminosäuren im N-terminalen Bereich, weist die Antigen-Antikörper-Bindung eine sehr hohe Spezifität und Affinität auf. Sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper werden deswegen auch für verschiedene analytische Zwecke eingesetzt.

Als bedeutendste Methode ist das sogenannte ELISA-Verfahren (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*) zu nennen, welches in unterschiedlichen Konfigurationen (siehe unten) eingesetzt wird. Es wurde von den Arbeitsgruppen Perlmann/Engvall und Schuurs/van Weemen parallel anhand der vormals etablierten Radioimmunoassays entwickelt, in denen radioaktiv markierte Antigene oder Antikörper eingesetzt wurden.(39) Durch die kovalente Kopplung von Enzymen wie alkalische Phosphatase oder Meerrettichperoxidase konnte eine Substitution der mitunter gesundheitsschädlichen Isotope erfolgen, was zu einer stetig wachsenden Zahl an Publikationen zu dem Thema führte.(39) Im Folgenden sollen die am häufigsten eingesetzten Versionen kurz beschrieben werden (Waschschritte zur Entfernung ungebundener Reagenzien erfolgen nach jedem Schritt):

direkter ELISA:

- Immobilisierung Antigen,
- Zugabe Enzym-konjugierter Antikörper (Affinität zu immobilisiertem Antigen),
- Zugabe Farbsubstrat und Umsetzung durch Enzym

indirekter ELISA:

- Immobilisierung Antigen,
- Zugabe primärer Antikörper (Affinität zu immobilisiertem Antigen),
- Zugabe Enzym-konjugierter sekundärer Antikörper (Affinität zu primärem Antikörper),
- Zugabe Farbsubstrat und Umsetzung durch Enzym

(direkter) Sandwich-ELISA:

- Immobilisierung *capture*-Antikörper (Affinität zu Epitop 1 des Antigens),
- Zugabe Antigen,
- Zugabe Enzym-konjugierter *detection*-Antikörper (Affinität zu Epitop 2 des Antigens),
- Zugabe Farbsubstrat und Umsetzung durch Enzym

indirekter Sandwich-ELISA:

- Immobilisierung *capture*-Antikörper (Affinität zu Epitop 1 des Antigens),
- Zugabe Antigen,
- Zugabe primärer *detection*-Antikörper (Affinität zu Epitop 2 des Antigens),
- Zugabe Enzym-gekoppelter sekundärer *detection*-Antikörper (Affinität zu primären *detection*-Antikörper),
- Zugabe Farbsubstrat und Umsetzung durch Enzym Farbsubstrat und Umsetzung durch Enzym

Es ist zu erkennen, dass die Anzahl der erforderlichen Antikörper unterschiedlich ist und die Auswahl der Methodik den analytischen Anforderungen angepasst werden kann. In verhältnismäßig matrixarmen Proben ist der direkte ELISA zur Analytik von leicht immobilisierbaren Antigenen hervorragend geeignet. Bei indirekten ELISAs werden sekundäre Antikörper eingesetzt, welche eine Affinität zum F_c-Teil der primären Antikörper, welcher je nach Spezies unterschiedlich ist, aufweisen. Werden in einem Labor unterschiedliche ELISAs mit primären Antikörpern aus einer Spezies durchgeführt, so bieten die indirekten Durchführungen die Möglichkeit, ein und denselben sekundären Antikörper mit einer Affinität gegenüber Proteinen dieser Spezies einzusetzen. Die bei den direkten Durchführungen erforderliche Herstellung (oder der Erwerb) von Enzym-konjugierten primären Antikörpern kann so entfallen. Der indirekte ELISA wird in einer modifizierten Form auch zur Quantifizierung von Antikörpern gegen ein bestimmtes Antigen genutzt. Dafür wird das Antigen immobilisiert, die zu analysierende Probe (beispielsweise ein Serum) hinzugegeben und nach einem Waschschrift durch einen sekundären Antikörper, mit einer Affinität gegen Proteine aus dem entsprechenden Organismus, aus dem die Probe stammt, detektiert.(31) Die weit verbreiteten Sandwich-ELISAs bieten durch die Immobilisierung über den F_c-Teil eines entsprechenden *capture*-Antikörpers, die Möglichkeit, auch aus komplexen Proben nur das gewünschte Antigen zu isolieren und so eine selektive Immobilisierung durchzuführen. Diese Methode erfordert jedoch eine gewisse Größe des Antigens damit zwei Antikörper an unterschiedliche Epitope binden können.(31) Die durch das Enzym umgesetzte Menge an Farbsubstrat ist proportional zur Antigenkonzentration, bei einer Führung als kompetitiver Assay (Zugabe von bekannter Menge an Antigen oder antigenähnlicher Komponente, Konkurrenz um verfügbare Bindungsstellen) hingegen antiproportional.(4)

Gemäß den Resolutionen OIV/OENO 427/2010 und OIV-COMEX 502-2012 wird das ELISA –Verfahren auch für die Quantifizierung von potentiell allergenen Rückständen eiweißhaltiger Schönungsmittel in Wein empfohlen. Die OIV definiert als Mindestleistung für die verwendeten Methoden eine Nachweisgrenze von 0.25 ppm und eine Bestimmungsgrenze von 0.5 ppm. Neben der hohen Empfindlichkeit der Methode und einer Vielzahl an kommerziell erhältlichen Kits, bietet dieses antikörperbasierte Verfahren die Möglichkeit, Aussagen hinsichtlich der Immunogenität der Rückstände zu treffen. Mittels Verfahren wie der Massenspektrometrie kann nur eine grobe Abschätzung im Hinblick auf Sequenzepitope erfolgen, DNA-basierte Methoden wie die PCR (engl.: *polymerase chain reaction*) sind hinsichtlich der Anwesenheit von Proteinen nicht geeignet und können nur indirekt als Nachweis genutzt werden.(27,28) Wie oben (3.2 Lebensmittelallergien) beschrieben, müssen die Allergene aus Anhang II VO (EU) Nr. 1169/2011 bei Anwesenheit in Lebensmitteln deklariert werden. Durch die EU wurden für Allergene, im Gegensatz zu beispielsweise Kontaminanten, jedoch keine Grenzwerte festgelegt. Die Festlegung von Schwellenwerten für eine gesamte Bevölkerung erweist sich als schwierig, da beispielsweise durch die individuelle Sensitivität der Verbraucher, Unterschiede zwischen subjektiven und objektiven Reaktionen sowie hinsichtlich Prozessierung und Matrix des Lebensmittels erhebliche Schwankungen zu erkennen sind.(27) In den USA und Australien werden für die Festlegung NOAEL- (engl.: *no observable adverse effect level*) oder LOAEL-Werte (engl.: *lowest observable adverse effect level*) herangezogen, welche jedoch durch sehr sensitive Verbraucher in ihrer Aussagekraft eingeschränkt werden. Eine Möglichkeit ist die Nutzung von sogenannten *Benchmark*-Modellen, bei denen diverse Studien zusammengefasst werden und durch die Festlegung auf ein bestimmtes Konfidenzintervall, extreme Werte aus der Berechnung eliminiert werden.(27) Ähnlich wie bei krebserregenden Stoffen, wo auf die Festlegung von Grenzwerten verzichtet wird, da bereits ein einzelnes Molekül Krebs auslösen kann, gestaltet sich die Festlegung von allgemein gültigen Grenzwerten durch die hohe Empfindlichkeit einzelner Personen somit als schwierig. Da gemäß Art. 80 (3) lit. a VO (EU) Nr. 1308/2013 die veröffentlichten Analysemethoden der OIV

berücksichtigt werden sollen, können Methoden, welche den oben genannten Kriterien entsprechen, für die Allergenuntersuchung herangezogen werden, um so über eine gegebenenfalls erforderliche Kennzeichnung zu entscheiden.

Antikörper werden darüber hinaus in weiteren analytischen Methoden eingesetzt. So kann beispielsweise in der Immunohistochemie durch die Verwendung von markierten Antikörpern eine selektive Anfärbung einzelner Gewebe oder Gewebestrukturen erreicht werden. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Detektion von Proteinen nach der Trennung durch die SDS-PAGE (engl.: *sodium dodecylsulfat polyacrylamid gel electrophoresis*, siehe 6.2.1.2 SDS-PAGE und dem elektrophoretischen Transfer auf Nitrocellulosemembranen. Dieses Verfahren wird als Western Blot bezeichnet und ermöglicht neben der Trennung anhand des Molekulargewichtes durch die Affinität zu spezifischen Antikörpern eine weitere Unterscheidungsebene für die Identifizierung von Proteinen. Adaptionen wurden auch für die Dünnschichtchromatografie entwickelt, die Detektion erfolgt bei beiden Verfahren meistens indirekt, ähnlich wie im ELISA (siehe oben).(40) Auch außerhalb von Laboratorien, bei sogenannten *in field*-Anwendungen, finden Antikörper Anwendung. Ein weit verbreitetes Beispiel sind die LFDs, wie sie bei Schwangerschaftstest häufig eingesetzt werden (siehe 5.2.3.2 Lateral Flow Dipsticks).

Die Vielzahl an Anwendungsmöglichkeiten zeigt, welche Bedeutung Antikörper aufgrund der hohen Antigenspezifität und Affinität (Dissoziationskonstanten im nano- bis picomolaren Bereich, siehe auch 3.4.2 Kinetik) in analytischen Verfahren aufweisen.(31,37) Ein wesentlicher Nachteil ist jedoch die Herstellung, welche ohne den Einsatz von Tieren beziehungsweise Tier-abhängigen Methoden wie der Zellkultur (Einsatz von tierischen Präparaten wie fötalem Kälberserum im Rahmen der Kultivierung) nicht möglich ist. Gemäß Artikel 4 (1) RL 2010/63/EU soll, wo immer dies möglich ist, anstelle eines Verfahrens bei dem Tiere eingesetzt werden, eine wissenschaftlich zufriedenstellende Methode angewendet werden, bei der keine lebenden Tiere verwendet werden. Da es sich um eine EU-Richtlinie handelt, musste diese in Deutschland im Rahmen des deutschen Tierschutzgesetzes und unter anderem in der Tierschutz-Versuchstierverordnung und der Versuchstiermeldeverordnung umgesetzt werden. Zwar handelt es sich bei der Herstellung von Antikörpern nicht um einen „klassischen“ Tierversuch bei dem eine Substanz hinsichtlich ihrer Verträglichkeit an einem Tier getestet wird, gemäß Art. 1 (2) Satz 1 RL 2010/63/EU gelten die Anforderungen der Richtlinie aber auch für Tiere, die in Verfahren verwendet werden oder verwendet werden sollen oder die speziell gezüchtet werden, damit ihre Organe oder Gewebe zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet werden können. Da im Rahmen der Antikörperherstellung entweder Blut oder lymphatische Gewebe wie die Milz eingesetzt werden, fällt auch die Antikörperherstellung unter dieses Gesetz. Darüber hinaus wird die Herstellung von monoklonalen Antikörpern explizit in der Versuchstiermeldeverordnung aufgeführt.

Eine Alternative zum Einsatz von Antikörpern können *in vitro* hergestellte Rezeptoren, wie beispielsweise die sogenannten Aptamere, darstellen.

3.3 Aptamere

Aptamer leitet sich von dem lateinischen Wort *aptus* für passend und dem griechischen Wort *meros* für Teil oder Gebiet ab, kann also mit „passendes Teil“ übersetzt werden. Diese Bezeichnung wird sowohl für einzelsträngige Oligonukleotide als auch für Peptide genutzt, welche in der Lage sind unterschiedlichste Moleküle oder Molekülklassen zu binden. Die für diese Eigenschaft erforderliche Affinität und Spezifität wird durch eine spezifische dreidimensionale Struktur ermöglicht.

Nukleinsäure-Aptamere (im folgenden Aptamere) sind sowohl aus DNA (engl.: *deoxyribonucleic acid*) als auch aus RNA (engl.: *ribonucleic acid*) bekannt, werden aus bis zu 100 Basen gebildet und sind somit den Oligonukleotiden zuzuordnen. Beide Polymere sind aufgebaut aus den sogenannten Nukleotiden, mit einer Ribose (RNA) bzw. 2'-Desoxyribose (DNA) als zentralem Baustein. Der jeweilige Zucker ist an der 1'-Position mit einer Stickstoffbase und über die 5'-Hydroxygruppe mit einer Phosphatgruppe verestert (Abbildung 9). Neben den unterschiedlichen Zuckern sind die Stickstoffbasen (Abbildung 10) kennzeichnend für die jeweilige Nukleinsäure (DNA: Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin; RNA: Adenin, Uracil, Guanin, Cytosin). Das lineare Polymer aus den einzelnen Nukleotiden wird durch die Verknüpfung der 3'-Hydroxygruppe eines Nukleotids mit der Phosphatgruppe eines weiteren Nukleotids gebildet. Konventionsgemäß wird das Ende des

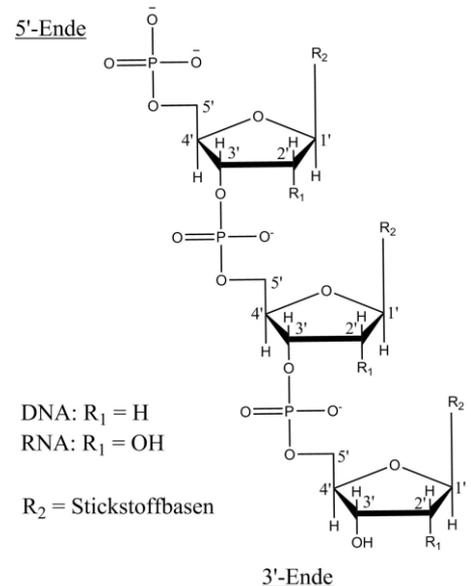


Abbildung 9: Phosphatrückgrat DNA & RNA. Dargestellt ist das Phosphatrückgrat von DNA und RNA. Die Verknüpfung erfolgt zwischen der 3'-Hydroxygruppe eines Zuckers über eine Phosphatbrücke mit der 5'-Hydroxygruppe des nächsten Zuckers.

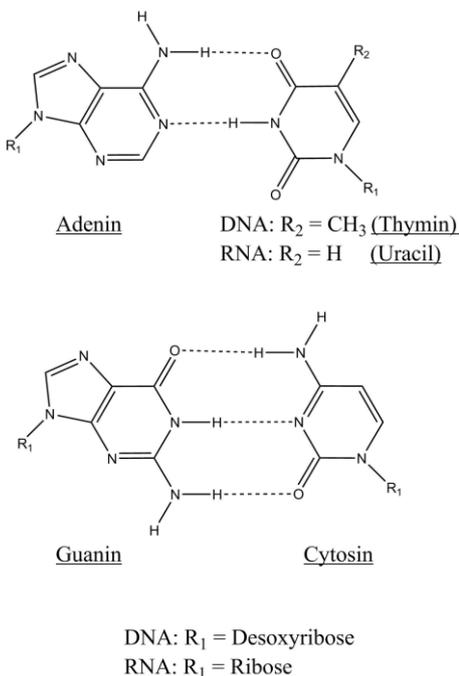


Abbildung 10: Lewis-Strukturen der Stickstoffbasen.

Dargestellt sind die Lewis-Strukturen der Stickstoffbasen in DNA und RNA sowie die zwischen komplementären Basenpaaren gebildeten Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelte Linien).

Nukleinsäurestranges mit der freien Phosphatgruppe als 5'-Ende und das mit der freien 3'-Hydroxygruppe als 3'-Ende bezeichnet. Während RNA

auch innerhalb von Organismen als Einzelstrang vorliegt, kommt DNA als Doppelhelix vor. Diese Doppelstruktur wird dabei aus zwei komplementären Strängen gebildet, wobei einer der Stränge ($5' \rightarrow 3'$) als codierender Strang bezeichnet wird und der andere entgegengesetzt orientiert ($3' \rightarrow 5'$) an diesen gebunden vorliegt. Die Bindung der beiden Stränge aneinander erfolgt durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin, welche deswegen als komplementäre Basenpaarungen bezeichnet werden. Die Paarung der Basen und die Ausbildung einer helicalen Tertiärstruktur durch Windung der Doppelhelix um sich selbst (Abbildung 11, links) wurde von Watson und Crick entdeckt und 1962 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.(41,42) Diese Doppelstruktur wird im Wesentlichen stabilisiert durch π - π -Wechselwirkungen zwischen aromatischen Ringen der Stickstoffbasen.(43) Durch das Phosphatrückgrat und die gegenüber nucleophilen Angriffen stabilere 2'-Desoxyribose wird die genetische Information, welche in den Basen codiert ist, geschützt.

Energetisch begünstigt durch die freie Enthalpie bei der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären Basen kommt es bei einzelsträngigen Nukleinsäuren zur Ausbildung von intramolekularen Basenpaarungen. Während zwischen Guanin und Cytosin drei Bindungen ausgebildet werden, liegen zwischen Adenin und Thymin, beziehungsweise in der RNA Uracil, nur zwei Bindungen vor (Abbildung 10). Die im Rahmen von intramolekularen Basenpaarungen gebildeten Sekundär- und Tertiärstrukturen können auf verschiedene Grundstrukturen (Abbildung 11, Mitte) zurückgeführt werden. Haarnadelstrukturen (engl.: *hairpin-structures* oder *stem-loop-structures*), bei denen ein Teil des Nukleinsäurestranges mit einem weiter vorne in der Sequenz liegenden Abschnitt in Wechselwirkung tritt, sind häufig zu beobachten. Der Bereich zwischen den beiden komplementären Abschnitten liegt ungepaart vor und bildet, in Analogie zur Haarnadel, die Öse (engl. *loop*).⁽³¹⁾ Ungepaarte Bereiche am Ende des Makromoleküls werden entsprechend als offene *loops* bezeichnet, kleine ungepaarte Bereiche zwischen zwei komplementären Abschnitten können als Blasen (engl.: *bubbles*) bezeichnet werden.

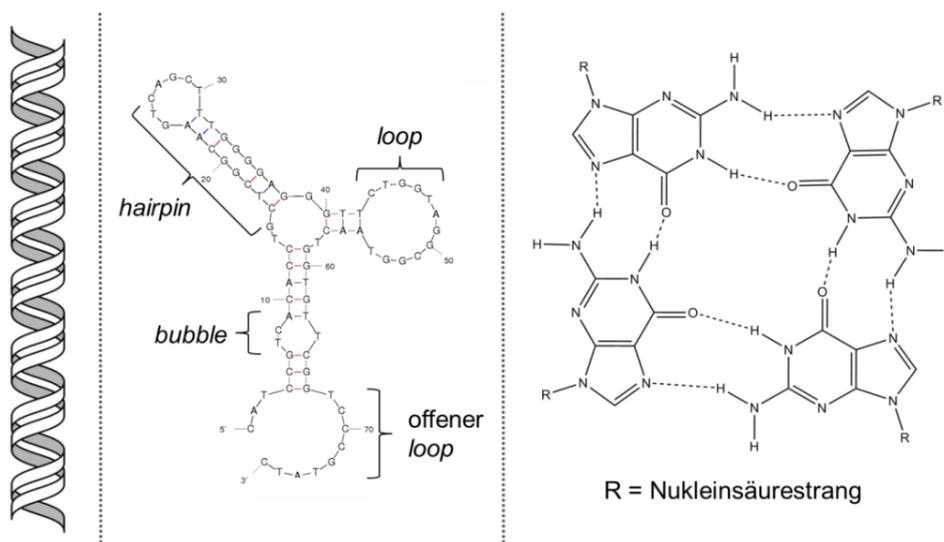


Abbildung 11: Sekundär- und Tertiärstrukturen von Nukleinsäuren.

Links: DNA-Doppelhelix aus zwei komplementären Strängen. Mitte: Mögliche Sekundärstrukturen in einzelsträngigen Nukleinsäuren (hier: DNA). Rechts: G-Quadruplexstruktur, stabilisiert durch Hoogsteen-Basenpaarungen (Abbildung modifiziert nach Han (148)).

Neben den oben beschriebenen Watson-Crick-Basenpaarungen (Adenin/Thymin und Guanin/Cytosin) sind auch sogenannte Hoogsteen-Basenpaarungen zwischen den Basen möglich (Abbildung 11, rechts). Die Ausbildung von zwei Wasserstoffbrückenbindungen erfolgt dabei abweichend von der Watson-Crick-Basenpaarung unter Einbeziehung des Stickstoffs an Position 7.^(44,45) Diese Wechselwirkungen ermöglichen in Anwesenheit von mehreren Guaninbasen die Ausbildung von sogenannten G-Quadruplexen, eine Struktur welche durch eine hohe Stabilität gekennzeichnet ist und auch in den Endbereichen von Chromosomen, den sogenannten Telomeren, entdeckt wurde. Diese, bereits in unterschiedlichen Aptameren nachgewiesenen Strukturen, können gebildet werden, wenn mehrere Guanine in einzelsträngigen Nukleinsäureabschnitten auftreten.⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾

Durch die Ausbildung von dreidimensionalen Strukturen können unterschiedlichste Eigenschaften der Nukleinsäuren induziert werden. Ein Beispiel dafür ist die tRNA (*transfer-RNA*), welche bei der Translation, dem Vorgang der Proteinsynthese innerhalb der Ribosomen, von entscheidender Bedeutung ist. Diese Form der RNA bildet durch intramolekulare Watson-Crick- und Hoogsteen-Basenpaarungen eine dreidimensionale Struktur mittels der Aminosäuren entsprechend der durch die mRNA (*messenger-RNA*) vorgegebenen

Reihenfolge miteinander verknüpft werden können. Ein weiteres Beispiel sind die sogenannten *riboswitches*, eine Form der mRNA welche besonders häufig in Bakterien zu finden ist. Diese Nukleinsäuren bestehen aus einem Aptamer-Teil sowie einem regulierenden Teil und treten häufig bei der Regulation von Genexpressionen in Erscheinung. So trägt beispielsweise der Cobalamin-*riboswitch* dazu bei, dass in Anwesenheit von Cobalamin das Transportprotein BtuB nicht mehr exprimiert wird. Durch die Bindung an den Aptamer-Teil des *riboswitches* kommt es im anderen Teil der mRNA zu einer Strukturveränderung infolgeder keine Bindung an Ribosomen erfolgen und somit auch keine Translation mehr stattfinden kann.(49) Das für den Transport von Cobalamin erforderliche Protein BtuB wird somit nicht exprimiert und der entsprechende Stoffwechselweg für Vitamin B₁₂ wird allosterisch reguliert.

3.3.1 Entwicklung von Aptameren

Es sind mittlerweile mehrere, natürlicherweise vorkommende Aptamere bekannt. Die Entwicklung von Aptameren im Labor für verschiedenste Fragestellungen erfolgt über einen sogenannten SELEX-Prozess (engl.: *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*). Dieser 1990 von den Arbeitsgruppen Tuerck/Gold und Ellington/Szostak nahezu gleichzeitig beschriebene Prozess basiert auf den Darwin'schen Prinzipien von Variation, Selektion und Replikation.(50,51)

Den Ausgangspunkt einer SELEX stellt immer eine Aptamerbibliothek dar. Alle Nukleinsäuren in diesem Pool beinhalten einen randomisierten Bereich, welcher von zwei bekannten Primern eingeschlossen wird.(52) Die theoretische Diversität eines randomisierten Bereiches von 40 Basen beträgt 4^{40} also ungefähr 10^{24} , wird jedoch durch technische Limitierungen im Rahmen der Festphasensynthese auf eine praktisch erreichbare Diversität von ungefähr 10^{15} unterschiedlichen Aptameren begrenzt.(53) In der ersten Runde des kreisförmig geführten Prozesses (Abbildung 12) wird das Zielmolekül (engl.: *target*) mit dem Aptamerpool inkubiert. Da sowohl DNA als auch RNA durch die vorhandene Phosphatgruppe unter physiologischen Bedingungen negativ geladen vorliegen, liegt es nahe, dass die Eigenschaften dieser Moleküle durch das umgebende Puffersystem beeinflusst werden.(54) So ist beispielsweise bekannt, dass Magnesium die Struktur der DNA positiv beeinflusst oder dass einwertige Kationen mit dem Phosphatrückgrat interagieren.(55,56) Um eine Bindung zwischen Aptamer und Zielmolekül unter bestimmten Bedingungen zu erreichen, muss der entsprechende Puffer an dieser Stelle als Medium eingesetzt werden.(57,58) So sollten beispielsweise in einer vorangegangenen Arbeit an der Universität Hamburg Aptamere entwickelt werden, welche zur Isolierung von lebensmittelrelevanten *Alicyclobacillus* spp.-Sporen aus Fruchtsäften eingesetzt werden sollten.(59) Für diesen Zweck wurde ein Puffersystem entwickelt, welches hinsichtlich der Ionenkonzentration und des pH-Wertes einem Orangensaft entspricht. Durch die Verwendung dieses Puffers entsprachen die Bedingungen während der Inkubation von Aptamerpool und *Target* näherungsweise denen in einem Orangensaft. Aptamere, welche unter diesen Konditionen eine Affinität zum *Target* zeigten, gingen so bevorzugt eine Bindung ein. Neben der Ionenkonzentration können an dieser Stelle auch weitere Rahmenbedingungen von Bedeutung sein, wie beispielsweise die Temperatur oder die Anwesenheit von Detergenzien.

Im nächsten Schritt des SELEX-Prozesses erfolgt ein Waschschriff bei dem gar nicht oder schlecht bindende Aptamere abgetrennt werden, während Aptamere mit einer erhöhten Affinität weiterhin an das *Target* gebunden vorliegen. Die Implementierung dieses Waschschriffes kann durch eine Vielzahl an Methoden durchgeführt werden, wobei häufig auf eine Immobilisierung des *Targets* zurückgegriffen wird. In den ersten Arbeiten zur SELEX wurde das Zielmolekül beispielsweise auf Nitrocellulosemembranen oder auf quervernetzter Agarose in Säulen immobilisiert.(50,51) Häufig durchgeführt wird auch die Immobilisierung auf magnetischen Partikeln, wodurch Waschschriffe apparativ als *pull-down-Assay* schnell und einfach

durchgeführt werden können.(53,60) Die Nutzung von Fluoreszenzmarkierungen, beispielsweise in Form von entsprechend modifizierten magnetischen Partikeln oder direkt im eingesetzten Aptamerpool, kann prozessbegleitend eine Qualitätskontrolle ermöglichen.(61) Auch für Zielmoleküle, welche nicht immobilisiert oder durch einen entsprechenden Vorgang in starkem Maße verändert werden, wurden Methoden entwickelt. So werden bei der CE-SELEX (*capillary electrophoresis-SELEX*) beispielsweise *Target* und Aptamerpool miteinander in Lösung inkubiert und dann auf eine entsprechende Säule gegeben. Die Mobilität eines Aptamers im elektrischen Feld wird durch die Bindung an das entsprechende Zielmolekül beeinflusst, sodass durch Fraktionierung eine Separation des Aptamerpools erfolgen kann.(62,63) Auch durch spezifische Eigenschaften des *Targets* wie etwa eine hohe Dichte kann eine SELEX-Adaption erfolgen. Zur Selektion von Aptameren, welche vollständige Zellen oder Sporen binden, kann durch Zentrifugation eine Separation von Aptamer-*Target*-Komplexen erreicht werden.(64) Soll des Weiteren zum Beispiel zwischen lebenden und toten Zellen im Rahmen der SELEX unterschieden werden, kann durch die Implementierung der Durchflusszytometrie (engl.: *fluorescence-activated cell-sorting* (FACS)) unter Nutzung von fluoreszenzmarkierten Aptameren eine deutliche Verbesserung erzielt werden.(65) Auch für gegebenenfalls schwer zu selektierende *Targets* wie Metallionen, kann mittels FACS eine sogenannte SS-PD-SELEX (engl.: *structure-switching particle display-SELEX*) durchgeführt werden. Für diesen Zweck wird ein an magnetische Partikel immobilisierter Aptamerpool eingesetzt, welcher eine Teilsequenz mit einer Affinität zu einem Farbstoff aufweist. Durch Bindung an das Metallion kommt es zu einer Umlagerung, infolge derer auch der Farbstoff freigesetzt wird und somit eine Trennung anhand der Fluoreszenzaktivität möglich ist.(66)

Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment = SELEX

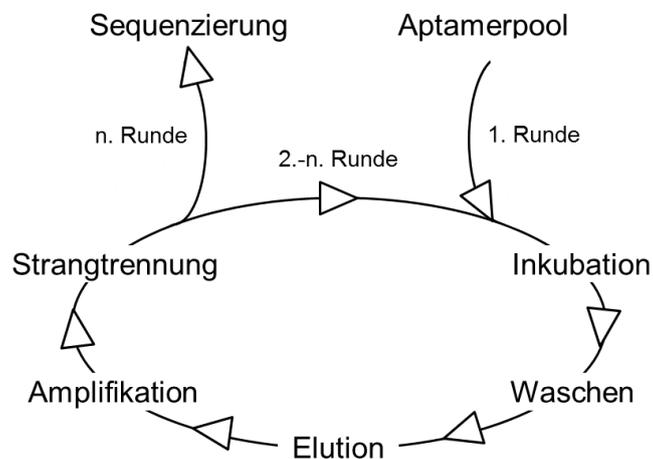


Abbildung 12: Schematische Darstellung des SELEX-Prozesses.

Dargestellt ist die Verknüpfung der wesentlichen Schritte einer SELEX zur Entwicklung von DNA-Aptameren. Ausgehend vom Aptamerpool in Runde 1 erfolgen die Inkubation mit dem Zielmolekül und ein oder mehrere Waschschrte zur Entfernung von Aptameren mit geringerer Affinität. Nach der gegebenenfalls erforderlichen Elution der übrigen Aptamere erfolgt eine Amplifikation mittels PCR und eine Strangtrennung, um aus den doppelsträngigen PCR-Produkten wieder einzelsträngige Nucleinsäure zu isolieren. Der resultierende Aptamerpool wird wieder in den Kreisprozess eingeführt und dieser solange durchgeführt, bis nach der Strangtrennung in Runde n die Sequenzierung der selektierten Aptamere erfolgt.

Nach dem Waschen liegen im Idealfall nur noch Komplexe aus Aptameren und dem jeweiligen *Target* vor. Diese werden durch nicht-kovalente Wechselwirkungen stabilisiert, sodass eine Trennung durch Änderungen

des Mediums erreicht werden kann. Dies kann durch unterschiedliche Vorgehensweisen erreicht werden, beispielsweise durch eine Erhöhung der Temperatur oder Verschiebung des pH-Wertes.(61) Da, wie oben beschrieben, die Ionenkonzentrationen im umgebenden Medium für die Sekundärstruktur und damit für die Affinität des Aptamers von Bedeutung sind, kann auch durch den Einsatz von entsprechenden Puffern eine Trennung erreicht werden. Die Elution der Aptamere ist jedoch gegebenenfalls nicht erforderlich, wenn die Anwesenheit des *Targets* den nachfolgenden Schritt der Amplifikation nicht negativ beeinflusst.(67) Dies ist insbesondere auch dann von Vorteil, wenn für den SELEX-Prozess beispielsweise eine entsprechende Säule präpariert wurde und diese durch die Elution irreparabel geschädigt werden würde.

Die Amplifikation des vorliegenden, verkleinerten Aptamerpools ist erforderlich, um in weiteren Selektionsrunden einen, den Darwin'schen Prinzipien folgenden, Selektionsdruck aufzubauen. Ohne eine Amplifikation entspricht die Anzahl der Aptamere in dem verkleinerten Aptamerpool ungefähr der Anzahl der verfügbaren Bindungsstellen, sodass bei einer erneuten Inkubation unter den gleichen Bedingungen (gleiche Menge an *Target*) keine Konkurrenz zwischen den einzelnen Nukleinsäuren auftreten würde. Durch eine Vervielfältigung der Gesamtmenge an DNA beziehungsweise RNA tritt bei einer anschließenden Inkubation mit dem Zielmolekül wieder eine Konkurrenz um die vorhandenen Bindungsstellen auf, sodass eine Selektion hinsichtlich der Affinität stattfindet.(53,61) Für die Vervielfältigung wird die PCR eingesetzt, welche jedoch den Anforderungen des SELEX-Prozesses angepasst werden muss, da durch diese Technik doppelsträngige Produkte erzeugt werden (zum Ablauf der PCR siehe 6.2.2.1 PCR). Wie oben beschrieben, ist es jedoch für die Faltung und damit für die Funktion der Aptamere erforderlich, dass diese einzelsträngig vorliegen. Es haben sich unterschiedliche Modifikationen etabliert, um dieses Ziel zu erreichen, wobei die meisten auf eine Manipulation der eingesetzten Primer zurückgreifen. So kann beispielsweise durch den Einsatz von 5'-biotinylierten *Reverse*-Primern eine entsprechende Biotinmodifizierung im komplementären Strang des Aptamers eingeführt werden. Unter Ausnutzung der hochspezifischen und hochaffinen Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin können die beiden Stränge separiert (beispielsweise durch Hitze) und die Aptamere isoliert werden.(52,57,67) Durch ein geschicktes Design des *Reverse*-Primers kann auch eine Schlaufenbildung (Stamm-Schleife-Struktur, siehe Abbildung 11, Mitte) induziert werden, welche eine Synthese des komplementären Stranges unterbindet.(65) Auch die Verwendung von modifizierten *Forward*-Primern mit Molekülen, welche einen Einfluss auf die Eigenschaften im elektrischen Feld haben (beispielsweise Fluorescein), kann zur Strangtrennung eingesetzt werden, da es so unter denaturierenden Bedingungen in der SDS-PAGE zu einem unterschiedlichen Wanderungsverhalten der beiden komplementären Stränge kommt.(52,61) Ohne den Einsatz von Modifikationen kommt die sogenannte asymmetrische PCR aus, welche durch den überschüssigen Einsatz eines Primers die Bildung des entsprechenden Stranges bevorzugt.(52)

Bei der Selektion von RNA-Aptameren ist es erforderlich, vor der Amplifikation mittels PCR, eine Umwandlung des verkleinerten RNA-Aptamerpools zu DNA durchzuführen. Dies erfolgt durch den Einsatz einer reversen Transkriptase, ein Enzym, welches in der Lage ist aus einzelsträngiger RNA eine entsprechende doppelsträngige DNA, eine sogenannte cDNA (*complementary DNA*), zu synthetisieren. Diese cDNA wird als Templat für die PCR eingesetzt und im Anschluss werden aus dem doppelsträngigen Produkt mittels *in vitro*-Transkription wieder die entsprechenden RNA-Aptamere isoliert.(52,68)

Der auf die oben beschriebene Art und Weise generierte Aptamerpool wird dann wieder mit dem *Target* inkubiert, um eine weitere Selektionsrunde einzuleiten (Abbildung 12). Durch diese iterative Vorgehensweise werden von Runde zu Runde die Aptamere mit der geringsten Affinität aus dem Aptamerpool entfernt, sodass nach mehreren Runden eine deutliche Anreicherung von vielversprechenden Aptameren erfolgt.(52,53) Durch

eine stringente Veränderung der Inkubationsbedingungen kann der auf das System ausgeübte Selektionsdruck mit steigender Rundenzahl weiter intensiviert werden. Wird beispielsweise von Runde zu Runde die eingesetzte Menge an *Target* oder auch die Kontaktzeit zwischen den Bindungspartnern immer weiter reduziert, kommt es zu einer immer größeren Konkurrenz um die vorhandenen Bindungsstellen.(67) Auch eine Intensivierung des Waschschrilles durch wiederholte Durchführung oder Steigerung der eingesetzten Volumina führt zu einer Eliminierung von schwächer bindenden Aptameren.(53) Um Aptamere, welche eine Kreuzreaktivität aufweisen, aus dem Aptamerpool zu entfernen, kann die Implementierung einer Gegen-SELEX sinnvoll sein. Dabei wird der Aptamerpool vor der Inkubation mit dem eigentlichen *Target* mit der Spezies inkubiert, gegen die eine Kreuzreaktivität vermieden werden soll. Kommt es zu einer Bindung, können die entsprechenden Aptamere entfernt werden und nur Nukleinsäuren ohne eine entsprechende Affinität werden dann im nächsten Schritt mit dem *Target* inkubiert.(52,57,69) Wie viele SELEX-Runden durchgeführt werden, ist sowohl vom jeweiligen Zielmolekül als auch von der SELEX-Methode abhängig, sodass der zeitliche Aufwand stark variieren kann.(52) In der Literatur wird üblicherweise eine Spanne von 5-15 Runden angegeben, wobei beispielsweise durch die CE-SELEX schon nach wenigen Runden vielversprechende Aptamere identifiziert wurden.(63) Bei der FACS-SELEX beispielsweise wird von den Autoren eine Dauer von zwei bis drei Tagen pro SELEX-Runde angegeben.(65) Eine Beschleunigung und gleichzeitige Reduktion des erforderlichen personellen Aufwandes kann durch den Einsatz einer Automation erreicht werden.(65,70)

Einer der wesentlichen Vorteile von Aptameren im Vergleich zu Antikörpern ist die Möglichkeit, dass die Oligonukleotide bei Kenntnis der entsprechenden Sequenz jederzeit und zu geringen Kosten synthetisiert werden können. Um die erforderlichen Sequenzinformationen aus dem finalen Aptamerpool zu extrahieren, muss dieser sequenziert werden, was den Abschluss des SELEX-Prozesses darstellt. Da die Diversität während des gesamten Prozesses im Vergleich zur am Anfang eingesetzten Aptamerbibliothek deutlich verringert ist, kann dies durch eine Klonierung erfolgen. Für diesen Zweck werden die Nukleinsäuren des finalen Aptamerpools unter Verwendung eines Vektors in ein geeignetes Expressionssystem, wie beispielsweise *Escherichia coli*, transformiert (zum Ablauf der Klonierung siehe 6.2.3.3 Sequenzierung). Diese Vorgehensweise bietet bei entsprechender Anpassung der jeweiligen Konzentrationen den Vorteil, dass jeweils nur ein Aptamer in einen Vektor und nur ein Vektor in eine Zelle eingebracht werden. Durch Vereinzelung und Kultivierung der entsprechenden Zellen wird der Vektor mit dem darin enthaltenen Aptamer vervielfältigt und kann dann in ausreichender Menge isoliert und sequenziert werden.(61,71) Durch die Weiterentwicklungen im Bereich der Sequenzierungstechnologien stehen der Aptamerforschung weitere Möglichkeiten offen. So ist es durch den Einsatz von sogenannten *Next-Generation-Sequencern* möglich, den finalen Aptamerpool vollständig und ohne den Zwischenschritt der Klonierung und Kultivierung zu analysieren, was mehrere zufällige Selektionen aus dem Gesamtprozess eliminiert. Sowohl beim Einbau der Aptamere in die Vektoren als auch bei der Transformation in Zellen und deren Kultivierung ist es kaum zu vermeiden, dass einzelne Aptamere aus dem Prozess ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zur Selektion während des SELEX-Prozesses steht dies in keinem Zusammenhang zu den Eigenschaften der Nukleinsäuren in Bezug auf das Zielmolekül. Die Nutzung der *Next-Generation-Sequencing*-Technologie eliminiert diese Problematiken und bietet darüber hinaus unterschiedlichste Möglichkeiten zur prozessbegleitenden Kontrolle. Da außerdem am Ende alle im finalen Aptamerpool vorhandenen Nukleinsäuren erfasst werden, ist es gegebenenfalls möglich Motive, die für die Bindung an das *Target* von Vorteil sind, zu identifizieren.(53,72)

3.3.2 Verwendung von Aptameren

Im Gegensatz zu Antikörpern, welche zur Herstellung auf Tiere oder tierabhängige Methoden angewiesen sind (siehe 3.2.2.1 Antikörper), können Aptamere vollständig *in vitro* synthetisiert werden und entsprechen somit den Anforderungen der RL 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. Durch unterschiedliche Variationen des oben beschriebenen SELEX-Prozesses wurde seit 1990 eine Vielzahl an Aptameren identifiziert. Es sind sowohl Aptamere bekannt, welche eine Affinität zu Ionen, *small molecules* oder Proteinen aufweisen, als auch solche mit einer Affinität zu vollständigen Zellen oder Sporen.(57,73-76) Einige der Eigenschaften von Aptameren und Antikörpern werden in Tabelle 6 zusammengefasst und gegenübergestellt.

Obwohl es sich bei den Aptameren um ein, im Vergleich zu den Antikörpern, junges Forschungsgebiet handelt, sind bereits eine Vielzahl an Anwendungsmöglichkeiten entwickelt worden. Es sind sowohl Methoden beschrieben, in denen das Aptamer den Antikörper ersetzt, als auch solche, die insbesondere von der hohen Flexibilität im Hinblick auf die unterschiedlichsten Modifikationen einen Nutzen aus der Aptamertechnologie ziehen.(77,78) So wurde beispielsweise in Analogie zum ELISA, als eines der Hauptanwendungsgebiete für Antikörper, die Technik des ELASA (engl.: *enzyme-linked aptamer sorbent assay*) begründet. Aptamere können hier sowohl als *capture*- oder auch als *detection*-Element eingesetzt werden und die entwickelten Methoden somit leicht in bereits bestehende Arbeitsabläufe integriert werden. Auch Mischformen, welche sowohl auf Aptamere als auch auf Antikörper setzen, wurden entwickelt.

Durch die hohe Stabilität der Nukleinsäuren stellen diese auch für *in field*-Anwendungen wie LFDs eine sinnvolle Alternative zu Antikörpern dar. Darüber hinaus sind diese durch Festphasensynthese hergestellten Rezeptoren durch einen geringen Preis von wenigen Cent pro Base für diese Einweganwendungen attraktiv.(79-81) Durch die Möglichkeit unterschiedlichste Modifikationen wie beispielsweise Fluoreszenzmarkierungen in die Moleküle einzuführen, bieten Aptamere mit einer entsprechenden Affinität auch eine Option zur Färbung von Zellen oder Geweben.(65,82) Auch die Erweiterung oder Implementierung in bestehende Methoden wie beispielsweise in den *Western Blot* sind durch die Verwendung von markierten Aptameren möglich und können eine Alternative für Antikörper darstellen.(83) Die Anzahl an kommerziell erhältlichen Modifikationen ist groß, da sich entsprechend modifizierte Sonden bereits seit langer Zeit im Rahmen der *real time*-PCR im Einsatz befinden.

Die hohe Stabilität bei gleichzeitiger Beeinflussbarkeit der Affinität durch die Eigenschaften des umgebenden Mediums ist auch für Analoga zur Affinitätschromatografie von großem Interesse. Gemische können unter Verwendung des aptamerspezifischen Puffers als Laufmittel auf eine Säule aufgebracht werden, wo die entsprechenden Komponenten durch Interaktion mit immobilisierten Aptameren retardiert werden. Ein Wechsel des Laufmittels führt zum Verlust der Affinität des Aptamers zum entsprechenden *Target*, welches dann ohne Matrix von der Säule eluiert. Eine entsprechende Methode wurde zur Aufreinigung von HisTag-Proteinen (Polyhistidin-Tag) entwickelt, wodurch ein Verzicht auf Nickel-basierte Säulen ermöglicht wird.(56)

Auch als Medikament haben Aptamere eine Anwendung gefunden, so wurde das Medikament Pegaptanib® von der FDA (Behörde für Lebensmittel- und Arzneimittel der USA, engl.: *food and drug administration*) zur Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration zugelassen.(85) Durch die Interaktion von Aptameren mit bestimmten Proteinen (Oberflächenrezeptoren, Wachstumsfaktoren, Enzyme) können unter Umständen Krankheitsverläufe positiv beeinflusst werden, sodass der Einsatz von Aptameren als Inhibitoren vielversprechend ist.(52) Die verringerte Immunogenität von Nukleinsäuren im Vergleich zu Proteinen ist hier

ein weiterer Vorteil, da so Reaktionen durch das Immunsystem (siehe 3.2.2 Immunsystem) nicht induziert werden können.

Tabelle 6: Vergleich zwischen Antikörpern und Aptameren.

Dargestellt sind ausgewählte Eigenschaften (Aufbau, Stabilität, mögliche Targets, Affinität, Spezifität). (37,52,72,84)

	Aptamere	Antikörper
Aufbau	<ul style="list-style-type: none"> - Nukleinsäuren (RNA/DNA) - 5-30 kDa (15-100 Basen) 	<ul style="list-style-type: none"> - Proteine - ca. 150 kDa
Stabilität	<ul style="list-style-type: none"> - reversible Denaturierung - Lagerung in gefriergetrocknetem Zustand nahezu unbegrenzt 	<ul style="list-style-type: none"> - irreversible Schädigung durch Denaturierung - Lagerung in physiologischem Puffer begrenzt - lange Lagerung bei tiefen Temperaturen (-80 °C) möglich
Herstellung	<ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i> - hochreproduzierbar - sehr genau modifizierbar während der Synthese 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>in vivo</i> - biologische Schwankungen - Modifizierungen nur nachträglich
mögliche Targets	<ul style="list-style-type: none"> - unpolare Substanzen nur eingeschränkt - ohne Einschränkung hinsichtlich Toxizität 	<ul style="list-style-type: none"> - immunogene Substanzen - toxische Substanzen nur eingeschränkt
Eigenschaften	<ul style="list-style-type: none"> - hohe Affinität (K_D-Werte im nanomolaren Bereich) - Kreuzreaktivitäten im SELEX-Prozess schwer zu kontrollieren 	<ul style="list-style-type: none"> - sehr hohe Affinität (K_D-Werte im picomolaren Bereich) - sehr hohe Spezifität

Der Bereich der möglichen *Targets* wird bei der Antikörperherstellung auch dadurch limitiert, dass nicht jede Substanz das Immunsystem zur Produktion von entsprechenden Antikörpern anregt. Nur sogenannte Immunogene provozieren durch Bindung von B-Lymphozyten eine Reaktion.(31) Durch Modifikation des SELEX-Prozesses (siehe 3.3.1 Entwicklung von Aptameren) können beispielsweise auch ohne Bindung an stationäre Phasen oder Verwendung von komplexierenden Liganden, Aptamere mit einer Affinität zu Ionen selektiert werden.(66) Auch bei der Selektion von hochtoxischen Substanzen kann die Aptamertechnologie im Vorteil sein, da der komplette Prozess *in vitro* geführt wird.

3.4 Biosensoren

Biologische Interaktionen sind häufig durch eine hohe Spezifität gekennzeichnet, wodurch auch eine Nutzung für analytische Zwecke in den Fokus rückt. In Biosensoren wird mit sogenannten Umwandlern (engl.: *transducer*) eine biochemische Interaktion in ein physikochemisches Signal umgesetzt.(86) Im Gegensatz zu bioanalytischen Systemen wie dem ELISA können Biosensoren regeneriert werden, sodass eine mehrfache Verwendung ermöglicht wird. Es handelt sich darüber hinaus um geschlossene Systeme, in denen alle erforderlichen Komponenten enthalten sind und in engem Kontakt miteinander stehen.(86) In der Literatur

werden eine Vielzahl an unterschiedlichen Biosensoren beschrieben, eine Unterteilung kann dabei sowohl anhand der bio- als auch anhand der physikochemischen Komponente vorgenommen werden. Einteilungen anhand der untersuchten Analyten oder der gegebenenfalls katalysierten Reaktionen können ebenso sinnvoll sein.(86,87)

Als biochemische Komponenten kommen häufig Enzyme, also Proteine, welche durch ihre Struktur die Aktivierungsenergien von chemischen Reaktionen verringern, zum Einsatz. Neben der hohen Substratspezifität und großen Bandbreite an verfügbaren Reaktionen sind Enzyme auch durch die exponentielle Verstärkung des Signals von besonderem Interesse für die Anwendung in Biosensoren. Andere Proteine, welche ebenso in der Lage sind definierte Moleküle mit hoher Spezifität zu binden, sind beispielsweise Antikörper, Ionenkanäle oder Membranproteine.(87,88) Auch der Einsatz von ganzen Zellen oder Geweben wurde bereits für die Entwicklung von Biosensoren genutzt. Aptamere sind durch ihre Flexibilität hinsichtlich des *Targets* und die einfache, basengenaue Modifizierung auch für dieses Anwendungsgebiet gut geeignet.(86,87)

Die physikochemische Komponente ist im gleichen Maße vielfältig. Als naheliegend bei der Umwandlung in ein elektrisches Signal sind beispielsweise amperometrische oder potentiometrische Detektoren etabliert worden.(86) So kann es durch eine enzymatisch katalysierte Reaktion zur Bildung eines Reaktionsproduktes kommen, welches aufgrund der physikochemischen Eigenschaften einen Einfluss auf die Leitfähigkeit hat oder es kann durch kompetitive Konkurrenz zu einer Veränderung des Potentials durch freie Bindungspartner kommen.(89,90) Auch die Herstellung von räumlicher Nähe durch eine Interaktion zwischen einem immobilisierten und einem entsprechend modifizierten Rezeptor sowie dem entsprechenden Agonisten kann für einen Biosensor genutzt werden.(91) Die Kopplung mit Technologien wie der SPR-Spektroskopie (engl.: *surface plasmon resonance*) ist ebenso möglich und wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.(87)

3.4.1 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Bei der SPR-Spektroskopie oder auch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie handelt sich um eine optische Methode mit folgenden physikalischen Grundlagen. Die Geschwindigkeit von Licht im Vakuum beträgt ca. 3×10^8 m/s, in Medien mit einer höheren optischen Dichte verlangsamt sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Lichtes in Abhängigkeit von den Materialeigenschaften. Das Verhältnis der Ausbreitungsgeschwindigkeit von Licht, mit einer Wellenlänge von 589 nm, in einem Medium zu der Geschwindigkeit im Vakuum, wird durch den Brechungsindex beschrieben, welcher anhand des Quotienten der beiden Geschwindigkeiten gebildet wird. Beim Übergang von Licht zwischen zwei transparenten Medien, welche sich im Brechungsindex unterscheiden, wird das Licht gebrochen (Eintrittswinkel \neq Austrittswinkel). Handelt es sich um einen Übergang von einem optisch dichteren Medium in ein optisch weniger dichtes Medium und der Eintrittswinkel zum Lot der Grenzfläche ist ausreichend groß, kommt es zur sogenannten Totalreflexion bei der das eingestrahlte Licht vollständig reflektiert (Eintrittswinkel = Austrittswinkel) wird.

Eine vollständige Reflexion bei einer Überschreitung des Grenzwinkels (=Winkel bei dem der Austrittswinkel 90° beträgt) ist jedoch eine Näherung für einen idealisierten Zustand. Da die Ausbreitungsrichtung einer Welle sich nicht schlagartig ändern kann, bildet sich im Grenzbereich zwischen den beiden Materialien eine stehende Welle, welche als evaneszentes Feld bezeichnet wird. Diese Welle beziehungsweise diese Photonen können mit der Umgebung interagieren (Oberflächenplasmon), sodass in Abhängigkeit der Materialeigenschaften des optisch dünneren Mediums, Absorptionslinien im reflektierten Licht (=Intensitätsminima) beobachtet werden können.(92,93)

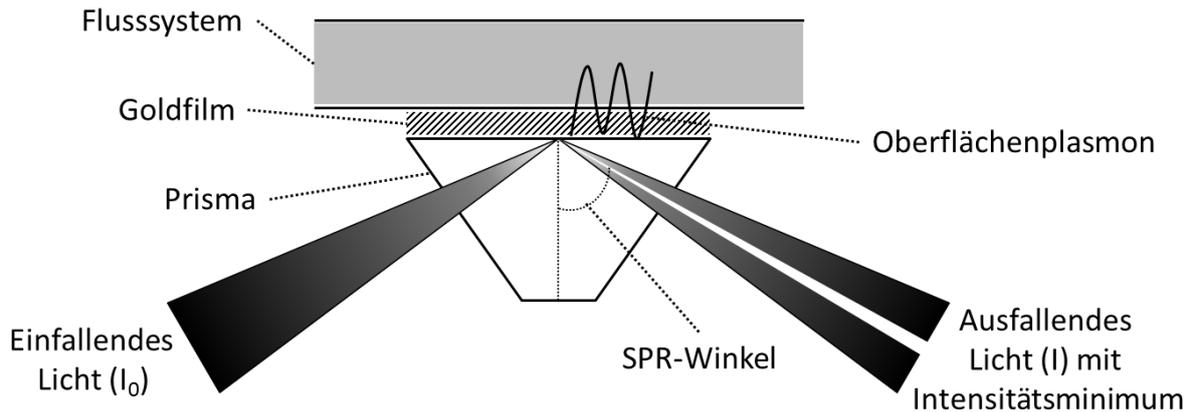


Abbildung 13: Schematische Darstellung SPR.

Dargestellt ist der Aufbau der SPR-Spektroskopie in Form der häufig genutzten Kretschmann-Anordnung. Dabei ist der Goldfilm direkt auf dem Glasprisma aufgebracht und steht in direktem Kontakt zum Flusssystem. Durch das einfallende Licht (I_0) und das aus der Totalreflexion resultierende evaneszente Feld kommt es zur Bildung eines Oberflächenplasmons. Die absorbierten Photonen sind im reflektierten Licht (I) nicht mehr vorhanden, woraus in diesem ein Intensitätsminimum (SPR-Winkel) entsteht.

In der SPR-Spektroskopie werden die genannten Effekte zur Messung ausgenutzt. Als optisch dichteres Medium wird ein Glasprisma eingesetzt, welches mit einer dünnen Goldschicht (≈ 50 nm) belegt ist (Kretschmann-Anordnung, siehe auch Abbildung 13). Das eingestrahelte, linear polarisierte Licht wird durch eine Linse vor dem Eintritt in das Prisma gebündelt, sodass Licht mit unterschiedlichen Einfallswinkeln auf die Grenzfläche der beiden Materialien trifft.⁽⁹³⁾ Das durch die Photonen parallel zur Grenzfläche gebildete evaneszente Feld kann bei Erfüllung der Resonanzbedingungen die freien Elektronen des Metalls anregen, sodass ein Oberflächenplasmon (Schwingung der Elektronen im Vergleich zu den Atomrümpfen) entsteht.⁽⁹³⁾ Die dabei zur Anregung absorbierten Photonen sind dementsprechend nicht mehr im reflektierten Licht detektierbar, ein Minimum bei einem bestimmten Winkel, dem sogenannten SPR-Winkel (auch: Resonanzwinkel), resultiert. Durch Anpassung der Gold-Schichtdicke kann erreicht werden, dass das evaneszente Feld ungefähr in der Größenordnung der Hälfte der Wellenlänge des eingestrahelten Lichtes in das Medium hineinragt.⁽⁹²⁾ Kommt es im Flusssystem im Bereich des Oberflächenplasmons zu einer Änderung der Umgebung, ändern sich auch die Resonanzbedingungen für die Anregung des Oberflächenplasmons, sodass Licht, welches mit einem anderen Winkel auf die Grenzfläche trifft, für die Anregung des Plasmons absorbiert wird. Diese Änderung verändert dementsprechend auch den Winkel des Intensitätsminimums (SPR-Winkel). Die Änderung des SPR-Winkels wird in *Resonance Units* (RU) ausgedrückt, wobei 1000 RU einer Änderung des Resonanzwinkels von ungefähr $0,1^\circ$ entsprechen. Da jedoch keine allgemein gültige Definition vorliegt, sind je nach Hersteller des SPR-Gerätes geringe Abweichungen zu verzeichnen.^(92,94)

Während einer SPR-Messung ist, im Gegensatz zu Detektionssystemen wie dem ELISA, keine Markierung der beiden Bindungspartner erforderlich. Zur Durchführung der Messungen muss jedoch einer der beiden Bindungspartner auf der Goldoberfläche immobilisiert werden, was durch chemische Modifikation derselben ermöglicht wird (Abbildung 14, Grundzustand). Da bei den meisten auf dem Markt verfügbaren SPR-Geräten das Prisma mit der Goldoberfläche austauschbar ist, können entsprechende Module mit unterschiedlichsten Oberflächenmodifikationen kommerziell erworben werden. Nach der Immobilisierung muss gewährleistet sein, dass die Interaktion zwischen den beiden Partnern weiterhin möglich ist, erforderliche Bindungsepitope sollten also nicht durch Beteiligung an der Bindung verdeckt sein.⁽⁹⁵⁾ Dementsprechend ist dieser Schritt sowohl für die Empfindlichkeit als auch für die Spezifität von entscheidender Bedeutung.⁽⁹⁵⁾ Grundlegend

wird zwischen kovalenten und nicht-kovalenten Immobilisierungen unterschieden, letztere werden durch elektrostatische Wechselwirkungen oder Einschluss in biokompatible Polymerfilme realisiert.(95) Für die Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen der Sensoroberfläche und dem zu immobilisierenden Partner sind beispielsweise Goldoberflächen mit Hydroxyl-, Thiol-, Carboxyl- oder Amingruppen kommerziell erhältlich. So ist es bei Proteinen in Abhängigkeit der vorhandenen Seitengruppen (siehe Tabelle 4) möglich, eine Vielzahl an kovalenten Bindungen auszubilden, wodurch eine ebenso große Vielfalt an Orientierungsmöglichkeiten besteht.(95) Soll eine gerichtete Immobilisierung auf der Sensoroberfläche erfolgen, um so beispielsweise eine Verbesserung der Sensitivität zu erzielen, können Reaktionen dementsprechend gesteuert werden. Unter Verwendung von nur einmal vorkommenden funktionellen Gruppen, durch die Einführung von Modifikationen mit entsprechenden Gruppen oder die Nutzung von Schutzgruppen, ist es möglich, eine kovalente, gerichtete Immobilisierung, welche gegenüber nicht-kovalenten Bindungen stabiler ist, zu realisieren.(95) Eine Alternative können auch nicht-kovalente Immobilisierungen bieten, indem beispielsweise unter Nutzung von spezifischen Interaktionen eine bestimmte räumliche Ausrichtung begünstigt wird. So können beispielsweise Antikörper gerichtet immobilisiert werden, indem direkt auf der Sensoroberfläche das aus *Staphylococcus aureus* stammende Protein A aufgebracht wird. Dieses Protein weist eine Affinität zum F_c-Teil von Antikörpern auf, sodass eine Ausrichtung des F_{ab}-Teils in Richtung des Flusssystems erfolgt.(38,95) Auch die Nutzung der hochspezifischen Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung kann zu einer deutlichen Verbesserung der Sensitivität beitragen.(95)

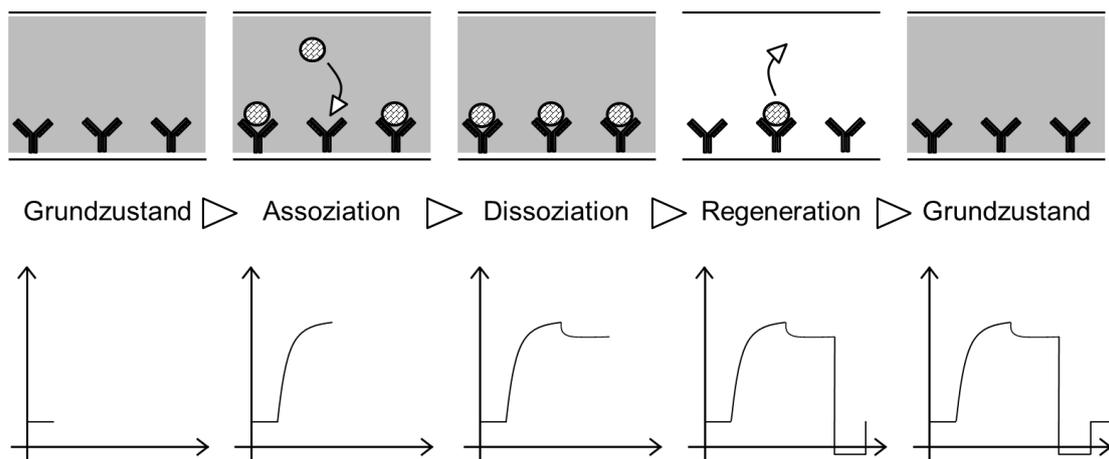


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Verlaufes einer SPR-Messung.

Dargestellt sind die einzelnen Schritte einer SPR-Messung. Nach dem Grundzustand, in dem einer der Bindungspartner immobilisiert ist, folgt die Assoziationsphase, in welcher der zweite Bindungspartner in das System injiziert wird und eine Bindung zwischen den beiden Bindungspartnern ausgebildet wird. Im Sensogramm (unten) ist der typische Kurvenverlauf mit einem kontinuierlichen Anstieg bis auf ein Niveau der Sättigung dargestellt. Bei einer stabilen Bindung bleibt die Bindung während der anschließenden Dissoziationsphase stabil, ebenso das Signal im Sensogramm. Zur Regeneration vor der nächsten Messung wird ein Regenerationspuffer injiziert, welcher die Bindung zwischen den Partnern löst. Da sich dieser vom Laufpuffer meistens stark unterscheidet, verändert sich das Signal im Sensogramm entsprechend drastisch. Nach dem Abschluss der Regeneration wird wieder der Laufpuffer injiziert und das Signal kehrt auf das Niveau vor der Messung zurück.

Der andere Bindungspartner wird durch eine Mikrofluidik über definierte Immobilisationspunkte (engl.: *spots*) geleitet. Diese Phase wird als Assoziationsphase (siehe Assoziation Abbildung 14) bezeichnet, da der gelöste Bindungspartner an den immobilisierten Partner assoziieren kann. Kommt es zur Interaktion der beiden Partner, ändert sich unmittelbar über der Goldoberfläche der lokale Brechungsindex, wodurch sich der Winkel des Intensitätsminimums wie oben beschrieben ändert, was im SPR-Sensogramm in Form einer ansteigenden Kurve verfolgt werden kann.(93) Sind Probenpuffer und Laufpuffer hinsichtlich des Brechungsindex sehr

verschieden, überlagert dies den Einfluss der Interaktion zwischen den Bindungspartnern. Infolgedessen kann die Assoziation nicht anhand des SPR-Signals verfolgt werden, sodass idealerweise Proben- und Laufpuffer identisch sein sollten. Durch Sättigung der vorhandenen Bindungsstellen auf der Sensoroberfläche kommt es zu einer Verringerung der Steigung bis bei vollständiger Sättigung der Bindungsstellen ein paralleler Verlauf des Signals zur x-Achse (Zeit) resultiert und ein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation vorliegt. Im Anschluss wird nur der Laufpuffer des Systems für einen definierten Zeitraum über den Chip geleitet. Ist die Bindung zwischen den beiden Partnern unter den gegebenen Bedingungen stabil, kommt es zu keiner Dissoziation, wodurch der SPR-Winkel, und damit das Signal im Sensogramm, stabil bleibt. Selbst bei einer sehr stabilen Bindung kommt es jedoch zu einer geringen Dissoziation, sodass eine geringfügige negative Steigung unter realen Bedingungen immer zu erkennen ist. Je schwächer die Bindung ist, desto größer die negative Steigung während der Dissoziationsphase. Da im Probenpuffer der gelöste Bindungspartner nicht vorhanden ist, kommt es infolge der Einstellung eines Gleichgewichtes bei unspezifisch gebundenen Molekülen zur Ablösung von der Sensoroberfläche. Dieser Effekt führt häufig zu einer plötzlichen Verringerung des SPR-Signales (engl.: *dip*) nach dem Abschluss der Assoziationsphase.(93)

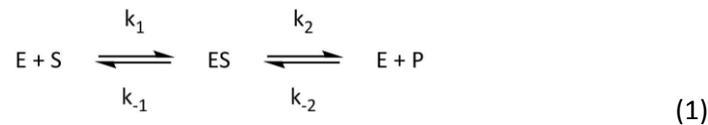
Um alle an die Sensoroberfläche gebundenen Moleküle wieder zu eluieren und so den Sensor für eine weitere Messung vorzubereiten, folgt anschließend die Regeneration. Für diesen Zweck wird häufig ein Puffer verwendet, welcher sich deutlich von den vorher eingesetzten Lösungen unterscheidet. Die nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen den beiden Bindungspartnern können beispielsweise durch Lösungen mit einer hohen ionischen Stärke oder durch eine Veränderung des pH-Wertes unterbrochen werden. Bei der Entwicklung einer entsprechenden Regenerationslösung muss beachtet werden, dass der immobilisierte Rezeptor in seiner biologischen Funktion nicht beeinträchtigt wird, der Akzeptor jedoch vollständig von der Sensoroberfläche entfernt wird. Bei einer unvollständigen oder denaturierenden Regeneration wird der Grundzustand nicht wieder hergestellt und für die folgende Messung liegen somit andere Rahmenbedingungen zugrunde.(95)

Auch für die Detektion von Allergenen in Lebensmitteln wurden bereits mehrere SPR-basierte Biosensoren entwickelt. Die in den USA am häufigsten auftretende Lebensmittelallergie ist die Erdnuss-Allergie, sodass für dieses *Target* bereits mehrere antikörperbasierte und einzelne aptamerbasierte SPR-Biosensoren publiziert worden sind.(96) SPR-Biosensoren wurden auch für den Nachweis von anderen Allergenen wie beispielsweise Haselnuss oder Milch entwickelt, die Nachweisgrenzen liegen für gewöhnlich im ppb-Bereich.(96,97) Für den Nachweis von Ovalbumin in Wein wurde ein antikörperbasierter SPR-Biosensor mit einer Nachweisgrenze von bis zu 0,03 ppm nach Probenaufarbeitung durch Größenausschlusschromatografie entwickelt.(98)

3.4.2 Kinetik

Die SPR-Technologie bietet durch die vollständige Aufzeichnung der Assoziation und Dissoziation zwischen den beiden Bindungspartnern die Möglichkeit, entsprechend detailliert kinetische Untersuchungen durchzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Technologie genutzt, um die Dissoziationskonstanten unterschiedlicher Komplexe zu bestimmen. Zur Herleitung dieser Konstante soll zuerst die Michaels-Menten-Kinetik betrachtet werden, welche die Kinetik von Enzymen beschreibt.

Damit ein Enzym als Katalysator wirken kann, muss sich aus den beiden an der Reaktion beteiligten Partnern (Enzym & Substrat) ein Komplex bilden, welcher nach der Bildung des Produktes wieder dissoziiert:



E = Enzym; S = Substrat; ES = Enzym-Substrat-Komplex, P = Produkt, k = Geschwindigkeitskonstanten

Die Kinetik der Reaktion kann näherungsweise durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden:

$$v_0 = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (2) \quad \text{mit:} \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (3)$$

v_0 = Anfangsgeschwindigkeit; v_{\max} = maximale Geschwindigkeit; $[S]$ = Konzentration Substrat; K_M = Michaelis-Menten-Konstante; k_1 = Geschwindigkeitskonstante der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes; k_{-1} = Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls des Enzym-Substrat-Komplexes zu den Edukten; k_2 = Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls des Enzym-Substrat-Komplexes durch Produktbildung; k_{-2} = Geschwindigkeitskonstante der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes unter Beteiligung des Produktes.

Dieser Gleichung liegen mehrere vereinfachende Annahmen zugrunde, trotzdem ist sie für eine Vielzahl von enzymatisch katalysierten Reaktionen anwendbar. So wird die Reaktion zum Zeitpunkt 0 betrachtet, sodass die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes unter Beteiligung des Produktes nicht berücksichtigt werden muss ($k_{-2} = 0$). Außerdem wird ein so genanntes Fließgleichgewicht (engl.: *steady state*) angenommen, demzufolge die Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes gleich sind, sodass diese gleichgesetzt werden können und die Michaelis-Menten-Konstante K_M daraus abgeleitet werden kann. Des Weiteren wird angenommen, dass die Konzentration des Substrates im Vergleich zum Enzym sehr hoch ist und die Reaktionsgeschwindigkeit lediglich von der Konzentration des Produktes abhängig ist (Reaktion 1. Ordnung).⁽³¹⁾

Aus der Gleichung (2) kann abgeleitet werden, dass wenn die Substratkonzentration der Michaelis-Menten-Konstante entspricht, die halbmaximale Geschwindigkeit der Reaktion erreicht wird. Je kleiner die Michaelis-Menten-Konstante also für ein Enzym ist, desto schneller wird die halbmaximale Geschwindigkeit erreicht, sodass dieser Wert zum Vergleich von Enzymen herangezogen werden kann.⁽³¹⁾ Zur Bestimmung werden unterschiedliche Methoden eingesetzt, eine Möglichkeit ist das Ansetzen einer Konzentrationsreihe des Substrates und die Quantifizierung eines Produktes nach definierten Zeiträumen. Aus der grafischen Auftragung kann dann ein Wert für K_M abgeschätzt werden.

Wenn der Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes deutlich schneller erfolgt als die Bildung des Produktes ($k_{-1} \gg k_2$) und diese somit vernachlässigbar wird, entspricht dies der Anlagerung eines Liganden an einen Rezeptor:



L = Ligand; R = Rezeptor; LR = Ligand-Rezeptor-Komplex, k_a = Geschwindigkeitskonstante der Assoziation; k_d = Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation

Anstelle der Michaelis-Menten-Konstante wird unter diesen Bedingungen die Dissoziationskonstante K_D zur Beschreibung der Stabilität des gebildeten Komplexes herangezogen. Diese ist wie folgt definiert:

$$K_D = \frac{[R][L]}{[RL]} = \frac{k_a}{k_d} \quad (5)$$

K_D = Dissoziationskonstante; $[R]$ = Konzentration Rezeptor; $[L]$ = Konzentration Ligand; $[RL]$ = Konzentration Rezeptor-Ligand-Komplex; k_a = Geschwindigkeitskonstante der Assoziation; k_d = Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation

Ähnlich wie bei K_M geht hier aus der Gleichung (5) hervor, dass bei der halbmaximalen Sättigung des Rezeptors die Dissoziationskonstante der Ligandenkonzentration entspricht. In Abbildung 15 ist dargestellt, wie grafisch die Dissoziationskonstante abgelesen werden kann. Auch hier ist erkennbar, dass ein Komplex aus zwei Bindungspartnern als umso stabiler angesehen werden kann, je kleiner die Dissoziationskonstante ist. (31)

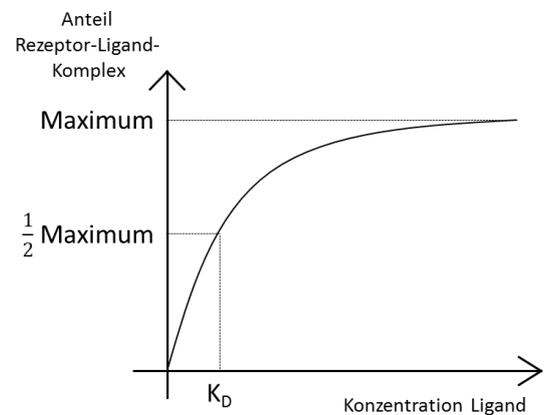


Abbildung 15: Grafische Bestimmung des K_D -Wertes. Dargestellt ist der Zusammenhang zwischen dem Anteil an Rezeptor-Ligand-Komplexen und der Dissoziationskonstante.

4 Zielsetzung

Verschiedene Lebensmittelallergene können für sensitive Verbraucher ein Problem darstellen, sodass innerhalb der Europäischen Union Lebensmittel, welche diese enthalten, entsprechend gekennzeichnet werden müssen.(99) Auch Wein kann im Rahmen der Herstellung mit allergenen Proteinen in Kontakt kommen, beispielsweise durch Behandlung mit Lysozym zur Kontrolle der malolaktischen Gärung oder mit Ei- oder Milchprotein im Rahmen der Schönung zur Verbesserung der Lagerstabilität.(21,24) Die Analyse des Endproduktes bezüglich verbliebener Allergenrückstände und die Feststellung, ob eine entsprechende Deklaration erforderlich ist, basiert gegenwärtig größtenteils auf antikörperbasierten Methoden wie dem ELISA.

Die für diese Zwecke verwendeten Antikörper (Immunoglobuline) werden im Rahmen der adaptiven Immunantwort von Wirbeltieren als Reaktion auf körperfremde Substanzen gebildet und können aus dem Blut der Tiere isoliert werden. Bei der Durchführung eines ELISA werden diese Antikörper jedoch verbraucht und stehen nicht für weitere Reaktionen zur Verfügung, zudem ist die Methode relativ personal- und zeitintensiv. Durch die Etablierung von Biosensoren, bei denen der entsprechende Antikörper mehrmals eingesetzt werden kann, soll eine Reduktion des Antikörperverbrauches und damit auch eine Reduktion des Einsatzes von Tieren für wissenschaftliche Zwecke erreicht werden. Für das Allergen Ovalbumin wurde parallel zur vorliegenden Arbeit bereits ein SPR-basierter Biosensor entwickelt, bei dem für die Detektion in Wein jedoch eine Probenvorbereitung durch den Einsatz von Ultrafiltration und Größenausschlusschromatografie erforderlich ist.(98) Eine Beschleunigung durch eine Methode ohne aufwändige Probenvorbereitung würde somit eine Weiterentwicklung darstellen.

Da die für diesen Zweck erforderlichen Antikörper jedoch nicht ohne Tiere oder tierabhängige Methoden (Zellkulturen) hergestellt werden können und innerhalb der Europäischen Union gleichwertige Methoden, welche ohne den Einsatz von Tieren auskommen, bevorzugt werden sollen, soll auch die Anwendbarkeit von Aptameren für diese Analytik untersucht werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stehen insbesondere solche Allergene im Fokus, welche in das Lebensmittel Wein im Rahmen der Produktion (Behandlung, Schönung) eingetragen werden. Deswegen sollen zunächst durch eine *in vitro*-Methode Aptamere entwickelt werden, welche unter dem Wein vergleichbaren Bedingungen eine Affinität zu Lysozym, Ovalbumin und den bovinen Caseinen aufweisen. Nach der Identifikation sollen die Nukleinsäuren hinsichtlich ihrer Eigenschaften untersucht und mit den im Rahmen des oben genannten SPR-basierten Biosensors eingesetzten Antikörpern verglichen werden.

Abschließend sollen die Aptamere hinsichtlich der Einsatzmöglichkeiten in unterschiedlichen Testsystemen evaluiert werden. Durch die vielfältigen Modifikationsmöglichkeiten ist sowohl eine aptamerbasierte Alternative zum antikörperbasierten SPR-Biosensor denkbar, als auch der Einsatz in LFDs oder als Detektionselement nach einer chromatografischen Trennung mittels HPTLC.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Antikörper

5.1.1 Charakterisierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zunächst die verfügbaren Antikörper mit einer Affinität gegenüber dem Weinbehandlungsmittel Lysozym und dem Weinschönungsmittel Ovalbumin hinsichtlich der Affinität zum jeweiligen Antigen untersucht werden. Beide Antikörper wurden in vorangegangenen Arbeiten durch Immunisierung von Kaninchen gewonnen (siehe 6.1) und zur Entwicklung sensitiver ELISA-Methoden eingesetzt.(21,34) Da die Immunisierung unter Verwendung von Präparaten önologischer Qualität durchgeführt wurde und schlussendlich polyklonale Antikörper isoliert wurden, ist davon auszugehen, dass einerseits unterschiedliche Epitope des jeweiligen Allergens und darüber hinaus auch Bruchstücke sowie Agglomerate im Rahmen der Antikörper-Antigen-Interaktion erkannt werden.(100) Im Rahmen bereits durchgeführter Untersuchungen unter Verwendung der *Western Blot*-Technik zeigte sich, dass der Lysozym-Antikörper eine hohe Spezifität aufweist.(21) Der vorliegende Ovalbumin-Antikörper zeigte eine geringfügige Kreuzreaktivität zu Conalbumin und Lysozym, was wahrscheinlich auf das nicht in analytischer Reinheit vorliegende und zur Immunisierung eingesetzte Präparat zurückzuführen ist.(34) Da sowohl Conalbumin (Gal d 3) als auch Lysozym (Gal d 4) ebenso bekannte Allergene des Hühnereierweißes darstellen, ist diese Kreuzreaktivität hinsichtlich der Beurteilung möglicherweise vorhandener Rückstände von geringerer Relevanz.

Da die vorliegenden Antikörper zur Herstellung antikörperbasierter Biosensoren genutzt werden sollen, wurde durch eine SDS-PAGE (siehe 6.2.1.2) untersucht, ob neben den Immunoglobulinen weitere Proteine in größeren Mengen in den Präparaten vorliegen. Durch die denaturierenden Bedingungen im Rahmen der Probenaufarbeitung werden die über Disulfidbrücken kovalent verbundenen Untereinheiten isoliert und anschließend gelelektrophoretisch voneinander getrennt. In Abbildung 16 sind bei beiden Antikörpern gut die zu erwartenden Banden bei ungefähr 25 kDa, welche auf die leichte Kette zurückzuführen sind, und bei ungefähr 50 kDa die auf die schweren Ketten zurückzuführenden Banden zu erkennen. Wenn größere Mengen der Proteine aufgetragen werden, sind im Bereich der größeren Massen vereinzelte Banden zu erkennen, welche jedoch höchstwahrscheinlich auf unvollständig voneinander getrennte Ketten zurückzuführen sind. Hinsichtlich der Bandenschärfe könnten durch Anpassung des Polymerisationsgrades oder der aufgetragenen Volumina Optimierungen erreicht werden, für eine erste Beurteilung der Antikörper sind die SDS-Gele jedoch ausreichend. Insgesamt entspricht das Bild den Erwartungen, sodass die Antikörper auch im weiteren Verlauf der Arbeit eingesetzt werden.

Im Anschluss wurde die Affinität der Antikörper zu den jeweiligen Antigenen unter Verwendung der SPR-Spektroskopie bestimmt, um so einen Vergleich zu den in dieser Arbeit identifizierten Aptameren zu ermöglichen. Wie bereits in 3.4.1 beschrieben, ist es für die Durchführung einer SPR-Untersuchung erforderlich, einen der beiden Bindungspartner auf dem SPR-Sensorchip, bestehend aus einem Prisma sowie

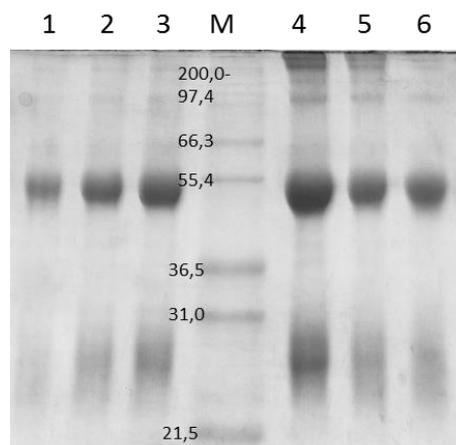


Abbildung 16: SDS-PAGE Antikörper.

Abgebildet ist eine SDS-PAGE der untersuchten Antikörper mit einer Affinität gegen Lysozym (Bahn 1: 1,2 µg, Bahn 2: 2,4 µg, Bahn 3: 3,6 µg) beziehungsweise Ovalbumin (Bahn 4: 5,5 µg, Bahn 5: 3,3 µg, Bahn 6: 1,1 µg). M = Marker, Färbung Coomassie-Blue.

einer direkt darauf aufgetragenen Goldschicht, zu immobilisieren. Der gelöste Bindungspartner kann dann durch die Mikrofluidik des eingesetzten SPR-4 (Sierra Sensors GmbH, Hamburg, Deutschland) durch voneinander unabhängige Pumpen über unterschiedliche Bereiche (engl.: *spots*) der Goldoberfläche geleitet werden. Um die Proteine zu immobilisieren, konnte auch in diesem Kontext durch den Einsatz carboxylmodifizierter Sensorchips auf die EDC/NHS-Kopplung (1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid / N-Hydroxysuccinimid) unter Nutzung primärer Amine aus den Aminosäureseitenketten der Proteine zurückgegriffen werden (siehe auch 5.2.1.1). Um eine Verfälschung der Messergebnisse durch Signale infolge unspezifischer Wechselwirkungen des gelösten Bindungspartners mit der Sensoroberfläche zu vermeiden, wurden durch Ethanolamin sowohl ein separater *spot* auf der Sensoroberfläche (zur späteren Referenzierung) als auch die nach der kovalenten Bindung der Proteine verbliebenen Bindungsstellen blockiert. Die Immobilisierung (siehe auch beispielhafte Darstellung in Abbildung 21) erfolgte somit durch konsekutive Injektion von Aktivierungslösung (100 mM EDC, 400 mM NHS), Proteinlösung (0,1 mg/mL) in Natriumacetatpuffern (pH 5,5 bei Ovalbumin und pH 6 bei Lysozym) sowie Ethanolamin (1 M) über definierte Bereiche des Sensorchips und unter Verwendung von PBS (phosphatgepufferte Salzlösung, engl.: *phosphate buffered saline*) als Laufpuffer (+0,05 % Tween-20). Durch die hohe Affinität und das relativ hohe Molekulargewicht der Antikörper konnten hier, im Gegensatz zu den im späteren Kontext durchgeführten Untersuchungen der Aptamere, bereits mit 10 bis ungefähr 55 pg Protein erfolgreiche Charakterisierungen durchgeführt werden. Eine Minimierung der immobilisierten Proteinmenge wurde angestrebt, da es bei einer großen Anzahl an verfügbaren Bindungsstellen wahrscheinlicher wird, dass es zum sogenannten *Rebinding* kommt. Dieser, durch eine geringe Menge an immobilisiertem Protein unterbundene Effekt, beschreibt die wiederholte Anlagerung des gelösten Bindungspartners an die Sensoroberfläche nach einer Trennung der Bindung, infolgeder eine nicht mit der Affinität in Zusammenhang stehende Steigerung des Signals induziert wird.(101)

Durch die Injektion einer Verdünnung des Lysozym-Antikörpers sollte nach der Chipherstellung untersucht werden, ob auch nach der Immobilisierung noch eine Interaktion zwischen den beiden Bindungspartnern erfolgt. Wie in Abbildung 17 deutlich zu erkennen ist, konnte ein typisches SPR-Sensogramm aufgenommen werden. Während der Injektion der Antikörperlösung ist eine deutliche Veränderung des SPR-Winkels infolge der Assoziation an das auf der Sensoroberfläche immobilisierte Protein zu erkennen. Das bereits während dieser Phase abflachende und insbesondere das in der Dissoziationsphase parallel zur x-Achse verlaufende Signal deuten die hochaffine und stabile Bindung zwischen den beiden Partnern an.

Zur Berechnung der Dissoziationskonstanten, im Anschluss an die Untersuchung einer Verdünnungsreihe des Antikörpers unter Verwendung der hergestellten Sensorchips, muss gewährleistet sein, dass jede Messung unter vergleichbaren Bedingungen erfolgt. Es ist deswegen erforderlich eine Regenerationsprozedur zu entwickeln, bei der zwar die starke Bindung zwischen Antikörper und Antigen getrennt wird, jedoch keine Schädigung des Sensors beispielweise durch Denaturierung der immobilisierten Proteine induziert wird. Die in der Literatur zur Regeneration von SPR-Sensorchips beschriebenen Vorgehensweisen basieren auf der Injektion von unterschiedlichsten Lösungen, welche

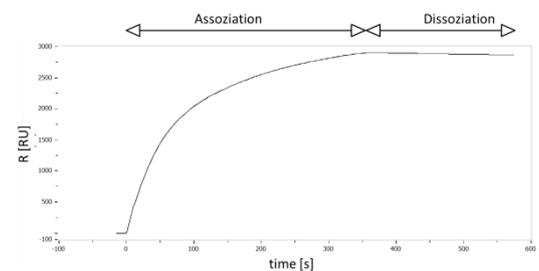


Abbildung 17: SPR-Sensogramm Testinjektion Lysozym-Antikörper.

Abgebildet ist ein Sensogramm der Injektion einer Lösung des Lysozym-Antikörpers (16 pM) über einen SPR-Sensorchip auf dem das Antigen Lysozym immobilisiert ist. Die Assoziations- und Dissoziationsphase sind markiert. Lauf- und Probenpuffer = PBS (+0,05 % Tween-20). RU = engl.: *resonance units*.

beispielsweise Tenside (oberflächenaktive Substanzen) oder Lösungsmittel enthalten und die Interaktion zwischen den beiden Bindungspartnern beeinflussen können. Auch Verschiebungen des pH-Wertes oder der Ionenkonzentration können eine Veränderung der Ladung der an der Interaktion beteiligten funktionellen Gruppen verursachen, sodass eine Trennung erfolgt und der nicht kovalent an die Sensoroberfläche gebundene Partner durch das Flusssystem wieder entfernt werden kann. (95,102) Unterschiedliche Substanzen beziehungsweise Kombinationen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, wobei das Ziel war, nach dem Ende des Regenerationsschrittes wieder das Ausgangsniveau, also den vor der Injektion vermessenen SPR-Winkel ($R = 0$ RU, engl.: *resonance units*), zu erreichen. Eine unvollständige Regeneration ist in diesem Kontext durch ein positives Signal, eine Schädigung der Sensoroberfläche und eine daraus resultierende Ablösung des immobilisierten Bindungspartners durch ein negatives Signal erkennbar. Weder Verdünnungen von Essigsäure, Malonsäure oder Ethanol, Lösungen mit NaCl oder EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) noch die im späteren Verlauf eingesetzten Precondition I-Puffer (100 mM HCl in dest. Wasser) beziehungsweise Precondition II-Puffer (10 mM NaOH, 1 M NaCl in dest. Wasser) zeigten signifikante Effekte auf die injizierten und an die auf der Sensoroberfläche immobilisierten Proteine beziehungsweise gebundenen Antikörper. Durch das Detergenz CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid), welches in Wasser gelöst und anschließend über den belegten Sensor geleitet wurde, konnte ein erster Effekt beobachtet werden. Sowohl das resultierende negative Signal als auch die verminderte Bindungsfähigkeit im Rahmen einer anschließenden Antikörperinjektion ließen jedoch eine Schädigung der Sensoroberfläche vermuten. Das auch im Rahmen der SDS-PAGE eingesetzte SDS (Natriumdodecylsulfat, engl.: *sodium dodecyl sulfate*) zeigte bei einer Konzentration von 0,5 % (m/v) in dest. Wasser eine unvollständige Regeneration, bei Folgeinjektionen konnte zudem beobachtet werden, dass dann zu Beginn ein von der untersuchten Lösung unabhängiges Signal erzeugt wurde („Geisterpeak“). Die Bindungsfähigkeit der Sensoroberfläche konnte bei Verwendung dieses Detergenzes erhalten werden, eine vollständige Regeneration konnte aber auch durch wiederholte Injektionen der SDS-Lösung oder größere Volumina nicht erreicht werden. Untersuchungen mit Phosphorsäureverdünnungen unterschiedlichen pH-Wertes (1,5/3,5/5) zeigten bei der sauersten Lösung eine nahezu vollständige Regeneration an, während die eher neutralen Lösungen nur eine geringe Regenerationsfähigkeit offenbarten. Zwar konnte durch eine im Anschluss durchgeführte Antikörperinjektion gezeigt werden, dass die Sensoroberfläche weiterhin für Messungen genutzt werden kann, bei höheren Antikörperkonzentrationen erwies sich jedoch auch die Phosphorsäureverdünnung mit einem pH-Wert von 1,5 als nicht mehr ausreichend. Da sowohl durch SDS als auch durch die Phosphorsäure eine Trennung der Antikörper-Antigen-Bindung erreicht werden konnte, war eine Kombination der beiden Substanzen naheliegend. Durch Untersuchung von unterschiedlichen Lösungen (pH-Wert 1,4 -2,5; Konzentration SDS 0,05 – 0,5 % (m/v)) konnten bei einer SDS-Konzentration von 0,5 % (m/v) und pH-Werten von 2,0 – 2,5 vollständige Regenerationen ohne irreversible Denaturierung der Sensoroberfläche erreicht werden. Für die K_D -Bestimmung der Antikörper wurde schließlich die Kombination mit dem weniger sauren pH-Wert von 2,5 genutzt, zur Eliminierung verbliebener Reste der Regenerationslösung in der Mikrofluidik und Verhinderung der Geisterpeaks wurde ein Spülschritt mit dem Laufpuffer in den Ablauf integriert.

Vertiefende Untersuchungen hinsichtlich des Mechanismus der Regeneration wurden nicht durchgeführt, durch im späteren Verlauf der Arbeit erzielte Beobachtungen können jedoch Hypothesen aufgestellt werden. So zeigte sich im Rahmen der Biosensorentwicklung bei den immobilisierten Lysozym-Antikörpern (siehe 5.1.2.1), dass nach der Assoziation von Lysozym zwar weiterhin durch eine Injektion der SDS-Phosphorsäure-Lösung eine Trennung der Antikörper-Antigen-Bindung erfolgte, im Anschluss jedoch keine erneute Assoziation von Lysozym zu beobachten war. Da jedoch nach dem Einsatz der gleichen Lösung beim Lysozym-Sensorchip

(siehe Abbildung 17) auch nach der Regeneration noch Assoziationen durch Antikörper möglich waren, kann geschlussfolgert werden, dass durch die SDS-Phosphorsäure-Lösung wahrscheinlich die Immunglobuline irreversibel denaturiert werden und dementsprechend im Folgenden keine spezifische Bindung mehr eingehen können. Durch Untersuchung unterschiedlicher Lösungen zeigte sich jedoch, dass zur Regeneration des Antikörper-Sensorchips der Precondition I-Puffer (100 mM HCl in dest. Wasser) geeignet ist, obwohl dieser beim Lysozym-Sensorchip nicht erfolgreich eingesetzt werden konnte. Möglicherweise kommt es durch den sauren Precondition I-Puffer zu einer reversiblen Protonierung funktioneller Gruppen innerhalb des Proteins Lysozym infolgeder der Trennung der beiden Bindungspartner erfolgt. Durch die Anlagerung des Antikörpers an ein auf der Sensoroberfläche immobilisiertes Protein steht dieses mit einem entsprechend geringeren Teil der Lösung in Kontakt und die Protonierung des Proteins könnte durch sterische Hinderung erschwert werden. Diese These wird unterstützt durch die Beobachtung, dass bei einer hohen Antikörperkonzentration eine Regeneration durch Phosphorsäure ohne SDS nicht mehr durchgeführt werden konnte. Die Denaturierung des Antikörpers durch SDS und die daraus resultierende Ablösung könnte dann wieder eine Protonierung des immobilisierten Proteins ermöglichen.

Nachdem die Herstellung der entsprechenden Sensorchips sowie die Entwicklung einer Regeneration ohne Denaturierung der immobilisierten Proteine erfolgreich umgesetzt wurde, konnten Verdünnungsreihen der Antikörper erstellt und untersucht werden. Wie bereits unter 3.4.2 beschrieben, ist es für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten erforderlich, eine Sättigung der zur Verfügung stehenden Bindungsstellen zu erreichen. In Abbildung 18 sind beispielhaft die Sensogramme einer Untersuchung des Lysozym-Antikörpers zusammengefasst, die mit steigender Konzentration zunehmende Sättigung des Signals während der Injektion (Assoziationsphase) ist gut zu erkennen.

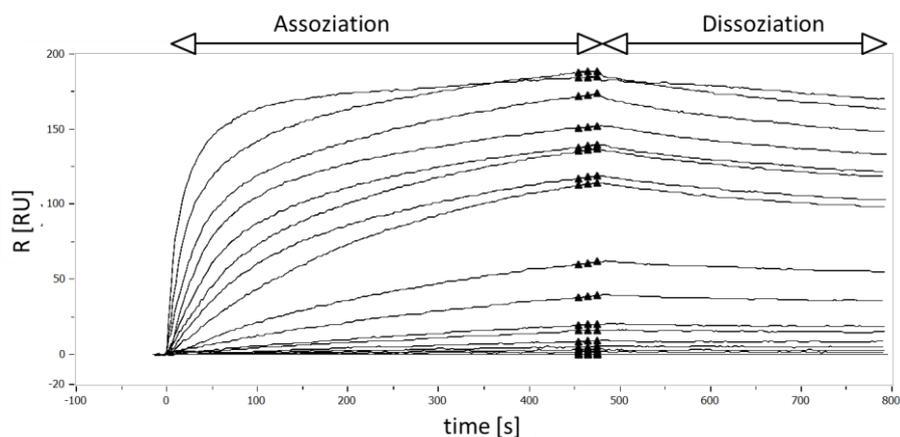


Abbildung 18: SPR-Sensogramme Lysozym-Antikörper.

In der Abbildung sind die durch Injektionen einer Verdünnungsreihe (0,16 - 1600 nM, siehe auch Tabelle 7) des Lysozym-Antikörpers und doppelte Referenzierung erhaltenen Sensogramme dargestellt. Auf dem genutzten Sensorchip wurde Lysozym immobilisiert, als Laufpuffer wurde PBS (+0,5 % Tween-20) eingesetzt. Zur Verdeutlichung wurden neben der Injektionszeit (Assoziation) und Dissoziationszeit (Dissoziation) auch die zur Berechnung des K_D -Wertes genutzten Zeitpunkte markiert. R mit der Einheit RU (engl.: *resonance units*) stellt hierbei die Änderung des Resonanzwinkels dar, welcher durch Interaktionen in unmittelbarer Nähe der Sensoroberfläche verändert wird.

Zur Referenzierung wurde einerseits der bereits im Rahmen der Herstellung genannte *spot* mit dem Blockierungsreagenz Ethanolamin genutzt. Des Weiteren wurde PBS mit einer geringen Konzentration des Detergenz Tween-20 (0,5 % m/v) sowohl als Laufpuffer als auch zur Verdünnung der Antikörperstammlösungen genutzt, um unspezifische Wechselwirkungen innerhalb des SPR-Systems zu

verringern (Herstellerempfehlung Sierra Sensors GmbH, Hamburg, Deutschland). Zur Vermeidung einer Beeinträchtigung der Messergebnisse erschien es somit sinnvoll, immer nach der Vermessung von zwei Antikörperverdünnungen ein äquivalentes Volumen des Puffers über den Sensorchip zu leiten und die gegebenenfalls resultierenden Signale ebenso zur Referenzierung zu nutzen. Durch diese doppelte Referenzierung ist sichergestellt, dass die zur Berechnung am Ende der Assoziationsphase extrahierten Signale ausschließlich durch die Antikörper-Antigen-Interaktion verursacht werden. Für beide Antikörper wurden so viele Messungen durchgeführt, dass für jede Konzentration mindestens drei Werte vorliegen (siehe beispielhaft für den Lysozym-Antikörper in Tabelle 7, Daten für den Ovalbumin-Antikörper siehe 8.2).

Zur Berechnung einer Regression wurde die mathematische Analysesoftware OriginPro 9.0G sowie die Hill-Funktion ($y = c_{\max} \frac{x^n}{k^n + x^n}$, mit c_{\max} = Maximalkonzentration, x = Antikörperkonzentration, k = Dissoziationskonstante, n = Hill-Koeffizient) genutzt, welche ähnlich wie die Michaelis-Menten-Gleichung ($y = c_{\max} \frac{x}{k+x}$, siehe 3.4.2) zur Beschreibung einer Sättigungsfunktion genutzt werden kann. Die Hill-Funktion unterscheidet sich von letztgenannter Gleichung lediglich durch den sogenannten Hill-Koeffizienten n , welcher bei der Michaelis-Menten-Funktion gleich 1 ist und die Anzahl der möglichen Bindungsstellen darstellt. Eine kooperative Bindung (Hill-Koeffizient $\neq 1$) wird im Rahmen der Antikörper-Antigen-Interaktion nicht erwartet, eine hypothesenfreie Untersuchung durch Nutzung der Hill-Funktion könnte diesbezüglich jedoch gegebenenfalls weitere Informationen liefern.

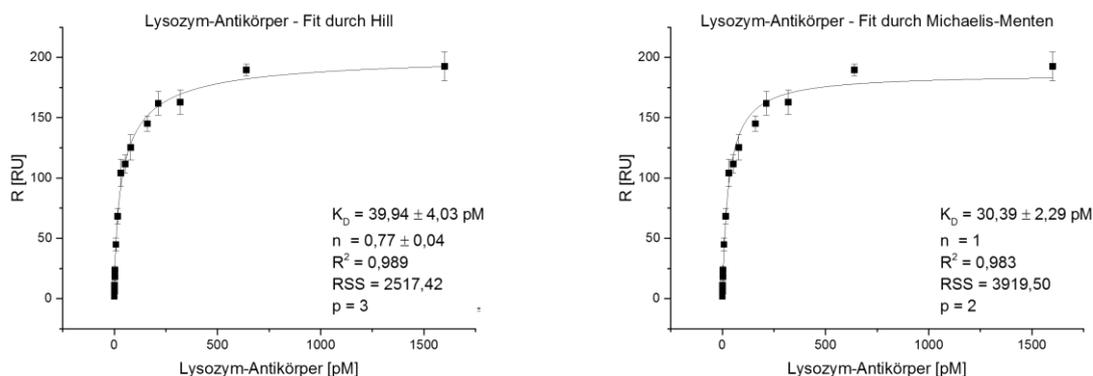


Abbildung 19: SPR-Spektroskopie Lysozym-Antikörper, Vergleich unterschiedlicher Regressionen.

Grafisch dargestellt sind unterschiedliche Regressionen der mittels SPR-Spektroskopie für den Lysozym-Antikörper erhaltenen Daten (siehe Tabelle 7). Links: Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung mit dem resultierenden K_D -Wert und dem Hill-Koeffizienten. Rechts: Regression unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung mit dem resultierenden K_D -Wert. Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Modellen ist der Hill-Koeffizient, welcher im Rahmen der Michaelis-Menten-Gleichung gleich 1 ist und somit nicht in die Rechnung einfließt. R mit der Einheit RU (engl.: *resonance units*) stellt hierbei die Änderung des Resonanzwinkels dar, welcher durch Interaktionen in unmittelbarer Nähe der Sensoroberfläche verändert wird. R^2 beschreibt die Güte der Regression und liegt im Optimalfall bei 1.

Unter Verwendung der in Tabelle 7 dargestellten Daten ergab sich für den Lysozym-Antikörper mit einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,989 ein K_D -Wert von $39,94 \pm 4,03$ pM sowie ein Hill-Koeffizient von $0,77 \pm 0,04$. Diese Dissoziationskonstante zeigt, insbesondere im Vergleich mit den im späteren Verlauf der Arbeit charakterisierten Aptameren und auch im Vergleich mit anderen in der Literatur beschriebenen Antikörpern, eine sehr starke Interaktion.(37,103) Der Hill-Koeffizient mit einem Wert kleiner 1 deutet an, dass die Bindung weiterer Antikörper nach der initialen Bindung eines Immunoglobulins eher inhibiert wird. In Anbetracht des relativ geringen Molekulargewichts von Lysozym (14,4 kDa) sowie dem Umstand, dass es sich hier um einen polyklonalen Antikörper handelt, könnte es sich hier um eine sterische Hinderung handeln. Wie bereits in

3.2.2.1 beschrieben, handelt es sich bei einem polyklonalen Antikörper nicht um ein definiertes Immunglobulin, welches an genau ein Epitop des Antigens bindet, sondern vielmehr um eine Mischung unterschiedlicher Antikörper, welche an unterschiedliche Epitope binden. Somit erscheint es denkbar, dass nach der Bindung eines Antikörpers die Bindung eines weiteren Moleküls an ein anderes Epitop sterisch gehindert ist. Dieser Ansatz wird durch den im Rahmen der Ovalbumin-Charakterisierung bestimmten Hill-Koeffizienten von $0,94 \pm 0,06$ unterstützt, da dieses Protein deutlich größer ist (42,8 kDa) und somit die beschriebene sterische Hinderung deutlich unwahrscheinlicher ist. Zum Vergleich wurden die in Tabelle 7 angegebenen Daten auch unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung untersucht, indem die Anzahl der Bindungsstellen (Hill-Koeffizient n) gleich 1 gesetzt wird. Wie bereits in Abbildung 19 zu erkennen, ist der Unterschied zwischen den beiden Regressionen minimal. Auch die in diesem Zusammenhang bestimmte Dissoziationskonstante von $30,39 \pm 2,29$ pM liegt im gleichen Bereich wie bei der Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung. Für die Interaktion zwischen dem Ovalbumin-Antikörper und dem Antigen Ovalbumin konnte ein K_D -Wert von $43,38 \pm 3,93$ pM (Hill) beziehungsweise $41,18 \pm 2,74$ pM (Michaelis-Menten) berechnet werden (siehe 8.2), der Unterschied zwischen den beiden Modellen ist aufgrund des bereits genannten Hill-Koeffizienten von fast 1 ($0,94 \pm 0,06$) deutlich geringer.

Tabelle 7: Messwerte SPR-Spektroskopie Lysozym-Antikörper.

In der Tabelle sind die nach doppelter Referenzierung (Sensoroberfläche + Puffer) generierten Signale unmittelbar vor dem Ende der Injektion aufgeführt. Messung 1 entspricht hierbei Abbildung 18, Messung 2 & 3 sind in 8.2 dargestellt. Der in der letzten Spalte angegebene Mittelwert und die resultierende Standardabweichung wurden zur Berechnung des K_D -Wertes genutzt (siehe auch Abbildung 19). R mit der Einheit RU (engl.: *resonance units*) stellt hierbei die Änderung des Resonanzwinkels dar, welcher durch Interaktionen in unmittelbarer Nähe der Sensoroberfläche verändert wird.

Konzentration [nM]	R [RU]			Mittelwert \pm Standardabweichung
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	
0,16	1,96	1,79	2,28	2,01 \pm 0,25
0,32	2,34	3,25	3,67	3,09 \pm 0,68
0,64	5,66	4,97	7,72	6,12 \pm 1,43
1,2	10,93	8,58	13,87	11,13 \pm 2,65
2,4	17,04	15,66	22,10	18,27 \pm 3,39
3,2	25,00	19,72	26,40	23,71 \pm 3,52
8	47,40	38,69	48,73	44,94 \pm 5,45
16	72,20	60,98	71,78	68,32 \pm 6,36
32	91,59	113,4	107,75	104,25 \pm 11,32
53	113,09	118,09	103,46	111,55 \pm 7,44
80	123,56	136,37	115,91	125,28 \pm 10,34
160	145,61	138,49	151,04	145,05 \pm 6,29
213	155,51	173,01	157,12	161,88 \pm 9,67
320	165,69	151,56	171,23	162,83 \pm 10,14
640	185,69	188,23	194,97	189,63 \pm 4,80
1600	186,67	184,53	206,51	192,57 \pm 12,12

Da bei der Erstellung einer Regression im Allgemeinen davon ausgegangen werden kann, dass mit einer höheren Anzahl an variablen Parametern auch die Unterschiede (Residuenquadratsumme) zwischen den Messwerten und den aus der Regression resultierenden Werten immer geringer werden und die Hill-Gleichung

im Gegensatz zur Michaelis-Menten-Gleichung drei variable Parameter (c_{\max} = Maximalkonzentration, k = Dissoziationskonstante, n = Hill-Koeffizient) beinhaltet, wurden die Regressionen durch einen F-Test (siehe 6.2.5) untersucht. Unter Berücksichtigung der Residuenquadratsummen sowie der Anzahl der verfügbaren Parameter p wird hierbei durch Vergleich mit der F-Verteilung abgeschätzt ($p = 0,05$), ob die bessere Annäherung der Regression mit einer höheren Anzahl an Parametern auf die Messwerte zurückzuführen und somit signifikant ist. Es zeigte sich, dass bei dem Lysozym-Antikörper die Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung zu bevorzugen ist; beim Ovalbumin-Antikörper aber die durch die Michaelis-Menten-Gleichung bestimmte Regression zwar eine geringfügig größere Residuenquadratsumme aufweist, dieser Umstand jedoch auf die geringere Anzahl an Parametern und nicht auf die Messwerte zurückzuführen ist. In beiden Fällen bleibt aber festzuhalten, dass die Interaktion zwischen den hier untersuchten Antikörpern und den jeweiligen Antigenen von einer hohen Affinität gekennzeichnet ist. Eine Entwicklung von antikörperbasierten Biosensoren unter Verwendung der bereits im Rahmen unterschiedlicher ELISA-Methoden erfolgreich eingesetzten Antikörper erscheint somit sinnvoll, die Einhaltung der durch die OIV festgelegten Anforderungen erscheint möglich. Sollte die aufgestellte Hypothese bezüglich der sterischen Hinderung im Rahmen der Bindung von Lysozym an den entsprechenden Antikörper der Wahrheit entsprechen, wäre dies durch die geplante Immobilisierung des Antikörpers nicht von Bedeutung.

5.1.2 Antikörperbasierter Biosensor

Nachdem im Rahmen der Antikörpercharakterisierung die hohe Stabilität der Antikörper-Antigen-Interaktion festgestellt wurde, sollen unter Verwendung der zur Verfügung stehenden Immunglobuline antikörperbasierte Biosensoren entwickelt werden. Als *Transducer* zur Umwandlung der biochemischen Interaktion in ein physikochemisches Signal soll auch in diesem Kontext die empfindliche SPR-Spektroskopie zum Einsatz kommen. Da die Immobilisierung des Antigens (wie im Rahmen der Bestimmung der Dissoziationskonstanten) jedoch für jede Messung einen individuellen Sensorchip erfordern würde und zudem die Quantifizierung schwer umsetzbar wäre, soll stattdessen der Antikörper immobilisiert werden und die zu untersuchende Lösung über den Sensorchip geleitet werden. In Anwesenheit des Antigens würde dieses an den Antikörper binden, sodass durch die Veränderung der lokalen Bedingungen für die Ausbildung des Oberflächenplasmons eine entsprechende Veränderung des SPR-Signals resultiert.

5.1.2.1 Methodenentwicklung

Um im antikörperbasierten Biosensor eine maximale Sensitivität zu erreichen, sollte zu Beginn der Methodenentwicklung untersucht werden, bei welchem pH-Wert der zur Immobilisierung eingesetzten Verdünnung ein Maximum der Antikörper auf der Sensoroberfläche kovalent gebunden werden kann. Da für die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen den Carboxylgruppen auf dem SPR-Sensorchip und den primären Aminen der Aminosäureseitenketten eine räumliche Nähe unabdingbar ist, wurden die Antikörperstammlösungen unter Verwendung unterschiedlicher Natriumacetatpuffer (10 mM, pH 4,5 – 6) verdünnt, ohne Aktivierung über den Sensorchip geleitet und die resultierenden Signale kurz vor dem Ende der Injektion verglichen. In Abbildung 20 sind die

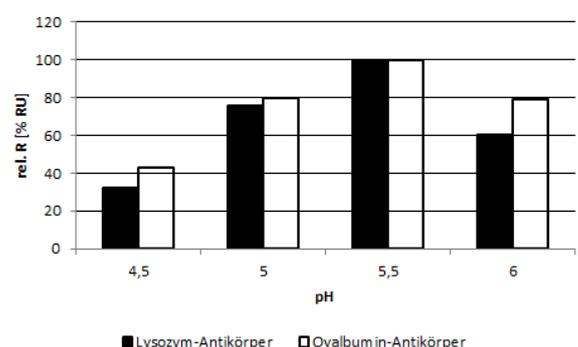


Abbildung 20: SPR-Signal im Rahmen der pH-Wert-Bestimmung im Vorfeld der Antikörperimmobilisierung. Dargestellt sind die resultierenden Signale kurz vor dem Ende der Injektion von Verdünnungen (15 µg/L) der beiden untersuchten Antikörper mit Acetatpuffern unterschiedlichen pH-Wertes (4,5/5/5,5/6). Die Signale wurden jeweils auf das maximale Signal normiert, es ergibt sich dementsprechend eine relative Änderung des SPR-Winkels (rel. R).

normierten Signale (=Veränderungen des SPR-Winkels) dargestellt und es ist deutlich zu erkennen, dass bei einem pH-Wert von 5,5 das größte Signal zu beobachten ist. Bei diesem pH-Wert scheint die Ladung der funktionellen Gruppen in den Aminosäureseitenketten in einer Art und Weise vorzuliegen, dass eine Anlagerung der Antikörper an die Sensoroberfläche begünstigt wird. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass durch die räumliche Nähe auch nach der Aktivierung der Sensoroberfläche (durch Injektion von EDC/NHS) unter diesen Bedingungen die meisten kovalenten Bindungen gebildet werden.

Zur Herstellung der Antikörpersensorchips wurden die Stammlösungen (Lysozym-Antikörper = 2,4 g/L, Ovalbumin-Antikörper = 2,2 g/L, siehe 6.1) somit unter Verwendung des Acetatpuffers mit einem pH-Wert von 5,5 im Verhältnis 1:1 verdünnt und nach der Aktivierung durch EDC/NHS über unterschiedliche *spots* der carboxylierten Sensoroberfläche geleitet (siehe beispielhafte Darstellung in Abbildung 21). Obwohl versucht wurde, durch wiederholte Injektionen oder größere Volumina eine Steigerung zu erreichen, konnte bei dem Lysozym-Antikörper stets eine Menge von ungefähr 5000 - 6000 pg immobilisiert werden.

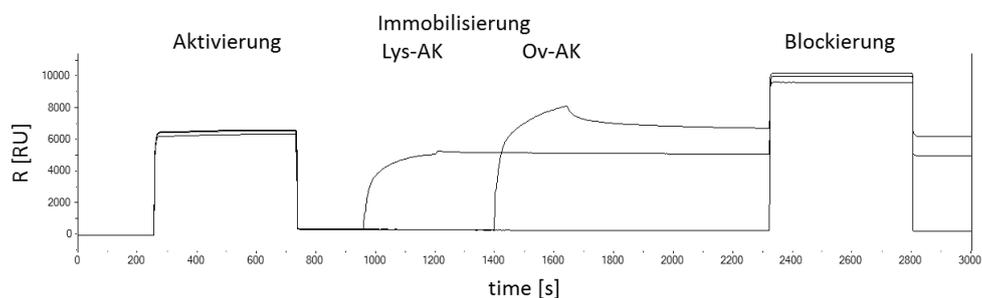


Abbildung 21: Beispielhafter Ablauf der Herstellung antikörperbasierter Sensorchips.

In der Darstellung sind der Ablauf der Sensorchipherstellung und die resultierenden Signalveränderungen zu erkennen. Da während der Sensorchipherstellung PBS (+0,5 % Tween-20) als Laufpuffer verwendet wird, kommt es im Rahmen der Aktivierung durch Injektion der EDC/NHS-Lösung in dest. Wasser zu einer deutlichen Signalverschiebung (Änderung des SPR-Winkels). Zur Immobilisierung der Antikörper (900 – 1200 s: Lys-AK = Lysozym-Antikörper; 1400 – 1700 s: Ov-AK = Ovalbumin-Antikörper) werden diese über definierte Bereiche (*spots*) geleitet und der typische Signalverlauf einer Assoziation an die Sensoroberfläche (siehe auch 3.4.1) ist zu erkennen. Anhand des Signalunterschiedes zwischen dem Ende der Aktivierung (ca. 800 s) und dem Abschluss der Immobilisierung (ca. 1800 s) kann die Menge an kovalent gebundenen Molekülen abgeleitet werden. Zum Abschluss werden die verfügbaren Bindungsstellen durch eine Injektion von Ethanolamin in dest. Wasser blockiert, eine deutliche Signalverschiebung während der Injektion ist auch hier zu erkennen.

Es ist deswegen davon auszugehen, dass hier die maximale Bindungskapazität der carboxylierten Sensorchips erreicht wurde. Da unter Verwendung des Ovalbumin-Antikörpers ungefähr 8000 pg immobilisiert werden konnten, beide Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen hergestellt wurden und somit die gleichen F_c-Fragmente aufweisen, scheint die maximal zu immobilisierende Menge für jeden Antikörper individuell zu sein. Möglicherweise könnte die Menge an kovalent gebundenen Antikörpern, und damit gegebenenfalls auch die Sensitivität des resultierenden Biosensors, durch die Verwendung anderer Immobilisierungsstrategien vergrößert werden. Auch die Nutzung von SPR-Sensorchips mit einer höheren Bindungskapazität könnte in weiteren Arbeiten untersucht werden. Zum Abschluss der Antikörperimmobilisierung wurden die verbliebenen Bindungsstellen auf dem SPR-Sensorchip, wie auch im Rahmen der Antikörpercharakterisierung, durch eine Injektion von Ethanolamin blockiert.

Durch unterschiedliche Testinjektionen wurde im Folgenden untersucht, ob die Antikörper auch nach der Immobilisierung noch eine Affinität zum entsprechenden Antigen aufweisen und ob eine Konzentrationsabhängigkeit des Signals zu beobachten ist. Als Laufpuffer sowie zur Verdünnung der Proben wurde PBS (+0,5 % Tween-20) genutzt, die Regeneration erfolgte wie bereits erwähnt (siehe 5.1.1) unter

Verwendung des Precondition I-Puffers. Da diese Untersuchungen zeigten, dass die Antikörper-Antigen-Interaktion unter diesen Bedingungen auch nach der Immobilisierung erfolgt und ein konzentrationsabhängiges Signal generiert wird (siehe Abbildung 22), sollte im weiteren Verlauf untersucht werden, ob eine Detektion auch unmittelbar in Wein möglich ist. Für diesen Zweck wurden unterschiedliche Weine ohne Deklaration hinsichtlich einer Behandlung mit allergenen Behandlungs- oder Schönungsmitteln erworben (siehe 6.1), mit unterschiedlichen Mengen an Lysozym beziehungsweise Ovalbumin versetzt und mittels der hergestellten Biosensoren untersucht. Wie in Abbildung 23 auf der linken Seite deutlich zu erkennen ist, kommt es während der Injektion einer Weinprobe zu einem starken Signal (ca. 8000 RU), was auf den großen Unterschied zwischen dem weiterhin als Laufpuffer eingesetzten PBS (+0,05 % Tween-20) und den Weinproben zurückzuführen ist. Wie bereits in 3.4.1 erwähnt, wird durch das SPR-Signal abgebildet, in welchem Maße sich der SPR-Winkel infolge einer Änderung des lokalen Brechungsindex in unmittelbarer Nähe zur Sensoroberfläche verändert. Der Einfluss des Probenmediums auf die lokalen Bedingungen ($\Delta RU \approx 8000$ RU) ist bedingt durch die veränderten Ionenkonzentrationen und die weiteren im Wein vorhandenen Komponenten (beispielsweise Polyphenole, Zucker, Proteine) offensichtlich deutlich größer als die Änderung infolge der Interaktion von Antikörper und Antigen ($\Delta RU \approx 120$ RU), sodass eine Auswertung in diesem Bereich auch nach einer Referenzierung (siehe Abbildung 23, rechts) nicht möglich ist. Wie auch die im Vorfeld bestimmte Dissoziationskonstante zeigt, handelt es sich jedoch um eine sehr stabile Bindung zwischen den beiden Interaktionspartnern, sodass eine Auswertung während der Dissoziationszeit möglich ist.

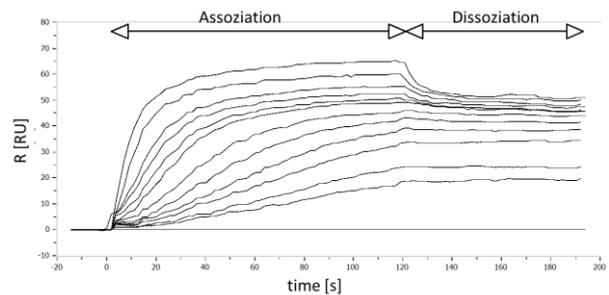


Abbildung 22: Konzentrationsabhängigkeit antikörper-basierter Biosensor.

Dargestellt sind die Sensogramme unterschiedlich konzentrierter Lysozymlösungen in PBS (50 μ L, 0,013 – 0,5 ppm) resultierend aus der Vermessung mit dem Lysozym-antikörperbasierten Biosensor. Alle Daten wurden doppelt referenziert (Sensoroberfläche + Pufferinjektionen).

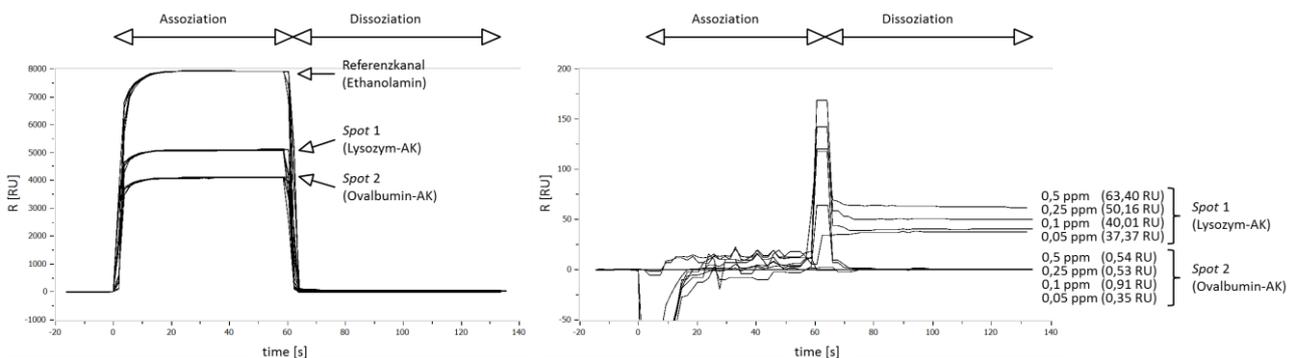


Abbildung 23: Bindungsfähigkeit des Biosensors von Lysozym in Weinproben.

Dargestellt sind Sensogramme unterschiedlich konzentrierter Lysozymlösungen (0,05/0,1/0,25/0,5 ppm) in Wein (Weißwein, Monfleur Fruit, siehe 6.1), Laufpuffer PBS (+0,5 % Tween-20). Links: Resultierende Sensogramme ohne Referenzierung, die auf den spots immobilisierten Substanzen sind angegeben. Während der Injektion (Assoziation) ist die Signalüberlagerung infolge der stark unterschiedlich Zusammensetzungen von Probenlösung (Weißwein) und Laufpuffer deutlich zu erkennen. Rechts: Resultierende Sensogramme mit Referenzierung (Referenzkanal (Ethanolamin) + Blindproben), während der Injektion (Assoziation) resultieren weiterhin keine auswertbaren Signale. Infolge der Interaktion zwischen Antikörper und Antigen können Unterschiede zwischen den spots identifiziert werden. Die Veränderungen des SPR-Winkels (R) sind in Klammern angegeben.

Wie auf der rechten Seite von Abbildung 23 gut zu erkennen ist, konnte auf dem spot auf dem der Lysozym-Antikörper immobilisiert ist, ein konzentrationsabhängiges und stabiles Signal erhalten werden. Durch den

Ovalbumin-Antikörper auf *spot 2* hingegen kommt es durch den mit Lysozym versetzten Wein zu keinem konzentrationsabhängigen Signal, welches zudem unterhalb von 1 RU liegt. Durch eine analog durchgeführte Vermessung einer Ovalbuminkonzentrationsreihe in Wein (siehe 8.4) konnte das bei biologisch aktiven Antikörpern zu erwartende, gegenteilige Bild mit konzentrationsabhängigen Signalen auf *spot 2* und Signalen unterhalb von 1 RU auf *spot 1* erzeugt werden.

Um die Spezifität der antikörperbasierten Biosensoren hinsichtlich der Interaktion mit anderen Proteinen zu untersuchen, wurden entsprechende Lösungen in Wein hergestellt, vermessen und das Signal während der Dissoziationszeit zur Auswertung herangezogen. Wie in Abbildung 24 gut zu erkennen ist, zeigten bei einer Konzentration von 0,25 ppm die entsprechenden Antigene Lysozym (links) und Ovalbumin (rechts) die höchsten Signale. Bei allen anderen Proteinen ergaben sich nach der Referenzierung zur blockierten Sensoroberfläche negative Werte, sodass davon auszugehen ist, dass die immobilisierten Antikörper keine Affinität zu diesen Proteinen zeigen. Da nach der Injektion der Proteine auf dem Referenzkanal (belegt mit dem Blockierungsreagenz Ethanolamin) ein größeres Signal zu beobachten war, kann außerdem geschlussfolgert werden, dass die unspezifische Anlagerung an die immobilisierten Antikörper sogar unterbunden wird.

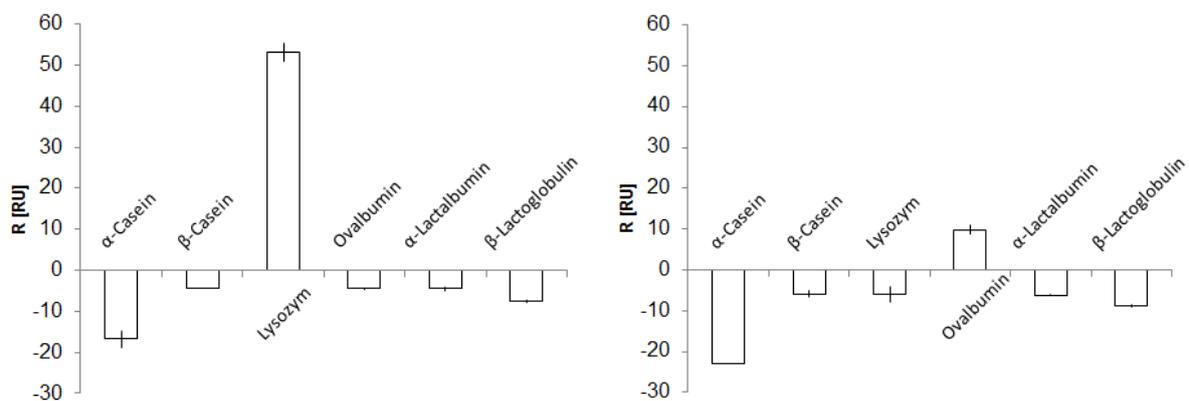


Abbildung 24: Spezifität antikörperbasierter Biosensoren zur Detektion von Lysozym und Ovalbumin.

Unter Verwendung von PBS (+0,5 % Tween-20) als Laufpuffer wurden unterschiedliche Proteine (α -Casein, β -Casein, Lysozym, Ovalbumin, α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin; 25 μ L in Wein, 0,25 ppm $n = 2$) mit den auf dem Lysozym-Antikörper (links) beziehungsweise Ovalbumin-Antikörper (rechts) basierenden Biosensoren untersucht. Zur Auswertung wurde das Signal in der Mitte der Dissoziationszeit nach Referenzierung zur Sensoroberfläche (blockiert mit Blockierungsreagenz Ethanolamin) verwendet.

Die in vorangegangenen Arbeiten im Rahmen von *Western Blottings* beobachtete Kreuzreaktivität des Ovalbumin-Antikörpers zu Lysozym konnte unter den gegebenen Bedingungen nicht reproduziert werden. (25,100) Dies kann möglicherweise auf die kurze Kontaktzeit (60 s) zurückgeführt werden, da im Rahmen der Immunodetektion üblicherweise deutlich längere Inkubationszeiten genutzt werden (1 h). Erwähnenswert ist des Weiteren, dass obwohl eine deutlich größere Menge an Ovalbumin-Antikörpern auf der entsprechenden Sensoroberfläche immobilisiert werden konnte, das resultierende Signal während der Dissoziationszeit selbst bei dem entsprechenden Antigen Ovalbumin nur im Bereich von 10 RU liegt. Obwohl Lysozym mit einem Molekulargewicht von 14,4 kDa nur ungefähr ein Drittel der Masse von Ovalbumin (42,8 kDa) ausmacht und ca. 2000 pg weniger Lysozym-Antikörper immobilisiert werden konnten, ist das entsprechende Signal von Lysozym um den Faktor fünf größer. Somit kann der zu Beginn der Methodenentwicklung vermutete Zusammenhang zwischen der Menge an kovalent gebundenen Immunglobulinen und der Sensitivität des Biosensor nicht über unterschiedliche Antikörper hinweg gezogen werden.

5.1.2.2 Validierung

Nachdem SPR-basierte Biosensoren unter Erhalt der Affinität und Spezifität von Antikörpern hergestellt werden konnten und sowohl Detektion als auch Auswertung von Realproben möglich erscheinen, sollten im Folgenden verschiedene Validierungen durchgeführt werden. Da sich in der vorliegenden Arbeit zeigte, dass der Lysozym-Antikörper eine geringfügig höhere Affinität aufweist und trotz der in geringerem Maße erfolgten Immobilisierung auf der SPR-Sensoroberfläche stärkere Signale generiert werden konnten, wurden die folgenden Untersuchungen durch antikörperbasierte Biosensoren zur Detektion von Lysozym durchgeführt. Dies ist auch unter Berücksichtigung der in vorangegangenen Arbeiten durchgeführten Untersuchungen zur Depletion von Behandlungs- und Schönungsmitteln aus dem Lebensmittel Wein sinnvoll. Es konnte dort gezeigt werden, dass zwar verschiedene önologische Verfahren einsetzbar sind, um die Konzentration des Allergens Ovalbumin zu reduzieren, für Lysozym jedoch nur auf der Fällung durch Bentonit basierende Verfahren für eine signifikante Reduktion geeignet sind.(21,24)

Da von der OIV zur Untersuchung von allergenen Rückständen in Wein eine Nachweisgrenze von 0,25 ppm sowie eine Bestimmungsgrenze von 0,5 ppm durch die entsprechenden Methoden erreicht werden muss (siehe auch 3.2.1), sollten zunächst diese Parameter bestimmt werden. Wie bereits bei der Bestimmung der Dissoziationskonstante wurde zunächst PBS (+0,5 % Tween-20) als Lauf- und Probenpuffer eingesetzt, da es sich bei Antikörpern um Proteine handelt und diese innerhalb eines Organismus unter den entsprechenden physiologischen Bedingungen mit den Antigenen interagieren. Somit soll durch das Puffersystem PBS, welches hinsichtlich der Ionenkonzentrationen und des pH-Wertes die entsprechenden Bedingungen abbildet, die maximale Leistungsfähigkeit des Biosensors gezeigt werden. Zur Auswertung wurde, da, wie in Abbildung 23 dargestellt, bei Realproben nur nach Abschluss der Injektion auswertbare Signale erhalten werden können, auch hier der Mittelwert von drei Zeitpunkten in der Mitte der Dissoziationszeit genutzt.

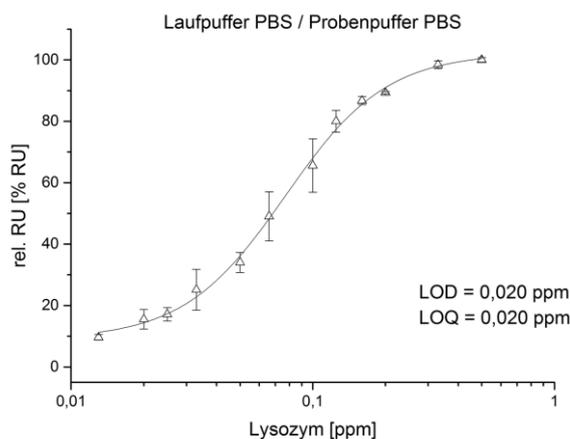


Abbildung 25: Regression des antikörperbasierten Biosensors zur Detektion von Lysozym in PBS.

Für die Erstellung der Abbildung wurden mit dem antikörperbasierten Biosensor zur Detektion von Lysozym unterschiedliche Verdünnungsreihen von Lysozym (0,013/0,02/0,025/0,033/0,05/0,066/0,1/0,125/0,16/0,2/0,33/0,5 ppm, je 50 µL, Lauf- und Probenpuffer: PBS (+0,5 % Tween-20)) vermessen und der Mittelwert des Signals zu drei Zeitpunkten nach Abschluss der Injektion (Dissoziationszeit) aus den Sensogrammen extrahiert. Die erhaltenen Daten wurden auf den Mittelwert der höchsten Konzentration normiert, sodass durch die Software OriginPro 9.0G eine Regression unter Verwendung der 4-Parameter-Regression berechnet werden konnte. LOD = Nachweisgrenze (engl.: *limit of detection*), LOQ = Bestimmungsgrenze (engl.: *limit of quantification*).

Obwohl unter Verwendung desselben Sensorchips zur Untersuchung mehrerer Messreihen nur geringfügige (relative) Signalverschiebungen zu beobachten sind, kann diesem Zusammenhang durch eine Normierung der Daten begegnet werden. Bei allen Auswertungen im Rahmen der Biosensoruntersuchungen wurde deswegen der Mittelwert der höchsten, in die Berechnungen miteinbezogenen Konzentration als 100 % festgelegt und alle anderen Daten entsprechend umgerechnet. Wie auch in der anhand der resultierenden Mittelwerte und Standardabweichungen erstellten Abbildung 25 gut zu erkennen ist, ergibt sich, wie es bei immunologischen Verfahren häufig zu beobachten ist, ein sigmoidaler Signalverlauf bei halblogarithmischer Auftragung der Daten. Zur Erstellung einer Regression wurde deswegen auf die auch bereits in vorangegangenen Arbeiten genutzte 4-Parameter-Regression ($y = \frac{A-D}{1+\frac{x}{C}} + D$, mit $y = \text{Signal [rel. RU]}$ A = untere Asymptote, B = Steigung im Wendepunkt C, D = obere Asymptote, $x = \text{Konzentration [ppm]}$) zurückgegriffen, welche unter Verwendung der Software OriginPro 9.0G durch Minimierung der Differenz zwischen Regressionsfunktion und Datenpunkten die Bestimmung der Variablen ermöglicht.(34,100) Dieser Ansatz ist besonders deswegen von Vorteil, weil durch die asymptotische Annäherung an den Grenzen des Messbereiches auch diese Bereiche zur Auswertung herangezogen werden können.(34,100)

Die resultierende Regressionsfunktion (siehe Abbildung 25 und 8.4) kann im Anschluss genutzt werden, um nach der Vermessung mehrerer Nullproben ($n=19$) unter Verwendung des Mittelwerts der Nullproben (MW_0) sowie der Standardabweichung der Nullproben (SD_0) die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (LOD & LOQ, engl.: *limit of detection* & *limit of quantification*) abzuschätzen:

$$\text{LOD} = MW_0 + 3 \times SD_0 \quad (6)$$

$$\text{LOQ} = MW_0 + 9 \times SD_0 \quad (7)$$

Des Weiteren können unter Verwendung der Regressionsfunktion Wiederfindungen berechnet werden, indem die mit dieser Funktion berechnete Konzentration mit der realen Konzentration unterschiedlicher Kalibrationspunkte verglichen wird (siehe 6.2.5). Da sich in diesem Kontext zeigte, dass die niedrigste im Rahmen der Verdünnungsreihen untersuchte Konzentration von 0,013 ppm zwar rechnerisch oberhalb des nach Formel (6) berechneten LOD liegt, hier aber lediglich eine Wiederfindung von 53,55 % berechnet werden konnte, wurde die nächsthöhere Konzentration von 0,020 ppm (Wiederfindung 110,00 %) als LOD definiert. Als LOQ ergab sich rechnerisch ein Wert 0,009 ppm, unter Berücksichtigung der Wiederfindung (siehe 8.4) wurde auch hier der nächste Kalibrationspunkt von 0,020 ppm als LOQ definiert. Durch den sigmoidalen Kurvenverlauf infolge der Sättigung der verfügbaren Bindungsstellen auf der Sensoroberfläche und Berücksichtigung der in diesem Bereich berechneten Wiederfindung von 90,65 % (siehe auch Tabelle 8) kann auch das obere Ende des Messbereiches abgeschätzt werden, welches unter Verwendung von PBS (+ 0,5 % Tween-20) als Lauf- und Probenpuffer und einem Injektionsvolumen von 50 μL bei ungefähr 0,5 ppm liegt.

Tabelle 8: Wiederfindung antikörperbasierter Biosensor zur Detektion von Lysozym in PBS.

Konzentration [ppm]	Wiederfindung [%]
0,5	90,65
0,1	94,75
0,02	110,00

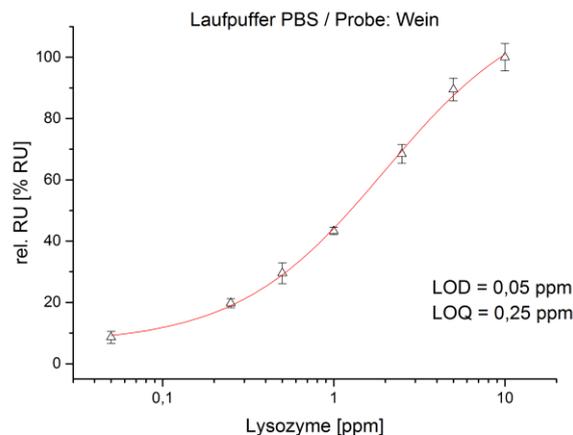


Abbildung 26: Regression des antikörperbasierten Biosensors zur Detektion von Lysozym in Wein.

Für die Erstellung der Abbildung wurden mit dem antikörperbasierten Biosensor zur Detektion von Lysozym unterschiedliche Verdünnungsreihen von Lysozym (100/10/5/2,5/1/0,5/0,25/0,05 ppm) in Wein (Monfleur, Eigenschaften 6.1) vermessen und der Mittelwert des Signals zu drei Zeitpunkten nach Abschluss der Injektion (Dissoziationszeit) aus den Sensogrammen extrahiert. Als Laufpuffer wurde weiterhin PBS (+0,5 % Tween-20) eingesetzt, die Proben (25 µL) bestanden jedoch aus Wein, welcher mit Lysozym versetzt wurde. Die erhaltenen Daten wurden auf den Mittelwert der höchsten Konzentration normiert, sodass durch die Software OriginPro 9.0G eine Regression unter Verwendung der 4-Parameter-Regression berechnet werden konnte. LOD = Nachweisgrenze (engl.: *limit of detection*), LOQ = Bestimmungsgrenze (engl.: *limit of quantification*).

Da es sich bei der Antikörper-Antigen-Interaktion wie bei allen chemischen Reaktionen um ein Gleichgewicht handelt, die Rückreaktion aufgrund der geringen Dissoziationskonstante jedoch zu vernachlässigen ist, kann davon ausgegangen werden, dass durch eine Steigerung des injizierten Volumens auch eine Detektion von geringeren Konzentrationen umsetzbar ist. Da sowohl die Nachweis- als auch die Bestimmungsgrenze bei dem Einsatz von PBS (+0,5 % Tween-20) als Lauf- und Probenpuffer deutlich unter den von der OIV festgelegten Anforderungen liegen, sind für die Untersuchung von Realproben trotz der nicht physiologischen Bedingungen Optimierungen denkbar. So ist zwar aufgrund des zur Regeneration eingesetzten Precondition I-Puffers, eine Denaturierung der immobilisierten Immunglobuline aufgrund des sauren pH-Wertes eher nicht zu erwarten. Da Wein jedoch in nicht unerheblichem Maß Polyphenole enthält, wurde für die Untersuchung der Weinproben ein verringertes Probenvolumen von 25 µL eingesetzt, sodass bei der für alle Untersuchungen eingesetzten Fließgeschwindigkeit von 25 µL/min eine Kontaktzeit der Probe mit dem Sensor von lediglich einer Minute resultiert. Durch Untersuchung von Verdünnungsreihen und Weinproben ohne Lysozym (n=13) konnten analog zur Bestimmung in PBS, eine Regressionsfunktion (siehe Abbildung 26 und 8.4) sowie eine Nachweisgrenze von 0,05 ppm und eine Bestimmungsgrenze von 0,25 ppm erreicht werden. Die Wiederfindung im Bereich des LOD liegt zwar nur bei 77,37 %, ab dem LOQ konnte jedoch wieder ein Wert von 107,39 % erreicht werden (siehe Tabelle 9). Obwohl auch in diesem Kontext nicht die mathematisch berechneten Werte (LOD = 0,01 ppm; LOQ = 0,08 ppm), sondern die entsprechenden nächsthöheren Kalibrationsstandards als Grenzen definiert wurden, konnten die Anforderungen der OIV erfüllt werden. Die Reduktion des untersuchten Volumens führte dazu, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit die hergestellten

Tabelle 9: Wiederfindung antikörperbasierter Biosensor zur Detektion von Lysozym in Wein.

Konzentration [ppm]	Wiederfindung [%]
10	94,32
1	96,81
0,25	107,39
0,05	77,37

Biosensoren alle für deutlich mehr als 500 Untersuchungen ohne eine erkennbare Denaturierung oder einen deutlichen Sensitivitätsverlust für die direkte Detektion ohne Probenaufarbeitung eingesetzt werden konnten.

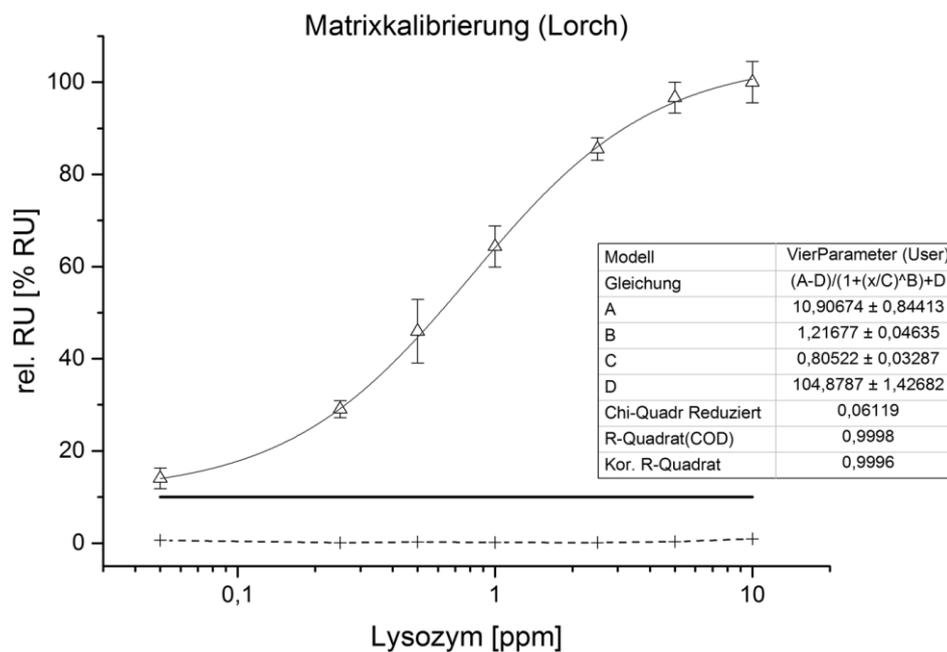


Abbildung 27: Matrixkalibrierung Weißwein.

Anwendung des antikörperbasierten SPR-Biosensors zur Detektion von Lysozym (10/5/2,5/1/0,5/0,25/0,05 ppm) in Weißwein (Lorch, Eigenschaften 6.1). Die Messwerte der unterschiedlichen Messungen ($n \geq 3$) wurden normiert, die resultierenden Mittelwerte sowie Standardabweichungen zur Berechnung einer Regression unter Verwendung der 4-Parameter-Gleichung genutzt. Die gepunktete Linie stellt den Verlauf des relativen Fehlers dar, die durchgezogene schwarze Linie ist zur Verdeutlichung eines Niveaus von 10 % eingezeichnet.

Um auch die Anwendbarkeit des antikörperbasierten Biosensors in anderen Weinen als dem zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze eingesetzten Weins zu demonstrieren, wurden weitere aus dem Handel bezogene Weine mit Lysozym versetzt und untersucht. Auch in diesem Kontext wurden die in Mehrfachbestimmung erhaltenen Daten auf die höchste untersuchte Konzentration normiert, die resultierenden Mittelwerte und Standardabweichungen halblogarithmisch aufgetragen und Regressionen unter Nutzung der 4-Parameter-Gleichung berechnet. Die erhaltenen Daten sind beispielhaft in Abbildung 27 und 8.4 dargestellt, die berechneten Bestimmtheitsmaße (in Abbildung 27 R-Quadrat) zeigen die hohe Korrelation zwischen den Daten und den Regressionen an.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Messbereich, in welchem mit dem entwickelten Biosensor eine Detektion erfolgen kann, unter Berücksichtigung des sigmoidalen Kurvenverlaufs und den resultierenden Wiederfindungen definiert. Bei den in vorangegangenen Arbeiten entwickelten ELISA-Methoden wurde dieser Bereich durch Betrachtung des relativen Fehlers definiert.(34,100) Dafür wurde zu jedem Zeitpunkt die Standardabweichung der Kalibrationsstandards in Relation zur Steigung der Regressionsgerade in diesem Bereich betrachtet (siehe 6.2.5) und mit einem im Vorfeld definierten Schwellenwert (20 %) verglichen. Durch diesen Ansatz wird einerseits berücksichtigt, dass Schwankungen der Messwerte besonders an den Rändern des Messbereiches zu starken Verzerrungen führen können. Des Weiteren handelt es sich beim ELISA im Gegensatz zur SPR-Spektroskopie um eine Methode, welche durch eine Vielzahl an unterschiedlichen Schritten

und eine entsprechenden Vielzahl an Einflussfaktoren gekennzeichnet ist, sodass dieser eine größere Zahl an Unsicherheitsfaktoren berücksichtigende Ansatz erforderlich wird. Obwohl dieser Ansatz nicht zur Beurteilung des entwickelten Biosensors genutzt wurde, ist auch anhand der für die unterschiedlichen Weine berechneten Präzisionsprofile (Verlauf des relativen Fehlers, siehe Abbildung 27 und 8.4) gut zu erkennen, dass die Methode auch strengeren Anforderungen mit einem maximalen relativen Fehler von 10 % entspricht.

Sämtliche Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden unter Verwendung von Weißwein als Matrix durchgeführt, eine Adaption des antikörperbasierten Biosensors auf Rotweine erscheint jedoch denkbar. Der für diese Weine charakteristischerweise hohe Gehalt an Polyphenolen könnte durch Verdünnungen soweit abgesenkt werden, dass eine Denaturierung der immobilisierten Immunglobuline unterbunden wird. Zwar kommt es durch diese Vorgehensweise auch zu einer Verringerung des absoluten Gehaltes der zu untersuchenden Allergene, durch eine Anpassung der injizierten Volumina erscheint es aber durchaus denkbar eine Adaption zu etablieren.

5.2 Aptamere

5.2.1 Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment

Die Entwicklung von Aptameren erfolgt über einen sogenannten SELEX-Prozess, welcher im Rahmen dieser Arbeit durch eine *just in time-Selection* durchgeführt wird. Diese Vorgehensweise der Durchführung wurde in Zusammenarbeit mit einer vorangegangenen Arbeit durchgeführt und publiziert.(59,60) Durch die Nutzung eines programmierbaren, magnetischen Separators, dem KingFisher Duo, und die Kombination mit dem BEAMing-Verfahren (engl.: *beads, emulsion, amplification, magnetic*, siehe 5.2.1.2 und 6.2.3.2) können, bei gleichzeitiger Reduktion des Aufwands an Zeit und Anzahl der Arbeitsschritte, Selektionsprozesse für bis zu 12 *Targets* parallel durchgeführt werden.(60)

5.2.1.1 Vorbereitung

Als *Targets* für die in dieser Arbeit durchgeführten SELEX-Prozesse wurden Lysozym, Ovalbumin sowie die bovinen Caseine ausgewählt, da es sich hierbei um Allergene handelt welche im Rahmen der Weinherstellung eingesetzt werden, aber nicht, wie beispielsweise Fischgelatine, von einer Ausnahmeregelung im Hinblick auf die Kennzeichnung betroffen sind. Alle Proteine sind als Isolate aus Huhn (Lysozym, Ovalbumin) beziehungsweise Rind (Casein) kommerziell erhältlich, sodass entsprechende Präparate eingesetzt wurden. Zur Kontrolle, ob signifikante Kontaminationen mit anderen Proteinen vorliegen, wurden die Präparate mittels denaturierender SDS-PAGE (siehe 6.2.1.2) analysiert (Abbildung 28). Im Ovalbuminpräparat (Abbildung 28, Bahn 2) sind sowohl oberhalb als auch unterhalb der durch Ovalbumin gebildeten Bande Proteinfragmente zu erkennen, es könnte sich hierbei sowohl um Fragmente als auch um Agglomerate handeln. Diese erscheinen jedoch quantitativ im Vergleich zum Ovalbumin vernachlässigbar. Bei den bovinen Caseinen (Abbildung 28, Bahn 3) sind die unterschiedlichen Proteine zu erkennen. Die zu erwartende Doppelbande bei ca. 23,0 kDa (α -Casein) beziehungsweise ca. 23,6 kDa (β -Casein) ist zu erkennen, ebenso die leicht abgesetzte Bande bei ca. 19,0 kDa durch κ -Casein (siehe auch Abbildung 62). In allen Präparaten sind die zu erwartenden Banden im Gegensatz zu eventuell

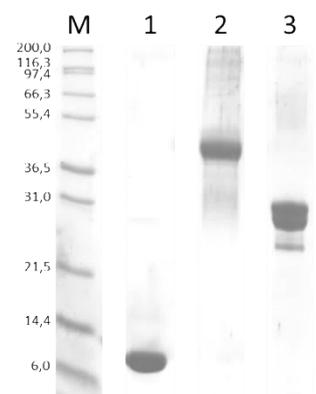


Abbildung 28: SDS-PAGE der zur SELEX eingesetzten Proteine.

Dargestellt ist eine SDS-PAGE von Lysozym (1, 14,3 kDa), Ovalbumin (2, 42,8 kDa) und Casein (3, 19,0 – 24,3 kDa). Leichte Verschiebung der Banden durch Randeffekte. M = Marker, Färbung Coomassie-Blue.

signifikanten Verunreinigungen eindeutig zu erkennen. Die Präparate wurden im weiteren Verlauf der Arbeit eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit sollten Aptamere entwickelt werden, welche eine aptamerbasierte Analytik von Lysozym, Ovalbumin und den bovinen Caseinen in Weißwein ermöglichen. Dementsprechend muss die nicht-kovalente Bindung zwischen den einzelsträngigen Oligonukleotiden und den *Targets* unter diesen Bedingungen stabil sein. Die dreidimensionalen Strukturen, welche durch intramolekulare Basenpaarungen gebildet werden und die Interaktion zwischen den beiden Bindungspartnern beeinflussen (Schlüssel-Schloss-Theorie, siehe auch 3.3), werden durch die Ionen aus dem umgebenden Medium beeinflusst.(54) Die Bedingungen bei der Inkubation von Aptamerpool und *Target* im Rahmen des SELEX-Prozesses sollten dementsprechend möglichst ähnlich zu den Bedingungen gewählt werden, welche in Wein zu erwarten sind. Eine Möglichkeit wäre die Auswahl eines geeigneten Modellweines, welcher im Rahmen der SELEX als Inkubationsmedium genutzt wird. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich bei Wein um ein Naturprodukt handelt, welches darüber hinaus auch heute noch häufig in Kleinbetrieben hergestellt wird. Dementsprechend sind chargen- und teilweise flaschenabhängige Schwankungen zu erwarten. Kontinuierlich vergleichbare Bedingungen können durch Festlegung auf ein definiertes Puffersystem erreicht werden, sodass aus der Literatur typische Zusammensetzungen für Weißweine zusammengetragen wurden. So ist Belitz et al. zu entnehmen, dass Weißweine im Mittel 1,8 bis 2,5 g/L Asche enthalten, welche wie in Tabelle 10 angegeben zusammengesetzt ist.(4) Anhand dieser Werte konnten die minimalen und maximalen Gehalte verschiedener Ionen in Wein berechnet, mit den Werten für Weißwein nach Souci, Fachmann und Kraut verglichen und ein arithmetisches Mittel gebildet werden (Tabelle 11).(104)

Tabelle 10: Mineralstoffzusammensetzung der Weinasche.

Angegeben ist die Mineralstoffzusammensetzung der Asche von Wein nach Belitz et al. (4)

Komponente	Gehalt [%]
K ₂ O	40
MgO	6
CaO	4
Na ₂ O	2
Al ₂ O ₃	1
CO ₂	18
P ₂ O ₅	16
SO ₃	10
Cl	2
SiO ₂	1

Tabelle 11: Mineralstoffzusammensetzung Wein.

Dargestellt sind die Gehalte an verschiedenen Ionen im Wein. Die Werte nach Belitz et al. wurden berechnet anhand der Mineralstoffzusammensetzung der Weinasche (siehe Tabelle 10) und dem mittleren Aschegehalt.(4) Die Werte nach Souci, Fachmann und Kraut wurden dem entsprechenden Nachschlagewerk entnommen.(104)

Ion	Gehalt [mmol/L]				arithmetisches Mittel [mmol/L]	Gehalt im Weißweinpuffer [mmol/L]
	nach Belitz et al.		nach Souci, Fachmann, Kraut			
	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum		
Na	1,16	1,61	0,22	1,74	1,18	1
K	15,29	21,24	16,88	23,54	19,24	20
Mg	1,67	2,32	2,47	6,17	3,16	3,5
Ca	0,75	1,04	2,00	2,75	1,64	1,5
Mn	-	-	0,00	0,05	0,03	0
P	4,06	5,64	3,23	6,47	4,85	5
Cl	1,02	2,82	0,56	2,26	1,66	1,5

Zwar ist zu berücksichtigen, dass nicht alle Ionen im Wein frei vorhanden sind, da es beispielsweise durch Polyphenole oder organische Säuren zur Bildung von Komplexen kommen kann. Es ist jedoch davon auszugehen, dass der wesentliche Teil in der Lage ist, eine Interaktion mit den Aptameren einzugehen. Das dominierende Ion im Weißwein stellt Kalium dar, auch Magnesium ist im Vergleich zu den anderen Kationen in höherer Konzentration vorhanden. Da von beiden Ionen bekannt ist, dass diese mit DNA interagieren (beispielsweise Stabilisierung von G-Quadruplexen durch Kalium), wurden die Gehalte im Weißweinpuffer leicht über dem arithmetischen Mittel von Weißwein angesetzt.(45,47)

Auf den Zusatz von Polyphenolen, Kohlenhydraten oder Proteinen zum Weißweinpuffer wurde verzichtet, um eine Bindung und einen daraus resultierenden Verlust von Aptameren durch diese Moleküle zu minimieren. Da die Vielfalt der organischen Säuren nicht adäquat abgebildet werden kann, wurde diese in ihrer Gesamtheit (26 – 60 mmol/L) durch Essigsäure (24,5 mmol/L) substituiert, wodurch auch ein Ausgleich der Ladungen möglich war.(4) DNA weist in Anwesenheit von hohem Ethanol- (70 %-vol.) und Ionenkonzentrationen eine verringerte Löslichkeit auf, was auch zur Aufreinigung von DNA eingesetzt werden kann.(105) Zwar werden im Wein die üblicherweise für diesen Zweck eingesetzten Konzentrationen nicht erreicht, es sollen jedoch trotzdem unvorhersehbare Effekte vermieden werden. Da der Ethanolgehalt von Weinen jedoch in Abhängigkeit vom Zuckergehalt der eingesetzten Trauben und der Möglichkeit zur vorzeitigen Beendigung der Gärung variiert, kann durch den hinzugefügten Gehalt von 10,9 %-vol. (Mittelwert Weißwein) nur eine Näherung erreicht werden.(104,105) Der pH-Wert des Puffers wurde auf 3,2 festgelegt und mit Schwefelsäure eingestellt. Dieser Wert liegt innerhalb des für Wein zu erwartenden Bereiches (2,8 – 3,8) und kann gegebenenfalls durch Zugabe von Schwefelsäure auch bei Realproben leicht erreicht werden. Um das Ionenungleichgewicht nicht durch die pH-Wert-Einstellung zu verschieben, wurde auf Schwefelsäure zurückgegriffen. Die finale Zusammensetzung des eingesetzten Weißweinpuffers ist in Tabelle 32 (6.1) dargestellt.

Im Rahmen der Vorbereitung des SELEX-Prozesses müssen die *Targets* so modifiziert werden, dass sie durch den magnetischen Separator, welcher bei der Durchführung der *just in time-Selection* für Inkubation, Waschschritte und Elution eingesetzt wird, bewegt werden können (siehe 5.2.1.2). Inerte Silicapartikel mit magnetischen Eigenschaften und unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen sind kommerziell erhältlich, sodass eine Immobilisierung und Magnetisierung von unterschiedlichsten Molekülen möglich wird. Da während des Selektionsprozesses unterschiedliche pH-Werte und Ionenkonzentrationen sowie hohe Temperaturen eingesetzt werden, erscheint es sinnvoll eine kovalente Bindung zu etablieren, um so eine unbeabsichtigte Trennung von *Target* und *Bead* zu vermeiden. Wie bei allen Proteinen, sind auch bei Lysozym, Ovalbumin und den Caseinen die einzelnen Aminosäuren untereinander durch Peptidbindungen verknüpft. Die Stabilität dieser Makromoleküle unter den Bedingungen im Wein (pH-Wert, Ionenkonzentration) erscheint im Hinblick auf die Stabilität von Proteinen in Wein gegeben, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Verbindung von Carbonsäuren und primären Aminen auch im eingesetzten Weinpuffer stabil ist. Die Immobilisierung (siehe 6.2.1.1) erfolgte deswegen unter Verwendung von magnetischen Partikeln mit Carboxylmodifikationen auf der Oberfläche, sodass mit den primären Aminen aus den Seitenketten unterschiedlicher Aminosäuren (Arginin, Asparagin, Glutamin, Lysin) eine Carboxamidbindung (=Peptidbindung) ausgebildet werden konnte. In Anwesenheit primärer Amine kommt es somit zur Bildung von Carbonsäureamiden und der kovalenten Immobilisierung der *Targets* auf der Oberfläche der magnetischen Partikel. Verbliebene Bindungsstellen wurden durch den Zusatz von Ethanolamin blockiert.

Ob die Kopplung erfolgreich verlief, sollte zuerst durch einen qualitativen, antikörperbasierten Assay untersucht werden (siehe 6.2.1.3), die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt. Als Negativkontrolle wurden *Beads* eingesetzt, welche nur mit dem Blockierungsreagenz Ethanolamin belegt sind (*Gegen-Beads*). Es ist zu erkennen, dass die Immobilisierung prinzipiell bei allen *Targets* erfolgreich durchgeführt werden konnte, da die Absorptionen des Überstands der jeweiligen *Targets-Beads* größer als die Absorption der mit dem Blockierungsreagenz Ethanolamin belegten *Gegen-Beads* sind. Die durch die *Gegen-Beads* induzierte Absorption bei Verwendung des Ovalbumin-Antikörpers ist höher als bei den anderen Antikörpern, was möglicherweise auf eine Affinität dieses Antikörpers zu Ethanolamin zurückzuführen ist. Da jedoch durch die Ovalbumin-*Beads* ein deutlich höheres Signal generiert werden konnte, ist auch hier von einer erfolgreichen Immobilisierung auszugehen. Kritisch zu bewerten ist die Immobilisierung der bovinen Caseine. Zwar liegt auch hier die durch die *Target-Beads* induzierte Absorption über der der *Gegen-Beads*, der Unterschied fällt jedoch deutlich geringer aus als bei Lysozym und Ovalbumin. Dies könnte andeuten, dass deutlich weniger Protein immobilisiert werden konnte, was vermutlich unter anderem auf die geringe Löslichkeit der Caseine und die deswegen eingesetzten, größeren Volumina bei Herstellung der *Beads* zurückzuführen ist. Da jedoch ein Unterschied zwischen den jeweiligen Partikeln erkennbar ist und eine Optimierung der *Target-Bead*-Herstellung nicht erfolgreich etabliert werden konnte, wurden auch diese im weiteren Verlauf für die SELEX eingesetzt (siehe 5.2.1.2).

Tabelle 12: Ergebnisse antikörperbasierter *Target*-Nachweis.

Dargestellt sind die photometrischen Messungen des Überstandes bei 450 nm (n=3). Auf den *Target-Beads* wurde jeweils das in Spalte 1 enthaltene Antigen immobilisiert, die *Gegen-Beads* wurden mit Ethanolamin belegt.

Antigen primärer Antikörper	Absorption Überstand (450 nm)	
	<i>Target-Bead</i>	<i>Gegen-Bead</i>
Lysozym	1,00	0,12
Ovalbumin	1,05	0,47
bovine Caseine	0,32	0,25

Als weitere Methode zum Nachweis der Proteinimmobilisierung wurde die Massenspektrometrie genutzt, die Vorgehensweise wurde in Anlehnung an eine an der Universität Hamburg bestehende Arbeitsvorschrift entwickelt (siehe 6.2.1.4). Im Rahmen der Aufarbeitung wurden die *Target-Beads* mit DTT (Dithiotreitol) und Iodacetamid behandelt, sodass die Thiolgruppen aus den Disulfidbrücken innerhalb der Proteine gespalten werden. Durch den Einsatz von Trypsin wurden im Anschluss die Peptidbindungen auf der carboxyterminalen Seite der Aminosäuren Arginin und Lysin gespalten, sodass eine Degradierung zu definierten Peptiden erfolgte.(106,107) Da durch einen *in silico*-Verdau ermittelt werden konnte, dass trotz des Einsatzes von Trypsin relativ große Fragmente zu erwarten sind und eine Fragmentierung der Peptide nicht angestrebt war, wurde für die Analyse auf ein zur Verfügung stehendes MALDI-TOF (engl.: *matrix-assisted laser-desorption/ionisation-time of flight*) zurückgegriffen. Die durch diese Methode erzeugten Massenspektren wurden für die Auswertung mit den laut des *in silico*-Verdau zu erwartenden Signalen verglichen. Sowohl bei Lysozym als auch bei Ovalbumin konnten mehrere Signale detektiert werden, die Ergebnisse sind in Tabelle 13 und Tabelle 14 dargestellt. Der Nachweis der bovinen Caseine über diese Methode war nicht erfolgreich, dies ist wahrscheinlich auf zu geringe Mengen an Peptiden, sowohl bei der Immobilisierung als auch nach dem tryptischen Verdau, zurückzuführen.

Tabelle 13: Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen der Lysozym-Beads.

Angegeben sind die Sequenzen der durch einen *in silico*-Verdau vorhergesagten Peptide, sowie die resultierenden monoisotopischen Massen [(M+H⁺) und gegebenenfalls (M+CAM+H⁺)] (http://web.expasy.org/peptide_mass/; Bedingungen: 0 missed cleavages, Trypsin, cysteines treated with iodoacetamide, minimale Größe 500 kDa). In Spalte 4 ist entweder angegeben, ob die Masse im Spektrum detektiert werden konnte (Ja, mit der detektierten Masse in Klammern) oder nicht (Nein). Als Entscheidungskriterium wurde eine maximale Abweichung von 0,1 festgelegt. Bei den vorhandenen Massen ist in Spalte 5 die Signalintensität und in Spalte 6 das *signal-to-noise*-Verhältnis angegeben. CAM = Carboxyamidomethylcystein.

Peptid	Masse (M+H ⁺)	Masse (M+CAM+H ⁺)	Vorhanden [m/z]	Intensität [counts]	Signal/Noise
NLCNIPCSALLSSDITASVNCAK	2337,125	2508,189	Ja (2508,180)	703	5,9
NTDGSTDYGIQINSR	1753,835		Ja (1753,848)	307480	1809,6
IVSDGNGMNAWVAWR	1675,801		Nein		
FESNFNTQATNR	1428,650		Ja (1428,598)	106626	574,8
GYSLGNWVCAAK	1268,609	1325,631	Nein		
GTDVQAWIR	1045,543		Ja (1045, 460)	6793	35,5
WWCNDGR	936,378	993,400	Ja (993,316)	13052	67,1
HGLDNYR	874,417		Ja (874,333)	2804	14
CELAAAMK	836,400	893,422	Ja (893,391)	831	4,2
TPGSR	517,273		Nein		

Bei der Analyse der Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung der Lysozym-Beads ist zu erkennen, dass mehrere der durch den *in silico*-Verdau vorhergesagten Peptide mittels MALDI-TOF detektiert werden konnten. Von den zehn Peptiden mit einer Masse von mehr als 500 kDa konnten sieben Peptide detektiert werden, wobei zwei ein *signal-to-noise*-Verhältnis von weniger als 10 aufwiesen. Eine Quantifizierung der Peptide wurde zwar nicht angestrebt, die im Allgemeinen jedoch häufig angewendete Regel, dass hierfür ein Signal zu Rausch-Verhältnis (engl.: *signal-to-noise*) von wenigstens 9 erforderlich ist, wurde als Grenze für eine sichere Identifikation herangezogen. Der sichere Nachweis von fünf Peptiden wird aber als ausreichend angesehen, da berücksichtigt werden muss, dass sowohl die Bindung an die magnetischen Partikel über die primären Amine der Aminosäuren Lysin und Arginin stattfinden kann, als auch die Spaltung durch Trypsin direkt hinter diesen Aminosäuren erfolgt, sodass sterische Hinderungen der Protease durch die magnetischen Partikel in diesem Kontext denkbar sind.(106,107) Im Gegensatz zu bereits im Vorfeld von anderen Arbeitsgruppen durchgeführten Selektionen mit dem Ziel RNA-Aptamere mit einer Affinität zu Lysozym zu identifizieren, konnte hier ohne Biotinylierung und Nutzung von Streptavidinpartikeln eine Immobilisierung erfolgen.(75)

Auch für Ovalbumin wurde ein *in silico*-Verdau durchgeführt und mit dem nach dem tryptischen Verdau der Ovalbuminpartikel erhaltenen Massenspektrum verglichen. Von den 24 zu erwartenden Peptiden lagen fünf außerhalb des Kalibrationsbereiches (600 – 3000 kDa), alle anderen sind in Tabelle 14 angegeben. In dem erhaltenen Massenspektrum war insbesondere das Signal bei 1687,835 m/z mit einer Intensität von 19957 counts sehr dominant und konnte dem Peptid GGLEPINFQTAADQAR zugeordnet werden. Auch das Signal bei 1858,972 m/z war mit einer Intensität von 7912 recht deutlich und konnte einem weiteren Peptid zugeordnet werden, es sind in diesem Bereich des Massenspektrums jedoch noch weitere Signale zu erkennen (siehe Abbildung 29 links). Die Aufspaltung des Signales infolge unterschiedlicher Isotopenverteilungen ist bei großen Molekülen zu erwarten und konnte auch bei allen anderen Messungen beobachtet werden. Das in diesem Fall detektierte Muster entspricht jedoch nicht den Erwartungen (siehe Abbildung 29 rechts).

Insbesondere das intensive Signal bei 1857,97 m/z sowie die Signale ab 1863,95 m/z deuten an, dass in den untersuchten Proben weitere Moleküle mit ähnlichen Masse-Ladungs-Verhältnissen vorliegen.

Tabelle 14: Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen der Ovalbumin-Beads.

Angegeben sind die Sequenzen der durch einen *in silico*-Verdau vorhergesagten Peptide sowie die resultierenden monoisotopischen Massen [(M+H⁺) und (M+CAM+H⁺)] (http://web.expasy.org/peptide_mass/; Bedingungen: 0 *missed cleavages*, Trypsin, *cysteines treated with iodoacetamide*, minimale Größe 500 kDa). In Spalte 4 ist entweder angegeben, ob die Masse im Spektrum detektiert werden konnte (Ja, mit der detektierten Masse in Klammern) oder nicht (Nein, ggf. mit der nächstgelegenen Masse in Klammern). Als Entscheidungskriterium wurde eine maximale Abweichung von 0,1 festgelegt. Bei den vorhandenen Massen ist in Spalte 5 die Signalintensität und in Spalte 6 das *signal-to-noise*-Verhältnis angegeben. CAM = Carboxyamidomethylcystein.

Peptid	Masse (M+H ⁺)	Masse (M+CAM+H ⁺)	Vorhanden [m/z]	Intensität [counts]	Signal/Noise
NVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFK	2460,317		Nein		
LPFGDSIEAQCGTSVNVHSSLR	2374,146	2431,167	Nein		
VTEQESKPVQMMYQIGLFR	2284,146		Ja (2284,167)	619	8,3
DILNQITKPNDEVYFSLASR	2281,182		Ja (2281,203)	1223	16,3
EVVGSAAEAGVDAASVSEEFR	2008,946		Nein		
ELINSWVESQTNGIIR	1858,966		Ja (1858,972)	7912	95,4
ISQAVHAAHAEINEAGR	1773,899		Nein		
GSIGAASMEFCDFVFK	1708,771	1765,792	Nein		
GGLEPINFQTAADQAR	1687,840		Ja (1687,835)	19957	245,8
LTEWTSSNVMEER	1581,721		Nein		
YPILPEYLQCVK	1465,776	1522,797	Nein		
HIATNAVLFFGR	1345,738		Nein		
DEDTQAMPFR	1209,520		Nein		
ADHPFLFCIK	1190,603	1247,624	Nein		
VASMASEK	822,403		Nein		
LYAEER	780,389		Nein		
VYLPR	647,388		Nein		
GLWEK	632,340		Nein		
TQINK	603,346		Nein		

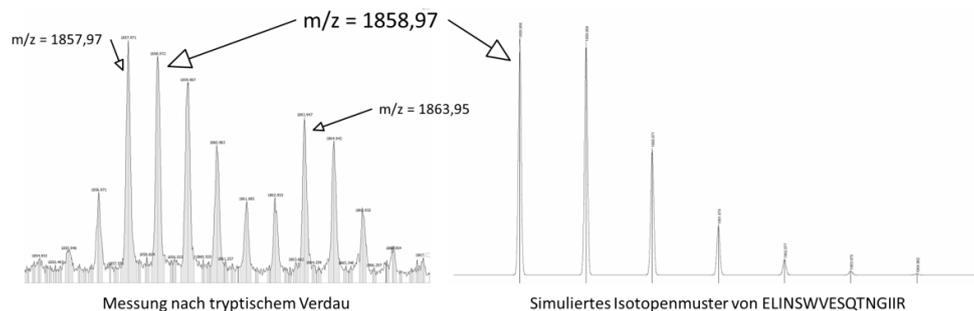


Abbildung 29: Massenspektrum und zu erwartendes Isotopenmuster des Peptids ELINSWVESQTNGIIR.

Links: Dargestellt ist das durch die Messung des tryptischen Verdau erhaltene Massenspektrum im Bereich eines Masse-Ladungs-Verhältnisses von 1858 m/z. Rechts: Dargestellt ist das zu erwartende Isotopenmuster des Peptids ELINSWVESQTNGIIR im gleichen Bereich (erstellt durch *Compass IsotopePattern*, Bruker Daltonik GmbH).

Signalüberlagerungen wurden im Spektrum auch im Bereich ab 2280 m/z detektiert, sodass auch hier die Interpretation bezüglich der in diesem Bereich vorhandenen Peptide erschwert wird (siehe Abbildung 30). So wird sowohl durch das Peptid DILNQITKPNDVYFSLASR als auch durch das Peptid VTEQESKPVQMMYQIGLFR ein Signal bei ungefähr 2284,2 m/z generiert. Diese Überlagerung führt dazu, dass das Spektrum in diesem Bereich keinem der beiden simulierten Muster entspricht und Rückschlüsse hinsichtlich der Immobilisierung erschwert werden. Insgesamt konnten im Spektrum des tryptischen Ovalbuminverdaus eine Vielzahl an Signalen detektiert werden, welche nicht den Erwartungen des *in silico*-Verdaus entsprochen haben. Es könnte sich hierbei sowohl um Verunreinigungen als auch um Fragmente der erwarteten Peptide oder des eingesetzten Trypsins handeln.

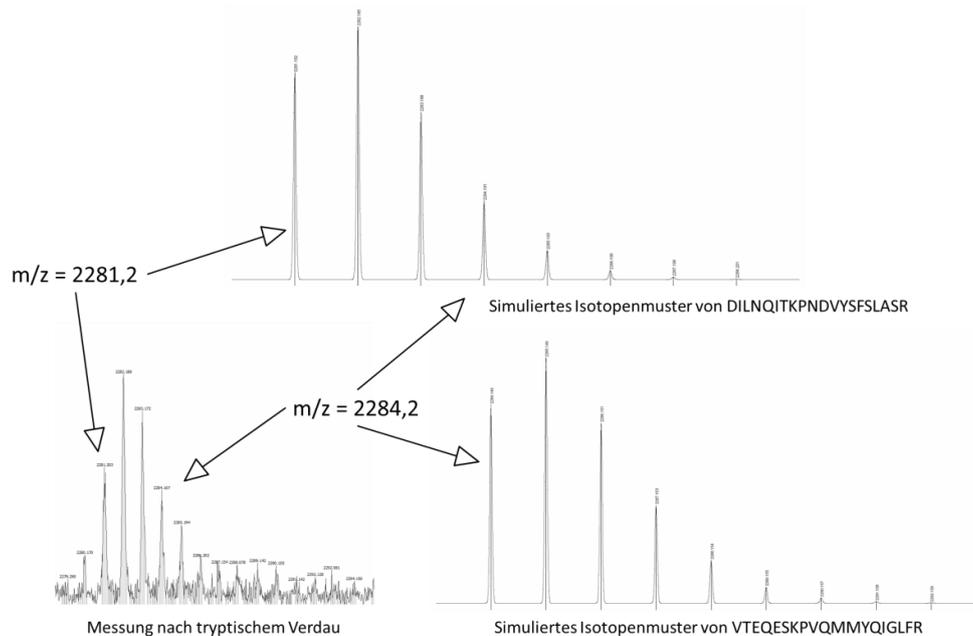


Abbildung 30: Massenspektrum und zu erwartende Isotopenmuster der Peptide DILNQITKPNDVYFSLASR und VTEQESKPVQMMYQIGLFR.

Links: Durch die Messung des tryptischen Verdaus erhaltenes Massenspektrum im Bereich eines Masse-Ladungs-Verhältnisses von 2280 m/z. Rechts: Zu erwartende Isotopenmuster der Peptide DILNQITKPNDVYFSLASR und VTEQESKPVQMMYQIGLFR (erstellt durch *Compass IsotopePattern*, Bruker Daltonik GmbH).

Die durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich der Kopplung von *Target* und magnetischen Partikeln zeigen insgesamt unterschiedliche Ergebnisse. So konnte für Lysozym durch zwei Methoden (Antikörper-Assay und MALDI-TOF) nachgewiesen werden, dass die Immobilisierung erfolgreich war. Bei Ovalbumin kann der Antikörper-Assay ebenso als positiv angesehen werden, die mittels Massenspektrometrie erzielten Ergebnisse sind durch Signalüberlagerungen und unbekannte Signale weniger eindeutig, hier sollte gegebenenfalls die Methode beispielsweise durch eine MS/MS-Messung weiterentwickelt werden. Da jedoch im Rahmen der Kopplung lediglich Ovalbumin zur Kopplung eingesetzt wurde und mehrere Peptide erfolgreich detektiert werden konnten, wurden die entsprechenden *Beads* auch im Folgenden eingesetzt. Bei der Immobilisierung der bovinen Caseine sind Zweifel angebracht, da weder über die Massenspektrometrie (keine Signale), noch über den entwickelten Antikörper-Assay die Anwesenheit der Proteine sicher nachgewiesen werden konnte. Es ist zwar denkbar, dass mit den hier genutzten Methoden aufgrund zu geringer Empfindlichkeiten kein Nachweis erfolgen konnte, dies erscheint jedoch wenig wahrscheinlich. Unter Berücksichtigung der geringen Löslichkeit von α - und den β -Caseinen in wässrigen Lösungen sollte möglicherweise eine andere Methode zur Kopplung zwischen Partikel und Protein angewendet werden.

Der Nachweis einer Kopplung hätte auch erfolgen können, indem der Proteingehalt der eingesetzten Lösungen vor und nach der Reaktion quantifiziert wird, beispielsweise unter Verwendung des Bradford- oder des Lowry-Assays. Diese Ansätze wurden jedoch verworfen, da es sich lediglich um einen indirekten Nachweis handeln würde, bei dem nicht zu unterscheiden ist, ob die Kopplung erfolgreich war oder ob es beispielsweise durch eine Adhäsion an die Oberflächen der eingesetzten Reaktionsgefäße zu einer Verringerung des Proteingehaltes gekommen ist.

5.2.1.2 Durchführung

Im Rahmen der *just in time-Selection* wird der SELEX-Prozess (siehe 3.3.1) zur Selektion von Aptameren in zwei Hauptschritte unterteilt (Abbildung 31), das FISHing (Akronym gebildet aus dem Namen des verwendeten magnetischen Separators: KingFisher Duo) und das BEAMing (engl.: *beads, emulsion, amplification, magnetic*). Die Inkubation zwischen *Target* und Aptamerpool, das Waschen zum Entfernen schwächer bindender Aptamere sowie die Elution der stärker bindenden Aptamere vom *Target* werden in diesem Kontext als FISHing zusammengefasst. Die Amplifikation der selektierten Aptamere durch eine PCR sowie die Strangtrennung der doppelsträngigen Produkte wird im BEAMing zusammengefasst. Die Entwicklung des Prozesses und die Selektion der Lysozymaptamere wurden in Zusammenarbeit mit einer vorangegangenen Arbeit publiziert.(60)

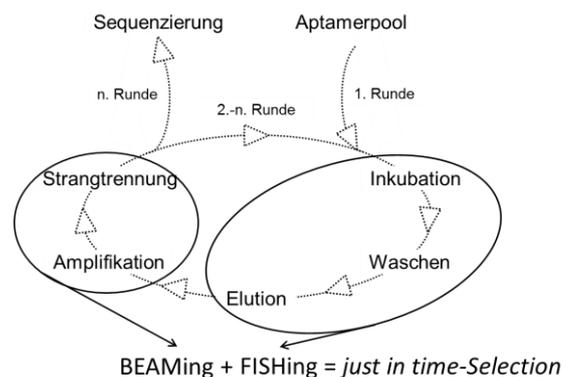


Abbildung 31: Aufteilung des SELEX-Prozesses im Rahmen der *just in time-Selection*.

Die Durchführung von Inkubation, Waschsritten und Elution als FISHing (siehe 6.2.3.1) bietet gegenüber einer manuellen Durchführung unter gleichen Bedingungen mehrere Vorteile. Generell ist nur bei der Vorbereitung der *DeepWell-Plate* die Anwesenheit von Personal erforderlich, alle weiteren Schritte werden durch die entsprechend programmierte Software durchgeführt. Eine weitere, noch deutlich signifikantere Zeitersparnis ergibt sich aus der Tatsache, dass bis zu zwölf FISHings parallel unter den gleichen Bedingungen (Inkubationszeiten, Waschschrte) durchgeführt werden können, die erforderlichen Lösungen und Komponenten müssen lediglich in der *DeepWell-Plate* vorgelegt werden. Des Weiteren ist es nachvollziehbar, dass durch die automatisierte Durchführung das Risiko von Kreuzkontamination deutlich verringert werden kann, da auch bei vorsichtigster Durchführung der Mensch immer fehleranfälliger als ein Roboter ist. Durch eine Standardisierung des SELEX-Prozesses können darüber hinaus verschiedene Aptamere mit Affinitäten zu unterschiedlichsten *Targets* unter unterschiedlichen Pufferbedingungen relativ schnell generiert werden. Aus diesem Zusammenhang leitet sich auch die Bezeichnung *just in time* ab, ein Fachbegriff aus der Automobilindustrie für bedarfsgesteuerte Produktionsprozesse, welche zur Verringerung von Lagerzeiten beitragen.(108) Ohne Berücksichtigung von Fehlschlägen innerhalb des SELEX-Prozesses und die aufzuwendende Zeit für die Sequenzierung des finalen Aptamerpools können durch die *just in time-Selection* theoretisch binnen zehn Tagen bis zu zwölf SELEX-Prozesse parallel durchgeführt werden.(60)

Die für die Durchführung der nächsten Runde erforderliche Amplifikation des verkleinerten Aptamerpools wird bei der *just in time-Selection* durch das sogenannte BEAMing eine festphasen-gebundene Emulsions-PCR durchgeführt (siehe 6.2.3.2). Durch diese Methodik können einige der im Kontext SELEX auftretende Schwächen der konventionellen PCR und die ansonsten häufig separat durchgeführte Strangtrennung miteinander kombiniert werden. Letzteres ist für den SELEX-Prozess unabdingbar, da im Rahmen einer PCR

zwar die Aptamere vervielfältigt werden (zum Ablauf der PCR siehe 6.2.2.1), diese im Anschluss jedoch an einen vollständig komplementären Gegenstrang gebunden sind. Die Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären Basen kann dementsprechend nicht mehr erfolgen, sodass weder dreidimensionale Strukturen noch die daraus resultierende Affinität zum jeweiligen *Target* ausgebildet werden können. Viele häufig eingesetzte Methoden (siehe 3.3.1) wie die Einführung spezifischer Gruppen im Rahmen der PCR durch die Verwendung entsprechend modifizierter Primer, spezifischer Abbau eines Nukleinsäurestranges (Lambda-Exonuklease) oder auch die Verwendung der asymmetrischen PCR sind gekennzeichnet durch eine deutliche Vergrößerung des Arbeitsaufwandes, erhöhte Kosten (Streptavidin-*Beads*, Lambda-Exonuklease) und teilweise geringere Ausbeute (Verluste durch Gelaufreinigung nach asymmetrischer PCR oder gelelektrophoretischer Trennung). Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass die konventionelle PCR zwar sehr gut geeignet ist, um beispielsweise durch Amplifikation eines spezifischen Abschnittes die Anwesenheit einer bestimmten DNA nachzuweisen, es kann jedoch zu Problemen durch die verstärkte Bildung von Nebenprodukten kommen, wenn wie im Rahmen des SELEX-Prozesses eine hohe Templatdiversität vorliegt. Obwohl die Nebenprodukte im Rahmen des Selektionsprozesses bei der nächsten Inkubation mit dem *Target* aufgrund mangelnder Affinität aus dem Aptamerpool entfernt werden, können diese, unter Umständen bereits nach wenigen Zyklen gebildeten Fragmente, die Amplifikation der Aptamere beeinträchtigen, wodurch möglicherweise vielversprechende Kandidaten in nicht ausreichender Menge vervielfältigt werden.(110)

Beide Problemstellungen (Strangtrennung und Nebenproduktbildung) können durch eine modifizierte Form (siehe 6.2.3.2) des von Diehl et al. publizierten BEAMings, eine Methode zur Detektion von seltenen Mutationen in großen Sequenzpopulationen, überwunden werden.(113) Zum einen wird bei dieser Methode eine Emulsion aufgebaut, welche durch Zugabe einer öligen Komponente zur wässrigen Phase (mit den für die PCR erforderlichen Reaktanden) und anschließende Durchmischung gebildet wird. Die Konzentrationen der Reaktionskomponenten in der wässrigen Phase und die Volumina der beiden Phasen werden dabei so aufeinander abgestimmt, dass in Annahme einer gleichmäßigen, statistischen Verteilung in den gebildeten Wassertröpfchen lediglich ein Templat und ausreichende Mengen der übrigen Komponenten vorhanden sind. Durch diese Vorgehensweise kommt es zur Schaffung einer Vielzahl an voneinander unabhängigen Reaktionsräumen, sodass die einzelnen Sequenzen nicht mehr miteinander interagieren können und keine Sequenzen aufgrund einer verringerten Amplifikationsgeschwindigkeit gegenüber anderen Sequenzen bei der Amplifikation unterrepräsentiert sind. Die kovalente Immobilisierung des *Reverse*-Primers und damit auch des durch die PCR gebildeten, doppelsträngigen Produktes ist im Rahmen des SELEX-Verfahrens insbesondere deswegen von Interesse, da so durch eine hitzeinduzierte Denaturierung und anschließende magnetische Separation eine schnelle und kostengünstige Isolierung der amplifizierten Aptamere möglich ist.

Wie oben beschrieben, wurden die *Targets* Lysozym, Ovalbumin sowie die bovinen Caseine auf magnetischen Partikeln immobilisiert, sodass eine Durchführung mittels FISHing ermöglicht und dieser Teilprozess anhand der gewonnenen Erfahrungen optimiert werden konnte. Trotz der Unsicherheit bezüglich der erfolgreichen Immobilisierung der bovinen Caseine (siehe 5.2.1.1), wurde ein SELEX-Prozess auch für dieses *Target* durchgeführt, da durch das Design der *just in time-Selection* kein signifikanter Mehraufwand entstand. Das BEAMing wurde aus einer vorangegangenen Arbeit übernommen und im Rahmen der *just in time-Selection* genutzt.(59) Es erfolgte nach jeder Runde (FISHing + BEAMing) eine Kontroll-PCR des BEAMing-Eluats durch eine konventionelle PCR, die Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese (AGE, siehe 6.2.2.1) getrennt und mit einem Größenstandard verglichen. Dieser nachgeschaltete Schritt wurde mit einem Aliquot des BEAMing durchgeführt, um wieder doppelsträngige DNA zu generieren, da die durch das BEAMing generierte,

einzelsträngige DNA durch Ethidiumbromid nur in sehr geringem Maße angefärbt wird.(105) Shao et al. konnten zeigen, dass bei hohen Templatdiversitäten die Bildung von Nebenprodukten im Rahmen der konventionellen PCR ab Zyklus 15 ansteigt, sodass im Rahmen dieser Arbeit die Anzahl der Zyklen während der Kontroll-PCR auf diesen Wert begrenzt wurde.(110) Alle AGEs der durchgeführten Kontroll-PCRs sind in 8.5 zu finden, die hier dargestellten Bilder dienen lediglich der beispielhaften Darstellung einzelner Sachverhalte und beinhalten aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht alle in der jeweiligen AGE analysierten Proben (das beinhaltet auch Positiv- und Negativproben). Da alle Aptamere der zu Beginn eingesetzten Aptamerbibliothek eine Größe von 76 Basen aufwiesen, mussten ebenso alle selektierten Aptamere, beziehungsweise die durch die Kontroll-PCR generierten doppelsträngigen Fragmente, diese Größe zeigen. Nur bei einem positiven Nachweis nach dem BEAMing wurde das entsprechende Eluat für das FISHing der nächsten Runde eingesetzt.

Damit bei kaum zu vermeidenden Fehlschlägen innerhalb des aus mehreren Runden aufgebauten SELEX-Prozesses kein vollständiger Neustart erforderlich wird, sollten Rückstellproben gebildet werden. Um FISHing-Rückstellproben zu generieren, wurde versucht, das anschließende BEAMing mit möglichst geringen Volumina durchzuführen (siehe Tabelle 15). Durch diese Vorgehensweise kann außerdem die Bildung von Nebenprodukten infolge einer erhöhten Templatdiversität in den Wassertröpfchen der Emulsions-PCR vermieden werden.(110) Der Einsatz von zu stark verdünnten Templatkonzentrationen für das BEAMing könnte jedoch zu einer von der Affinität zum *Target* unabhängigen Eliminierung einzelner Aptamere aus dem Aptamerpool führen, sodass in den ersten zwei SELEX-Runden oder bei eher schwachen Banden im Rahmen der Kontroll-PCR, größere Volumina eingesetzt oder sogar zwei konsekutive BEAMings durchgeführt wurden (siehe Tabelle 15, Lysozym-SELEX Runde 11, Ovalbumin-SELEX Runde 11 & 14). Während des SELEX-Prozesses wurde darüber hinaus versucht, durch die Anwendung einer fluorimetrischen Methode zur Quantifizierung des DNA-Gehaltes im FISHing-Eluat die optimale Templatkonzentration für das nachfolgende BEAMing einzustellen. Es zeigte sich jedoch, dass die durch diese Methode berechneten Volumina nicht zuverlässig waren, da mehrmals keine Banden im Rahmen der Kontroll-PCR detektiert werden konnten. Dies ist wahrscheinlich auf eine Miterfassung von Nebenprodukten oder Primerdimeren zurückzuführen, sodass im Folgenden, auch im Hinblick auf größere Rückstellproben, auf diese Methode verzichtet wurde.

Tabelle 15: Übersicht *just in time*-SELEX Lysozym, Ovalbumin und Casein.

Angegeben sind die eingesetzten Volumina für FISHing und BEAMing sowie die ggf. durchgeführten zusätzlichen Prozessierungsschritte.

Runde	Target	eingesetzte Volumina [μ L]		Anmerkungen/Prozessierungen
		FISHing	BEAMing	
1	Lysozym	20	30	
	Ovalbumin	20	30	
	Casein	20	30	
2	Lysozym	50	30	
	Ovalbumin	50	30	
	Casein	50	30	
3	Lysozym	50	30	FISHing-Eluat 1:1000 verdünnt
	Ovalbumin	50	30	FISHing-Eluat 1:1000 verdünnt
	Casein	50	30	FISHing-Eluat 1:1000 verdünnt
4	Lysozym	50	20	
	Ovalbumin	50	1	
	Casein	50	1	
5	Lysozym	50	1	
	Ovalbumin	50	3	
	Casein	50	2	
6	Lysozym	50	10	
	Ovalbumin	50	20	
	Casein	50	1	
7	Lysozym	50	16	
	Ovalbumin	50	20	
	Casein	50	5	
8	Lysozym	50	30	
	Ovalbumin	50	10	
	Casein	50	1	
9	Lysozym	50	30	
	Ovalbumin	50	12	
	Casein	50	30	FISHing-Eluat 1:1000 verdünnt
10	Lysozym	50	30	Gelaufreinigung nach BEAMing
	Ovalbumin	50	13	Gelaufreinigung nach BEAMing
	Casein	50	3,5	
11	Lysozym	50	30	Anreicherung, Gelaufreinigung nach BEAMing
	Ovalbumin	50	30	Anreicherung durch BEAMing
	Casein	50	8	
12	Lysozym	50	30	
	Ovalbumin	70	30	
	Casein	50	30	FISHing-Eluat 1:1000 verdünnt
13	Lysozym	50	30	BEAMing-Eluat zur Expression genutzt
	Ovalbumin	50	30	
	Casein	50	5	
14	Ovalbumin	50	30	Anreicherung durch BEAMing, Gelaufreinigung
	Casein	50	1	
15	Ovalbumin	70	30	BEAMing-Eluat zur Expression genutzt
	Casein	50	1	BEAMing-Eluat zur Expression genutzt

Zu Beginn des SELEX-Prozesses konnte sowohl nach dem FISHing als auch nach dem BEAMing im Rahmen der AGE der Kontroll-PCR ein zu erwartendes Produkt mit einer Größe von ungefähr 76 Basenpaaren nachgewiesen werden. Beispielhaft ist dies in Abbildung 32 zu erkennen, sowohl links vom Marker (FISHing) als auch rechts (BEAMing) sind eindeutig entsprechende Produkte zu erkennen. Mit steigender Rundenzahl konnte jedoch häufig keine Bande mehr nach dem FISHing detektiert werden, nach dem BEAMing waren jedoch die entsprechenden Banden wieder vorhanden (Abbildung 33). Dies steht in Einklang mit den Erwartungen, da durch das FISHing infolge der Reduktion des Aptamerpools die Menge an DNA verringert wird, während sie durch das anschließende BEAMing wieder amplifiziert wird. Darüber hinaus waren in den höheren Runden, trotz des Einsatzes der Emulsions-PCR, verstärkt Nebenprodukte zu erkennen (Abbildung 33, Bahn 4 & 5), teilweise mit höherer Intensität als das eigentliche Produkt. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass zwar die Bildung von größeren Fragmenten infolge einer homologen Kombination und einer daraus resultierenden Verlängerung von Aptameren durch den Einsatz der Emulsion inhibiert wird, die Bildung von kürzeren Fragmenten durch die Bildung von Sekundärstrukturen oder Anlagerungen von Primern außerhalb der definierten Primerbindungsregionen an den Enden der Aptamere, jedoch auch durch den Einsatz einer Emulsion nicht vollständig unterdrückt werden kann (Zu diesem Kontext siehe auch 5.2.2.1). Zur Entfernung von Nebenprodukten, wurde nach Identifikation im Rahmen der Kontroll-PCR, eine weitere konventionelle PCR unter Verwendung von 5'-biotinylierten *Reverse*-Primern durchgeführt. Durch Trennung mittels AGE können die doppelsträngigen Produkte bei 76 Basenpaaren aus dem Gel ausgeschnitten und somit isoliert werden. Durch den Einsatz von mit Streptavidin belegten, magnetischen Partikeln können dann in der Folge die einzelsträngigen Aptamere wieder isoliert werden und dann für das folgende FISHing eingesetzt werden.

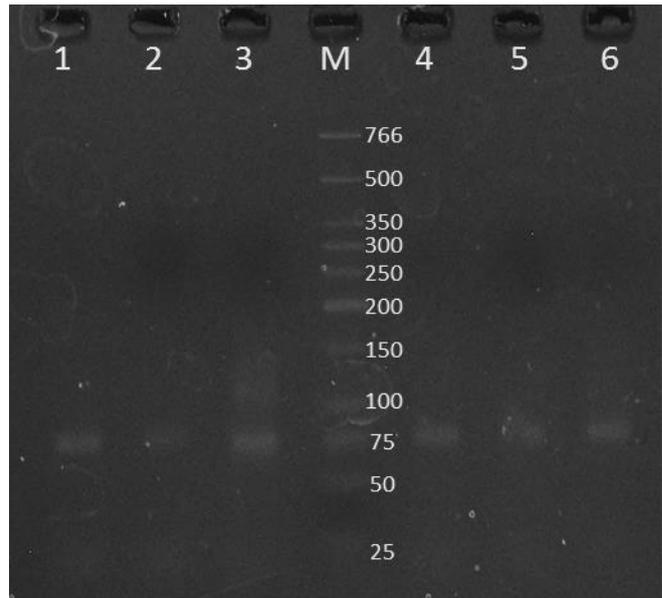


Abbildung 32: Gelelektrophorese Runde 3.

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 3 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. 1 = FISHing Lysozym; 2 = FISHing Ovalbumin; 3 = FISHing Casein; 4 = BEAMing Lysozym; 5 = BEAMing Ovalbumin; 6 = BEAMing Casein; M = Marker (*low molecular weight ladder*, Fragmentgrößen eingezeichnet).

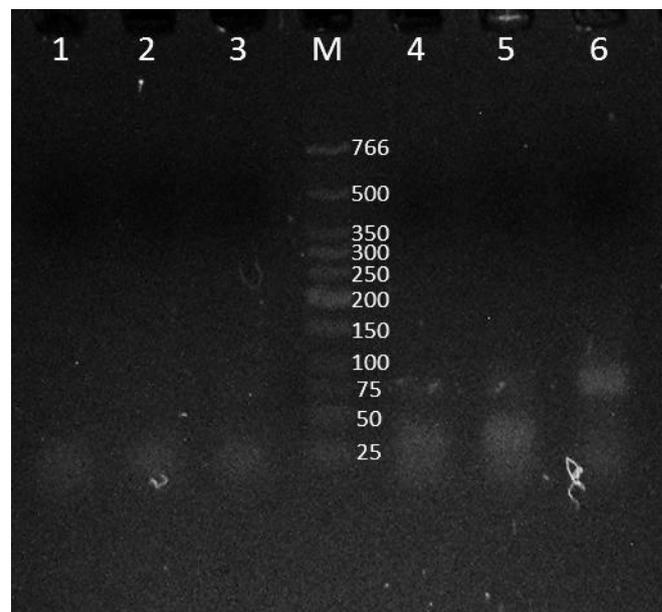


Abbildung 33: Gelelektrophorese Runde 10.

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 10 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. 1 = FISHing Lysozym; 2 = FISHing Ovalbumin; 3 = FISHing Casein; 4 = BEAMing Lysozym; 5 = BEAMing Ovalbumin; 6 = BEAMing Casein; M = Marker (*low molecular weight ladder*, Fragmentgrößen eingezeichnet).

Nach Runde 10 und 11 (Lysozym-SELEX) beziehungsweise 10 und 14 (Ovalbumin-SELEX) wurde eine entsprechende Gelaufreinigung (siehe 6.2.2.1) durchgeführt (siehe auch Tabelle 15).

Die SELEX, mit dem Ziel Aptamere mit einer Affinität zu Lysozym zu identifizieren, erforderte häufig Wiederholungen einzelner Schritte, eine Verdünnung des FISHing-Eluats war lediglich in Runde 3 erfolgreich. Ein positives Ergebnis im Rahmen der Kontroll-PCR nach dem BEAMing konnte in vielen Runden nur erreicht werden, wenn ein Volumen von 30 μL des FISH-Eluats eingesetzt wurde, was dazu führte, dass Rückstellproben von FISHings in dieser SELEX nur selten generiert werden konnten. Bis Runde 13 waren im Rahmen dieser SELEX außerdem zwei Gelaufreinigungen sowie eine Anreicherung erforderlich, eine Weiterführung über diese Runde hinaus konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Deswegen wurde das BEAMing-Eluat (Kontroll-PCR siehe Abbildung 34, Bahn 1) für die nachfolgende Sequenzierung genutzt, mit den 13 durchgeführten Runden konnte jedoch das im Vorfeld anvisierte Ziel von 10-15 Runden erreicht werden. Es kann geschlussfolgert werden, dass die Bedingungen innerhalb der SELEX nicht für jedes *Target* in gleichem Maße anwendbar sind.

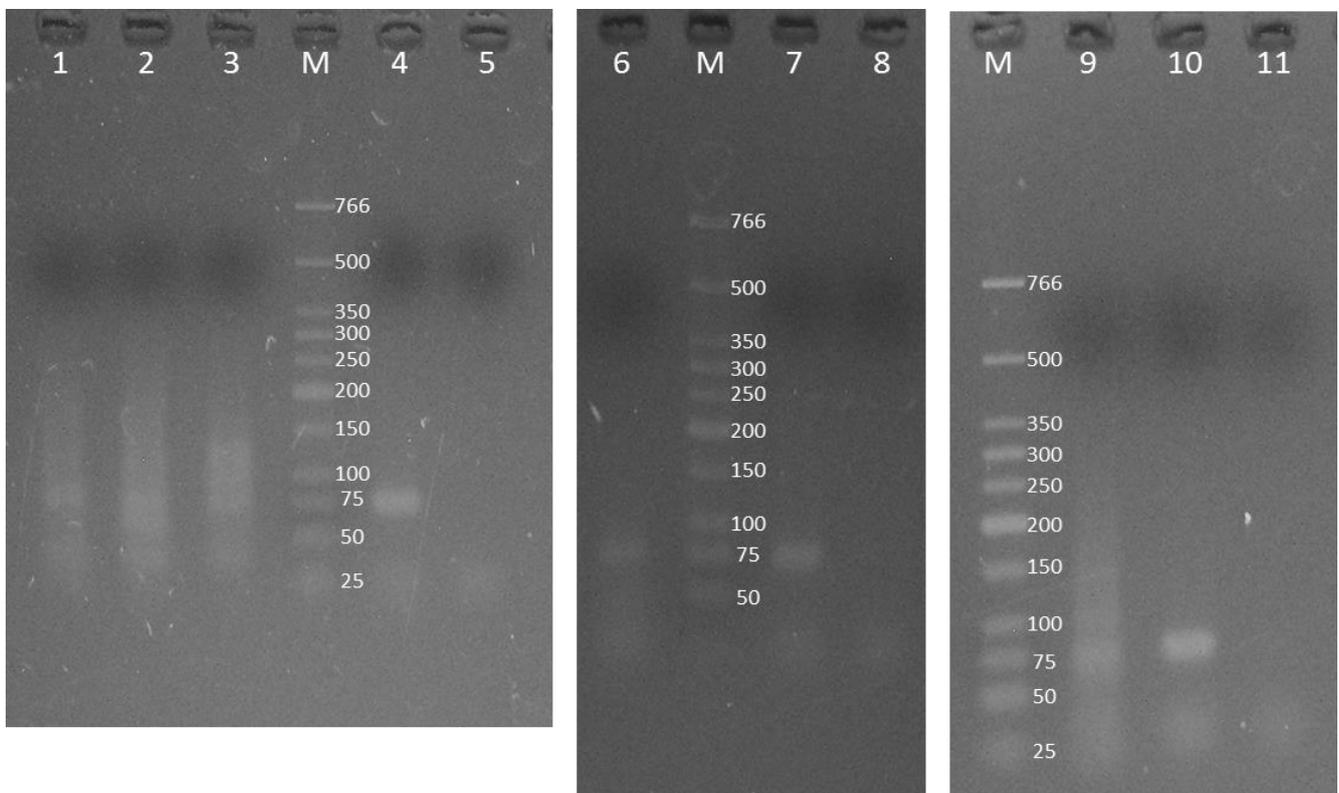


Abbildung 34: Gelelektrophorese Runde 13 & 15.

Abgebildet sind Fotos der nach Runde 13 & 15 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. 1 = BEAMing Lysozym Runde 13; 2 = BEAMing Ovalbumin Runde 13; 3 = BEAMing Casein Runde 13; 6 = BEAMing Ovalbumin Runde 15; 9 = BEAMing Casein Runde 15; 4, 7, 10 = Positivkontrollen der angeschlossenen, konventionellen PCRs; 5, 8, 11 = Negativkontrollen der angeschlossenen, konventionellen PCRs; M = Marker (*low molecular weight ladder*, Fragmentgrößen eingezeichnet).

Bei der Ovalbumin-SELEX konnte, ebenso wie bei der Lysozym-SELEX nur eine Verdünnung des FISHing-Eluats in Runde 3 durchgeführt werden. Auch in dieser SELEX waren zwei Gelaufreinigungen erforderlich, da sich in größerem Maße Nebenprodukte gebildet hatten (siehe beispielsweise Abbildung 33, Bahn 5). Darüber hinaus musste mehrmals festgestellt werden, dass die nach dem BEAMing zur Verfügung stehende Menge an DNA nicht ausreichend war, um im Rahmen der Kontroll-PCR eine entsprechende Bande zu generieren. Aus diesem

Grund wurden in Runde 11 und 14 jeweils zwei konsekutive BEAMings durchgeführt und in dem nachfolgenden FISHing ein Volumen von 70 µL BEAMing-Eluat eingesetzt. Nur durch diese Steigerung der Menge an DNA konnte diese SELEX bis in Runde 15 vorangetrieben werden (siehe Abbildung 34, Bahn 6) und das entsprechende BEAMing-Eluat für die nachfolgende Sequenzierung eingesetzt werden. Trotz der unsicheren Immobilisierung der bovinen Caseine auf den magnetischen Partikeln, welche für das FISHing erforderlich sind, konnte die SELEX für diese Proteine mit relativ wenig zusätzlichem Aufwand durchgeführt werden (siehe auch Tabelle 15). So war es beispielsweise nach Runde 3, 9 und 12 möglich, mit stark verdünnten Lösungen (1:1000) weiterzuarbeiten. Darüber hinaus waren weder Gelaufreinigungen noch Anreicherungen erforderlich, die durch die AGE der Kontroll-PCR detektierten Banden waren häufig schärfer und intensiver als die der anderen *Targets* (siehe beispielsweise Abbildung 32, Bahn 6 im Vergleich zu Bahn 4 & 5). Nach 15 Runden wurde auch diese SELEX beendet und das BEAMing-Eluat (siehe Abbildung 34, Bahn 9) für die nachfolgende Sequenzierung eingesetzt.

Durch die Analytik mittels Kontroll-PCR und anschließender AGE konnten Aptamere sowie Nebenprodukte detektiert werden, sodass gegebenenfalls erforderliche Aufreinigungen oder Anreicherungen durchgeführt werden konnten. Auch wenn die Anwendbarkeit der SELEX für die Selektion von Aptameren bereits durch eine Vielzahl an Publikationen gezeigt werden konnte, kann durch den Nachweis mittels AGE kaum nachvollzogen werden, ob eine Selektion der Aptamere stattgefunden hat. Aus diesem Grund wurde mit den zur Verfügung stehenden FISHing-Eluaten eine Schmelztemperaturbestimmung durchgeführt (siehe 6.2.2.2 und Abbildung 35). Von einer hohen Diversität (10^{15} unterschiedliche Aptamere) in der zu Beginn eingesetzten Aptamerbibliothek werden durch den SELEX-Prozess von Runde zu Runde solche Aptamere aussortiert, welche eine geringere Affinität zum *Target* aufweisen, sodass innerhalb des Prozesses eine Absenkung der Diversität zu erwarten ist. Die Schmelztemperatur einer doppelsträngigen Nukleinsäure, also die Temperatur bei der die beiden Einzelstränge getrennt voneinander vorliegen, ist umso höher je mehr komplementäre Basenpaare zwischen den beiden Strängen vorhanden sind, da thermische Energie erforderlich ist, um die aufgebauten Wasserstoffbrückenbindungen zu trennen.(114)

Sowohl bei der Ovalbumin- als auch bei der Casein-SELEX liegen die erhaltenen Werte für die Schmelztemperatur nahezu während des kompletten SELEX-Prozesses auf einem Niveau (80-81 °C), am Ende ist jedoch eindeutig eine Steigerung zu erkennen. In beiden Fällen kann somit davon ausgegangen werden, dass durch die immer stringenteren Bedingungen am Ende der SELEX noch einmal eine deutliche Verringerung der Aptamerpooldiversität erfolgt ist. Die Nutzung des BEAMing-Eluats von Runde 15 erscheint somit angemessen. Im Rahmen der Lysozym-SELEX ist ebenso ein Plateau zwischen Runde 6 und 10 zu erkennen. Diese SELEX deutet außerdem an, dass die Verringerung der Diversität hier nicht nur innerhalb der ersten Runde erfolgt ist, sondern von Runde 1 bis 4 stattfand, da auch in diesem Bereich noch relativ geringe Schmelztemperaturen detektiert werden konnten. Auch hier ist unmittelbar vor der Beendigung des SELEX-Prozesses in Runde 13 noch einmal eine Steigerung der Temperatur zu erkennen. Insgesamt deutet die Schmelzkurvenanalyse an, dass das jeweilige Ende der SELEX-Prozesse gut gewählt war, da im Vorfeld jeweils noch eine Verringerung der Diversität erreicht werden konnte. Eine Optimierung könnte dahingehend vorgenommen werden, dass neben den eigentlichen Proben auch Standards mit bekannter Diversität analysiert werden. Schütze et al. konnten durch den Einsatz von Diversitätsstandards eine gute Einordnung der Probanddiversität erreichen.(114)

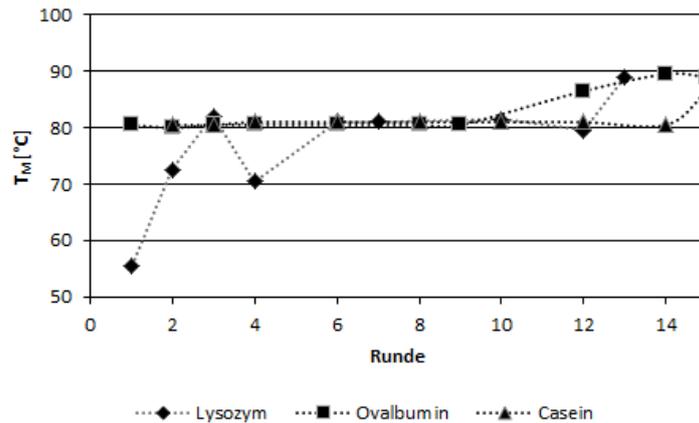


Abbildung 35: Schmelzkurve FISHing-Eluate.

Dargestellt sind die Schmelztemperaturen der FISHing-Eluate aus verschiedenen Runden. Eine hohe Schmelztemperatur ist auf eine geringe Diversität zurückzuführen und deutet auf einen erfolgreichen SELEX-Prozess hin.

5.2.1.3 Sequenzierung

Obwohl durch den SELEX-Prozess eine deutlich Verringerung der Diversität zu erwarten ist, kann nicht davon ausgegangen werden, dass im finalen Aptamerpool nur ein Aptamer vorhanden ist. Um zu vermeiden, dass es im Rahmen der Sequenzierung zu nicht eindeutigen Signalen und daraus resultierenden Unsicherheiten in Bezug auf die Aptamersequenz kommt, müssen die im finalen Aptamerpool vorliegenden Aptamere voneinander separiert werden. Für diesen Zweck wurden die Aptamere aus dem finalen Aptamerpool mittels konventioneller PCR unter Verwendung der *Taq*-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) amplifiziert und von den gebildeten Nebenprodukten (siehe auch Abbildung 34, Bahn 1 & 9) durch AGE und anschließende Gelextraktion separiert (Durchführung siehe 6.2.3.3). Das Enzym ist wie viele Polymerasen in der Lage, vom komplementären Strang unabhängig, an das gebildete, doppelsträngige Produkt ein weiteres Nukleotid anzuhängen. Besonders häufig wird in diesem Zusammenhang ein zusätzliches Adenosinphosphat angehängt, was wahrscheinlich auf energetisch besonders günstige π -Wechselwirkungen zwischen Adenin und dem Ende des doppelsträngigen Produktes zurückzuführen ist.(117) Diese Eigenschaft der Polymerase bietet gute Voraussetzungen, um diese doppelsträngigen Produkte in präparierte Plasmide einbinden zu können, entsprechende Vektoren können kommerziell erworben werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das TOPO TA Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) verwendet, welches den in Abbildung 73 abgebildeten Vektor enthält. Dieser beinhaltet neben mehreren Primerbindungsstellen (M13, T3/T7) und Schnittstellen für Restriktionsenzyme (*SpeI*, *PstI*, *PmeI*, *EcoRI*, *NotI*), weitere Bereiche, die im Rahmen von Genexpressionen erforderlich sind (*origin of replication* (ρ UC ori)) sowie solche Regionen, die für Antibiotikaresistenzen codieren (Kanamycin, Ampicillin). Für die Klonierung (siehe 6.2.3.3) ist entscheidend, dass der Vektor zwischen Position 294 und 295 geöffnet und dort an Thyminüberhängen das Enzym Topoisomerase I kovalent gebunden ist. Durch die komplementären Basen an den Enden des Vektors (Thymin) und dem zu klonierenden Produkt (Adenin) kommt es zur Ausbildung von komplementären Basenpaaren, sodass die Ligasefunktion des Enzyms infolge der räumlichen Nähe die Ausbildung einer kovalenten Bindung (Phosphodiesterbrücke) katalysieren kann und der Vektor geschlossen wird. Im Zuge dieses Vorgangs wird die Topoisomerase I vom Vektor gelöst und dieser kann anschließend in sogenannte chemisch kompetente Bakterien transformiert werden .(118,119) In dieser Arbeit wurden für diesen Zweck *E. coli*-Zellen (Stamm: XL-1) genutzt, welche durch eine Behandlung mit Calciumchlorid nach einem Hitzeschock (Lagerung von Zellen und Vektor auf Eis, Erwärmung auf 42 °C, unmittelbare Abkühlung auf Eis, siehe auch 6.2.3.3), in der Lage sind, Plasmide aus der Umgebung

aufzunehmen. Obwohl Teile dieses Vorgangs noch nicht auf allen Ebenen aufgeklärt wurde, handelt es sich bei dieser Methode um eine häufig im Rahmen der Klonierung angewendete Technik.(105)

Die auf die beschriebene Art und Weise hergestellten *E. coli*-Zellen wurden anschließend auf einem mit Ampicillin versetzten LB-Nährboden (engl.: *lysogeny broth*) ausgestrichen, nach 24 h vereinzelt und weitere 24 h kultiviert. Nur die Bakterien, welche ein Plasmid aufgenommen haben, sind durch die auf dem Plasmid codierte Ampicillinresistenz in der Lage, auf dem Nährboden in Anwesenheit des Antibiotikums zu wachsen und das in ihnen enthaltene Plasmid zu vervielfältigen. Um eine den Erwartungen entsprechende Klonierung abzusichern, wurden mit Zellen der vereinzelt Kolonien sogenannte Kolonie-PCRs (siehe 6.2.3.3 und 8.6) durchgeführt. Für diesen Zweck wird der auch bei der konventionellen PCR verwendete Mastermix hergestellt, wenige Zellen in diesem mechanisch aufgeschlossen und dann eine PCR durchgeführt. Nur solche Kolonien, die bei zwei unterschiedlichen Primerpaaren, welche unterschiedlich große Bereiche auf dem Plasmid umschließen (siehe beispielhaft Abbildung 36 links und Mitte, Aptamerprimer: 76 bp, M13-Primer: 240 bp), in einer anschließend durchgeführten AGE auch die zu erwartenden Fragmente aufwiesen, wurden im Anschluss in einer Schüttelkultur kultiviert. Die Bakterien wurden anschließend aufgeschlossen und die Plasmide mit den Aptameren durch eine Säulenchromatografie isoliert (siehe 6.2.3.3), wobei als Erfolgskontrolle mit den Eluaten wieder eine PCR unter Verwendung der Aptamerprimer durchgeführt wurde (siehe beispielhaft Abbildung 36 rechts). In Tabelle 16 ist dargestellt, wie viele Ansätze nach den Kontrollen der jeweiligen Arbeitsschritte weitergeführt wurden.

Tabelle 16: Überblick über die Klonierung der Aptamere.

Dargestellt sind die in den jeweiligen Stufen als positiv eingeordneten Klonierungen.

Target	Vereinzlungen	erfolgreiche Vereinzlungen	Positive PCR		erfolgreiche Plasmidisolierung
			M13-Primer	Aptamer-Primer	
Lysozym	96	80	14	13	10
Ovalbumin	138	118	40	26	26
Casein	36	36	14	13	13

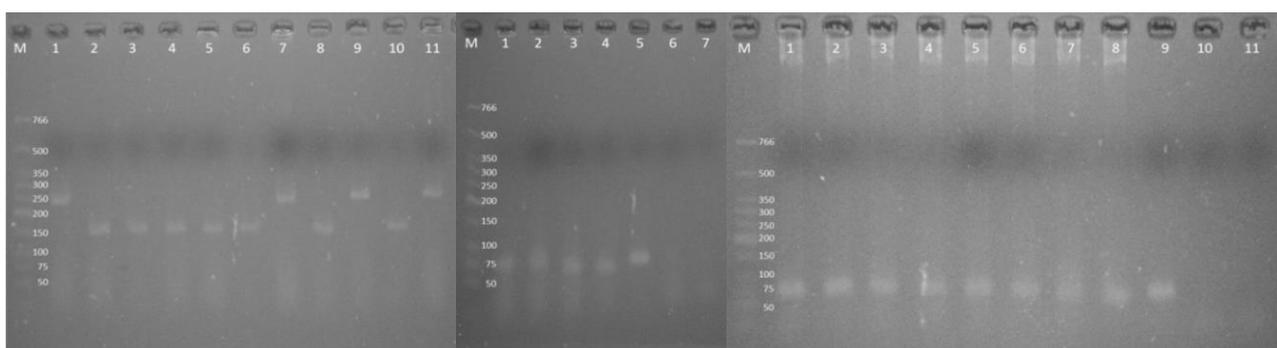


Abbildung 36: AGEs verschiedener Kontrollstufen der Aptamerklonierung.

Links: AGE der Kolonie-PCR mit M13-Primern (M = Marker; 1-6, 8, 10 = Vektor ohne eingeschlossenes Aptamer (Größe ca. 170 bp); 7, 9, 11 = Vektor mit eingeschlossenem Aptamer (Größe ca. 240 bp), Positiv- & Negativprobe aus Platzgründen nicht dargestellt, vollständiges Gel in 8.6). Mitte: AGE der Kolonie-PCR mit Aptamerprimern (M = Marker; 1 – 4 = Vektoren mit Aptamer (Größe ca. 75 bp), 5 = Positivprobe, 6 & 7 = Negativproben). Rechts: AGE der Kontroll-PCR der Plasmidisolierung mit Aptamerprimern (M = Marker, 1 – 8 erfolgreich isolierte Plasmide mit Aptamer (Größe ca. 75 bp); 9 = Positivprobe, 10 & 11 = Negativprobe).

Insgesamt wurden nach der Transformation und 24 h Wachstum 270 unterschiedliche Kolonien vereinzelt, 234 zeigten nach weiteren 24 h ein Wachstum (siehe Tabelle 16). Nach den Kolonie-PCRs mit unterschiedlichen Primern konnten jedoch nur in 53 Kolonien den Erwartungen entsprechende Fragmente durch eine Kolonie-PCR nachgewiesen werden. Mehrere Kolonien wiesen ein Fragment mit einer Größe von 160 – 170 bp auf, dies deutet auf solche Plasmide hin, die sich ohne den Einbau eines PCR-Produktes geschlossen haben (siehe Abbildung 36 links und 8.6). Das Wachstum entsprechender Klone sollte eigentlich durch das LacZ α -ccdB-Gen auf dem Vektor vermieden werden, da durch dieses Gen im Falle eines ohne PCR-Produkt geschlossenen Plasmids für den *E. coli* letale Proteine exprimiert werden.(119) Dieser zusätzliche Schritt der Absicherung hat anscheinend nicht im vorgesehenen Sinne funktioniert, sodass die zusätzliche Absicherung über die Kolonie-PCRs auf jeden Fall von Vorteil war. Auch die Durchführung zweier unterschiedlicher Kolonie-PCRs war sinnvoll, was insbesondere bei den Klonierungen im Anschluss an die Ovalbumin-SELEX zu erkennen ist, da in diesem Kontext nur 26 Kolonien die zu erwartenden Fragmente sowohl in der PCR mit den M13-Primern als auch in der PCR mit den Aptamerprimern aufwiesen (siehe Tabelle 16). Die Isolierung der Plasmide verlief im Wesentlichen erfolgreich, aus mindestens 76 % der in Schüttelkultur angereicherten Kolonien konnten Plasmide isoliert werden (siehe Tabelle 16 und Abbildung 36 rechts). Alle Gele sind mit den jeweiligen Positiv- und Negativproben in 8.6 aufgeführt. Insgesamt wurden nach Auswertung der durchgeführten Kontrollen 49 Sequenzierungen durch GATC durchgeführt, die in diesem Kontext vergebenen Nummerierungen wurden auch im weiteren Verlauf der Arbeit zur Bezeichnung der Aptamere genutzt (Tabelle 17).

Bei der Betrachtung der erhaltenen Sequenzdaten (siehe Tabelle 17) ist zu erkennen, dass mehrere Aptamere nach unterschiedlichen Selektionen mit unterschiedlichen *Targets* detektiert werden konnten. So wurde beispielsweise das Aptamer 607 in vier Plasmiden, welche aus dem finalen Aptamerpool der Ovalbumin-SELEX hergestellt wurden, aber auch in drei Plasmiden aus der Casein-SELEX detektiert. Vergleichbares gilt für die Aptamere 601 und 603 (Lysozym/Ovalbumin), sowie das Aptamer 617 (Ovalbumin/Casein). Außerdem konnte zwei Aptamere (609 und 663) identifiziert werden, welche bereits in vorangegangenen Arbeiten selektiert wurden (Aptamer 528: *Alicyclobacillus spp.*-SELEX und Aptamer 226: *Staphylococcus aureus*-SELEX).(59,120) Bei den genannten sechs Aptameren könnte es sich um Kontaminationen handeln, welche innerhalb des Labors durch Anheftung an mehrfach verwendete Geräte wie beispielsweise Pipetten oder Oberflächen weitergetragen wurden, in diesem Fall könnte mit aufwändigeren Reinigungsschritten der Problematik entgegen getreten werden. Da in allen bisher innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführten Selektionsprozessen die gleiche Aptamerbibliothek als Ausgangspunkt genutzt wurde, ist es jedoch auch denkbar, dass die genannten Aptamere eine sehr geringe Spezifität aufweisen und deswegen mehrfach identifiziert wurden. In beiden Fällen erscheint es nicht sinnvoll mit den Aptameren weiterzuarbeiten, sodass diese im weiteren Verlauf dieser Arbeit auch nicht untersuchungsweise genutzt wurden.

Des Weiteren ist zu erkennen, dass drei Aptamere deutlich (mehr als fünf Basen) von der zu erwartenden Größe von 76 Basen abweichen (Aptamere 608, 625 und 668) und zwei weitere (Aptamere 604 und 678) stark abweichen. Da insgesamt für das *Target* Ovalbumin nur ein Aptamer mit der zu erwartenden Länge von 76 Basen identifiziert werden konnte, wurde entschieden, dass eine Abweichung von fünf Basen als tolerabel für die weiteren Untersuchungen angesehen wird, um hier den verfügbaren Pool an Aptameren nicht noch weiter zu verkleinern.

Tabelle 17: Aptamersequenzen.

Angegeben sind die nach der Sequenzierung identifizierten Aptamersequenzen, deren Größe und die im weiteren Verlauf der Arbeit genutzte Bezifferung (#). In den letzten drei Spalten ist angegeben wie oft die jeweiligen Aptamere nach welcher SELEX (Lys. = Lysozym, Ovalb. = Ovalbumin, Cas. = Casein) detektiert wurden. Die im weiteren Verlauf der Arbeit genutzten Aptamere sind fett dargestellt, die Primerregionen sind kursiv hervorgehoben.

#	Sequenz	Größe [Basen]	Häufigkeit		
			Lys.	Ovalb.	Cas.
600	CATCC GTCAC ACCTG CTCGG CAAGT CAGCT TTGGG GAGGG <i>TTCTG GTAGG CGGTA ACTGG TGTTT GGTCC CGTAT C</i>	76	2		
601	<i>CATCC GTCAC ACCTG CTCAC GTCAT CCGTC ACACC TGCTC</i> <i>ACGTC ATCCG TCACA CCTGC TCCC CCACT GGGTG TTCGG</i> <i>TCCCG TATC</i>	89	2	1	
602	CATCC GTCAC ACCTG CTCCT CAACG ATTCT TTTT TTTGT CACGT TCGCA TTGTC TTGGT GTTCG GTCCC GTATC	75	1		
603	<i>CATCC GTCAC ACCTG CTCAC GTCAT CCGTC ACACC TGCTC</i> <i>ACGTC ATCCG TCACA CCTGC TCGGT GTTCG GTCCC GTATC</i>	80	1	1	
604	CATCC GTCAC ACCTG CTCGG TGTTT GGTCC CGTAT CATCC GTCAC ACCTG CTCGG TGTTT GGTCC CGTAT C	71		1	
606	CATCC GTCAC ACCTG CTCGT TGTGC CATT CTTA TTTGA TGTAA GTATG TATTT CTGGT GTTCG GTCCC GTATC	75			1
607	<i>CATCC GTCAC ACCTG CTCCA CCCGT CACAC CCATC CGTCA</i> <i>CACCT GCTCC CCCA CTGGG TGTTT GGTCC CGTAT C</i>	76		4	3
608	<i>CATCC GTCAC ACCTG CTCCT CAAGG TGGAC TCTCT GCTTT</i> <i>ATGTT TGGTG TTCGG TCCCG TATC</i>	64			2
609	<i>CATCC GTCAC ACCTG CTCCT CACA CCGGT CCGGT GTTCG</i> <i>GTCCC CGTAT CACGC CTCGG TGTTT GGTCC CGTAT C</i>	76			3
610	CATCC GTCAC ACCTG CTCCT ATTAA GATTC GCCTT TTGTT AAAAT AAAAA TATTG TGTGG TGTTT GGTCC CGTAT C	76			1
612	CATCC GTCAC ACCTG CTCCT TCGCG AAAT GTACT GACTA TTCTT CTGTT TATTC GTTGG TGTTT GGTCC CGTAT C	76			1
616	CATCC GTCAC ACCTG CTCCT ATGAT GTTTT AAAT CCTTC CCTTT TCCCT TTCGA GTCGG TGTTT GGTCC CGTAT C	76			1
617	<i>CATCC GTCAC ACCTG CTCCA CCCGT CACAC CCATC CGTCA</i> <i>CACCT GCTCG GTGTT CGGTC CCGTA TC</i>	67		2	1
619	CATCC GTCAC ACCTG CTCCT TGCTA GAAT TTTCA TGATC TTGCT GTATT TCTAT TATGG TGTTT GGTCC CGTAT C	76	2		
620	CATCC GTCAC ACCTG CTCCT GTTAT TTTT GTTGA TGTAG GTTTG ATGAT GTATT TCCGG TGTTT GGTCC CGTAT C	76	1		
623	CATCC GTCAC ACCTG CTCCT TTGTC GTCCT TGTGG TGTTG GCTCC CGTAT CACGG CTGGG TGTTT GGTCC CGTAT C	76	1		
625	<i>CATCC GTCAC ACCTG CTCAC GCCAT CCGTC ACACC TGCTC</i> <i>CCCC ATTGG GTGTT CGGTC CCGTA TC</i>	67		1	
628	CATCC GTCAC ACCTG CTCCA CCCGT CACAC TCATC CGTCA CACCT GCTCC CCACA CTGGG TGTTT GGTCC CGTAT C	76		1	
663	<i>CATCC GTCAC ACCTG CTCGG CGGGA AGCAG AGGAC GCGAA</i> <i>TAGGA GTCGG TGTGG TTGGG TGTTT GGTCC CGTAT C</i>	76		11	
668	<i>CATCC GTCAC ACCTG CTCAC GTCAT CCGTC ACACC TGCTC</i> <i>TCCGT CATTG GGTGT TCGGT CCCGT ATC</i>	68		1	
678	CATCC GTCAC ACCTG CTCCA CCCGT CACAC CCATC CGTCA CACCT GCTCC CCACA ACCGG TCCGG TGTTT GGTCC CGTAT C	81		2	
681	CATCC GTCAC ACCTG CTCCT AGCGT CCGTC GACCC GGACC CCTGT CAGCC CCTC GCGGG TGTTT GGTCC CGTAT C	76		1	

Abweichungen von lediglich einer Base (Aptamer 602 und 606) wurden bei den *Targets* Lysozym und Casein ebenfalls akzeptiert, da es denkbar erscheint, dass es durch häufige Wiederholungen einzelner Basen (beispielsweise neun konsekutive Thyminen in Aptamer 602) zu Lesefehlern seitens der eingesetzten Geräte gekommen sein kann. Abweichungen von lediglich einer Base konnten darüber hinaus durch die eingesetzte AGE nicht erkannt beziehungsweise im Rahmen einer Gelaufreinigung nicht entfernt werden. Es erscheint deswegen ebenso denkbar, dass diese Aptamere von Anfang an in der Aptamerbibliothek vorgelegen haben und kein Lesefehler oder eine fehlerhafte Amplifikation vorgekommen sind.

Einzelne Aptamere wurden mehrmals in den sequenzierten Plasmiden detektiert, beispielsweise das Aptamer 619 aus der Klonierung des finalen Aptamerpools der Lysozym-SELEX. Möglicherweise deutet dies an, dass das Aptamer in hoher Konzentration im finalen Aptamerpool vorlag und dementsprechend einen vielversprechenden Kandidaten darstellt. Insgesamt konnten für das *Target* Lysozym fünf und für Casein vier Aptamere identifiziert werden. Für Ovalbumin konnten im Rahmen der ersten Sequenzierungen lediglich drei Aptamere (604, 628 und 678) identifiziert werden, von denen jedoch nur eines die zu erwartende Größe von 76 Basen aufwies. In der Sequenz des Aptamers 604 treten darüber hinaus die Primersequenzen aneinandergereiht auf (Muster: *Forward-Reverse-Forward-Reverse*). Es könnte sich hier selbstverständlich auch nur um ein im Rahmen des SELEX-Prozesses entwickeltes Motiv handeln, die Vermutung einer fehlerhaften Amplifikation liegt aber insbesondere unter Berücksichtigung des in der Literatur von Tolle et al. beschriebenen Mechanismus der Primerelongation nahe.⁽¹¹²⁾ Da im Rahmen der Methodenentwicklung der *just in time-Selection* neben 4-Aminohippursäure und Phytosphingosin auch Ovalbumin als Modell-*Target* für die Entwicklung von Aptameren in Binde- und Waschpuffer genutzt wurde, konnte auf den in diesem Zusammenhang entwickelten, finalen Aptamerpool zurückgegriffen werden und das Aptamer 681 identifiziert werden. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass dieses Aptamer zwar unter den gleichen Bedingungen hinsichtlich der Inkubationszeiten und Waschschriffe, aber nicht in Weißweinpuffer selektiert wurde und dementsprechend hinsichtlich der Rahmenbedingungen eine Sonderrolle einnimmt. Abschließend konnten somit jedoch für Ovalbumin vier Aptamere identifiziert werden.

Insgesamt muss bei der Klonierung bedacht werden, dass eine Diskriminierung von Aptameren ohne Bezug zur Affinität erfolgen kann.⁽⁵³⁾ So wurde beispielsweise in vorherigen Arbeiten festgestellt, dass es durch die Gelextraktion zu starken Verlusten in Bezug auf die absolute Menge an DNA kommen kann.⁽⁵⁹⁾ Im Rahmen der SELEX wurde dieser Problematik durch die Implementierung des BEAMings begegnet, da diese Technik für hohe Templatdiversitäten besser geeignet ist und Gelextraktionen somit insgesamt seltener erforderlich waren. Nach dem Abschluss der SELEX musste jedoch nach der konventionellen PCR zur Bildung von doppelsträngigen Produkten mit Adeninüberhängen eine Gelextraktion erfolgen, um Nebenprodukte abzutrennen und die Klonierung zu ermöglichen. Auch bei der Ligation der Amplifikate in den Vektor ist es durchaus denkbar, dass nicht alle Aptamere erfasst und einige, möglicherweise vielversprechende, Kandidaten eliminiert werden. Anhand der im Rahmen der Kolonie-PCR mit M13-Primern häufig vorgefundenen Vektoren ohne Insertion liegt die Vermutung nahe, dass es auch in der vorliegenden Arbeit an dieser Stelle zu Verlusten gekommen ist. Auch die weiteren Schritte im Rahmen der Klonierung deuten Verluste von Aptameren an, beispielsweise durch die nicht erfolgreich verlaufenen Vereinzlungen oder Plasmidisolierungen.

Im Idealfall sollten alle im finalen Aptamerpool vorliegenden Aptamere erfasst werden, was jedoch durch die Klonierung kaum gewährleistet werden kann. Eine Alternative zur Aptamerseparation durch Klonierung, um die anschließende Sequenzierung durch das Sanger-Verfahren zu ermöglichen, wäre die Nutzung von sogenannten *Next-Generation-Sequencern*. Durch diese hochsensitiven Instrumente ist es möglich,

unmittelbar den Einbau einer Base zu dokumentieren und nicht nach Abschluss der Amplifikation eine Analyse der Fragmente vorzunehmen. So nutzt beispielsweise der MiSeq (Illumina Inc., CA, USA) die sogenannte *sequencing by synthesis*-Technologie, bei der im Rahmen der Amplifikation spezifische Fluorophore nach dem Einbau einer Base freigesetzt werden. Dies kann dann durch spezifische Anregung und hochempfindliche Detektoren dokumentiert werden. Bei dieser Technologie entfällt sowohl die Herstellung doppelsträngiger PCR-Produkte als auch die Trennung der Aptamere voneinander, da innerhalb einer Flusszelle einzelsträngige DNA immobilisiert wird und pro Messung der teilweise parallele Einbau von bis zu 25 Millionen Basen detektiert werden kann.(121) Auf dem Markt existieren darüber hinaus weitere *Next-Generation*-Methoden, die alle durch eine extrem hohe Kapazität gekennzeichnet sind und vielfältige Untersuchungen eines Aptamerpools ermöglichen. Neben der vollständigen Untersuchung des finalen Aptamerpools, um so alle Aptamere und deren Verteilung zu erfassen, können diese Methoden auch prozessbegleitend eingesetzt werden, um beispielsweise die Anreicherung bestimmter Motive zu verfolgen oder auch mögliche Kontaminationen rechtzeitig zu identifizieren.(53)

5.2.2 Charakterisierung

Im Folgenden sollen die durch die Klonierung und Sequenzierung der finalen Aptamerpools identifizierten Aptamere (siehe Tabelle 17, fettgedruckte Zeilen) weiter untersucht werden. Nach einer teilweise theoretischen Betrachtung mit Fokussierung auf die vorliegenden Sequenzen sollen die für die weitere Nutzung besonders wichtigen Parameter Affinität und Spezifität (siehe 5.2.3.1) untersucht werden.

5.2.2.1 Sequenzanalyse

Eine der Grundannahmen der Aptamer-*Target*-Interaktion ist, dass die Nukleinsäuren durch den fehlenden Komplementärstrang intramolekulare Basenpaarungen ausbilden und infolgedessen dreidimensionale Strukturen gebildet werden, die für die Interaktion von wesentlicher Bedeutung sind (siehe 3.3). Ähnlich wie bei der dreidimensionalen Struktur von Proteinen, ist deren Berechnung anhand von mathematischen Modellen aufgrund der hohen Kombinationsvielfalt extrem anspruchsvoll, sodass bei Proteinen auch heutzutage im Wesentlichen auf die Herstellung von Einkristallen und Vermessung durch Röntgenstrahlen zurückgegriffen werden muss.(31) Für die Berechnung von zweidimensionalen Nukleinsäurestrukturen unter Berücksichtigung der vorliegenden Ionenkonzentrationen stehen jedoch mittlerweile frei zugängliche Softwares zur Verfügung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Software *mfold* genutzt, um anhand der vorliegenden Aptamersequenzen die Sekundärstrukturen zu berechnen, bei denen durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen die maximale freie Reaktionsenthalpie vorliegt.(122) Die ionischen Konditionen (21 mM Na⁺, 5 mM Mg²⁺) wurden dabei vom eingesetzten Weißweinpuffer abgeleitet (siehe 5.2.1.1 und 6.1) und wurden in der Rechnung berücksichtigt.(122) Teilweise werden durch die Software mehrere Strukturen generiert, was auf sehr geringe Unterschiede hinsichtlich der freigesetzten Energie zwischen den Varianten hindeutet. Darüber hinaus wurde die Software *MEME Suite* genutzt, um in den nach ihrem jeweiligen *Target* gruppierten Sequenzen möglicherweise auftretende Motive zu identifizieren (siehe Tabelle 18, Tabelle 19 und Tabelle 20).(123) Die aus den beiden Methoden generierten Informationen wurden kombiniert, um so möglicherweise Motive, die an der Bindung zwischen Aptamer und *Target* beteiligt sind, zu identifizieren. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei auf solche Motive beziehungsweise Sequenzabschnitte gelegt, welche der Sekundärstruktur zufolge einzelsträngig oder in exponierten Bereichen auftreten und deswegen für eine Interaktion wahrscheinlich besser zugänglich sind.

Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen jedoch drei, unter Umständen wesentliche, Limitierungen berücksichtigt werden: (I) Dreidimensionale Strukturelemente, wie beispielsweise helikale Strukturen, die in

Folge der Ausbildung von doppelsträngigen Bereichen gebildet werden wie auch unzugängliche Sequenzabschnitte infolge von Überlagerungen, können bei der Dateninterpretation nicht berücksichtigt werden. (II) Durch den Einsatz der Klonierung in Vorbereitung der Sequenzierung wurden wahrscheinlich einzelne Aptamere diskriminiert (siehe 5.2.1.3), sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass an der Bindung im Rahmen des SELEX-Prozesses weitere Motive beteiligt waren. Zwar sind auch aus der Literatur solche Aptamerpopulationen bekannt, welche anscheinend keine Bindungsmotive enthalten, die Identifikation solcher Sequenzen kann jedoch bei der Weiterentwicklung der Aptamere große Vorteile bieten.(53,63,69) So kann im Anschluss an die Motividentifikation, eine neue Aptamerbibliothek, welche neben randomisierten Basen das entsprechende Motiv beinhaltet, entwickelt werden und ein weiterer SELEX-Prozess durchgeführt werden, um so möglicherweise sinnvolle Erweiterungen des Motivs zu identifizieren. Ebenso könnte eine gezielte Modifikation einzelner Basen innerhalb des Bindungsmotivs durchgeführt und deren Einfluss auf die Bindungseigenschaften untersucht werden. (III) In Analogie zum *induced fit*-Modell aus der Protein-Protein-Interaktion ist es ebenso denkbar, dass die berechneten Sekundärstrukturen zwar im jeweiligen Selektionspuffer gebildet werden, aber während der Interaktion zwischen Aptamer und *Target* Umfaltungen induziert werden. Dementsprechend können an der schlussendlich ausgebildeten Bindung auch Basen beteiligt sein, welche vorher in doppelsträngigen Strukturen gebunden waren.

Bei der Untersuchung der Aptamersequenzen mittels *MEME Suite* wurden bei allen drei Gruppen die Primerregionen als gemeinsame Motive identifiziert. Da ein Zusammenhang zwischen einer spezifischen Bindung und diesem Sequenzabschnitt aufgrund der gruppenübergreifenden Anwesenheit in allen Aptameren jedoch nicht zu erwarten ist, wurden diese bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Da in den untersuchten Gruppen kein Motiv identifiziert werden konnte, welches ohne wenigstens einen Basenaustausch (engl.: *mismatch*) in allen Sequenzen zu finden war, sollten die zu berücksichtigenden Motive wenigstens zu 2/3 mit den Aptamersequenzen übereinstimmen. Diese Limitierung führte beispielsweise dazu, dass im Aptamer 623 weder das Motiv 1 noch das Motiv 2 identifiziert werden konnte. Als exponierte Position wurden solche Motive gewertet, welche laut den mittels *mfold* berechneten Sekundärstrukturen größtenteils außerhalb von doppelsträngigen Abschnitten, beispielsweise innerhalb sogenannter *Loops*, liegen. Bei den Lysozymaptameren konnten mehrere Motive identifiziert und mit wenigen *mismatches* den Sequenzen zugeordnet werden (Tabelle 18 und 8.7).

Es wurde in diesem Zusammenhang erkannt, dass das Aptamer 623 eine Sequenz aufweist (GGTGT TGGCT CCCGT ATC), welche mit nur zwei Basenaustauschen der Bindungsstelle des *Reverse*-Primers (GGTGT TCGGT CCCGT ATC) sehr ähnlich ist. Da der randomisierte Bereich der Aptamere eine Größe von 40 Basen aufweist, entspricht es den Erwartungen, dass von den drei identifizierten Motiven zusätzlich lediglich das kleinste Motiv (Motiv 3: TTGTC A) innerhalb der verbleibenden 22 Basen des Aptamers 623 zu finden war. In den Aptameren 602 und 619 konnten alle drei Motive in 11 von 12 möglichen Sekundärstrukturen in exponierten Positionen lokalisiert werden. Für das Aptamer 620 wurde lediglich eine Sekundärstruktur mit einem größeren doppelsträngigen Bereich, welcher das Motiv 1 beinhaltet, berechnet. Sowohl das Motiv 2 (TTCTA TT) als auch das Motiv 3 (TTGTC A) sind in diesem Aptamer jedoch in einem einzelsträngigen Bereich innerhalb eines offenen *Loops* lokalisiert, sodass eine Interaktion mit dem *Target* auch hier möglich erscheint (siehe Abbildung 37 rechts). In den Sekundärstrukturen des Aptamers 600 waren öfter Motive innerhalb von doppelsträngigen Abschnitten lokalisiert, sodass eine Interaktion mit dem *Target* unter Beteiligung dieser Basen unwahrscheinlicher erscheint. Motiv 3 in Sekundärstruktur 2 dieses Aptamers kann beispielhaft für eine teilweise exponierte Position herangezogen werden, da drei der sechs Basen des Motivs innerhalb eines doppelsträngigen Abschnitts lokalisiert sind (siehe Abbildung 37 links).

Tabelle 18: Mögliche Bindungsmotive Lysozymaptamere.

Angegeben sind die mittels *MEME Suite* bestimmten Bindungsmotive innerhalb der Aptamere mit einer Affinität gegenüber Lysozym. Neben der Sequenz des Motivs sind die Position im Aptamer, die Anzahl der *Mismatches* sowie die Position innerhalb der mittels *mfold* berechneten Sekundärstrukturen angegeben. Als exponierte Position wird ein einzelsträngiger Bereich innerhalb eines *Loops* o.ä. angesehen. Für jedes Aptamer wurden maximal drei Strukturen berechnet (wenn weniger Strukturen berechnet wurden, sind die entsprechenden Zellen leer).

Motiv	Aptamer	Position	Mismatches	Exponierte Position (Loop o.ä.)		
				Struktur 1	Struktur 2	Struktur 3
TTTGA TGATG T	600	30-40	4	Nein	Nein	Ja
	602	34-44	4	Ja	Ja	
	619	31-41	2	Ja	Ja	
	620	42-52	0	Nein		
	623					
TTCTA TT	600	41-47	2	Ja	Ja	Nein
	602	27-33	1	Ja	Ja	
	619	50-56	0	Ja	Nein	
	620	27-33	2	Ja		
	623					
TTGTC A	600	22-27	2	Ja	Teilweise	Nein
	602	37-42	0	Ja	Ja	
	619	30-35	1	Ja	Ja	
	620	19-24	1	Ja		
	623	21-26	0	Ja	Ja	Ja

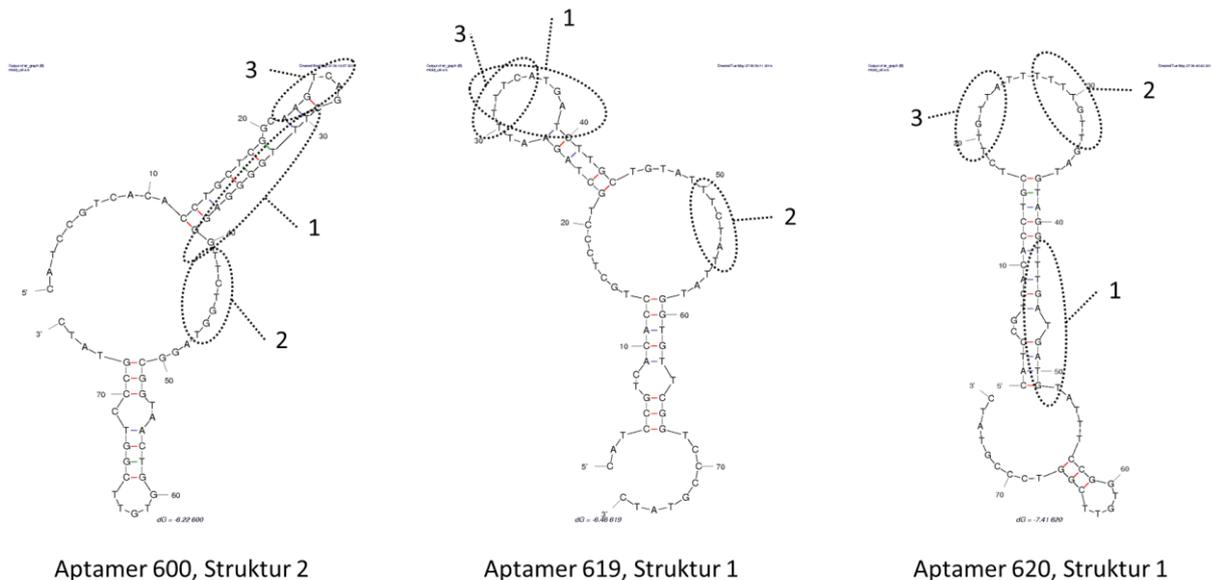


Abbildung 37: Ausgewählte Sekundärstrukturen und Motive der Lysozymaptamere.

Dargestellt sind drei Sekundärstrukturen (erstellt mittels *mfold*) der Aptamere 600 (links), 619 (Mitte) und 620 (rechts). Die in Tabelle 18 aufgeführten Motive sind markiert (Motiv 1: TTTGA TGATG T; Motiv 2: TTCTA TT; Motiv 3: TTGTC A).

Bereits im Anschluss an die Sequenzierung wurde festgestellt, dass das im Rahmen der Ovalbumin-SELEX identifizierte Aptamer 604 im Wesentlichen aus Primerwiederholungen (Muster: *Forward-Reverse-Forward-Reverse*) aufgebaut ist. Auch die erste Sequenz, welche im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich möglicher Motive identifiziert wurde, entspricht bis auf einen Basenaustausch an Position 2 (Cytosin statt Thymin) einem Abschnitt (Base 2 bis 16) des *Forward-Primers* (CATCC GTCAC ACCTG CTC). Dieses

Motiv konnte sowohl bei Aptamer 628 als auch bei Aptamer 678, von Position 20 bis 29 lokalisiert werden (siehe Tabelle 19 und 8.7). Außerdem enthalten auch diese Aptamere innerhalb des randomisierten Bereiches von Position 32 bis 50 den *Forward*-Primer. Dies könnte die bereits im Rahmen der Sequenzierung aufgestellte Hypothese, dass es innerhalb der Ovalbumin-SELEX zu fehlerhaften Amplifikationen durch Primerelongationen gekommen ist, bestätigen.(112) Es ist jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt auch denkbar, dass die Primerregionen an der Bindung zwischen Aptamer und Ovalbumin beteiligt sind und deswegen im Rahmen der SELEX selektiert wurden. Unter diesen Umständen muss eine Kreuzreaktivität aller Aptamere zu Ovalbumin erwartet werden und im Rahmen zukünftiger Ovalbuminaptamerentwicklungen sollte auf eine veränderte Aptamerbibliothek zurückgegriffen werden.

Tabelle 19: Mögliche Bindungsmotive der Ovalbuminaptamere.

Angegeben sind die mittels *MEME Suite* bestimmten Bindungsmotive innerhalb der Aptamere mit einer Affinität gegenüber Ovalbumin. Neben der Sequenz des Motivs sind die Position im Aptamer, die Anzahl der *Mismatches* sowie die Position innerhalb der mittels *mfold* berechneten Sekundärstrukturen angegeben. Als exponierte Position wird ein einzelsträngiger Bereich innerhalb eines *Loops* o.ä. angesehen. Für jedes Aptamer wurden maximal drei Strukturen berechnet (wenn weniger Strukturen berechnet wurden, sind die entsprechenden Zellen leer).

Motiv	Aptamer	Position	Mismatches	Exponierte Position (<i>Loop</i> o.ä.)		
				Struktur 1	Struktur 2	Struktur 3
ACCCG TCACA	604	37-46	1	Nein	Nein	
	628	20-29	0	Ja		
	678	20-29	0	Nein	Ja	
	681					
AACCG GA	604					
	628					
	678	55-61	1	Teilweise	Ja	
	681	32-38	1	Teilweise	Teilweise	
CACCG G	604					
	628	54-59	1	Ja		
	678					
	681	20-25	2	Teilweise	Teilweise	

Die Tatsache, dass einige Aptamere sowohl nach der Lysozym- als auch nach der Ovalbumin-SELEX und sowohl nach der Ovalbumin- als auch nach der Casein-SELEX identifiziert wurden, jedoch keine Überschneidungen zwischen der Lysozym- und Casein-SELEX vorliegen, unterstützt den Ansatz der Primerbeteiligung. Das nachträglich aus der *just in time*-Methodenentwicklung stammende Aptamer 681 beinhaltet die beiden anderen Motive, wenn auch nur teilweise in exponierten, einzelsträngigen Abschnitten der Sekundärstrukturen. Je eines der beiden Motive konnte auch in den Aptameren 628 und 678 lokalisiert werden, jeweils zwischen der *Forward*-Primer-Wiederholung und dem Beginn des *Reverse*-Primers. Die Erkenntnis, dass diese beiden Motive sowohl innerhalb der Ovalbumin-SELEX als auch im Rahmen der *just in time*-Methodenentwicklung selektiert wurden und wenigstens teilweise in einzelsträngigen Abschnitten lokalisiert sind, könnte darauf hindeuten, dass diese an einer spezifischen Interaktion mit Ovalbumin beteiligt sind. Eine Aptamerbibliothek, welche innerhalb des randomisierten Bereiches diese Motive enthält und auf andere Primer für die Amplifikation zurückgreift, könnte hinsichtlich der Entwicklung von neuen Ovalbuminaptameren genutzt werden.

Im Rahmen der Sequenzbetrachtung der Caseinaptamere wurden auch hier neben den Primern drei weitere Motive identifiziert (Tabelle 20) und innerhalb der Sekundärstrukturen lokalisiert (Abbildung 38 und 8.7). Da zwischen dem Motiv 2 (AGATT CGC) und der Sequenz des Aptameres 606 keine wesentlichen Übereinstimmungen (wenigstens 2/3 Übereinstimmung bei den Basen) identifiziert werden konnten, wurde dieses Motiv bei diesem Aptamer nicht weiter berücksichtigt. Die anderen beiden Motive konnten hier jedoch in einem großen einzelsträngigen Bereich lokalisiert werden, sodass eine Interaktion gut möglich erscheint (siehe Abbildung 38 links). Auffällig ist außerdem das Aptamer 616, für welches zwar nur eine Sekundärstruktur berechnet wurde, jedoch liegen alle Motive innerhalb eines *Loops* vor (siehe Abbildung 38 rechts). Das Motiv 1 (CCCTT T) konnte ohne jegliche *Mismatches* sogar zwei Mal in diesem Abschnitt lokalisiert werden, was möglicherweise auf eine hohe Bedeutung für die Aptamer-*Target*-Interaktion hindeuten könnte.

Tabelle 20: Mögliche Bindungsmotive der Caseinaptamere.

Angegeben sind die mittels *MEME Suite* bestimmten Bindungsmotive innerhalb der Aptamere mit einer Affinität gegenüber Casein. Neben der Sequenz des Motivs sind die Position im Aptamer, die Anzahl der *Mismatches* sowie die Position innerhalb der mittels *mfold* berechneten Sekundärstrukturen angegeben. Als exponierte Position wird ein einzelsträngiger Bereich innerhalb eines *Loops* o.ä. angesehen. Für jedes Aptamer wurden maximal drei Strukturen berechnet (wenn weniger Strukturen berechnet wurden, sind die entsprechenden Zellen leer).

Motiv	Aptamer	Position	Mismatches	Exponierte Position (<i>Loop</i> o.ä.)		
				Struktur 1	Struktur 2	Struktur 3
CCCTT T	606	29-34	2	Ja	Teilweise	Ja
	610	32-37	1	Ja	Nein	Nein
	612	46-51	2	Teilweise	Ja	Teilweise
	616	40-45/ 47-52	0	Ja/ Ja		
AGATT CGC	606					
	610	25-32	0	Ja	Nein	Teilweise
	612	50-57	3	Ja	Teilweise	Teilweise
	616	31-38	3	Ja		
TGATG T	606	38-43	0	Ja	Ja	Teilweise
	610	51-56	2	Ja	Teilweise	Ja
	612	44-49	2	Teilweise	Ja	Teilweise
	616	22-27	0	Ja		

Alle Motive konnten mindestens einmal innerhalb eines einzelsträngigen Sequenzbereiches lokalisiert werden, sodass hier eine *Target*-Interaktion wahrscheinlicher ist als bei den doppelsträngigen Abschnitten. Nennenswert ist noch das Aptamer 612, da hier in vergleichsweise wenigen Sekundärstrukturen Motive in exponierten Positionen lokalisiert sind. Die nur mit mehreren *Mismatches* lokalisierbaren Motive lagen alle zwischen den Basen 44 und 57, sodass es zu Überschneidungen kam (siehe Abbildung 38 Mitte). Da es sich beim *SELEX-Target* um eine Mischung unterschiedlicher Proteine handelte, könnte es auch möglich sein, dass die unterschiedlichen Motive jeweils an der Bindung zu lediglich einem der Proteine beteiligt sind.

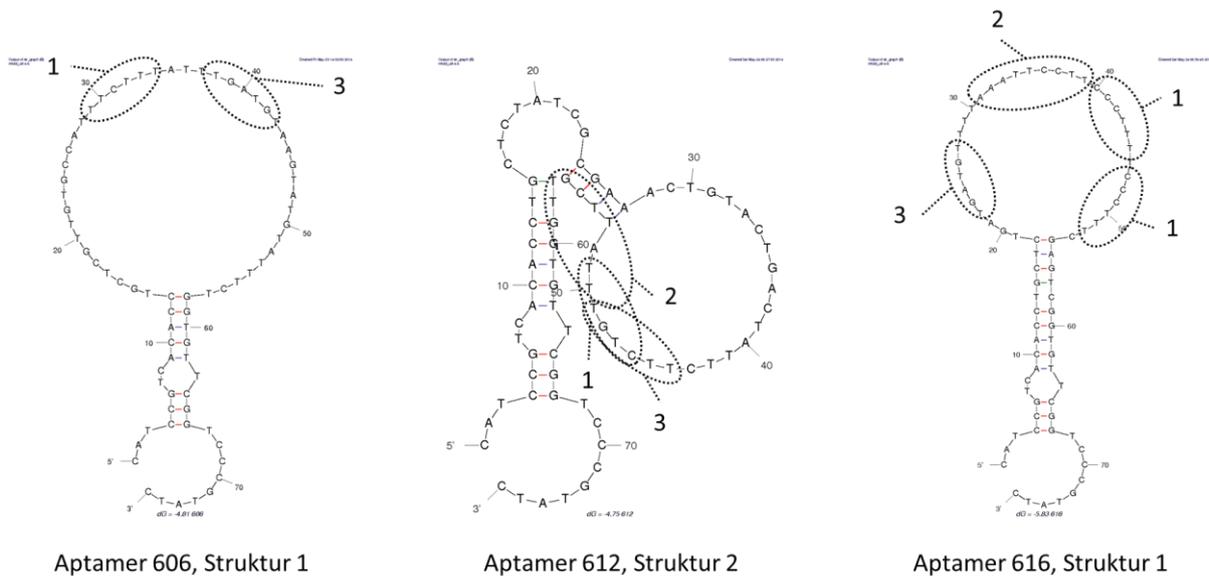


Abbildung 38: Ausgewählte Sekundärstrukturen und Motive Caseinaptamere.

Dargestellt sind drei Sekundärstrukturen (erstellt mittels *mfold*) der Aptamere 606 (links), 612 (Mitte) und 616 (rechts). Die in Tabelle 20 aufgeführten Motive sind markiert (Motiv 1: CCCTT T; Motiv 2: AGATT CGC; Motiv 3: TGATG T).

Weitere, insbesondere praktische, Untersuchungen hinsichtlich der möglichen Motive wurden nicht durchgeführt. Dies ist einerseits zu begründen mit der möglichen Diskriminierung von Aptameren im Rahmen der Klonierung und Sequenzierung. Die mehr oder weniger zufällige Auswahl von Aptameren aus dem finalen Aptamerpool der jeweiligen SELEX, ohne dass ein Bezug zur Affinität hergestellt wird, lässt eine verlässliche Bewertung der Motive im Hinblick auf eine Frequenz oder gar Dominanz nicht zu. Auch in diesem Kontext wäre die bereits erwähnte, vollständige Sequenzierung des finalen Aptamerpools mittels *Next-Generation-Sequencing* erforderlich. Andererseits wird eine Verkleinerung entwickelter Aptamere im Rahmen sogenannter Minimalmotivversuche insbesondere bei solchen Aptameren durchgeführt, welche innerhalb von Organismen, beispielsweise im Rahmen einer medizinischen Anwendung, eingesetzt werden sollen, um die Wahrscheinlichkeit einer Immunreaktion zu minimieren. Da dies kein Ziel der vorliegenden Arbeit ist und die Datenlage nicht abschließend beurteilt werden kann, wurde auf entsprechende Versuche verzichtet.

Neben den mittels mathematischer Berechnungen erhaltenen Sekundärstrukturen sollte untersucht werden, ob die Aptamere möglicherweise die als sehr stabil bekannten G-Quadruplexe aufweisen (siehe auch 3.3). Diese können ausgebildet werden, wenn mindestens zwei der durch Hoogsteen-Wechselwirkungen zwischen vier Guaninen gebildeten Tetraeder vorliegen und gestapelt werden können.(47,48) Da dementsprechend für diesen Zweck die Anwesenheit von mehreren Guaninenquartetten erforderlich ist, wurden zunächst die Sequenzen der Aptamere betrachtet. Für diesen Zweck wurde die Software *QGRS Mapper* (engl.: *quadruplex forming G-rich sequences*) genutzt, welche online zur Verfügung steht und mit der Sequenzen auf die Anwesenheit des Muster $G_xN_{y_1}G_xN_{y_2}G_xN_{y_3}G_x$ untersucht werden können (siehe 6.1).(48) Die dabei identifizierten Muster werden anhand der in der Literatur als vorteilhaft beschriebenen Eigenschaften für die Ausbildung von stabilen G-Quadruplexen mit einem *G-score* (Maximum: 105) bewertet. So wurde beobachtet, dass solche G-Quadruplexe mit kürzeren Abschnitten von vergleichbarer Länge zwischen den Guaninen stabiler sind und die Struktur insgesamt stabiler wird, umso mehr Tetraeder gestapelt werden können.(48) Da aus der Literatur bekannt ist, dass TBA (engl.: *thrombin-binding aptamer*), ein Aptamer mit einer Affinität zu Thrombin,

G-Quadruplexe ausbildet, wurde zum Vergleich auch die Sequenz (GGTTG GTGTG GTTGG) mit dem *QGRS Mapper* analysiert.(47,124)

Es konnten drei Sequenzabschnitte identifiziert werden, welche gemäß des *QGRS Mapper* in der Lage sind G-Quadruplexe auszubilden (siehe Tabelle 21). Davon befinden sich alle in solchen Aptameren mit einer Affinität zu Lysozym, zwei Sequenzen innerhalb des Aptamers 600. Ob es sich um zwei voneinander unabhängige G-Quadruplexe oder um einen aus vier Tetraedern gebildeten Komplex handelt, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht erkennen. Das im Aptamer 623 mittels *QGRS Mapper* identifizierte Motiv (Position 34-60) umschließt den Bereich der Sequenz, welcher bis auf zwei Einzelbasenaustausche der Bindungsstelle des *Reverse-Primers* entspricht (Position 34-51). Möglicherweise ist in der stabilen G-Quadruplex-Struktur einer der Gründe für das Auftreten dieser Sequenz und die Konservierung innerhalb des SELEX-Prozesses zu finden. Bei der Betrachtung der jeweiligen *G-scores* ist zu erkennen, dass bei allen drei Sequenzen ein Wert im gleichen Bereich wie bei TBA erzielt wird, wobei das Motiv von Position 45 bis 67 im Aptamer 600 sogar einen geringfügig höheren Wert als die Referenz aufweist.

Tabelle 21: Ergebnis *QGRS Mapping*.

Angegeben sind die mittels *QGRS Mapper* erzielten Ergebnisse. Die als QGRS (engl.: *quadruplex forming G-rich sequences*) identifizierten Abschnitte sind unterstrichen, die beteiligten Guanine sind kursiv dargestellt. In den letzten drei Spalten sind die Position und Länge der Abschnitte sowie der *G-score* angegeben. Sequenzen ohne entsprechende Motive sind nicht angegeben.

#	Target	Sequenz	QGRS-Position	QGRS-Länge	G-score
600	Lysozym	<u>CATCC GTCAC ACCTG CTCGG CAAGT</u>	19-40	22	9
		<u>CAGCT TTGGG GAGGG TTCTG GTAGG</u>			
		<u>CGGTA ACTGG TGTTT GGTCC CGTAT</u> C	45-67	23	21
623	Lysozym	<u>CATCC GTCAC ACCTG CTCTG TTGTC</u> <u>GTCCT TGTGG TGTTG GCTCC CGTAT</u> <u>CACGG CTGGG TGTTT GGTCC CGTAT</u> C	34-60	27	12
TBA	Thrombin	<u>GGTTG GTGTG GTTGG</u>	1-15	15	20

Um zu klären, ob die Strukturen innerhalb der Aptamere 600 und 623 auch unter den Bedingungen im Weißweinpuffer ausgebildet werden, wurde die CD-Spektroskopie (engl.: *circular dichroism*) genutzt (siehe 6.2.2.3). Zwar sind gegenwärtig noch nicht alle Zusammenhänge zwischen der Absorption von zirkular polarisiertem Licht und der chiralen Struktur der untersuchten Nukleinsäuren bekannt, in der Literatur wird jedoch beschrieben, dass eine antiparallele Anordnung (siehe Abbildung 39 A) der an der Ausbildung der G-Quadruplexe beteiligten Stränge zu einem Minimum der Elliptizität bei ungefähr 265 nm und einem Maximum bei ungefähr 295 nm führt. Eine parallele Anordnung (siehe Abbildung 39 B) führt hingegen zu einem Minimum bei ungefähr 240 nm und einem Maximum bei ungefähr 265 nm.(124,125)

Das CD-Spektrum von Aptamer 623 weist im Gegensatz zu Aptamer 600 nur geringe Extrema auf (Abbildung 39 C). Dies entspricht insofern den Erwartungen, dass auch durch die im Vorfeld durchgeführte Sequenzuntersuchung für das Aptamer 600 zwei Muster identifiziert wurden, eines davon mit einem *G-score* im Bereich von TBA. Die Einordnung, ob bei dem möglicherweise vorliegenden G-Quadruplex eine antiparallele

oder parallele Anordnung der beteiligten Stränge vorliegt, kann nicht eindeutig vorgenommen werden. Zwar liegt eindeutig ein Minimum bei ungefähr 240 nm vor, ebenso wie ein positives Signal im Bereich von 265 nm, eine eindeutige Einordnung als parallele Anordnung kann jedoch aufgrund der starken Absorption im Bereich zwischen 250 und 300 nm nicht vorgenommen werden. Es könnte sich hier möglicherweise um eine Überlagerung handeln, induziert durch eine unterschiedliche Orientierung der Stränge in den beiden identifizierten QGRS-Abschnitten des Aptamers 600. Durch die Messung konnte jedoch gezeigt werden, dass dieses Aptamer im Weißweinpuffer offensichtlich eine Sekundärstruktur ausbildet. Sollte sich in den weiteren Untersuchungen eine Affinität zu Lysozym zeigen, könnte dieser Zusammenhang als Hinweis gedeutet werden, dass dieses Aptamer vor der Bindung eine definierte Struktur ausbildet und nicht dem *induced fit*-Modell folgt.

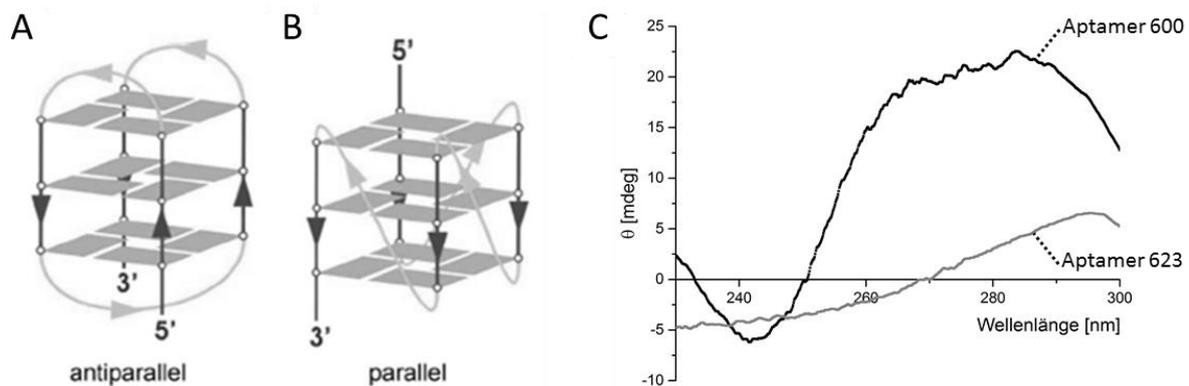


Abbildung 39: Mögliche G-Quadruplexstrukturen und CD-Spektroskopie Aptamere 600 und 623.

Dargestellt sind mögliche G-Quadruplex Strukturen (A: antiparallel, B: parallel), Abbildung entnommen aus (125), rechts die Ergebnisse der CD-spektroskopischen Messung (C) der Aptamere 600 (schwarz, 3 μ M, n=3) und 623 (grau, 3 μ M, n=3) im Bereich von 230-300 nm (Absorptionsbereich Nukleinbasen) (nach Subtraktion des Puffersignals). Durch die Interaktion des zirkular polarisierten Lichtes mit chiralen Molekülen kommt es zur Umwandlung in elliptisch polarisiertes Licht (siehe y-Achse, angegeben in Milligrad (engl.: *milli-degree*)).

5.2.2.2 Affinität

Die Möglichkeit Aptamere als Substituenten für Antikörper im Rahmen der Analytik in Erwägung zu ziehen, ergibt sich unter anderem aus den Beobachtungen, dass zwischen Aptameren und unterschiedlichsten *Targets* Bindungen ausgebildet werden, welche hinsichtlich der Stabilität mit der von Antigen-Antikörper-Bindungen vergleichbar sind. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit selektierten Aptamere sollen deswegen hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften charakterisiert werden, um dann auf dieser Basis die Entscheidung für weitere Anwendungen zu treffen. Für diesen Zweck wurde ein Fluoreszenzassay entwickelt und auf die bereits bei der Antikörpercharakterisierung genutzte SPR-Spektroskopie zurückgegriffen.

5.2.2.2.1 Fluoreszenzassay

Der entwickelte Fluoreszenzassay (siehe 6.2.2.4) basiert auf der Annahme, dass es bei einer spezifischen Interaktion zwischen Aptamer und *Target* sowie einer begrenzten Anzahl an verfügbaren Bindungsstellen, bei einer ausreichend großen Konzentration eines Bindungspartners zu einer Sättigung kommen muss. Durch Bestimmung der Sättigungskonzentration (c_{\max}) kann auf die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation ($K_D = \frac{c_{\max}}{2}$) zurückgeschlossen werden (siehe auch 3.4.2). Um die jeweils vorliegende Konzentration der Aptamere unter Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie mit hoher Empfindlichkeit zu bestimmen, wurden die zu charakterisierenden Aptamere mittels BEAMing unter Einsatz eines 5'-Alexa 647-modifizierten Primers modifiziert (siehe 6.2.3.2). Die so fluoreszenzmarkierten Aptamere wurden anschließend mittels AGE auf möglicherweise vorhandene Nebenprodukte untersucht, Konzentration und Reinheit wurden im Anschluss

photometrisch bestimmt (siehe 6.2.3.3). Das zu untersuchende *Target* wurde, wie im Rahmen der SELEX-Vorbereitung, auf magnetischen Partikeln immobilisiert (siehe 6.2.1.1), sodass eine magnetische Separation der Aptamer-*Target*-Komplexe von den nicht gebundenen Aptameren mit simplen Mitteln bewerkstelligt werden kann. Da jedoch die Immobilisierung der bovinen Caseine laut den im Vorfeld der SELEX durchgeführten Untersuchungen nicht erfolgreich war, wurde in diesem Rahmen auf die Bestimmung der Affinität dieser Aptamere verzichtet.

Für die Durchführung des Fluoreszenzassay (siehe 6.2.2.4) wurde jeweils eine konstante Menge an magnetischen Partikeln mit steigender Menge an 5'-fluoreszenzmarkierten Aptameren in Weißweinpuffer inkubiert, überschüssige Aptamere durch Waschschrte entfernt und abschließend die Fluoreszenz bestimmt. Obwohl im Rahmen der SELEX zur Steigerung der Stringenz der Binde- und Waschpuffer eingesetzt wurde, zeigte sich im Rahmen der Methodenentwicklung des Fluoreszenzassays, dass die Aptamer-*Target*-Bindung in diesem Puffer, unter den in diesem Assay herrschenden Bedingungen, anscheinend nicht stabil war. Erst nachdem auch für die Waschschrte der Weißweinpuffer eingesetzt wurde, konnten auswertbare Signale generiert werden. Da aber auch bei der Untersuchung des Aptamers 681, welches unter Verwendung des Binde- und Waschpuffers als Selektionsmedium selektiert wurde, keine auswertbaren Signale generiert werden konnten, liegt möglicherweise eine Inkompatibilität zwischen diesem Puffer und dem entwickelten Fluoreszenzassay vor.

In Abbildung 40 sind auf der linken Seite beispielhaft die Einzelmessungen des Aptamers 623 im Fluoreszenzassay dargestellt, auf der rechten Seite die Zusammenfassung mit den resultierenden Standardabweichungen. Es ist gut zu erkennen, dass hier ab einer Konzentration zwischen 200 und 300 nM eine Sättigung des Fluoreszenzsignals beginnt, die Interaktion scheint dementsprechend insoweit spezifisch, dass nur eine begrenzte Anzahl an Bindungen ausgebildet werden. Wie bereits unter 5.1.1 beschrieben, wird auch im Rahmen der Aptamercharakterisierung die Hill-Funktion ($y = c_{\max} \frac{x^n}{k^n + x^n}$, mit c_{\max} = Maximalkonzentration, x = Aptamerkonzentration, k = Dissoziationskonstante, n = Hill-Koeffizient) genutzt, um die Interaktion zwischen den beiden Bindungspartnern zu untersuchen. Sollte der Hill-Koeffizient ungleich 1 sein, so kann dies darauf hindeuten, dass mehrere Bindungsepitope an einem der beiden Partner vorliegen und die Ausbildung der Bindungen voneinander abhängig ist (kooperative Bindung). Da die Art und Weise der Interaktion zwischen den beiden Bindungspartnern unbekannt ist, im Rahmen der SELEX durch die Vielzahl an verfügbaren Bindungsepitopen keine Limitierung auf ein aktives Zentrum (wie bei einer einfachen Enzym-Substrat-Interaktion) existierte und die vorliegenden Daten durch eine Regression mit einem von 1 abweichenden Hill-Koeffizienten möglicherweise besser beschrieben werden können, wurde in diesem Kontext auf die Hill-Funktion zurückgegriffen. Durch Iteration unter Verwendung der mathematischen Analysesoftware OriginPro 9.0G wurde eine Regression erstellt, aus der direkt die Dissoziationskonstante resultiert. Die Zusammenhänge zwischen der Sättigungskonzentration und der Dissoziationskonstante wurden zur Verdeutlichung in Abbildung 40 (rechts) eingezeichnet. Für das Aptamer 623 resultierte eine Dissoziationskonstante von 130 ± 16 nM mit einem Hill-Koeffizienten von $1,60 \pm 0,22$. Der Koeffizient deutet somit, auch unter Berücksichtigung der Standardabweichung, an, dass die Bindung zwischen Aptamer und Lysozym wahrscheinlich nicht auf genau eine definierte Bindung zurückzuführen ist. Im Rahmen der Sequenzanalyse konnte in diesem Aptamer lediglich ein Bindungsmotiv identifiziert werden, sodass geschlussfolgert werden könnte, dass dieses Motiv entweder nicht vollständig spezifisch ist oder dass innerhalb des Proteins mehrere ähnliche Epitope vorliegen. Weitergehende Untersuchungen der Interaktion zwischen den beiden Bindungspartnern, beispielsweise durch röntgenspektroskopische Untersuchungen von

Einkristallen des Aptamer-Lysozym-Komplexes oder durch eine STD-NMR-spektroskopische Untersuchung (engl.: *saturation-transfer difference nuclear magnetic resonance*) der beiden Komponenten in Lösung, wären für eine umfassendere Beurteilung sinnvoll.(31,126) Es ist ebenso möglich, dass innerhalb des Aptamers 623 weitere Sequenzabschnitte an einer Bindung beteiligt beziehungsweise dazu in der Lage sind. Eine Identifikation könnte auch hier wieder durch eine vollständige Sequenzierung des finalen Aptamerpools erreicht werden.

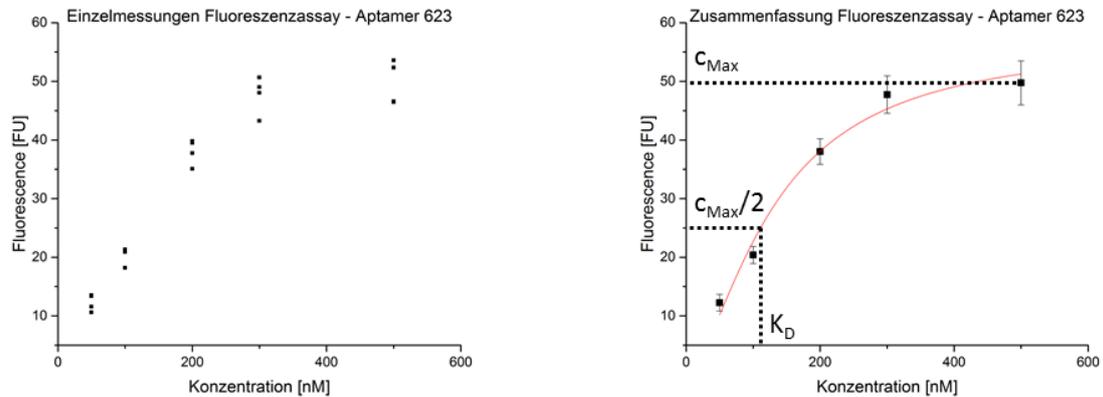


Abbildung 40: Fluoreszenzassay Aptamer 623.

Links: Dargestellt sind die Einzelmessungen ($n = 4$) des Aptamers 623 im Fluoreszenzassay. Rechts: Zusammenfassende Darstellung der Fluoreszenzassays des Aptamers 623 mit dem berechneten Hill-Fit. Zusätzlich wurden die Zusammenhänge zwischen der Sättigungskonzentration (c_{max}) und der Dissoziationskonstante (K_D) eingezeichnet.

Auch bei den anderen Aptameren konnten Hill-Koeffizienten größer 1 bestimmt werden (siehe Tabelle 22 und 8.3), sodass es sich hierbei möglicherweise auch um ein auf die Struktur der Nukleinsäuren zurückzuführendes Phänomen handeln könnte. Eine kooperative Bindung, infolge derer die Anlagerung eines zweiten Aptamer-moleküls, nachdem bereits ein Aptamer-molekül an das *Target* gebunden hat, begünstigt wird, könnte beispielsweise auf eine temporäre Ausbildung komplementärer Basenpaarungen zurückgeführt werden. So ist es denkbar, dass nach der Bindung eines Aptamers über einen bestimmten Sequenzabschnitt an das *Target*, der Rest der Nukleinsäure in das umgebende Medium hineinragt und so für Interaktionen mit weiteren Aptamer-molekülen aus der Lösung zur Verfügung steht. Bei allen Aptameren, die in dieser Arbeit identifiziert werden konnten, wurden mittels *mfold* Sekundärstrukturen mit unterschiedlich großen, doppelsträngigen Abschnitten berechnet (siehe 5.2.2.1 und 8.7). Die für diese Strukturen erforderlichen, komplementären Basenpaarungen können auch zwischen zwei unterschiedlichen Aptamer-molekülen ausgebildet werden, sodass eine „Anziehung“ denkbar erscheint. Selbst wenn diese Abschnitte der Nukleinsäuren vollständig an einer Bindung zum *Target* beteiligt sind, kann auch durch die Interaktion von nichtkomplementären Basenpaarungen (Bsp.: $\Delta G_{Adenin-Adenin}^0 = -4,77 \pm 1,21 \frac{kJ}{mol}$ oder $\Delta G_{Thymin-Guanin}^0 = -6,57 \pm 3,31 \frac{kJ}{mol}$) Energie frei und eine Annäherung begünstigt werden.(127,128) Weist das Aptamer in seiner Sequenz mehrere Bindungsmotive auf oder die enthaltenen Motive sind nicht absolut spezifisch, könnte durch diesen Mechanismus auch eine unter anderen Umständen weniger wahrscheinliche Bindung ausgebildet werden. Eine Verkleinerung der Aptamere durch Eliminierung von nicht an der Bindung beteiligten Basen könnte den beschriebenen Mechanismus unterbinden. Wie bereits erwähnt, können diese sogenannten Minimalmotivversuche jedoch mit deutlich höheren Erfolgsaussichten durchgeführt werden, wenn der finale Aptamerpool vollständig bekannt ist. Auch die SELEX könnte unter Berücksichtigung des postulierten Mechanismus optimiert werden, da gegenwärtig eine große Anzahl an unterschiedlichen Bindungsmotiven auf

Seiten des *Targets* verfügbar sind und somit die Selektion von Aptameren mit einer hohen Spezifität gegenüber einem Epitop unwahrscheinlich ist. Durch eine SELEX unter Verwendung definierter Teilbereiche oder durch Blockierung bestimmter Bereiche könnte erreicht werden, dass lediglich ein Epitop des *Targets* für eine Bindung zur Verfügung steht. Aptamere, welche den Prozess nur durch eine „Alternativbindung“ überstehen, würden unter diesen Umständen eliminiert werden.

Tabelle 22: Ergebnisse Fluoreszenzassay.

Angegeben sind die mittels Fluoreszenzassay berechneten Dissoziationskonstanten und Hill-Koeffizienten in Mehrfachbestimmung ($n \geq 3$).

#	Target	Dissoziationskonstante [nM]	Hill-Koeffizient
600	Lysozym	163 ± 35	1,39 ± 0,24
602	Lysozym	118 ± 20	1,39 ± 0,23
619	Lysozym	114 ± 25	1,74 ± 0,51
620	Lysozym	60 ± 17	2,13 ± 0,63
623	Lysozym	130 ± 16	1,60 ± 0,22
604	Ovalbumin	148 ± 14	1,63 ± 0,16
628	Ovalbumin	249 ± 42	1,38 ± 0,14
678	Ovalbumin	313 ± 58	1,31 ± 0,16

Die in Mehrfachbestimmung ($n \geq 3$) berechneten Dissoziationskonstanten (Tabelle 22) liegen alle im nanomolaren Bereich, wobei generell die Lysozymaptamere eine stärkere Bindung zum *Target* aufweisen als die Ovalbuminaptamere. Im Vergleich mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Antikörpern (siehe 5.1.1), welche Dissoziationskonstanten im picomolaren Bereich zeigten, sind die Aptamer-*Target*-Interaktionen somit als schwächer einzuordnen. Die im Vergleich stärkste Interaktion konnte zwischen Aptamer 620 und Lysozym beobachtet werden.

Im Anschluss an die Betrachtung der Sequenzierungsergebnisse wurde das Aptamer 601 nicht als potentieller Kandidat für weitere Untersuchungen eingeordnet, da es mit einer Länge von 89 Basen deutlich von der zu erwartenden Länge von 76 Basen abwich und darüber hinaus sowohl nach der Ovalbumin- als auch nach der Lysozym-SELEX auftrat. Im Rahmen der Untersuchungen mittels des Fluoreszenzassays sollte unter Verwendung dieses Aptamers sowohl festgestellt werden, ob diese Nukleinsäure wie erwartet keine spezifischen Bindungen mit dem *Target* Lysozym eingeht und ob dies mittels des entwickelten Tests detektiert werden kann. Es zeigte sich (Abbildung 41), dass bei diesem Aptamer, im Unterschied zu den anderen untersuchten Aptameren, keine Sättigung des Fluoreszenzsignals erreicht werden konnte. Für die vorliegenden Daten wurde zur Erstellung einer Regression zum Vergleich die allgemein bekannte Geradengleichung des Formats $y = mx + b$ (mit m = Steigung, x = Konzentration Aptamer und b = Achsenabschnitt) verwendet. Sowohl das Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,971$ für die lineare Regression als auch das Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,977$ für die Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung deuten jedoch in gleichem Maße eine Korrelation an. Durch Vergleich der Varianzen zwischen den Messwerten und den durch Regression berechneten Modellwerten wurde unter Verwendung der mathematischen Analysesoftware OriginPro 9.0G das sogenannte Akaike Informationskriterium (AIC, engl.: *Akaike's information criterion*) berechnet (siehe 6.2.5). Ein geringerer AIC-Wert deutet in diesem Zusammenhang das geeignetere Modell an. Im Gegensatz zu allen anderen Aptameren (siehe 8.3) zeigte sich beim Aptamer 601, dass die lineare Regression hier das

geeigneteres Modell darstellt. Auch der mittels des Hill-Fits berechnete K_D -Wert von 1774 ± 3943 nM ist aufgrund der fehlenden Sättigung des Fluoreszenzsignals unbrauchbar und deutet die Nichtanwendbarkeit dieser Regression an. Es konnte somit gezeigt werden, dass der Fluoreszenzassay geeignet ist, um eine unspezifische Wechselwirkung zu detektieren und dass die Einordnung des Aptamers 601 als ungeeignet korrekt ist.

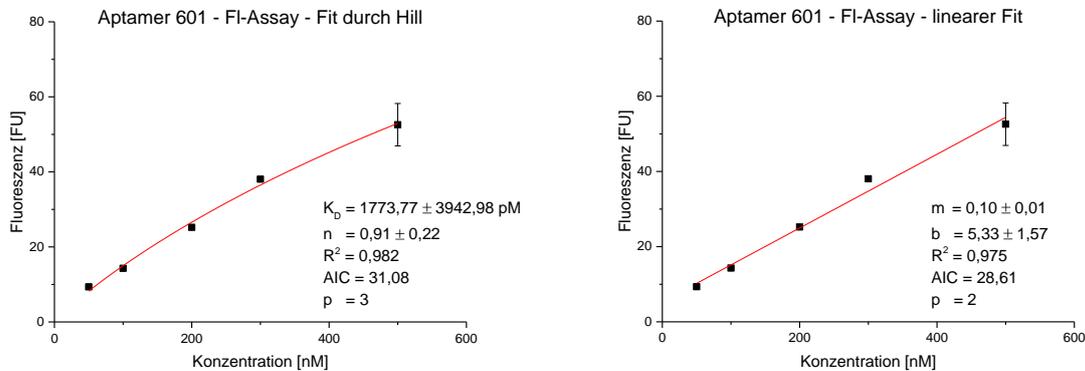


Abbildung 41: Fluoreszenzassay Aptamer 601, Vergleich unterschiedlicher Regressionen.

Dargestellt sind die Daten des Fluoreszenzassays ($n = 2$) mit Standardabweichung für das Aptamer 601. Zur Erstellung einer Regression wurden die Hill-Gleichung sowie die lineare Anpassung gewählt, laut AIC ist die Regression unter Verwendung der linearen Gleichung signifikant besser.

5.2.2.2.2 Surface Plasmon Resonance-Spektroskopie

Um die mittels Fluoreszenzassay bestimmten K_D -Werte weiter abzusichern, wurden die im Rahmen der Antikörpercharakterisierung gewonnenen Erfahrungen zur Bestimmung der Affinität unter Verwendung der SPR-Spektroskopie genutzt. Während es bei dem entwickelten Fluoreszenzassay nicht möglich ist, alle Teilprozesse der Interaktionen zu untersuchen, kann durch diese Technik sowohl die Assoziation als auch eine mögliche Dissoziation in Echtzeit durch eine Veränderung des Signals verfolgt werden. Wie bereits im Rahmen der Antikörperuntersuchung (siehe 5.1.1) beschrieben, wurden auch hier die zu untersuchenden *Targets* auf dem modifizierten Sensorchip unter Verwendung von EDC/NHS kovalent gebunden. Für die Bestimmung des K_D -Wertes wurden in diesem Vorgang ungefähr 200 bis 400 pg Protein immobilisiert, durch produktionsbedingte Variationen zwischen den verwendeten Chips und eine mit zunehmender Zeit nachlassende Aktivierung konnte trotz einer konstanten Proteinkonzentration in der Immobilisierungslösung nicht vermieden werden, dass hier Unterschiede auftraten. Da der K_D -Wert jedoch von der Konzentration des immobilisierten Bindungspartners unabhängig ist (siehe 3.4.2), führt dieser Faktor nicht zu einer Beeinträchtigung der Ergebnisse. Für die Untersuchung der Affinität wurde der Laufpuffer der Immobilisierung durch den im Rahmen der Aptamerselektion eingesetzten Weißweinpuffer (+ 0,05 % Tween-20) ersetzt, um so wieder die für die Ausbildung der Aptamersekundärstrukturen erforderlichen Bedingungen herzustellen. Die Regeneration der Sensoroberfläche erfolgte, im Anschluss an die Dissoziationszeit durch Injektion (25 μ L) von Precondition II-Puffer (10 mM NaOH, 1 M NaCl in dest. Wasser), gegebenenfalls in den Leitungen verbliebene Rückstände wurden durch einen Spülschritt mit dem Laufpuffer aus dem System entfernt. Die Sensorchips wurden nur solange für die Untersuchungen eingesetzt, bis durch eine abfallende Basislinie eine Degradation der Sensoroberfläche erkennbar war.

Die Mikrofluidik des für die Untersuchungen genutzten SPR4 (Sierra Sensors GmbH, Hamburg, Deutschland) ermöglichte die separate Ansteuerung von bis zu vier unterschiedlichen *spots* auf dem Sensorchip, sodass wie

im Kontext der Antikörpercharakterisierung (5.1.1) auch hier über einen dieser Kanäle nach der Aktivierung lediglich das Blockierungsreagenz geleitet wurde und so im Anschluss an die Messung die durch eine Interaktion zwischen Aptamer und Sensoroberfläche generierten Signale subtrahiert werden konnten. Die Aptamerlösungen wurden durch Verdünnungen mit dem Laufpuffer hergestellt und vor Beginn der Messungen einem *Refold* (Erhitzung auf 95 °C, unmittelbare Abkühlung auf 4 °C) unterworfen, sodass gegebenenfalls während der Lagerung gebildete Sekundärstrukturen aufgelöst wurden. Um einen Einfluss durch die Erhitzung auszuschließen, wurde immer nach zwei Aptamerlösungen eine auf die gleiche Art und Weise behandelte Pufferlösung injiziert und das induzierte Signal subtrahiert. Durch diese doppelte Referenzierung wird sichergestellt, dass auch im Rahmen dieser Auswertung lediglich das durch die Aptamer-*Target*-Interaktion induzierte Signal für die Berechnung des K_D -Wertes genutzt wird.

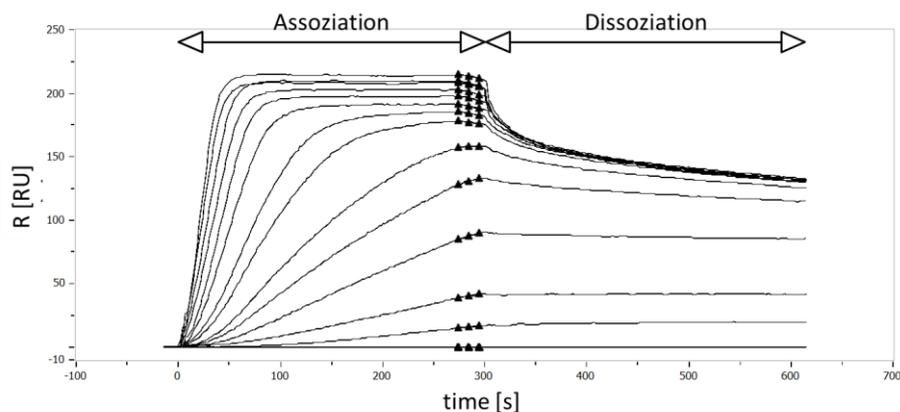


Abbildung 42: Sensogramme Aptamer 619.

In der Abbildung sind die durch Injektionen einer Verdünnungsreihe (1 - 100 nM, siehe auch Tabelle 23) des Aptamers 619 und doppelte Referenzierung erhaltenen Sensogramme dargestellt. Auf dem genutzten Sensorchip wurde das SELEX-*Target* Lysozym immobilisiert, der Laufpuffer entspricht dem Selektionspuffer des Aptamers. Zur Verdeutlichung wurden neben der Injektionszeit (Assoziation) und Dissoziationszeit (Dissoziation) auch die zur Berechnung des K_D -Wertes genutzten Zeitpunkte markiert. R mit der Einheit RU (engl.: *resonance units*) stellt hierbei die Änderung des Resonanzwinkels dar, welcher durch Interaktionen in unmittelbarer Nähe der Sensoroberfläche verändert wird.

Die auf diese Art und Weise generierten Sensogramme sind beispielhaft für das Aptamer 619 in Abbildung 42 dargestellt. Es ist gut zu erkennen, dass hier ab einer Konzentration zwischen 10 und 15 nM eine beginnende Sättigung des SPR-Signals zu beobachten ist. Obwohl während der Injektion der Aptamerlösung (Assoziation) bei höheren Konzentrationen geringfügige Steigerungen des Signals zu erkennen sind, deutet das zur x-Achse parallel verlaufende Signal die Sättigung an. Diese Interpretation der Ergebnisse wird unterstützt durch das Signal während der Dissoziationsphase nach dem Ende der Injektion, da in diesem Zeitraum bei allen Konzentrationen ab 15 nM das Signal auf einen gemeinsamen Maximalwert zurückfällt. Das in diesem Zeitraum parallel zur x-Achse verlaufende Signal deutet eine spezifische und vor allem stabile Interaktion an, da bei einer Trennung der Bindung eine deutliche Signalschwächung zu erwarten wäre. Für die Berechnung des K_D -Wertes wurde der Mittelwert aus drei Datenpunkten kurz vor dem Ende der Injektion genutzt (siehe Markierung in Abbildung 42). Für jedes Aptamer wurden so viele voneinander unabhängige Bestimmungen durchgeführt, dass für jede Konzentration mindestens drei Werte vorliegen (siehe beispielhaft für Aptamer 619 in Tabelle 23, Daten für alle anderen Aptamere siehe 8.3).

Tabelle 23: Messwerte SPR-Spektroskopie Aptamer 619.

In der Tabelle sind die nach doppelter Referenzierung (Sensoroberfläche + Puffer) generierten Signale unmittelbar vor dem Ende der Injektion aufgeführt. Messung 1 entspricht hierbei Abbildung 42, Messung 2 & 3 sind in 8.3 dargestellt. Der in der letzten Spalte angegebene Mittelwert und die resultierende Standardabweichung wurden zur Berechnung des K_D -Wertes genutzt (siehe auch Abbildung 43). R mit der Einheit RU (engl.: *resonance units*) stellt hierbei die Änderung des Resonanzwinkels dar, welcher durch Interaktionen in unmittelbarer Nähe der Sensoroberfläche verändert wird.

Konzentration [nM]	R [RU]			Mittelwert ± Standardabweichung
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	
1	15,77	7,37	4,36	9,17 ± 5,91
2,5	40,20	41,19	34,50	38,63 ± 3,61
5	87,55	90,40	92,54	90,16 ± 2,50
7,5	130,47	149,65	142,54	140,89 ± 9,70
10	157,80	163,02	152,44	157,75 ± 5,29
15	177,14	174,35	172,21	174,57 ± 2,47
20	184,03	187,59	162,15	177,92 ± 13,78
30	189,72	194,41	175,22	186,45 ± 10,00
40	196,08	201,05	183,55	193,56 ± 9,02
50	201,09	201,29	191,78	198,05 ± 5,43
60	207,90	203,57	195,63	202,37 ± 6,22
75	206,94	202,79	198,29	202,67 ± 4,33
100	213,26	211,48	202,14	208,96 ± 5,97

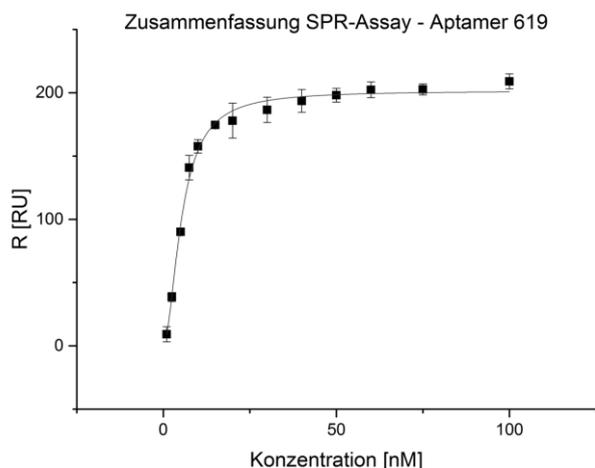


Abbildung 43: Zusammenfassung SPR-Spektroskopie Aptamer 619.

Grafisch dargestellt ist das Ergebnis der Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung für das Aptamer 619 unter Verwendung der in Tabelle 23 angegebenen Daten. R mit der Einheit RU (engl.: *resonance units*) stellt hierbei die Änderung des Resonanzwinkels dar, welcher durch Interaktionen in unmittelbarer Nähe der Sensoroberfläche verändert wird.

Da, wie bereits erwähnt, im Rahmen der SELEX keine Limitierung auf eine definierte Struktur der jeweiligen *Targets* zur Interaktion mit den Aptameren vorlag, wurde auch in diesem Kontext der bereits unter 5.1.1 und 5.2.2.2.1 beschriebene Hill-Fit genutzt, um unter Verwendung der mathematischen Analysesoftware OriginPro 9.0G eine Regression durchzuführen. Dieser auf Minimierung der Differenz zwischen Regressionsfunktion und den Datenpunkten basierende, iterative Ansatz ermöglicht ein direktes Ablesen der Dissoziationskonstante, welche infolge der voneinander abweichenden Datenpunkte entsprechend auch mit einer Abweichung

angegeben werden muss (siehe auch Tabelle 24). Abbildung 43 beinhaltet die grafische Auftragung der Aptamerkonzentration gegen die durch die SPR-Spektroskopie erhaltenen Signale. Die bereits bei der Betrachtung der Sensogramme erwähnte Sättigung ab einer Konzentration von 15 nM, ist auch in diesem Zusammenhang gut zu erkennen. Der resultierende K_D -Wert von $5,49 \pm 0,24$ nM deutet eine starke Bindung zwischen dem Aptamer 619 und dem *Target* Lysozym an. Wie bei der Bestimmung der Dissoziationskonstante mittels Fluoreszenzassay wurde auch hier ein Hill-Koeffizient von ungefähr 1,7 bestimmt, die Bindung zwischen den beiden Bindungspartnern ist somit anscheinend nicht auf ein Epitop begrenzt und die Anlagerung weiterer Nukleinsäure erfolgt möglicherweise kooperativ. Um festzustellen, ob eine Regression unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung zur Beschreibung der Zusammenhänge besser geeignet ist, wurden entsprechende Berechnungen auch mit dieser Gleichung durchgeführt. Durch den bereits unter 5.1.1 beschriebenen F-Test wurde im Anschluss untersucht, welches der beiden Modelle unter Berücksichtigung der Parameteranzahl signifikant geeigneter ist. Bei allen Aptameren außer dem Aptamer 678 zeigte sich, dass die Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung signifikant besser ($p = 0,05$) ist. Unter Verwendung des Aptamers 681, welches nachträglich sequenziert wurde und auch bereits im Rahmen des Fluoreszenzassays keine auswertbaren Ergebnisse erbrachte, konnten auch im Rahmen der SPR-Spektroskopie keine Sättigungskurven generiert und damit auch keine Dissoziationskonstante berechnet werden. Die mittels SPR-Spektroskopie und Regression bestimmten Ergebnisse für die anderen Aptamere sind in Tabelle 24 und 8.3 aufgeführt.

Tabelle 24: Ergebnisse SPR-Spektroskopie.

Angegeben sind die mittels SPR-Spektroskopie berechneten Dissoziationskonstanten und Hill-Koeffizienten in Mehrfachbestimmung ($n \geq 3$). *Berechnet unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung.

#	Target	Dissoziationskonstante [nM]	Hill-Koeffizient
600	Lysozym	$31,13 \pm 1,46$	$2,05 \pm 0,14$
602	Lysozym	$22,87 \pm 1,18$	$2,46 \pm 0,28$
619	Lysozym	$5,49 \pm 0,24$	$1,70 \pm 0,12$
620	Lysozym	$9,28 \pm 1,16$	$2,19 \pm 0,59$
623	Lysozym	$21,78 \pm 1,31$	$2,48 \pm 0,29$
604	Ovalbumin	$73,35 \pm 4,87$	$2,65 \pm 0,43$
628	Ovalbumin	$15,88 \pm 1,33$	$1,61 \pm 0,17$
678	Ovalbumin	$11,03 \pm 1,38^*$	1*

Der Vergleich zwischen den mittels SPR-Spektroskopie und Fluoreszenzassay bestimmten Werten (siehe Tabelle 22) lässt erkennen, dass bei beiden Methoden Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich bestimmt wurden. Im Vergleich zu den picomolaren K_D -Werten, welche für die im Rahmen des antikörperbasierten Biosensors eingesetzten Immunglobuline bestimmt wurden (siehe 5.1.1), deuten die Werte der Aptamere eine schwächere Interaktion an. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Antikörper auch im Vergleich mit anderen Immunglobulinen eine starke Bindung zu ihrem Antigen aufweisen.(37,103) Außerdem werden auch solche Antikörper kommerziell vertrieben und in der Forschung genutzt, welche deutlich größere Dissoziationskonstanten aufweisen.(103) Auch im Vergleich mit anderen, bereits publizierten Aptameren liegen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestimmten Bindungsstärken im oberen Bereich, es sind sowohl stärkere als auch schwächere Bindungen bekannt.(57,72,129,130)

Während die durch Nutzung des entwickelten Fluoreszenzassays bestimmten Dissoziationskonstanten im Bereich von 60 bis 281 nM liegen, konnten unter Verwendung der SPR-Spektroskopie K_D -Werte zwischen 5 und 73 nM bestimmt werden. Erklärungsansätze sind wahrscheinlich in erster Linie bei zwei Unterschieden zwischen den beiden Methoden zu suchen. So werden im Rahmen des Fluoreszenzassays zwar Waschschriffe durchgeführt, um das durch unspezifische Wechselwirkungen induzierte Hintergrundsignal zu minimieren, eine doppelte Referenzierung wie bei der Auswertung der SPR-Spektroskopie durch Berücksichtigung des Referenzkanals und der Pufferinjektionen kann jedoch durch diese Vorgehensweise nicht in gleichem Maße gewährleistet werden. Außerdem unterscheiden sich die beiden Methoden hinsichtlich des Zeitpunkts der Quantifizierung, da bei der SPR-Spektroskopie unmittelbar vor dem Ende der „Inkubation“ von Aptamer und *Target* (Dauer der Injektion/Assoziationsphase) das Signal aufgenommen wird, beim Fluoreszenzassay sogar erst nach dem Ende der Inkubation und einem Waschschriff. Die SPR-Spektroskopie visualisiert durch die kontinuierliche Aufnahme des Signals diesen Interpretationsansatz. So ist durch den parallelen Verlauf des Signals zur x-Achse innerhalb der Dissoziationszeit des Sensogramms (siehe beispielhaft Abbildung 42) zwar die stabile Bindung zwischen den beiden Bindungspartnern ableitbar, eine geringfügige Trennung ist jedoch insbesondere bei den höheren Konzentrationen zu erkennen. Bei einer geringen Aptamerkonzentration, bei der nicht alle Bindungsstellen besetzt sind und somit eine Signalsättigung nicht erkennbar ist, kann ein Aptamer, welches sich von der Sensoroberfläche ablöst, möglicherweise wieder an einer anderen Stelle gebunden werden, sodass in Summe keine Veränderung des Signals resultiert. Bei einer nahezu vollständigen Sättigung aller Bindungsstellen ist dieser Effekt des *Rebinding* deutlich unwahrscheinlicher, sodass mit zunehmender Zeit eine Signalreduktion zu erwarten ist. Bei Übertragung dieses Zusammenhanges auf den Fluoreszenzassay wird deutlich, dass durch die nicht unmittelbar nach der Inkubation erfolgende Quantifizierung eine Beeinträchtigung der Ergebnisse kaum zu vermeiden ist. Ein Vergleich zwischen diesen beiden Methoden kann aufgrund der unterschiedlichen Zeitpunkte somit nicht absolut erfolgen, eine Einordnung hinsichtlich der Affinität und einer möglicherweise vorhandenen Reihenfolge der Aptamere ist jedoch möglich. Aus den genannten Gründen werden zur Bewertung in erster Linie die mittels SPR-Spektroskopie erzielten Ergebnisse herangezogen.

Insgesamt führte die SELEX unter Verwendung von Lysozym als *Target* zur Identifikation von fünf unterschiedlichen Aptameren, welche alle eine entsprechende Affinität aufwiesen. Die Aptamere 619 und 620 zeigten in beiden Bestimmungen der Dissoziationskonstanten die vielversprechendsten Werte. Möglicherweise ist das im Rahmen der Sequenzanalyse identifizierte Motiv 3 (TTGTC A) für diese Eigenschaft von Bedeutung, da alle berechneten Sekundärstrukturen der beiden Aptamere diese Sequenz in einzelsträngigen, exponierten Positionen aufwiesen. Das Aptamer 600, dessen K_D -Wert sowohl in der SPR-Spektroskopie als auch im Fluoreszenzassay das Maximum innerhalb der Gruppe der Lysozymaptamere darstellt, weist dieses Motiv zwar ebenso auf, den berechneten Sekundärstrukturen zufolge jedoch überwiegend in doppelsträngigen Abschnitten. Ein Zusammenhang zwischen der hohen Stabilität der Bindung zwischen Aptamer 619 und Lysozym kann jedoch wahrscheinlich nicht als Erklärung für das zweimalige Auftreten nach der Sequenzierung herangezogen werden, da auch das relativ schwach bindende Aptamer 600 zwei Mal sequenziert wurde. Die innerhalb des Aptamers 600 auftretenden, Guanin-reichen Abschnitte und die in diesem Zusammenhang möglicherweise gebildeten G-Quadruplexe scheinen den vorliegenden Ergebnissen zufolge keinen besonders positiven Einfluss auf die Affinität zu Lysozym zu haben. Das Aptamer 623, welches den CD-spektroskopischen Messungen zufolge keinen G-Quadruplex ausbildet, zeigt eine höhere Affinität. Auch das Aptamer 602, welches im Gegensatz zu den anderen Aptameren um eine Base verkürzt ist, zeigte in den durchgeführten Untersuchungen eine Affinität zu Lysozym.

Abgesehen vom Aptamer 681, bei dem weder im Rahmen der SPR-Spektroskopie noch durch den Fluoreszenzassay eine Dissoziationskonstante bestimmt werden konnte und welches deswegen im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit nicht weiter betrachtet werden soll, zeigten die drei Aptamere 604, 628 und 678 alle eine Affinität zu Ovalbumin. Es zeigte sich hinsichtlich der Affinität zum *Target* ein interessanter Unterschied zwischen den beiden Methoden, die Reihenfolge der stärksten Bindungen ist bei den beiden Assays exakt vertauscht. Der oben erwähnte Unterschied bezüglich des zur Auswertung genutzten Zeitpunkts könnte für eine Erklärung herangezogen werden. Beim Vergleich der Sensogramme, welche aus den Vermessungen der Aptamere 604 und 628 resultieren (siehe Abbildung 44), ist ein wesentlicher Unterschied hinsichtlich des Kurvenverlaufs in den Dissoziationsphasen zu erkennen. So verläuft das Signal bei Aptamer 604 (Abbildung 44, links) parallel zur x-Achse, während bei Aptamer 628 (Abbildung 44, rechts) und 678 (siehe 8.3) eine kontinuierliche Verringerung zu erkennen ist. Diese negative Steigung deutet wahrscheinlich auf eine weniger stabile Bindung zwischen Aptamer und *Target* bei höheren Konzentrationen hin und könnte möglicherweise die Bestimmung der Dissoziationskonstanten beeinflusst haben.

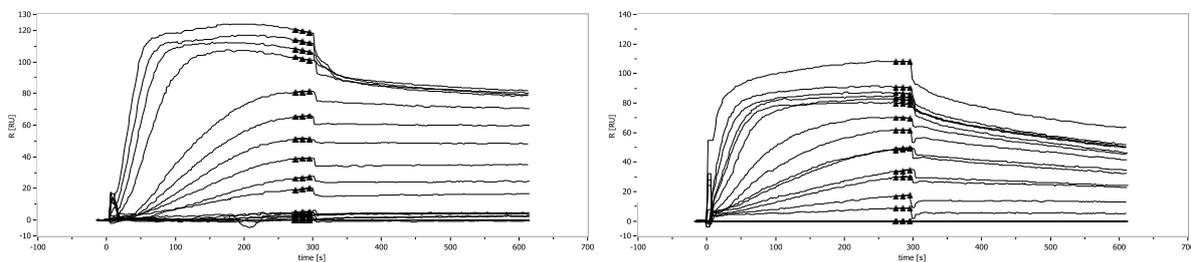


Abbildung 44: Vergleich zwischen Sensogramme Aptamer 604 und 628.

Abgebildet sind Sensogramme der Messungen zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Aptamere 604 (links) und 628 (rechts). Der unterschiedliche Kurvenverlauf innerhalb der Dissoziationsphase (ab 300 s) ist gut zu erkennen.

Da, wie oben erwähnt, den Ergebnissen der SPR-Spektroskopie eine höhere Bedeutung zugestanden wird, soll die weitere Betrachtung anhand dieser Ergebnisse erfolgen. So zeigte das Aptamer 604 die größte Dissoziationskonstante und damit die schwächste Bindung zwischen Aptamer und Ovalbumin. Die bereits im Rahmen der Sequenzanalyse beschriebene Vermutung, dass das lediglich aus Primerwiederholungen gebildete Aptamer eine weniger starke Bindung ausbildet, wird somit unterstützt. Die Bindung der Aptamere 628 und 678 zu Ovalbumin ist laut den mittels SPR-Spektroskopie erzielten Ergebnissen relativ stark und liegt im Bereich der stärksten Lysozymaptamere 619 und 620.

Die Aptamere 606, 610, 612 und 616, welche aus der SELEX mit Casein stammen, wurden in diesem Rahmen mittels SPR nicht untersucht. Grund hierfür ist, dass parallel die Entwicklung des unter 5.2.3.3 beschriebenen *Aptastaining* vorangetrieben wurde und die in diesem Kontext erzielten Ergebnisse hinsichtlich der Spezifität dieser Aptamere weitere Untersuchungen obsolet, sowie einen Einsatz im Rahmen analytischer Methoden sehr unwahrscheinlich gemacht haben.

Abschließend sollte angemerkt werden, dass sowohl die Immobilisierung der zu untersuchenden Proteine auf den SPR-Chips, als auch die Bindung an die magnetischen Partikel im Vorfeld der SELEX, unter Verwendung eines Puffersystems und Aktivierung der carboxylierten Oberflächen durch EDC/NHS durchgeführt wurden. Im Rahmen der SPR-Chipherstellung wurde das zu immobilisierende Protein in Acetatpuffern mit unterschiedlichen pH-Werten gelöst und ohne Aktivierung über die Sensoroberfläche geleitet (ähnlich Abbildung 20). Für die Immobilisierung wurde dann der Puffer genutzt, bei dem das stärkste Signal generiert wurde, da unter diesen Bedingungen offensichtlich die Ladungen der Carboxylgruppen auf der

Sensoroberfläche beziehungsweise der funktionellen Gruppen innerhalb der Aminosäureseitenketten so verteilt sind, dass eine maximale Annäherung stattgefunden hat. Während im Rahmen der *Target*-Immobilisierung ein MES-Puffer (2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure) mit einem pH-Wert von 5, welcher wie andere Good-Puffer durch eine geringe Interaktion mit Proteinen und eine hohe Stabilität gekennzeichnet ist, eingesetzt wurde, konnten im Vorfeld der SPR-Chipherstellungen mit Lysozym und Ovalbumin stärkere Signale bei anderen pH-Werten beobachtet werden.(106) Möglicherweise könnte durch die Verwendung des im Rahmen der SPR-Chipherstellung genutzten Puffersystems eine Optimierung der Immobilisierung und daraus resultierend auch eine Optimierung der gesamten SELEX erreicht werden.

5.2.3 Aptamerbasierte Methoden

Nach der Identifizierung unterschiedlicher Aptamere unter Verwendung der *just in time-selection* und der Charakterisierung im Hinblick auf die Sequenzen sowie die Affinität zu den entsprechenden SELEX-*Targets*, sollten im Folgenden die Einsatzmöglichkeiten in analytischen Verfahren untersucht werden.

5.2.3.1 Aptamerbasierter Biosensor

In Analogie zum antikörperbasierten Biosensor zur Detektion von Lysozym sollte auch unter Verwendung der Aptamere und der SPR-Spektroskopie eine entsprechende Methode entwickelt werden. Dabei wurde in diesem Kontext auf die Aptamere 619 und 620 aus der SELEX mit dem *Target* Lysozym zurückgegriffen, da sich im Rahmen der Affinitätsuntersuchungen zeigte, dass die entsprechenden Aptamer-Lysozym-Komplexe die größte Stabilität aufweisen. Des Weiteren wurden die Aptamere 604 und 678 aus der Ovalbumin-SELEX zur Herstellung von Biosensoren genutzt, da diese Aptamere ebenso durch eine hohe Affinität gekennzeichnet sind (Aptamer 678) beziehungsweise weil untersucht werden sollte, ob das mehrere Primerwiederholungen beinhaltende Aptamer 604 möglicherweise unspezifische Bindungen eingeht und somit eher als Kontaminante einzuordnen ist. Auch der Umstand, dass im Rahmen der SPR-Untersuchungen nur beim Aptamer 678 die Regression unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung geeigneter war, hob diese Nukleinsäure hervor.

5.2.3.1.1 Methodenentwicklung

Zu Beginn der Methodenentwicklung musste auch hier eine geeignete Immobilisierungsstrategie auf den zur Verfügung stehenden SPR-Sensorchips entwickelt werden. Bei allen bisher durchgeführten Untersuchungen unter Verwendung der SPR-Spektroskopie erfolgte die Immobilisierung auf dem Sensorchip durch die Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen primären Aminen in den Seitenketten der Proteine und Carboxylgruppen auf der Goldoberfläche des Sensors. Um diese bisher erfolgreich genutzte Methode und die vorhandenen SPR-Sensorchips weiter einsetzen zu können, wurde zunächst versucht 5'-Amin-C₁₂-modifizierte Aptamere direkt nach der Aktivierung durch EDC/NHS auf der Sensoroberfläche zu immobilisieren. Da bei diesem Ansatz jedoch nur eine sehr geringe Menge an Aptamer auf dem Chip verblieb, welche darüber hinaus keine messbare Affinität zum *Target* zeigte, wurde im Folgenden ein Ansatz unter Nutzung der Interaktion zwischen Streptavidin und Biotin verfolgt. Dieses aus *Streptomyces avidinii* isolierte Protein mit einer Größe von 66 kDa weist, ebenso wie das aus Hühnerei stammende Avidin, eine hohe Affinität zum Vitamin B₇ auf und kann bis zu vier dieser Moleküle binden. Aufgrund der gegenüber hohen Salzkonzentrationen und Schwankungen des pH-Wertes stabilen Bindung wird dieses Bindungspaar in der Biochemie häufig genutzt. (131)

Vor der endgültigen, kovalenten Bindung wurde durch Injektion von Streptavidin in Acetatpuffern mit unterschiedlichen pH-Werten über den nicht aktivierten Sensorchip evaluiert, bei welchem pH-Wert das

Protein so geladen ist, dass die Anlagerung an die Sensoroberfläche maximal ist. In Analogie zu den Untersuchungen im Vorfeld der Antikörperchipherstellung (siehe 5.1.2.1) wird auch hier davon ausgegangen, dass unter diesen Bedingungen die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer kovalenten Bindung maximal wird und so die größtmögliche Menge an Protein auf dem Sensorchip gebunden wird. Nachdem festgestellt werden konnte, dass Streptavidin in einem Acetatpuffer mit einem pH-Wert von 5,5 das größte Signal generiert, wurde dieser Puffer im Folgenden für die Immobilisierung genutzt. Die Modifizierung der Aptamere erfolgt durch das bereits im Rahmen der SELEX eingesetzte BEAMing (siehe 6.2.3.2) unter Verwendung eines 5'-biotinylierten *Forward*-Primers, sodass auch die resultierenden Aptamere am 5'-Terminus biotinyliert sind. Das BEAMing-Eluat wurde mittels Kontroll-PCR und AGE der Amplifikate im Hinblick auf möglicherweise vorhandene Nebenprodukte untersucht und bei ausreichender Reinheit unter Verwendung der Mikrofluidik des genutzten SPR-4 über einzelne Kanäle des mit Streptavidin belegten Sensorchips geleitet.

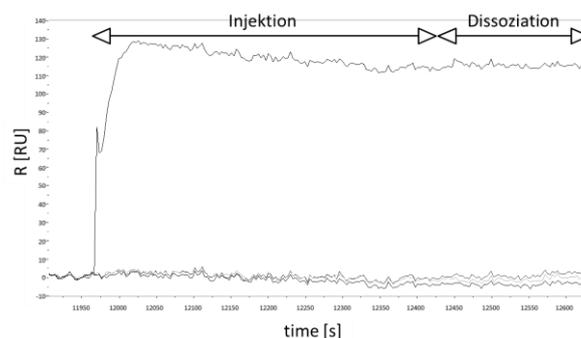


Abbildung 45: Immobilisierung Aptamer 619

Abgebildet ist ein Ausschnitt des Sensogramms der Immobilisierung des 5'-biotinylierten Aptamers 619 (ansteigende Kurve). Auf dem Chip wurde im Vorfeld Streptavidin immobilisiert, die Signale auf Basislinienniveau werden durch das Signal auf den anderen Kanälen generiert.

In Abbildung 45 ist beispielhaft die Immobilisierung des Aptamers 619 dargestellt, die große Steigung unmittelbar nach dem Start der Injektion ist auf die sehr starke Bindung zwischen Streptavidin und Biotin ($K_D = 1 \text{ fM}$) zurückzuführen.⁽¹³¹⁾ Des Weiteren kann aufgrund der relativ schnell eintretenden Sättigung während der Injektion und dem stabilen Signal während der Dissoziationsphase davon ausgegangen werden, dass alle sterisch nicht gehinderten Bindungsstellen abgesättigt sind und das Aptamer somit auf der Sensoroberfläche immobilisiert ist. Zur Referenzierung wurden im Zuge der Streptavidinimmobilisierung die entsprechenden Lösungen über einen weiteren Kanal geleitet, welcher dann im Folgenden durch eine Injektion von Biotin blockiert wurde. Alle weiteren Bindungsstellen auf der gesamten Sensoroberfläche wurden wie in allen bisherigen Versuchen durch Ethanolamin abgesättigt.

Im Anschluss sollten die unter Verwendung der Aptamere 619 und 620 hergestellten Biosensoren hinsichtlich der Bindungsfähigkeit der immobilisierten Aptamere untersucht werden. Für diesen Zweck wurde als Laufpuffer und für die Herstellung einer Verdünnungsreihe von Lysozym der Weißweinpuffer aus der SELEX (+0,05 % Tween-20) eingesetzt. Wie bei dem unter 5.1.2 beschriebenen antikörperbasierten SPR-Biosensor wurde auch hier für die konsekutive Injektion der Proben ein Volumen von 25 μL eingesetzt, anschließend jedoch die durch das SPR-4 definierte, maximale Dissoziationszeit von 300 s genutzt.

Bei der Betrachtung der Rohdaten (Abbildung 46 links und 8.8) ist zu erkennen, dass durch den entwickelten Biosensor ein konzentrationsabhängiges und in der Injektionsphase ungesättigtes Signal generiert wird. Das parallel zur x-Achse verlaufende Signal innerhalb der Dissoziationszeit lässt den Rückschluss zu, dass die in

diesem Kontext ausgebildete Bindung stabil ist. Ohne eine Referenzierung bleibt jedoch unklar, ob es sich in diesem Kontext um eine Interaktion zwischen Lysozym und dem Aptamer oder zwischen Lysozym und Streptavidin handelt. Aus diesem Grund wurde die Probenlösung auch über den mit Streptavidin/Biotin belegten Referenzkanal geleitet und das aus einer möglichen Interaktion resultierende Signal aufgenommen. Durch Subtraktion des Referenzsignals ergibt sich während der Injektion und zu Beginn der Dissoziationsphase für alle Konzentrationen ein negatives Signal, ein positives Signal ist erst wieder am Ende der Dissoziationsphase vorhanden (Abbildung 46 rechts). Da im Rahmen der Sensorchipherstellung (siehe 6.2.4) sowohl die Aktivierungs- als auch die Streptavidinlösung über beide Kanäle geleitet wurde und das gleiche Signal resultierte, kann davon ausgegangen werden, dass die Menge an kovalent gebundenem Streptavidin gleich ist. Lediglich das aus der SELEX mit dem *Target* Lysozym stammende Aptamer wurde nur über einen der beiden Kanäle geleitet und dementsprechend nur dort immobilisiert.

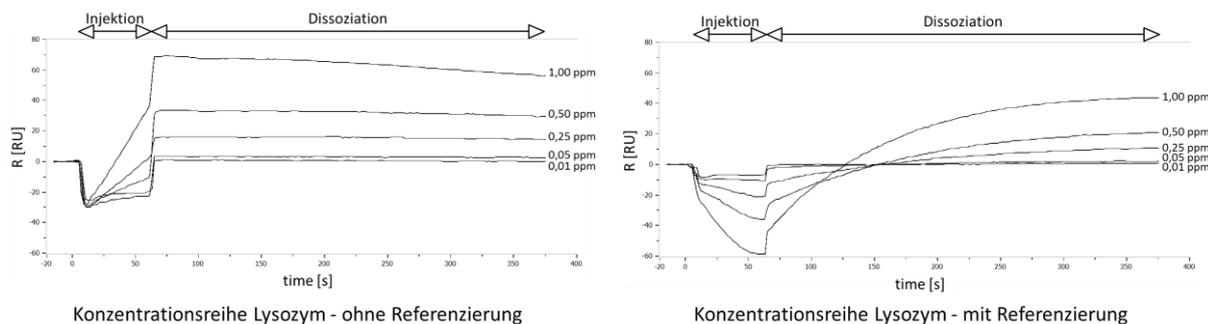


Abbildung 46: Vergleich Konzentrationsreihe Lysozym SPR-Biosensor des Aptamers 620 mit und ohne Referenzierung.

Sensogramme einer Konzentrationsreihe von Lysozym in Weißweinpuffer, vermessen unter Verwendung des beschriebenen SPR-Biosensors mit dem Aptamer 620. Links: Generierte Sensogramme ohne Referenzierung. Rechts: Sensogramme mit Referenzierung gegenüber Sensoroberfläche und Streptavidin/Biotin.

Anhand des Signalverlaufes ist deutlich zu erkennen, dass eine Interaktion zwischen dem Lysozym in der Probenlösung und dem Streptavidin/Biotin auf der Sensoroberfläche des Referenzkanals stattfindet. Da die Veränderung des Resonanzwinkels massenabhängig ist und die Differenz zwischen den beiden Kanälen zu einem negativen Signal führt, ist davon auszugehen, dass während der Injektion und unmittelbar zu Beginn der Dissoziationsphase sogar mehr Lysozym auf dem Referenzkanal als auf dem Kanal mit den Aptameren zurückgehalten wird. Eine Auswertung in diesem Bereich ist somit nicht sinnvoll. Der weitere Verlauf des referenzierten Signals lässt jedoch auch erkennen, dass nach dem Ende der Injektion, wenn durch die Mikrofluidik nicht kontinuierlich weiter die Lysozym-haltige Probenlösung über den Sensorchip geleitet wird, der Einfluss des Referenzkanals geringer wird. Bereits 90 Sekunden nachdem lediglich der Laufpuffer des Systems über den Chip fließt (Dissoziationszeit) ist das durch die Interaktion von Lysozym mit dem Referenzkanal induzierte Signal so gering, dass das referenzierte Signal positiv wird. Da der einzige Unterschied zwischen den beiden Kanälen das immobilisierte Aptamer ist, kann geschlossen werden, dass eine stabile nicht-kovalente Bindung zwischen Lysozym und der Nukleinsäure auch nach der Immobilisierung ausgebildet werden kann. Eine mögliche Auswertung sollte jedoch weder während der Injektion noch unmittelbar zu Beginn der Dissoziationszeit stattfinden, sondern erst am Ende nachdem die Trennung unspezifischer Bindungen ermöglicht wurde.

Neben der auch nach der Injektion weiterhin möglichen Interaktion zwischen Aptamer und *Target* muss auch gewährleistet sein, dass die Aptamere keine Bindungen mit anderen Substanzen eingehen und somit ein falsch-positives Signal generieren. Eine Kreuzreaktivität kann die Einsatzmöglichkeiten für analytische Zwecke

deutlich einschränken, da unter diesen Umständen nicht zwischen einem Positivbefund und einem Falschpositivbefund unterschieden werden kann.(132) Diese als Spezifität beschriebene Eigenschaft wurde initial durch Herstellung einer Konzentrationsreihe von Ovalbumin und Vermessung mittels der Biosensoren mit den Aptameren 619 und 620 untersucht. Die in diesem Kontext aufgenommenen Sensogramme erwecken ohne eine Referenzierung (Abbildung 47 links und 8.8) den Eindruck, dass eine Interaktion zwischen Aptamer und Protein stattgefunden hat. Wird jedoch das durch die Interaktionen auf dem Referenzkanal erzeugte Signal zur Referenzierung genutzt, ergibt sich ein, insbesondere im Vergleich mit der Lysozymkonzentrationsreihe, gänzlich anderes Bild (Abbildung 47 rechts). Die nach der Subtraktion erhaltenen Sensogramme weisen zwar eine Konzentrationsabhängigkeit auf und zeigen durch das konstant parallel zur x-Achse verlaufende Signal eine stabile Bindung an, alle Kurven liegen jedoch im negativen Bereich. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Kanälen liegt im immobilisierten Aptamer 620 aus der SELEX mit dem *Target* Lysozym, welches offensichtlich zu einer Verringerung der Menge an zurückgehaltenem Ovalbumin führt. Es kann somit geschlussfolgert werden, dass die immobilisierte Nukleinsäure keine Bindung mit diesem Protein eingeht und es somit nicht zu einer Retention des Proteins kommt. Außerdem ist zu erkennen, dass Ovalbumin, im Gegensatz zu Lysozym, eine recht stabile Bindung mit dem auf der Sensoroberfläche immobilisierten Streptavidin eingeht.

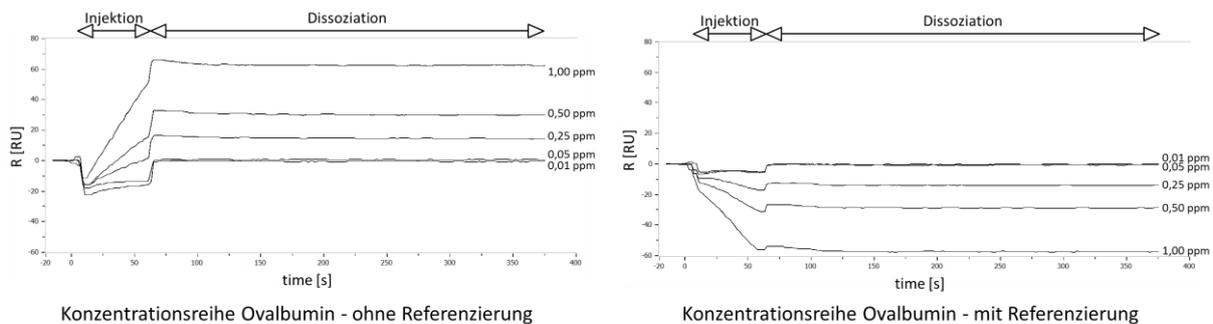


Abbildung 47: Vergleich Konzentrationsreihe Ovalbumin SPR-Biosensor des Aptamers 620 mit und ohne Referenzierung.

Sensogramme einer Konzentrationsreihe von Ovalbumin in Weißweinpuffer, vermessen unter Verwendung des beschriebenen SPR-Biosensors mit dem Aptamer 620. Links: Generierte Sensogramme ohne Referenzierung. Rechts: Sensogramme mit Referenzierung gegenüber Sensoroberfläche und Streptavidin/Biotin.

Die Aptamere 619 sowie 620 und die mit diesen Nukleinsäuren entwickelten Biosensoren sind somit in der Lage diese beiden, aus Hühnerei stammenden Proteine zu differenzieren. Ein idealer Rezeptor für analytische Zwecke weist nicht nur eine hohe Affinität zum *Target* auf, sondern ist auch durch eine hohe Spezifität gekennzeichnet.(133,134) Zur Untersuchung möglicher Interaktionen der Aptamere mit weiteren Proteinen (α -Casein, β -Casein, κ -Casein, α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin) wurden deswegen mit Weißweinpuffer entsprechende Lösungen hergestellt, über die Sensorchips geleitet und gegenüber dem mit Streptavidin/Biotin belegten Kanal referenziert (Abbildung 48 und 8.8). Bei beiden Aptameren aus der Lysozym-SELEX konnte das größte Signal am Ende der Dissoziationszeit durch das SELEX-*Target* generiert werden, entgegen den Erwartungen wurden jedoch bei beiden Biosensoren auch durch andere Proteine positive Signale induziert. Aufgrund des ähnlichen Bindungsverhaltens ist diese Kreuzreaktivität möglicherweise auf homologe Sequenzen oder Strukturen in den Proteinen zurückzuführen und könnte wie bereits erwähnt durch umfassendere Sequenzierungsdaten und Kenntnisse der an der Bindung beteiligten Nukleinbasen weiter eingegrenzt werden.

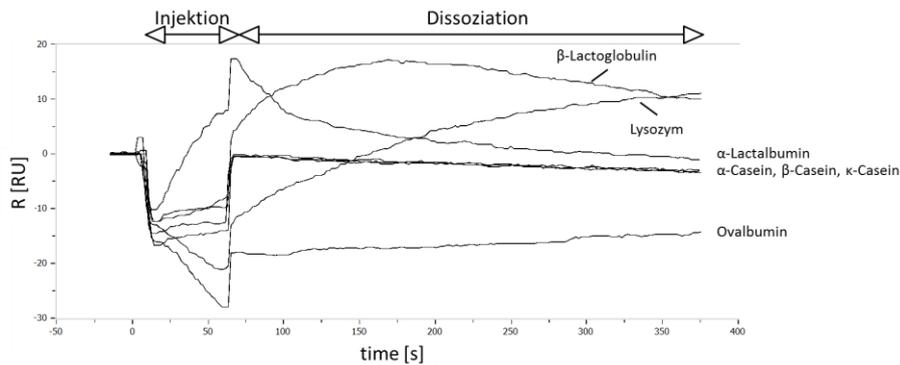


Abbildung 48: Sensogramme Spezifität Aptamer 620.

Sensogramme unterschiedlicher Proteinlösungen (Je 25 μ l, 0,25 ppm; α -Casein, β -Casein, κ -Casein, α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin, Lysozym, Ovalbumin). Aptamer 620-SPR-Biosensor, Laufpuffer: Weißweinpuffer (+0,5 % Tween-20), referenziert gegenüber dem Referenzkanal (Streptavidin/Biotin), Doppelbestimmung in 8.8.

Insbesondere das Molkenprotein β -Lactoglobulin zeigt bei gleicher Konzentration unmittelbar vor der Regeneration ein deutliches Signal auf dem Niveau des SELEX-Targets Lysozym. Das zu Beginn der Dissoziationszeit weiter ansteigende Signal lässt zudem erkennen, dass die Interaktion des Proteins mit den immobilisierten Aptamern stabiler ist als die Interaktion mit dem Streptavidin auf dem Referenzkanal. Eine allgemeine Affinität des Proteins zu DNA ist unter Berücksichtigung der Untersuchungen mit den Aptamern 604 und 678 (siehe 8.8 und Abbildung 49) nicht zu vermuten, da dort keine stabile Anlagerung an die immobilisierten Aptamere zu beobachten war. α -Lactalbumin interagiert zunächst mit den immobilisierten Nukleinsäuren in größerem Maße als mit dem Referenzkanal, das zum Ende der Dissoziation auf ungefähr 1 RU fallende Signal deutet aber an, dass diese Bindung deutlich weniger stabil ist. Wie sich bereits bei der Untersuchung der Lysozymkonzentrationsreihe zeigte, ist es somit auch in diesem Kontext für die Auswertung sinnvoll, einen Zeitpunkt am Ende der Dissoziation zur Auswertung zu nutzen. Zu anderen Zeitpunkten, wie beispielsweise unmittelbar vor dem Ende der Injektion, kann es durch unspezifische Wechselwirkungen, deren Dissoziation durch die konstant über den Sensorchip fließende Proteinlösung nicht begünstigt wird, zu Fehlinterpretationen kommen. Unter Berücksichtigung des Referenzkanals konnte bei den Caseinen kein Signal beobachtet werden, sodass unter gegebenen Bedingungen nicht von einer Interaktion mit dem immobilisierten Aptamer auszugehen ist. Beim Vergleich der Primärstrukturen (durch Software BLASTp, engl.: *basic local alignment search tool*) von Lysozym und α -Lactalbumin konnte eine Übereinstimmung von 38 % festgestellt werden, sodass die Interaktion der Nukleinsäuren mit diesem Protein möglicherweise auf homologe Bereiche zurückzuführen ist.⁽¹³⁵⁾ Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Bindungs epitope sind jedoch auch in diesem Kontext erforderlich, da homologe Sequenzen infolge der dreidimensionalen Faltung der Proteine auch im Inneren der Struktur verborgen sein können. So weist auch Ovalbumin eine Sequenzüberstimmung von 38 % mit Lysozym auf, unter den gegebenen Bedingungen scheint jedoch die Bindung zu Streptavidin in größerem Maße ausgebildet zu werden. Aus der Abwesenheit homologer Aminosäuresequenzen kann jedoch ebenso wenig eine Kreuzreaktivität ausgeschlossen werden. So konnten weder in den Caseinen noch in β -Lactoglobulin homologe Sequenzen mit Lysozym identifiziert werden. Die Interaktion zwischen der Nukleinsäure und dem Molkenprotein muss somit wahrscheinlich auf ähnliche Sekundär- oder Tertiärstrukturen zurückgeführt werden.

Um Kreuzreaktivitäten von Aptamern in Zukunft zu verhindern, sind unterschiedliche Herangehensweisen denkbar. So könnten die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Aptamere als Ausgangspunkt genutzt werden und weitere Schritte zur Steigerung der Selektivität durchgeführt werden. Eine Möglichkeit wäre der Austausch

einzelner Basen in der Sequenz gegen artifizielle Basen, um eine Veränderung der Bindungseigenschaften zu erreichen.(114,136) Auch definierte Einzelbasenaustausche durch die natürlicherweise in DNA und RNA auftretenden Basen oder Verkleinerungen der Sequenz (Minimalmotivversuche) könnten zur Identifikation von den an der Bindung beteiligten Basen sinnvoll sein. Da denkbar ist, dass die beobachtete Kreuzreaktivität der Aptamere vielen Einsatzmöglichkeiten entgegensteht, sollte auch über mögliche Optimierungen des SELEX-Prozesses nachgedacht werden. So wurde beispielsweise im Rahmen der Entwicklung von Aptameren, welche an die Oberfläche intakter Zellen binden sollen (*Cell-SELEX*), das entsprechende SELEX-Target mit größeren Mengen an DNA aus Lachssperma belegt.(137) Durch diesen Ansatz werden durch den SELEX-Prozess nur solche Aptamere selektiert, welche eine definierte Bindung mit bestimmten Strukturmerkmalen eingehen und solche Nukleinsäuren, welche nur aufgrund unspezifischer Interaktionen nicht in Waschschrinen entfernt werden, an der Anlagerung an das Target gehindert. Neben der bereits unter 5.2.2.1 genannten Möglichkeit der Erstellung einer neuen Aptamerbibliothek unter Berücksichtigung identifizierter Motive und deren Nutzung für weitere SELEX-Prozesse, wäre es auch zielführend die bereits implementierte Gegen-SELEX (siehe 5.2.1.2) zu erweitern. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Schritt nur unter Verwendung von solchen Partikeln, welche lediglich mit dem Blockierungsreagenz Ethanolamin belegt sind, durchgeführt. Die Nutzung von β -Lactoglobulin-Beads könnte beispielsweise dazu beitragen, aus der neuen Aptamerbibliothek direkt solche Nukleinsäuren mit einer Affinität zu diesem Protein zu entfernen und die Inkubation mit dem Target nur mit den verbliebenen Aptameren durchzuführen. Es muss hierbei jedoch, auch im Hinblick auf die Wirtschaftlichkeit des Prozesses, bedacht werden, dass selten alle denkbaren Kreuzreaktivitäten mit dieser Vorgehensweise berücksichtigt werden können.(52,57,69)

Neben den Aptameren mit einer Affinität zu Lysozym wurden auch entsprechende Biosensoren unter Verwendung der Ovalbuminaptamere 604 sowie 678 hergestellt und die oben genannten Proteinlösungen über den Sensorchip geleitet. Die erhaltenen Sensogramme (siehe Abbildung 49 und 8.8) entsprechen insofern nicht den Erwartungen, dass auch bei diesen Biosensoren eine stärkere Interaktion von Ovalbumin mit dem Referenzkanal zu beobachten ist und somit ein negatives Signal nach der Referenzierung resultiert.

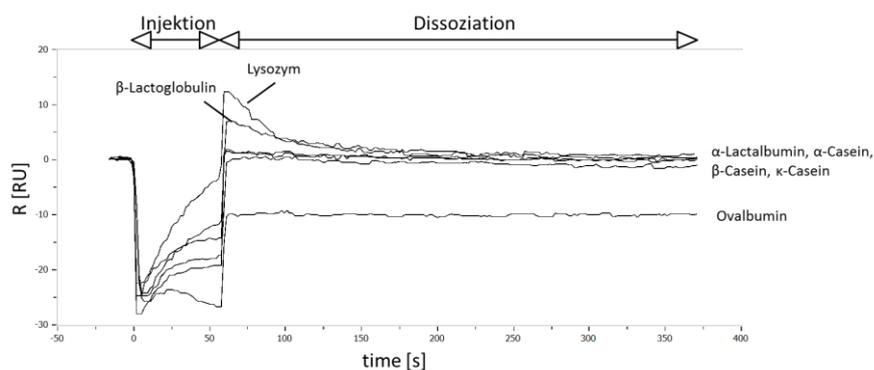


Abbildung 49: SPR-basierte Spezifitätsuntersuchung Aptamer 678.

Sensogramme unterschiedlicher Proteinlösungen (Je 25 μ l, 0,25 ppm; α -Casein, β -Casein, κ -Casein, α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin, Lysozym, Ovalbumin). Aptamer 678-SPR-Biosensor, Laufpuffer: Weißweinpuffer (+0,5 % Tween-20), referenziert gegenüber dem Referenzkanal (Streptavidin/Biotin), Doppelbestimmung in 8.8.

Bei dem unter Verwendung des Aptamers 678 hergestellten Biosensor ist unmittelbar nach dem Ende der Injektion eine geringfügige Bindung von Lysozym und β -Lactoglobulin zu erkennen, bereits nach kurzer Zeit sinkt das Signal jedoch auf Basislinienniveau. Da außerdem am Ende der Dissoziationszeit bei beiden untersuchten Ovalbuminaptameren nur geringe Signale im Bereich von bis zu 3 RU zu erkennen sind und wie

erwähnt die Bindung zum SELEX-Target nach der Referenzierung sogar negativ ist, müssen diese Nukleinsäuren als nicht geeignet für die Herstellung von Biosensoren unter Verwendung von Streptavidin zur Immobilisierung beurteilt werden.

Ein Ansatz könnte die Nutzung von anderen *Linkern* sein, um die Flexibilität der Aptamere zu vergrößern. So wurde für die Biotinylierung unter Verwendung des BEAMings bisher ein Biotin-C₆-Forward-Primer eingesetzt, die enthaltene Kohlenwasserstoffkette (C₆H₁₂) stellt damit im entsprechend markierten Aptamer eine flexible Verknüpfung zwischen dem für die Immobilisierung erforderlichen Biotin und der Nukleinsäure dar. Möglicherweise vorhandene, sterische Hinderungen könnten durch länger-kettige *Linker* verkleinert werden. Sollten, wie bereits unter 5.2.2.1 in Betracht gezogen, die Primerregionen an einer Bindung zwischen den Aptameren und Ovalbumin beteiligt sein, könnte auch allgemein die Immobilisierung über eine 5'-Biotinylierung des Forward-Primers oder die analoge Nutzung der Reverse-Primerregion für diesen Zweck die Interaktion einschränken. Da die Aptamere sowohl im Rahmen der SELEX als auch bei den Untersuchungen zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten frei in Lösung vorlagen und unter diesen Bedingungen Aptamer-Target-Komplexe ausgebildet wurden, müssen andere, diese Zusammenhänge berücksichtigende Methoden entwickelt werden. Für die abschließende Beurteilung der Ovalbuminaptamere im Hinblick auf die Kreuzreaktivität sollte auch unter Berücksichtigung der beobachteten Interaktion von Ovalbumin und Streptavidin ein alternatives Testsystem entwickelt werden.

5.2.3.1.2 Anwendung

Für den Einsatz in Biosensoren muss sichergestellt sein, dass die Aptamere eine Affinität zu ihrem jeweiligen Target aufweisen und dass es unter den Einsatzbedingungen auch weiterhin ermöglicht wird, dass die Aptamer-Target-Bindung ausgebildet werden kann. Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Aptamere weisen den bisher beschriebenen Ergebnissen zufolge eine Affinität auf und auch die Immobilisierung auf SPR-Sensorchips unter Verwendung von Streptavidin scheint prinzipiell geeignet. Die Untersuchungen zur Spezifität zeigten jedoch, dass die identifizierten Ovalbuminaptamere aufgrund der Interaktion von Ovalbumin und Streptavidin nicht geeignet für den Einsatz in den entsprechenden Biosensoren sind. Obwohl die Lysozymaptamere 619 und 620 keine absolute Spezifität aufweisen, aber eine Detektion unter den gegebenen Bedingungen möglich erscheint, sollten die entsprechenden Biosensoren auch im Hinblick auf einen Einsatz in Realproben untersucht werden.

Im Rahmen der Methodenentwicklung konnte bereits gezeigt werden, dass es mit den unter Verwendung der Aptamere 619 und 620 hergestellten Biosensoren unter Berücksichtigung einer Referenzierung möglich ist, konzentrationsabhängige und teilweise spezifische Signale zu generieren. Anhand der vermessenen Verdünnungsreihe von Lysozym in Weißweinpuffer konnte eine Kalibrationsgerade erstellt werden, die Daten sind in Tabelle 25 und Abbildung 50 dargestellt. Unter Nutzung der allgemeinen Geradengleichung $y = mx + b$ konnte eine Ausgleichsgerade mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,999 berechnet werden, was eine hohe Korrelation und einen linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Signal erkennen lässt. Ein sigmoidaler Signalverlauf infolge der Sättigung der verfügbaren Bindungsstellen auf dem Sensorchip wurde nicht beobachtet, sodass dieser lineare Bereich wahrscheinlich den Kurvenverlauf zwischen den beiden asymptotischen Enden darstellt. Da die bisherigen Untersuchungen alle unter Verwendung von Weißweinpuffer als Lauf- beziehungsweise Lösungsmittel durchgeführt wurden, sollte im Folgenden untersucht werden, ob auch eine direkte Untersuchung von Weißweinproben möglich ist. Der Zusammenhang zwischen der Affinität der Aptamere und ihrer chemischen Umgebung wurde bereits thematisiert (siehe 3.3, 5.2.1.1 und 5.2.2) und obwohl der als Selektionsmedium im Rahmen der SELEX eingesetzte Weißweinpuffer an

einen durchschnittlichen Weißwein angelehnt wurde, kann erst durch eine Messung bestätigt werden, ob eine Bindung zwischen Aptamer und *Target* auch in Realproben stattfindet. Bei der Injektion der Weinproben werden diese über die auf der Sensoroberfläche immobilisierten Aptamere geleitet, sodass die Nukleinsäuren vom untersuchten Wein umspült werden. Nur wenn die Aptamere auch nach einer Veränderung der sie umgebenden Lösung noch die erforderlichen Sekundärstrukturen ausbilden, sollte die Ausbildung einer Aptamer-*Target*-Bindung möglich sein.

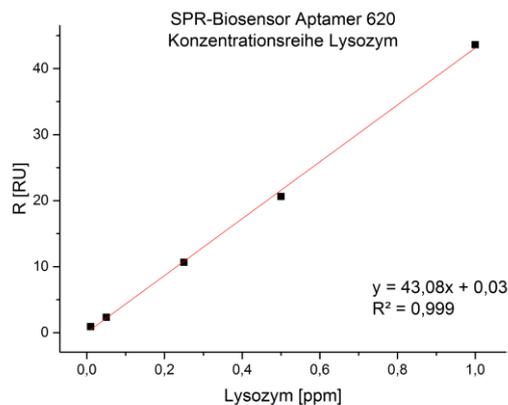


Abbildung 50: Kalibrationsgerade Lysozym (Aptamerbasierter Biosensor).

Dargestellt ist die Regression der in Tabelle 25 angegebenen Daten unter Verwendung der allgemeinen Geradengleichung, die resultierende Funktion sowie das Bestimmtheitsmaß.

Tabelle 25: Messwerte Kalibrationsreihe Lysozym (Aptamerbasierter Biosensor).

Angegeben sind die im Rahmen des Funktionstests gemessenen Signale am Ende der Dissoziationszeit (siehe Abbildung 46). Die Proteinlösungen wurden mit Weißweinpuffer verdünnt und mit dem SPR-Biosensor (basierend auf dem Aptamer 619) vermessen.

Konzentration Lysozym [ppm]	R [RU]
1	47,89
0,5	25,87
0,25	14,45
0,05	4,24
0,01	1,63

Für diesen Zweck wurden unterschiedliche Weißweine (siehe 6.1) mit 0,25 ppm Lysozym versetzt und anschließend unter Verwendung der auf den Aptameren 619 und 620 basierenden SPR-Biosensoren untersucht. Als Laufpuffer wurde wieder der Weißweinpuffer (+0,05 % Tween-20) eingesetzt, die erhaltenen Sensogramme sind in Abbildung 51 und 8.8 dargestellt. Ähnlich wie bei den Untersuchungen von Realproben unter Verwendung des antikörperbasierten Biosensors (5.1.2), ist auch hier während der Injektion eine deutliche Signalverschiebung zu erkennen (Abbildung 51, links). Während der Unterschied im Brechungsindex zwischen Wein und PBS jedoch zu einer Verschiebung um ca. 3000 RU führte, kommt es durch den Unterschied zwischen Wein und Weißweinpuffer zu einer Verschiebung von ca. 300 RU. Dieser verringerte Wert ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass im Rahmen der SELEX-Vorbereitung (5.2.1.1) versucht wurde, den Weißweinpuffer hinsichtlich der Ionenkonzentration, des pH-Wertes und der Ethanolkonzentration an einen durchschnittlichen Weißwein anzunähern und der Unterschied zwischen den Lösungen somit geringer ist. Bedingt durch die trotzdem auftretende Verschiebung ist jedoch auch hier eine Auswertung, während die Probe über den Sensorchip geleitet wird, nicht möglich.

Unter Berücksichtigung der Erkenntnisse hinsichtlich der Interaktion von Lysozym und Streptavidin (5.2.3.1.1) wurden zur Auswertung die Signale am Ende der Dissoziationszeit genutzt (siehe Abbildung 51, rechts und Tabelle 26). Da bei allen drei hier untersuchten Weinproben zum Ende der Dissoziationszeit ein positives Signal detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass Lysozym infolge einer Aptamer-*Target*-Bindung auf dem Sensorchip retardiert wurde. Als Laufpuffer wurde weiterhin der Weißweinpuffer eingesetzt, sodass anhand der vorliegenden Ergebnisse zumindest davon auszugehen ist, dass die in diesem Medium vor der Injektion

gebildeten Sekundärstrukturen im Wein stabil bleiben. Der aptamerbasierte Biosensor scheint somit zur Detektion von Lysozym in Weißwein geeignet.

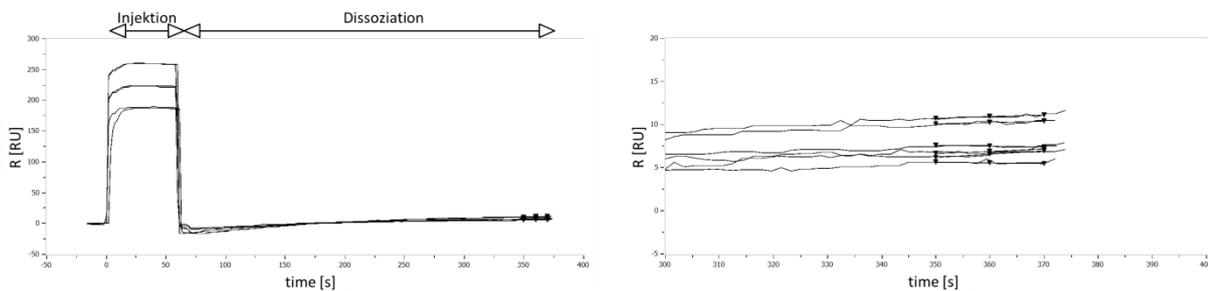


Abbildung 51: Sensogramme der Realproben (Vermessung mit SPR-Biosensor, basierend auf Aptamer 620).

Dargestellt sind die Sensogramme der mit Lysozym (0,25 ppm) versetzten Weine nach Referenzierung zur blockierten Sensoroberfläche. Links: Überblick mit deutlich erkennbarer Veränderung des Brechungsindex während der Injektion. Rechts: Ende der Dissoziationszeit (vergrößert). Die von einem Nullwert deutlich zu unterscheidenden Signale sind gut zu erkennen und die zur Auswertung genutzten Datenpunkte sind durch Markierung hervorgehoben.

Die untersuchten Weißweine wurden allesamt mit 0,25 ppm Lysozym versetzt, unter Verwendung der berechneten Regressionsgeraden konnten die Wiederfindungen (siehe Tabelle 26) berechnet werden. Während bei den Weinen A und C lediglich Wiederfindungen im Bereich von 60 bis 70 % berechnet werden konnten, zeigte die Weinprobe B eine nahezu optimale Wiederfindung. Es kann anhand der bekannten Daten nicht festgestellt werden, welche Eigenschaft der Weine diese Schwankungen verursachte, ein Zusammenhang mit dem Alkoholgehalt oder der zur Herstellung eingesetzten Weintrauben erscheint jedoch unwahrscheinlich. So handelt es sich bei Weinprobe B um ein Cuvée mit einem Alkoholgehalt von 9,5 %-vol., die laut Deklaration alkoholfreie Weinprobe A ist jedoch ebenfalls aus unterschiedlichen Trauben hergestellt worden. Weinprobe C enthält Alkohol in einer Menge von 11,5 %-vol. und ist aus den Trauben der Sorte Müller-Thurgau produziert worden. Da somit ein eindeutiger Rückschluss aus den vorliegenden Daten nicht gezogen werden kann, erscheint es sinnvoll zur Unterdrückung von Matrixeffekten, einen möglichst ähnlichen Wein zur Erstellung einer Kalibrierung zu nutzen.

Tabelle 26: Messwerte Weinproben mit Lysozym (Aptamerbasierter Biosensor).

Die Weinproben A-C wurden mit 0,25 ppm Lysozym versetzt, die Untersuchung erfolgte mit dem auf dem Aptamer 620 basierenden SPR-Biosensor. In Spalte 3 sind die gemessenen Signale am Ende der Dissoziationszeit (siehe Abbildung 51) angegeben. Zur Berechnung der Wiederfindung (siehe 6.2.5) wurde die Geradengleichung aus Abbildung 50 verwendet.

Weinprobe	Konzentration Lysozym [ppm]	R [RU]	Wiederfindung [%]
A	0,25	6,65	62,02
A	0,25	7,51	70,01
B	0,25	10,48	97,59
B	0,25	10,95	101,95
C	0,25	6,95	64,81
C	0,25	7,16	66,76

Für eine abschließende Beurteilung des aptamerbasierten Biosensors müssen auf jeden Fall weitere Untersuchungen erfolgen, auch im Hinblick auf die Spezifität in Realproben. Außerdem zeigte sich bereits bei den hier vermessenen Realproben, dass die Weinmatrix offensichtlich einen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit des Biosensors hat. Erweiterte Untersuchungen durch entsprechend präparierte Realproben erscheinen sinnvoll. Des Weiteren muss beachtet werden, dass zur Berechnung von Kenndaten wie der Nachweis- und Bestimmungsgrenze oder des linearen Bereiches deutlich umfangreichere Messreihen und Auswertungen erforderlich sind. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit identifizierten

Lysozymaptamere 619 (siehe 8.8) und 620 sowie die daraus entwickelten Biosensoren auch in Realproben zur Detektion von Lysozym geeignet sind. Die Nutzung dieser Nukleinsäuren in anderen Methoden erscheint dementsprechend sinnvoll und die im bisherigen Verlauf der Arbeit erzielten Erkenntnisse können nach einer Optimierung der Spezifität als Ausgangspunkt für weitere Entwicklungen herangezogen werden.

5.2.3.2 *Lateral Flow Dipsticks*

Trotz fortschreitender Minimierung unterschiedlichster Technologien, erfordert der Einsatz von Biosensoren, wie sie unter 5.1.2 und 5.2.3.1 beschrieben wurden, häufig ein Labor und technisch geschultes Personal. Als *Lateral Flow Dipsticks* oder *Devices* (LFDs) werden alternative Testsysteme beschrieben, welche eine Vor-Ort-Analytik auch durch ungeschulte Personen ermöglichen. Das Prinzip ist vom weitverbreiteten Schwangerschaftstest, welcher nach dem Kontakt mit dem Urin einer möglicherweise schwangeren Person unmittelbar eine Ja/Nein-Diagnostik ermöglicht, bekannt. Ausgehend von einer vorangegangenen Arbeit, in der ein kommerziell erhältliches und adaptierbares LFD-System genutzt wurde um die Anwesenheit von Nichtspeisepilzen zu detektieren, wurde in der vorliegenden Arbeit auf der gleichen Basis ein System zur Detektion von Lysozym in Weinproben entwickelt.(138)

Unter Verwendung des beschriebenen Systems (siehe 6.2.2.5) und der Aptamere 619 beziehungsweise 620 konnten zwei unterschiedliche Testsysteme etabliert werden. Bei beiden Systemen findet die Ausbildung einer Gold-Kontrollbande auf die gleiche Art und Weise statt und zeigt einen den Erwartungen entsprechenden Ablauf an. Im Bereich der Testbande kommt es jedoch unter Verwendung von FITC-markierten Sonden, welche unterschiedlich großen Teilbereichen (10 beziehungsweise 18 Basen, siehe 6.1) des *Reverse-Primers* entsprechen und somit komplementär zu Abschnitten der eingesetzten Aptamere sind, in Abhängigkeit des verwendeten Aptamers und der Anwesenheit von Lysozym in unterschiedlichen Fällen zur Ausbildung einer Bande.

So kommt es in der zu analysierenden Lösung, welche mit dem mittels BEAMing (6.2.3.2) am 5'-Ende biotinylierten Aptamer und der FITC-Sonde versetzt wird, zur Ausbildung eines Aptamer-*Target*-Komplexes. Dieser wird durch Kapillarkräfte entlang des LFDs getragen und aufgrund der hochspezifischen Interaktion von Biotin und dem im Bereich der Testbande immobilisierten Streptavidin zurückgehalten. Da die dreidimensionale Struktur und die an der Bindung beteiligten Sequenzabschnitte nicht bekannt sind, kann im Vorfeld jedoch nicht prognostiziert werden, ob die FITC-Sonde mit dem im Aptamer-*Target*-Komplex gebundenen Aptamer interagieren kann. Ist beispielsweise der zur Sonde komplementäre Bereich unmittelbar an der Bindung zum Lysozym beteiligt, wird die Sonde in Anwesenheit von Lysozym im Bereich des Teststreifens nicht retardiert (siehe Abbildung 52 unten). Wird erst durch die Interaktion von Aptamer und *Target* der zur Sonde komplementäre Aptamerbereich für eine Bindung verfügbar, wird auch die Sonde aufgrund der Bindung an das Aptamer im Bereich des Teststreifens gebunden (siehe Abbildung 52 oben). Da die Detektion bei dem genutzten System durch Goldpartikel erfolgt, welche mit einem Antikörper mit einer Affinität gegenüber FITC beschichtet sind und bereits mit dem bloßen Auge erkannt werden können, ist die Anwesenheit der FITC-Sonde im Bereich der Testbande entscheidend. Ob eine vorhandene Testbande die Anwesenheit oder die Abwesenheit von Lysozym anzeigt, ist somit von der Struktur des Aptamer-*Target*-Komplexes abhängig. Handelt es sich um den im oberen Bereich von Abbildung 52 dargestellten Mechanismus, so zeigt die Abwesenheit der Kontrollbande die Anwesenheit von Lysozym an. In Abwesenheit von Lysozym käme es bei diesem Mechanismus zur Ausbildung einer Testbande, da dann Aptamer und Sonde miteinander interagieren können und somit auch die zur Detektion eingesetzten Goldpartikel im Bereich der Testbande zurückgehalten werden. Liegt jedoch der im unteren Bereich von Abbildung 52 dargestellte Mechanismus zugrunde, so kommt

es in Anwesenheit von Lysozym zur Ausbildung einer Testbande, da nur durch die Interaktion von *Target* und Aptamer die Bindungsstelle für die FITC-Sonde zur Verfügung steht. Durch die spezifische dreidimensionale Struktur des Aptamers wäre jedoch keine Bande zu erkennen, wenn Lysozym nicht in der zu analysierenden Lösung vorliegt, da dann keine Anlagerung der FITC-Sonde an das biotinylierte Aptamer und somit auch keine Anlagerung der Goldpartikel im Bereich der Testbande möglich wäre.

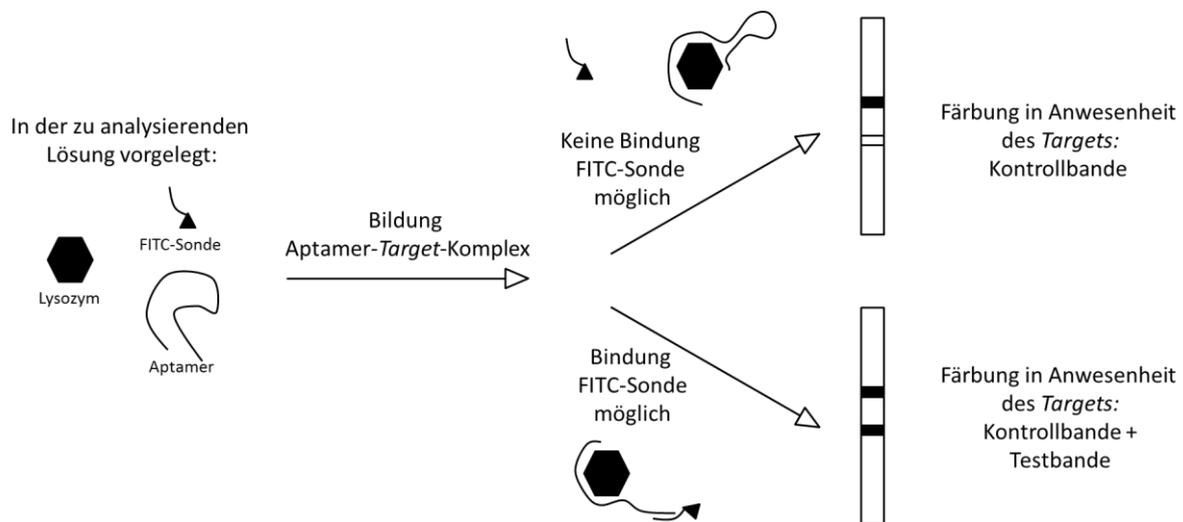


Abbildung 52: Varianten des entwickelten LFDs.

Schematische Darstellung der unterschiedlichen Varianten unter Verwendung des HybriDetect Systems (Milenia Biotech GmbH, Gießen, Deutschland), biotinylierter Aptamere sowie einer zu Teilbereichen des Aptamers komplementären FITC-Sonde. Je nach Bindungsverhalten der Aptamere können die beiden dargestellten Ergebnisse resultieren.

Da das Testsystem teilweise auf einer Antikörper-Antigen-Interaktion (Kontrollbande und Interaktion von FITC und Antikörper den Goldpartikeln) basiert, wird durch den Hersteller ein Assaypuffer unbekannter Zusammensetzung empfohlen. Da im Rahmen der Methodenentwicklung durch den Einsatz eines PBS-Puffers keine Beeinträchtigung erkannt wurde, konnte auf den Assaypuffer verzichtet werden. Dies entspricht insofern den Erwartungen, da durch den PBS-Puffer hinsichtlich pH-Wert und Ionenkonzentration physiologische Bedingungen abgebildet werden können und somit für die Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen ideale Bedingungen vorliegen sollten. Bedingt durch die ebenfalls im Rahmen des Testsystems eingesetzten Aptamere wäre jedoch die Nutzung des Weißweinpuffers aus der SELEX erforderlich, um die Sekundärstrukturen und somit auch die Affinität aufrecht zu erhalten. Da bei ausschließlicher Verwendung von einem der beiden Puffer keine Detektion etabliert werden konnte, wurde ein Gemisch aus den beiden Puffern (35 μ L PBS, 35 μ L Weißweinpuffer) zur Entwicklung eingesetzt. Die Verdünnungen von Lysozym, FITC-Sonde und biotinylierten Aptameren wurden ebenso in Weißweinpuffer bei einem Volumen von jeweils 10 μ L angesetzt. Zunächst wurde die Entwicklung der Testsysteme unter Verwendung einer relativ hochkonzentrierten Lösung von Lysozym (10 mg/mL) durchgeführt, um gegebenenfalls eine möglichst intensiv gefärbte Testbande zu erhalten. Je 10 μ L der Lysozymlösung, also 10 μ g Protein, wurden in den Positivproben eingesetzt, als Negativprobe wurde ein entsprechendes Volumen an Weißweinpuffer ohne Lysozym untersucht. Ausgehend von einem bereits in einer vorangegangenen Arbeit entwickelten LFD-System zur Detektion von Metaboliten wurden Sonden- sowie Aptamerkonzentrationen und Entwicklungsdauer sowie mögliche Vorbereitungsschritte variiert. Oberstes Entscheidungskriterium war eine Unterscheidbarkeit von

Positiv- und Negativproben durch voneinander unterscheidbare Testbanden und die Anwesenheit der Kontrollbande.

Unter Verwendung des Aptamers 619 sowie der 10 Basen langen FITC-Sonde konnte durch die in Tabelle 27 angegebenen Parameter eine erfolgreiche Detektion von Lysozym erreicht werden (zur genauen Durchführung siehe 6.2.2.5). Da die Positivproben hier keine Testbande zeigten (siehe Abbildung 53, Bande 1 & 2), in den Negativproben jedoch eine entsprechende Bande erkennbar war, ist davon auszugehen, dass der in Abbildung 52 im oberen Bereich dargestellte Mechanismus zugrunde liegt (Inhibierung der Interaktion von Aptamer 619 und Sonde in Anwesenheit von Lysozym). Dies kann entweder durch eine sterische Hinderung oder durch eine Beteiligung des 3'-Endes der Nukleinsäure an der Bindung bedingt sein. Während in anderen Testsystemen durch einen *Refold* (Erhitzung auf 95 °C, anschließend unmittelbare Abkühlung) des Gemisches aus Probe, Sonde und Aptamer eine deutliche Verbesserung erreicht werden konnte, zeigte dieser Schritt erwartungsgemäß im Rahmen der Lysozymdetektion keine Verbesserung.⁽¹²⁹⁾ Vermutlich wird durch diesen Schritt die dreidimensionale Struktur des Proteins in einer Art und Weise beeinträchtigt, dass eine Interaktion mit dem Aptamer unterbunden wird. Dieser Zusammenhang deutet darauf hin, dass die Bindung der Nukleinsäure nicht über ein Sequenzepitop erfolgt. Veränderungen der Aptamerkonzentration im Bereich von 20 bis 70 nM oder der Sondenkonzentration im Bereich von 10 bis 100 nM zeigten zwar Kontrollbanden, es war jedoch kein Unterschied zwischen den Positiv- und Negativproben zu verzeichnen. Auch die Zeit, in welcher der Teststreifen in das Reaktionsgemisch aus Probe, Puffer, Sonde und Aptamer getaucht wird (Entwicklungsdauer), sollte nicht variiert werden. Im Anschluss sollte untersucht werden, bis zu welcher Konzentration eine Detektion durch den Aptamer 619-LFD möglich ist. Für diesen Zweck wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und mittels des LFD untersucht, die Aufnahmen sind in Abbildung 53 enthalten.

Tabelle 27: Parameter LFD Aptamer 619.

Entwickelte Werte für unterschiedliche Parameter im Rahmen der LFD-Entwicklung zur Detektion von Lysozym in PBS/Weißweinpuffer-Gemischen unter Verwendung des Aptamers 619.

Parameter	Wert
Konzentration Aptamer	40 nM
Konzentration Sonde	30 nM
<i>Refold</i>	-
Entwicklungsdauer	5 min

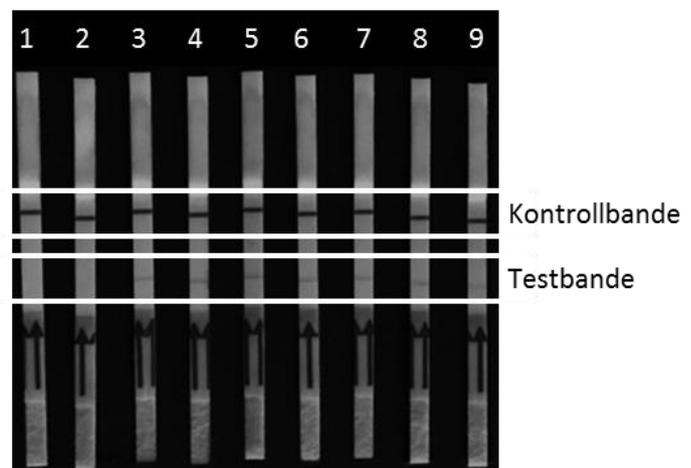


Abbildung 53: Detektion von Lysozym durch Aptamer 619-LFD in Puffer.

Abgebildet sind die LFDs einer Verdünnungsreihe von Lysozym in PBS/Weißweinpuffer-Gemisch (1: 800 ppm, 2: 600 ppm, 3: 500 ppm, 4: 250 ppm, 5: 100 ppm, 6: 75 ppm, 7: 50 ppm, 8: 25 ppm, 9: 5 ppm) durchgeführt unter den in Tabelle 27 angegebenen Bedingungen.

Es zeigte sich in diesem Kontext, dass ab einer Konzentration von 500 ppm wieder eine Testbande erkennbar ist, sodass die Nachweisgrenze ungefähr bei diesem Wert liegt. Möglicherweise kommt es bei sehr hohen Konzentrationen von Lysozym zu einer unspezifischen Interaktion des Proteins mit den biotinylierten Aptameren, infolgeder kein spezifischer Aptamer-*Target*-Komplex mehr ausgebildet wird und die FITC-Sonde dem komplementären Bereich der im Bereich der Testbande retardierten Nukleinsäuren interagieren kann. Eine Adaption der Methodik zur Untersuchung von Realproben konnte unter Verwendung des Aptamers 619

möglicherweise auch aus diesem Grund nicht erreicht werden, gelang jedoch mit dem Aptamer 620 und in Tabelle 28 angegebenen Bedingungen.

Im Gegensatz zum LFD unter Verwendung des Aptamers 619 ist in Abbildung 54 jedoch in Anwesenheit des Allergens eine Bande zu erkennen, wahrscheinlich liegt somit der im unteren Bereich von Abbildung 52 dargestellte Mechanismus zugrunde (Freilegung der Bindungsstelle am Aptamer infolge der Aptamer-Target-Komplexbildung). Somit kann auch geschlussfolgert werden, dass die beiden Aptamere 619 und 620, obwohl beide innerhalb eines SELEX-Prozesses identifiziert wurden, vergleichbare Dissoziationskonstanten aufweisen (siehe 5.2.2.2) und beide zur Entwicklung von Biosensoren eingesetzt werden konnten (siehe 5.2.3.1), Unterschiede hinsichtlich der Interaktion mit Lysozym zeigen. Auffällig ist des Weiteren, dass unter Verwendung des Aptamers 619 keine Detektion in Realproben etabliert werden konnte, obwohl dies im Rahmen des Biosensors erfolgreich umgesetzt wurde. Da auch bei dem Aptamer 620 durch den Einsatz eines *Refolds* keine Detektion erreicht wurde, könnte es sich hier jedoch ebenso um eine auf dreidimensionalen Strukturepitopen basierende Interaktion handeln. Variationen der weiteren Parameter (Konzentrationen Aptamer und Sonde, Entwicklungsdauer) waren nicht zielführend, sodass durch Untersuchung einer Verdünnungsreihe eine Nachweisgrenze bestimmt wurde. Da bis zu einer Konzentration von 20 ppm Lysozym in Wein eine Testbande erkennbar war, wird dieser Wert noch als nachweisbar und somit als Grenze angesehen (siehe 8.9).

Die Entwicklung eines teilweise aptamerbasierten LFDs konnte somit auch zur Detektion in Realproben umgesetzt werden, die erreichte Nachweisgrenze von 20 ppm liegt deutlich unter der durch die VO (EG) 606/2009 geregelten Höchstmenge von Lysozym von 500 ppm. Eine schnelle Vor-Ort-Analytik durch Kontrollbehörden im Hinblick auf diesen Grenzwert könnte somit durchgeführt werden. Einsparungen im Hinblick auf zeit- und kostenintensive Untersuchungen sind denkbar, da diese bei einem negativen Befund nicht erforderlich sind. Die Notwendigkeit einer Allergenkennzeichnung kann unter Verwendung des entwickelten LFDs jedoch nicht untersucht werden, da die durch die VO (EU) 1308/2013 in Verbindung mit der OIV festgelegte Nachweisgrenze von 0,25 ppm nicht erreicht wird. Eine erste Risikoabschätzung kann jedoch gegebenenfalls erfolgen, insbesondere unter Berücksichtigung der Erkenntnisse einer vorangegangenen Arbeit, dass lediglich der Einsatz bestimmter önologischer Verfahren (Bentonit-Schönung) zur Lysozymdepletion geeignet ist.(21)

Die Entwicklung eines vollständig auf Aptameren basierenden LFDs ist denkbar und wird gegenwärtig in einer parallel durchgeführten Arbeit untersucht. So sollte beispielsweise durch die Immobilisierung eines zur Sonde komplementären Nukleinsäurefragments die Entwicklung einer Kontrollbande umsetzbar sein. Auch die bisher unter Verwendung von antikörperbeschichteten Goldpartikeln durchgeführte Visualisierung könnte durch ein

Tabelle 28: Parameter LFD Aptamer 620.

Entwickelte Werte für unterschiedliche Parameter im Rahmen der LFD-Entwicklung zur Detektion von Lysozym in Weißwein unter Verwendung des Aptamers 620.

Parameter	Wert
Konzentration Aptamer	200 nM
Konzentration Sonde	40 nM
<i>Refold</i>	-
Entwicklungsdauer	2,5 min

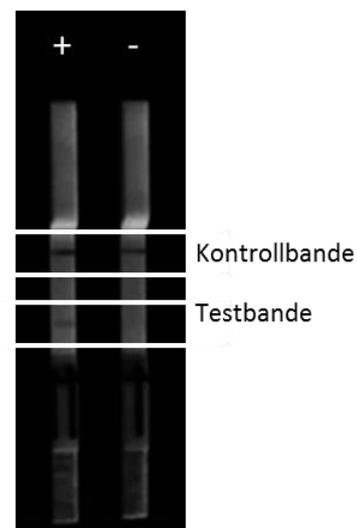


Abbildung 54: Detektion von Lysozym durch Aptamer 620-LFD in Wein.

Beispielhafter LFD unter Verwendung des Aptamers 620 zur Detektion von Lysozym (20 ppm) in Wein (Monfleur Fruit, siehe 6.1) mit den in Tabelle 28 angegebenen Parametern.

auf komplementären Basenpaarungen basierendes System ersetzt werden. Da jedoch beispielsweise bei beiden Aptameren eine Adaption unter Verwendung der 18 Basen-Sonde stets sowohl eine Kontroll- als auch eine Testbande generierte, erfordert die Entwicklung vollständig aptamerbasierter Systeme umfangreichere Untersuchungen als im Rahmen der vorliegenden Arbeit möglich waren.

5.2.3.3 HPTLC-Aptastaining

Für die Untersuchung von Proteinen sind eine Vielzahl unterschiedlichster analytischer Methoden verfügbar. So kann beispielsweise nach einer denaturierenden Aufarbeitung durch den Einsatz der Elektrophorese (SDS-PAGE, siehe auch Abbildung 28) das Molekulargewicht bestimmt werden oder durch die sogenannte isoelektrische Fokussierung eine Aussage hinsichtlich der Abhängigkeit der Gesamtladung vom pH-Wert getroffen werden. Wie bereits unter 5.2.1.1 beschrieben, können diese Makromoleküle auch durch den Einsatz von Peptidasen wie Trypsin in eine Vielzahl unterschiedlicher Fragmente gespalten werden, welche dann wiederum mit hoher Genauigkeit unter Verwendung der Massenspektrometrie analysiert werden können. Eine weitere Alternative stellt die HPTLC dar, da durch die hohe Flexibilität im Hinblick auf die eingesetzten Phasen die jeweils für die zu untersuchenden Proteine günstigsten Bedingungen, gegebenenfalls auch unter Erhaltung dreidimensionaler Strukturelemente, genutzt werden können. Durch das offene System kann außerdem im Anschluss an die chromatografische Trennung durch Inkubation der HPTLC-Platten eine Renaturierung der Proteine durchgeführt werden, sodass eine auf der Interaktion mit dreidimensionalen Strukturelementen basierende Detektion ermöglicht wird. Unter Berücksichtigung der Erkenntnisse in Rahmen der LFD-Entwicklung, dass nach hitzeinduzierter Denaturierung die Interaktion der Aptamere 619 und 620 mit Lysozym beeinträchtigt ist, könnte die Nutzung der HPTLC vorteilhaft sein. Da nach der chromatografischen Trennung die Analyten außerdem auf der Oberfläche der stationären Phase vorliegen und somit für Interaktionen gut zugänglich sind, soll hier die Möglichkeit einer Detektion unter Nutzung der Aptamer-*Target*-Wechselwirkung untersucht werden. Durch die Verwendung von markierten RNA-Aptameren mit einer Affinität zum sogenannten His-Tag konnte bereits eine in Grundzügen vergleichbare Technik für die Detektion von denaturierten Proteinen nach einem Western Blot durchgeführt werden.(83)

Im Rahmen der SELEX wurde ein Weißweinpuffer entwickelt, um die Selektion solcher Aptamere zu begünstigen, welche unter dem Weißwein vergleichbaren Bedingungen die für die Bindung erforderlichen Sekundärstrukturen ausbilden (siehe 5.2.1.1). Durch diesen Ansatz wird jedoch eine Nutzung dieser Nukleinsäuren für andere Matrices erschwert, da durch veränderte Rahmenbedingungen wie beispielsweise pH-Wert oder Ionenkonzentration die Interaktion mit dem *Target* möglicherweise beeinträchtigt wird. Im Gegensatz zu den im bisherigen Verlauf der Arbeit genutzten Methoden kann hier durch die HPTLC eine Trennung von Analyt und Matrix erreicht werden, sodass eine Nutzung dieser Aptamere auch außerhalb des Lebensmittels Weißwein ermöglicht wird. Da nach der chromatografischen Trennung auch das Laufmittel durch Verdunstung entfernt wird und die spezifische Detektion durch Inkubation der HPTLC-Platte in einer entsprechenden Lösung durchgeführt werden kann, ist es hier möglich durch den Einsatz des Weißweinpuffers, die optimalen Bedingungen für die Aptamer-*Target*-Interaktion herzustellen. Außerdem ist die gegebenenfalls nicht vorhandene absolute Spezifität der entwickelten Nukleinsäuren in dieser Methode von weniger großer Relevanz, da eine doppelte Absicherung auf zwei voneinander unabhängigen Ebenen erfolgt. So kann durch die Trennung der Analyten infolge der Wechselwirkungen mit der mobilen und stationären Phase der sogenannte R_f -Wert durch Division der Laufstrecke des Analyten (Startlinie bis Analyt) durch die Laufstrecke des Lösungsmittels (Startlinie bis Laufmittelfront) berechnet werden (siehe auch Abbildung 69). Durch die vielfältigen Möglichkeiten zur Modifizierung von Nukleinsäuren kann dann im

Anschluss zusätzlich die spezifische Detektion erfolgen, welche im Folgenden als *Aptastaining* (von Aptamer und engl. *staining*) bezeichnet wird.

5.2.3.3.1 Methodenentwicklung

Wie auch bei den bisherigen Untersuchungen zu Anwendungsmöglichkeiten der Aptamere wurde auch hier zunächst das Aptamer 620 mit dem *Target* Lysozym genutzt. Da im Rahmen der Untersuchungen zur Spezifität eine Kreuzreaktivität des Aptamers 620 zum Molkenprotein β -Lactoglobulin festzustellen war (siehe 5.2.3.1.1), wurde dieses Protein mit in die Methodenentwicklung einbezogen. Die Aptamere wurden mit einer 5'-Markierung durch den Fluoreszenzfarbstoff ATTO550 kommerziell erworben, da im Allgemeinen bei Untersuchungen unter Anwendung der Fluoreszenz durch die unterschiedlichen Absorptions und Emissionswellenlängen geringe Hintergrundsignale zu erwarten sind. Da kein wesentlicher Unterschied zwischen den Kosten eines entsprechend markierten *Forward*-Primers, welcher für eine Markierung unter Nutzung des BEAMings erforderlich wäre und einem vollständig markierten Aptamer bestand, wurden die Aptamere markiert erworben und im Rahmen dieser Herstellung durch die Sigma Aldrich GmbH unter Nutzung der HPLC aufgereinigt. In Vorversuchen (siehe 8.10) konnte gezeigt werden, dass bei der Exzitationswellenlänge des Farbstoffs von 550 nm keine Signale durch das Material der stationären Phasen, das Protein Lysozym oder die Nukleinsäure selbst generiert werden.

Zu Beginn der Methodenentwicklung stand die Wahl des chromatografischen Systems. Ausgehend von einer vorangegangenen Arbeit wurden polare Silica-Platten (SiO_2 -Kristalle auf inerten Materialien) und ein unpolares Laufmittel (2-Butanol, Pyridin, Eisessig, bidest. Wasser (3,9/2,0/1,0/3,1; v/v/v/v)), sowie unpolare RP-Phasen (bestehend aus Silica-Platten, deren polare Gruppen mit Alkylresten unterschiedlichen Kettenlängen belegt wurden) und polare Laufmittel (Acetonitril, Trifluoressigsäure, bidest. Wasser (5/0.375/4.625; v/v/v)) genutzt (siehe 6.1).(139) Zur Detektion wurde Fluorescamin verwendet (siehe 6.2.2.6), ein heterozyklisches Dion, welches durch Reaktion mit primären Aminen ein durch UV-Licht (366 nm) stimulierbares, fluoreszierendes Produkt bildet.(141,142) Zusätzlich zu Lysozym und β -Lactoglobulin wurde in diesem Zusammenhang auch das Protein Insulin aufgetragen, da die Leistungsfähigkeit des chromatografischen Systems so umfassender beurteilt werden kann.

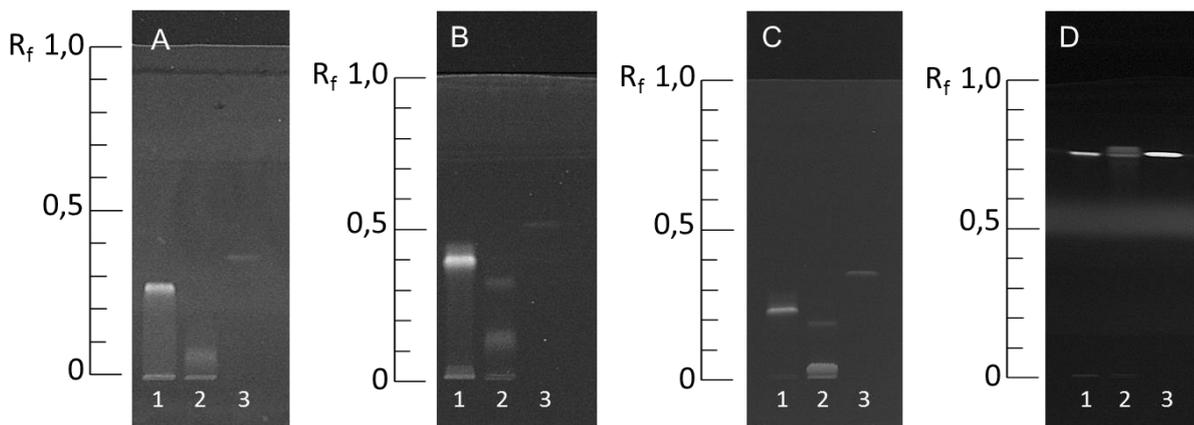


Abbildung 55: Chromatografische Trennungen der Modellproteine.

Abgebildet sind die Ergebnisse der Trennung von Lysozym (1), β -Lactoglobulin (2) und Insulin (3) auf unpolaren (A-C) und polaren (D) stationären Phasen. Färbung durch Fluorescaminderivatisierung und Detektion bei 366 nm. A: RP-8, B: RP-18, C: RP-18We, D: Silica. (RP: engl.: *reversed phase*, We: engl.: *wettable*). Abbildung veröffentlicht in (143).

Es ist gut zu erkennen, dass die Proteine in Abhängigkeit der eingesetzten Phasen unterschiedliche R_f -Werte zeigen, wobei die Unterschiede bei den unpolaren Phasen (Abbildung 55, A-C) deutlich stärker sind als bei der polaren Silica-Phase (Abbildung 55, D). Das Protein β -Lactoglobulin bildet infolge der chromatografischen Trennung zwei Banden, was wahrscheinlich auf die eher sauren pH-Werte der mobilen Phasen und die daraus resultierende Spaltung des dimeren Proteins zurückzuführen ist.(144) Aufgrund der hohen Bandenschärfe wurden im Folgenden insbesondere die unpolare RP-18We-Phase (Abbildung 55, C) und die polare Silica-Phase weiter untersucht.

Nach der Etablierung des chromatografischen Systems wurden unterschiedliche Untersuchungen zur Etablierung einer aptamerbasierten Detektion durchgeführt. Ausgangspunkt waren bereits in der Arbeitsgruppe bestehende Erfahrungen hinsichtlich einer antikörperbasierten Detektion von Proteinen auf HPTLC-Platten und andere antikörperbasierte Methoden wie beispielsweise der *Western Blot* zur Detektion von Antigenen nach elektrophoretischer Trennung und Transfer auf Nitrocellulosemembranen.(145) So wurde nach der chromatografischen Trennung die mobile Phase durch Verdampfen entfernt und die getrocknete Platte zur Unterbindung unspezifischer Anlagerungen blockiert. Da mit BSA, Milchpulver oder gänzlich ohne Blockierung keine auswertbaren Signale generiert werden konnten, wurde für diesen Zweck im Folgenden das Detergenz Tween®20 eingesetzt. Dafür wurde Weißweinpuffer mit 0,6 % Tween®20 (m/v) versetzt und die HPTLC-Platte zwei Mal fünf Minuten darin geschwenkt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Platte mit den Aptameren, welche in Weißweinpuffer gelöst wurden, indem die blockierte HPTLC-Platte direkt in der Lösung geschwenkt wurde.

Im Rahmen der Methodenentwicklung zeigte sich hierbei, dass in Abhängigkeit der stationären Phase unterschiedliche Aptamerkonzentrationen und Inkubationszeiten erforderlich waren. In Abbildung 56 ist beispielhaft ein Ausschnitt aus der Methodenentwicklung für die aptamerbasierte Detektion auf Silica-Platten dargestellt. Es ist gut zu erkennen, dass sowohl mit steigender Aptamerkonzentration (Abbildung 56, links) als auch mit steigender Inkubationszeit (Abbildung 56, rechts) immer mehr unspezifische Bindungen detektiert werden können. So ist beispielsweise bei einer Inkubationszeit von fünf Minuten und einer Aptamerkonzentration von 5 nM, eine Bindung des Aptamers 620 sowohl an Lysozym als auch an β -Lactoglobulin zu erkennen (Abbildung 56, E). Außerdem ist erkennbar, dass mit steigender Inkubationsdauer die Färbung der β -Lactoglobulinbande in stärkerem Maße zunimmt als die der Lysozymbande (Abbildung 56, F) und des Weiteren bei einer Inkubationsdauer von 20 min sogar eine Färbung der Insulinbande erkennbar wird (Abbildung 56, G).

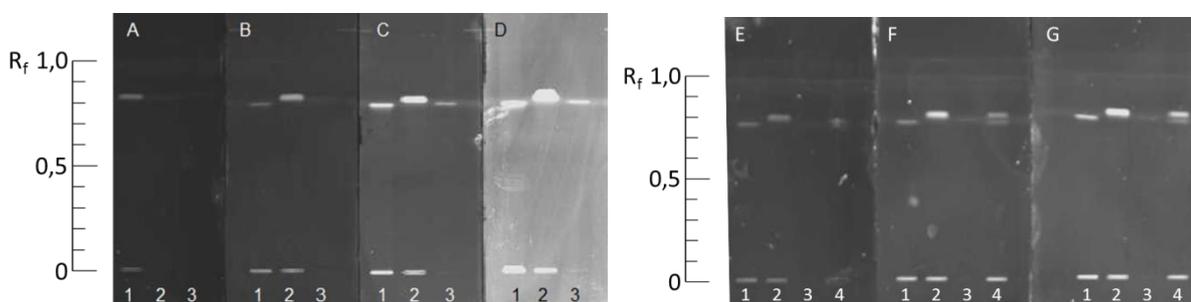


Abbildung 56: Einfluss Aptamerkonzentration und Inkubationszeit *Aptastaining*.

Dargestellt ist der Einfluss unterschiedlicher Aptamerkonzentrationen (A-D) und Inkubationszeiten (E-G) im Rahmen des *Aptastainings* unter Verwendung des Aptamers 620 zur Detektion auf Silica als stationäre Phase (Detektion bei 555 nm, 15 s Belichtungszeit). Automatisiert aufgetragen (1 μ g): Lysozym (Bahn 1), β -Lactoglobulin (Bahn 2), Insulin (Bahn 3), Mischung Lysozym/ β -Lactoglobulin (Bahn 4). Links: Inkubationszeit 1 min, Aptamerkonzentrationen 5 nM (A), 7,5 nM (B), 10 nM (C), 20 nM (D). Rechts: Inkubationszeiten 5 min (E), 10 min (F), 20 min (G), Aptamerkonzentration 5 nM.

Im Rahmen der Untersuchung zum Einfluss der Aptamerkonzentration ist gut zu erkennen, dass bei einer Inkubationsdauer von einer Minute und einer Aptamerkonzentration von 5 nM lediglich die Lysozymbande angefärbt wird (Abbildung 56, A). Größere Mengen der markierten Nukleinsäuren (Abbildung 56, B-D) führen jedoch auch bei dieser verkürzten Inkubationsdauer zu unspezifischen Wechselwirkungen mit den anderen aufgetragenen Proteinen und der stationären Phase (erkennbar durch sukzessive Aufhellung des Hintergrundes).

Es ist davon auszugehen, dass die in diesem Kontext zu beobachtenden Effekte auf die grundlegenden Eigenschaften der Proteine und Nukleinsäuren zurückzuführen sind. Durch den im Rahmen der Blockierung und Detektion eingesetzten Weißweinpuffer mit einem pH-Wert von 3,2 liegen alle hier untersuchten Proteine positiv geladen vor (Isoelektrische Punkte: 4,83 (β -Lactoglobulin), 5,39 (Insulin) und 9,32 (Lysozym)), während die Nukleinsäuren aufgrund der vielfältig vorhandenen Phosphatgruppen negativ geladen vorliegen.(31,139) Eine auf elektrostatischen Wechselwirkungen basierende Anlagerung der fluoreszenzmarkierten Aptamere an die Proteine auf der stationären Phase ist dementsprechend kaum zu vermeiden und wird nachvollziehbarerweise umso wahrscheinlicher je höher die Aptamerkonzentration beziehungsweise Inkubationsdauer ist. Dieser Effekt der unspezifischen Anlagerung ist wahrscheinlich auch als Grund für die Signale im Bereich der Startlinie zu sehen. Die Kapazität der mobilen Phase ist hinsichtlich des Transports einiger Proteine begrenzt, sodass hier häufig Proteinrückstände verbleiben und somit relativ große Mengen mit den Aptameren aus der Lösung interagieren können.(139) Eine geringfügige Verbesserung konnte in diesem Kontext durch einen angeschlossenen Waschschriff (30 s Schwenken) mit Weißweinpuffer erreicht werden (bei den Detektionen in Abbildung 56 bereits durchgeführt). Die Nutzung von anderen zur Verfügung stehenden Pufferlösungen (PBS, Kombipuffer), welche möglicherweise eine Veränderung der Proteinladungen bedingen könnten, führte jedoch zu einem vollständigen Signalverlust. Dies entspricht den Erwartungen, da die Aptamer-Target-Interaktion, wie bereits beschrieben, vom pH-Wert und Ionenkonzentration abhängig ist. Eine Optimierung diesbezüglich müsste bereits im Rahmen der SELEX durch den Einsatz eines anderen Puffersystems erfolgen und sollte in zukünftigen Arbeiten in Betracht gezogen werden.

Das schlussendlich für die aptamerbasierte Detektion auf Silica-Platten entwickelte System (6.2.2.6) konnte auch unter Verwendung des Aptamers 619 (Abbildung 57) durchgeführt werden und sollte anschließend auch auf die unpolaren stationären Phasen übertragen werden. Es zeigte sich in diesem Kontext, dass bei den unpolaren Phasen eine weitere Reduktion der Aptamerkonzentration auf 0,5 nM für eine spezifische Detektion erforderlich ist. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die Beschaffenheit der unpolaren Phasen, bei denen die Hydroxylgruppen der SiO_2 -Partikel mit Alkylgruppen derivatisiert wurden, zurückzuführen. Da im Rahmen der Methodenentwicklungen für die unterschiedlichen stationären Phasen immer die gleiche Menge an Protein (1 μg) auf die jeweilige Startlinie aufgetragen wurde und somit auch die gleiche Menge an Bindungsstellen zur Verfügung steht, kann unter Berücksichtigung der zunehmenden Hintergrundfärbung bei der Methodenentwicklung für die polare Silica-Phase (Abbildung 56) folgender Ablauf postuliert werden. Auch wenn die Aptamere keine absolute Spezifität aufweisen sollten, kann durch den SELEX-Prozess und aufgrund der Untersuchungen zur Affinität (siehe 5.2.2.2) davon ausgegangen werden, dass bei einer geringen Aptamerkonzentration zunächst

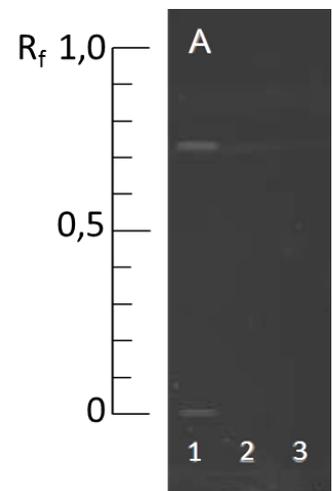


Abbildung 57: Aptastaining auf Silica durch Aptamer 619.

Etabliertes Aptastaining (2 x 5 min Blockierung (0,6 % Tween®20), 1 min Inkubation (5 nM Aptamer), 30 s Waschen) unter Verwendung des Aptamers 619 (Detektion bei 555 nm, 15 s Belichtung). Automatisiert aufgetragen (1 μg): Lysozym (Bahn 1), β -Lactoglobulin (Bahn 2), Insulin (Bahn 3).

eine Bindung zwischen Aptamer und dem *Target* Lysozym ausgebildet wird. Wenn keine weiteren Bindungsstellen auf dem Protein verfügbar sind, ist es denkbar, dass im Anschluss, wie oben beschrieben, aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen unspezifische Interaktionen folgen. Dies ist sowohl zwischen Aptameren und anderen Proteinen, als auch zwischen Aptameren und der Oberfläche der stationären Phase denkbar. Durch die hohe Hydrophobie der RP-Phasen wird deren Interaktion mit dem Aptamer jedoch unwahrscheinlicher, sodass ein größerer Anteil an den anderen Proteinen lokalisiert sein könnte. Eine Verbesserung der Spezifität durch Verringerung der Aptamerkonzentration ist somit unter diesen Bedingungen schlüssig, wird jedoch durch die Fluoreszenz und die Empfindlichkeit der eingesetzten Dokumentationsanlagen limitiert.

Die im Rahmen der Methodenentwicklung durch eine hohe Bandenschärfe gekennzeichneten RP-18- und RP-18We-Phasen wurden im Folgenden für eine chromatografische Trennung von Lysozym und β -Lactoglobulin eingesetzt und unter Verwendung einer Aptamerkonzentration von 0,5 nM sowie ansonsten analogen Bedingungen gefärbt. Um eine zuverlässige Bandenidentifikation zu gewährleisten, wurde jeweils eine Zwillingsplatte hergestellt, deren Untereinheiten nach der chromatografischen Trennung durch unterschiedliche Verfahren angefärbt wurden.

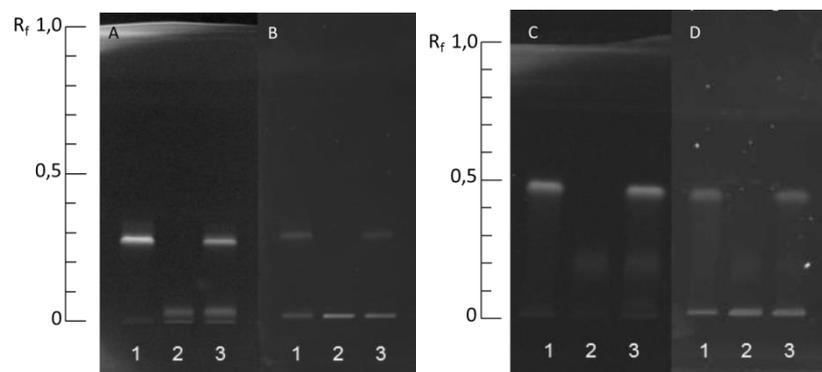


Abbildung 58: Fluorescaminfärbung und Aptastaining auf RP-18We und RP-18 durch Aptamer 620.

Dargestellt sind Zwillingsplatten der Trennung von Lysozym und β -Lactoglobulin unter Verwendung der RP-18We- (A & B) und RP-18-Phase (C & D). Ein Teil der jeweiligen Platte wurde unter Verwendung des proteinspezifischen Reagenz Fluorescamin gefärbt (A & C, Detektion bei 366 nm), die jeweils andere Hälfte (B & D) durch ein *Aptastaining* unter Verwendung des 5'-ATTO 550 markierten Aptamers 620 (0,5 nM; Detektion bei 555 nm, 15 s Belichtungszeit). Automatisiert aufgetragen (10 μ g): Lysozym (Bahn 1), β -Lactoglobulin (Bahn 2), Mischung Lysozym/ β -Lactoglobulin (Bahn 3).

Bei der Detektion unter Verwendung des proteinspezifischen Reagenz Fluorescamin (Abbildung 58, A & C) sind beide Proteine auf beiden Phasen gut zu erkennen (R_f -Werte: 0,05 (β -Lactoglobulin) & 0,3 (Lysozym)). Beim *Aptastaining* unter Verwendung des Aptamers 620 konnte auf der RP-18We-Phase (Abbildung 58, B) eine spezifische Detektion erreicht werden. Die bei einem R_f -Wert von ungefähr 0,05 lokalisierte Bande von β -Lactoglobulin tritt hier im Gegensatz zur Lysozymbande bei einem R_f -Wert von 0,3 nicht in Erscheinung. Bei der RP-18-Phase ist im Rahmen des *Aptastainings* jedoch eine β -Lactoglobulinbande zu erkennen, die Detektion scheint unter diesen Bedingungen somit nicht spezifisch. Unter Berücksichtigung des postulierten Mechanismus zur Interaktion der Aptamere im Rahmen der Detektion kann eine Erklärung auch hier möglicherweise im Bereich der stationären Phase gefunden werden. So wird die RP-18We-Phase, wie auch durch das „W“ (engl.: *wettable*) angedeutet, im Gegensatz zur RP-18-Phase vom Hersteller (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) so produziert, dass eine höhere Benetzbarkeit mit wässrigen Lösungsmitteln resultiert. Auch wenn diesbezüglich aufgrund des Produktschutzes keine weiteren Informationen veröffentlicht sind, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt auf einen höheren Anteil hydrophiler Gruppen

zurückzuführen ist. Somit erscheint es denkbar, dass bei der RP-18-Phase, nach Sättigung der verfügbaren Bindungsstellen auf dem Protein Lysozym, eine unspezifische Aptameranlagerung aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen folgte. Bei der RP-18We-Phase könnte dieser Effekt durch eine Anlagerung der Aptamere an die Oberfläche der stationären Phase eliminiert worden sein und so eine spezifische Detektion von Lysozym und Lysozym in Mischungen ermöglicht haben.

Um festzustellen, ob die entwickelte Methode zur Detektion auf RP-Phasen auch unter Verwendung anderer Aptamere genutzt werden kann, wurde eine entsprechende Detektion unter Verwendung des Aptamers 619 durchgeführt (Abbildung 59). Auch diesem Aptamer konnte unter Verwendung der RP-18We-Phase eine spezifische Detektion von Lysozym erreicht werden, wenn auch erst bei einer Konzentration von 1 nM (Abbildung 59, C). Auch hier konnte auf der RP-18-Phase keine spezifische Detektion erreicht werden, die Banden sind darüber hinaus schwächer (Abbildung 59, E & F). Insgesamt kann somit geschlussfolgert werden, dass eine aptamerbasierte Detektion von Lysozym auf unterschiedlichen stationären Phasen etabliert werden konnte. Es ist jedoch in Abhängigkeit der unterschiedlichen Phasen und eingesetzten Aptamere eine Methodenoptimierung erforderlich. Durch die doppelte Absicherung durch den R_f -Wert und die spezifische Detektion sind eine Kreuzreaktivität und ein daraus resultierendes falsch-positives Ergebnis schnell identifizierbar, eine erforderliche Methodenoptimierung kann dann durchgeführt werden. Da vermutet wird, dass die unspezifischen Detektionen auch infolge „überschüssiger“ Aptamere induziert werden, sollten neben der Fluoreszenzmarkierung der Aptamere auch andere Detektionsmöglichkeiten in Betracht gezogen werden.

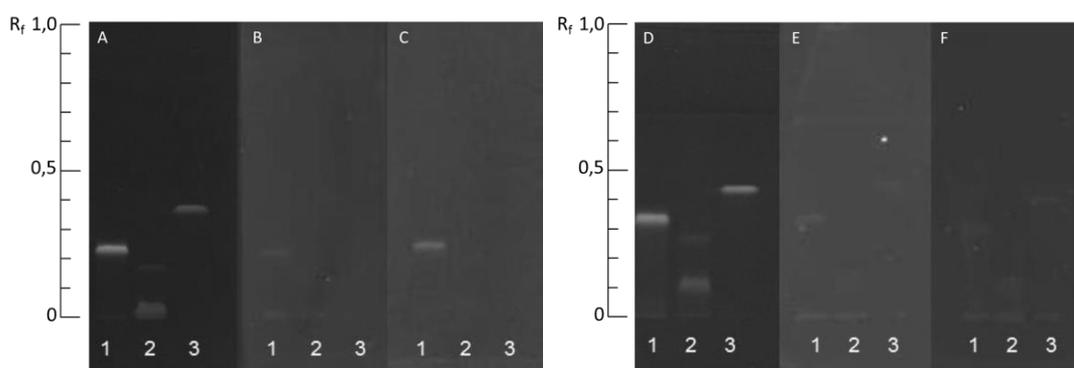


Abbildung 59: Fluorescaminfärbung und Aptastaining auf RP-18We und RP-18 durch Aptamer 619.

Dargestellt sind Zwillingsplatten der Trennung von Lysozym und β -Lactoglobulin unter Verwendung der RP-18We- (A - C) und RP-18-Phase (D - F). Ein Teil der jeweiligen Platte wurde unter Verwendung des proteinspezifischen Reagens Fluorescamin gefärbt (A & D, Detektion bei 366 nm). Durch ein *Aptastaining* bei Einsatz des 5'-ATTO 550 markierten Aptamers 619 (Detektion bei 555 nm, 15 s Belichtungszeit) unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen (B & E: 0,5 nM; C & F: 1 nM) wurden die anderen Teile der Platten gefärbt. Automatisiert aufgetragen (1 μ g): Lysozym (Bahn 1), β -Lactoglobulin (Bahn 2), Insulin (Bahn 3).

So wäre es möglich, durch Nutzung von unmarkierten Aptameren und anschließende Inkubation mit einer komplementären Sonde ein flexibleres Detektionssystem zu etablieren. Entsprechende Versuche unter Nutzung der bereits im Rahmen der LFD-Entwicklung genutzten Sonde (siehe 5.2.3.2 und 6.1) waren jedoch nicht zielführend, da die Sonde allein bereits mit den untersuchten Proteinen interagierte. Auch die Nutzung eines in einzelsträngige Nukleinsäuren interkalierenden Farbstoffs wie SYBR Green II wäre deutlich flexibler als das im Rahmen dieser Arbeit etablierte System. Hier konnte im Rahmen einiger durchgeführter Vorversuche jedoch keine Bandenfärbung erreicht werden. Zur Steigerung der Sensitivität und damit zur Verringerung der erforderlichen Aptamerkonzentration wurde eine Kopplung 5'-aminmodifizierter Aptamere an HRP (engl.: *horseradish peroxidase*) unter Verwendung der EDC/NHS-Kopplung untersucht. Zwar konnte die Enzymaktivität erhalten werden, nach der Inkubation mit dem Farbsubstrat TMB erfolgte jedoch eine

vollständige Blaufärbung der Platte. Da mittlerweile auch Nukleinsäuren mit katalytischer Aktivität in der Literatur beschrieben werden, könnte durch Nutzung solcher Sequenzen möglicherweise eine Option zur Umsetzung bestehen.(146) Insgesamt konnte keine der untersuchten Weiterentwicklungen erfolgreich umgesetzt werden, möglicherweise können diese jedoch für zukünftige Arbeiten als Ausgangspunkte dienen. Bemerkenswert ist des Weiteren, dass unter Verwendung der Aptamere 619 und 620 eine spezifische Detektion von Lysozym auch in Anwesenheit von β -Lactoglobulin erreicht werden konnte. Im Gegensatz zu den Untersuchungen im Rahmen der Biosensorentwicklung (5.2.3.1.1) scheinen die Lysozymaptamere, wenn sie in freier Lösung und nicht zu hoch konzentriert vorliegen, also doch eine Spezifität aufzuweisen. Da die Aptamere während des Selektionsprozesses und des *Aptastainings* nicht kovalent gebunden vorlagen, im Rahmen des entwickelten Biosensors jedoch schon, könnte hier ein Zusammenhang bestehen.

5.2.3.3.2 Anwendung

Um die Anwendbarkeit der entwickelten Methode zu demonstrieren, wurde untersucht, ob eine Detektion von Lysozym mittels *Aptastaining* auch in hoch matrixhaltigen Proben möglich ist. So wäre es im Kontext Wein denkbar, dass das Protein infolge der Interaktion mit sekundären Pflanzeninhaltsstoffen nicht mehr vom Aptamer erkannt wird. Auch eine ausgeprägte Kreuzreaktivität der Nukleinsäuren könnte in Anwesenheit weiterer Komponenten für eine selektive Detektion von Nachteil sein. Für diesen Zweck wurden zunächst zur Verfügung stehende Vollei- und Eiklarpräparate unter Anwendung der SDS-PAGE (siehe 6.2.1.2) hinsichtlich der Menge an Lysozym untersucht (Abbildung 60, A). Eine erfolgreiche Detektion durch Vergleich mit einem Standard gelang hierbei lediglich in der Eiklarprobe auf Bahn 2, welche im Gegensatz zur Eiklarprobe auf Bahn 1 in 10-facher Konzentration aufgetragen wurde. Dies entspricht den Erwartungen, da dieses Protein insgesamt nur 3,5 % am Gesamtprotein des Hühnereis ausmacht und das Volleipräparat neben weiteren Proteinen auch Fette und Kohlenhydrate enthält.(4) Nach dem positiven Nachweis durch die SDS-PAGE wurde das Eiklarpräparat sowohl in Weißwein (siehe 6.1) als auch in Weißweinpuffer aufgenommen, unter Verwendung der HPTLC-RP-18We-Phase getrennt und anschließend eine Hälfte mit Fluorescamin und die andere Hälfte mit dem 5'-ATTO 550-markierten Aptamer 619 durch ein *Aptastaining* gefärbt. Durch beide Methoden konnte die durch Lysozym gebildete Bande angefärbt werden (R_f -Werte 0,3). Während jedoch im Rahmen des *Aptastaining* (Abbildung 60, C) ausschließlich diese Banden angefärbt wurden, und somit die Anwendbarkeit der Methode in Matrixproben gezeigt werden konnte, kam es durch Fluorescamin zur Anfärbung diverser weiterer Banden (Abbildung 60, B).

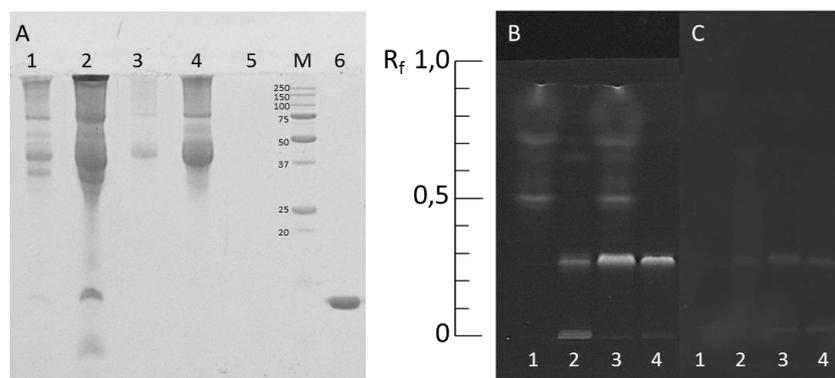


Abbildung 60: SDS-PAGE und *Aptastaining* auf RP-18We durch Aptamer 619.

A: Dargestellt ist eine SDS-PAGE von Eiklar (1: 8 μ g, 2: 80 μ g), Vollei (3: 8 μ g, 4: 80 μ g), Weißwein (5) und Lysozym (6: 4 μ g), (M = Marker, Färbung Coomassie-Blue). B & C: Zwillingsplatte mit Weißwein (1: 10 μ L), Eiklar in Weißweinpuffer (2: 10 μ g), Lysozym in Weißwein (3: 1 μ g), Lysozym in Weißweinpuffer (4: 1 μ g). Färbung B: Fluorescamin (Detektion 366 nm), Färbung C: 5'-ATTO 550 Aptamer 619 (Detektion 555 nm, 15 s Belichtung).

Bei den Proben, welche in Weißwein gelöst wurden, konnten im Bereich eines R_f -Wertes von 0,5 bis 0,9 mehrere Banden detektiert werden. Da bei der Analyse des Weins mittels SDS-PAGE (Abbildung 60, A, Bahn 5) keine Proteine oberhalb der Nachweisgrenze detektiert werden konnten, handelt es sich wahrscheinlich um sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie Polyphenole oder mehrere Proteine beziehungsweise Proteinfragmente aus der Weinmatrix, welche sich in diesem Bereich überlagern. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht im Rahmen der Dokumentation der Fluorescaminplatte wurden die π -Elektronensysteme der Polyphenole vermutlich ebenso angeregt. Ein weiteres Signal konnte im Bereich der Startlinie bei der Untersuchung der Eiklarprobe in Weißweinpuffer detektiert werden (Abbildung 60, B, Bahn 4). Es handelt sich möglicherweise um Ovalbumin, da bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass dieses Protein, welches die höchste Konzentration innerhalb des Hühnereis aufweist, nicht durch das chromatografische System bewegt werden kann und deswegen auf der Startlinie verbleibt. (139) Durch das *Aptastaining* kam es zu keiner Anfärbung der beschriebenen Banden, sodass eine erfolgreiche Anwendung auch für Lysozymproben gezeigt werden konnte, welche in Kontakt mit einer Matrix standen.

Für die Anwendung der Methode ist es ebenso von Interesse, welche Mengen an Protein noch detektiert werden können und ob eine Quantifizierung möglich ist. Aus diesem Grund wurden eine Verdünnungsreihe von Lysozym sowie unterschiedliche Verdünnungen in Weißwein hergestellt und mittels *Aptastaining* untersucht (Ausschnitt in Abbildung 61, links; vollständige Platte und Fluorescaminfärbung in 8.10). Die Auswertung kann sowohl optisch als durch die Densitometrie unter Verwendung der im Rahmen der Detektion aufgenommenen Bilder erfolgen. Für die Densitometrie wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Software *ImageJ* genutzt, welche durch Auswertung der Pixel in einem definierten Bereich eine quantitative Abschätzung ermöglicht (siehe 6.2.2.6). (147) Durch beide Vorgehensweisen wird ersichtlich, dass eine Menge von 0,25 μg Lysozym auf der RP-18We-Phase durch ein *Aptastaining* nicht mehr detektiert werden kann. Diese Konzentration konnte im Rahmen einer parallel durchgeführten Fluorescaminfärbung noch detektiert werden, sodass diese hinsichtlich der Nachweisgrenzen gegenwärtig zu bevorzugen ist.

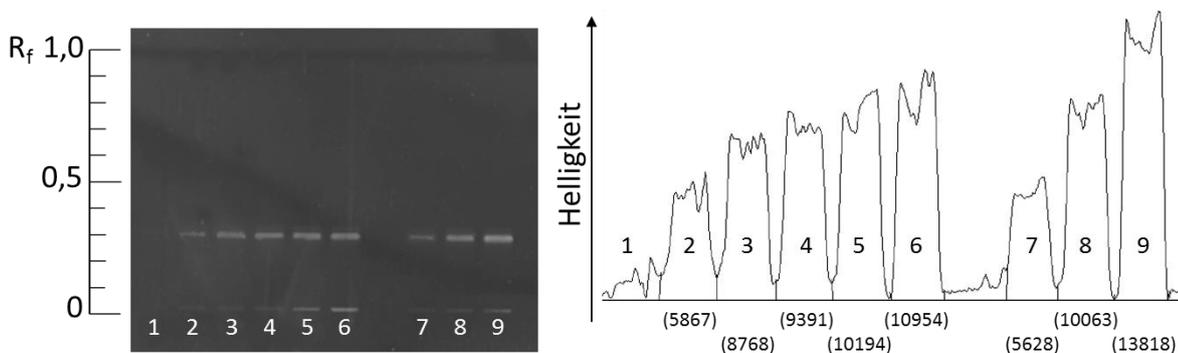


Abbildung 61: *Aptastaining* auf RP-18We durch Aptamer 619 und densitometrische Auswertung.

Verdünnungsreihe von Lysozym in Weißweinpuffer (1-6: 0,25 μg , 0,5 μg , 0,75 μg , 1 μg , 1,25 μg , 1,5 μg) und Verdünnungen von Lysozym in Weißwein (7-9: 0,5 μg , 1 μg , 1,5 μg). Links: *Aptastaining* mit 5'-ATTO 550 Aptamer 619 (Detektion bei 555 nm, 15 s Belichtung). Rechts: Densitometrische Auswertung unter Verwendung von *ImageJ*, in Klammern: Helligkeitswerte.

Die densitometrische Auswertung (Abbildung 61, rechts; Helligkeitswerte in Klammern) der Verdünnungsreihe von Lysozym in Weißweinpuffer (Bahn 1-6) und der in Weißwein detektierten Lysozymgehalte (Bahn 7-9) lässt des Weiteren erkennen, dass eine Zuordnung der Konzentrationen in eingeschränktem Maße möglich ist. So ist bei geringen Konzentrationen (0,5 μg Protein) ein ähnlicher Helligkeitswert zu detektieren (Puffer: 5867, Probe: 5628), bei hohen Konzentrationen (1,5 μg) sind jedoch Unterschiede erkennbar (Puffer: 10954, Probe: 13818). Somit bleibt abschließend festzustellen, dass eine halbquantitative Abschätzung unter Anwendung der

Densitometrie möglich ist, aber für eine exaktere Bestimmung gegenwärtig noch andere Methoden vorteilhafter sind. Es muss des Weiteren berücksichtigt werden, dass weder die HPTLC noch das *Aptastaining* ein geschlossenes System darstellen und somit grundsätzlich eine Vielzahl an äußeren Faktoren Einfluss nehmen können. Ein Vergleich zur Abschätzung einer Konzentration ist somit grundsätzlich nur auf einer HPTLC-Platte sinnvoll.

Neben der Detektion von Lysozym in Realproben wurden das *Aptastaining* auch zur Untersuchung der Caseinaptamere 606, 610, 612 und 616 genutzt. Diese Nukleinsäuren wurden, ebenso wie die Lysozym- und Ovalbuminaptamere, durch die unter 5.2.1 beschriebene *just in time-Selection* identifiziert. Zur Durchführung war eine Kopplung der Proteine an magnetische Partikel erforderlich, wobei dies im Falle des Caseins nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte. Da durch die Automatisierung des FISHings der Mehraufwand für die Durchführung einer weiteren SELEX unerheblich ist, wurde trotzdem ein entsprechender Prozess durchgeführt infolgedessen vier Aptamere identifiziert wurden. Um die Bindungseigenschaften der Aptamere im Hinblick auf die Caseine zu untersuchen, konnten im späteren Verlauf der Arbeit Einzelstandards von α -, β - und κ -Casein (Abbildung 62) akquiriert und eine HPTLC-Methode zur Trennung dieser Proteine entwickelt werden. Da die Kopplung der Caseine an die magnetischen Partikel nicht nachgewiesen werden konnte, ist es jedoch auch denkbar, dass die identifizierten Aptamere lediglich unspezifisch binden. Aus diesem Grund wurden weitere Proteine (Lysozym, α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin) mit auf die entsprechenden Platten aufgetragen. Für die chromatografische Trennung wurde, in Anlehnung an vorangegangene Arbeiten und im Gegensatz zur Methodenentwicklung für die Trennung von Lysozym und β -Lactoglobulin, ein basisches Gemisch (2-Butanol, Pyridin, Ammoniak, bidest. Wasser (3,9/2,0/1,0/3,1; v/v/v/v)) als mobile Phase eingesetzt.(139) Alle anderen Parameter entsprechen der in 6.2.2.6 beschriebenen Vorgehensweise. Es wurden für alle Aptamere Zwillingsplatten hergestellt und unter Verwendung von Fluorescamin angefärbt.

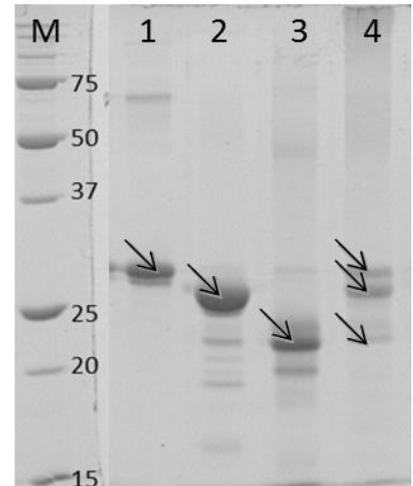


Abbildung 62: SDS-PAGE Caseine.

Dargestellt ist eine SDS-PAGE von α_{S1} -Casein (Bahn 1, 10 μ g, 23,0 kDa), β -Casein (Bahn 2, 10 μ g, 23,6 kDa), κ -Casein (Bahn 3, 10 μ g, 19,0 kDa) und dem Caseinstandard (SELEX-Target; Bahn 4, 10 μ g, 19,0 – 23,6 kDa) M = Marker, Färbung Coomassie-Blue.

In Abbildung 63 und Abbildung 64 sind beispielhaft die Ergebnisse für die Aptamere 606 und 612 dargestellt, alle anderen Abbildungen sind in 8.10 aufgeführt. Bei keinem der untersuchten Aptamere konnte eine bevorzugte Bindung der Caseine festgestellt werden. So wurde bei den Aptameren 606, 610 sowie 616 eine Interaktion mit allen verfügbaren Proteinen beobachtet. Das Aptamer 612 scheint den vorliegenden Ergebnissen zufolge sogar in größerem Maße mit den Proteinen Lysozym, β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin zu interagieren. Da keinerlei bevorzugte Bindung der Caseine zu erkennen war, ist es unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um ein ungünstiges Zusammenspiel der eingesetzten Phasen sowie der Aptamerkonzentration handelt. Während im Rahmen der Methodenentwicklung unter Verwendung der Aptamere 619 und 620 eine bevorzugte Bindung der Lysozymbanden zu beobachten war und aufgrund dessen eine Methodenoptimierung durchgeführt wurde, konnte ein vergleichbarer Effekt bei keinem der Caseinaptamere beobachtet werden. Aufgrund der bereits im Vorfeld zweifelhaften Ergebnisse im Kontext der SELEX-Vorbereitung wurde deswegen auf weitere Untersuchungen verzichtet.

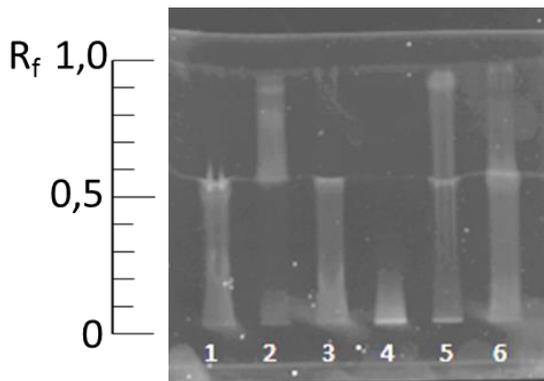


Abbildung 63: Aptastaining auf Silica durch Apt. 606.

Dargestellt ist ein *Aptastaining* unter Verwendung des Aptamers 606 (Detektion bei 555 nm, 15 s Belichtung).. Automatisiert aufgetragen (1 µg): α_{S1}-Casein (Bahn 1), β-Casein (Bahn 2), κ-Casein (Bahn 3), Lysozym (Bahn 4), α-Lactalbumin (Bahn 5) und β-Lactoglobulin (Bahn 6).

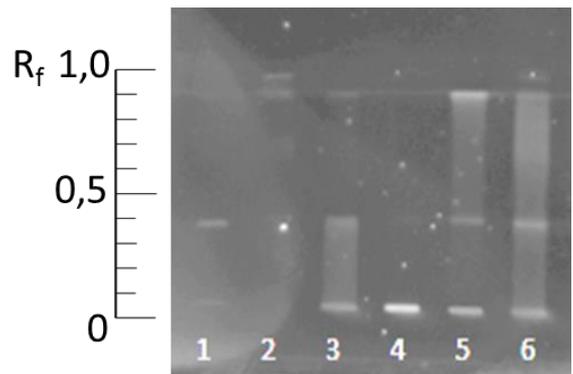


Abbildung 64: Aptastaining auf Silica durch Apt. 612.

Dargestellt ist ein *Aptastaining* unter Verwendung des Aptamers 606 (Detektion bei 555 nm, 15 s Belichtung).. Automatisiert aufgetragen (1 µg): α_{S1}-Casein (Bahn 1), β-Casein (Bahn 2), κ-Casein (Bahn 3), Lysozym (Bahn 4), α-Lactalbumin (Bahn 5) und β-Lactoglobulin (Bahn 6).

Die unter Verwendung des *Aptastainings* erzielten Ergebnisse zeigen zum einen die Bedeutung einer zuverlässigen Kopplung von *Target* und magnetischem Partikel vor Beginn der SELEX sowie eine weitere Einsatzmöglichkeit für die Methode. So könnte der Aptamerpool einer SELEX-Runde durch den Einsatz eines entsprechend markierten Primers mittels BEAMing markiert werden und dieses Gemisch anschließend zur Detektion auf HPTLC-Platten eingesetzt werden. Sollte sich in diesem Kontext eine Kreuzreaktivität erkennen lassen, könnten bereits während des SELEX-Prozesses Gegenmaßnahmen wie beispielsweise die Implementierung einer Gegen-SELEX durchgeführt werden. Im Zusammenspiel mit einer Sequenzierung des vorliegenden Aptamerpools könnten deutliche Optimierungen des Gesamtprozesses erreicht werden und Zeit sowie Kosten reduziert werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Materialien

Sämtliche in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Chemikalien und Geräte sind in Anhang 8.1 aufgeführt, alle anderen eingesetzten Materialien sind im Folgenden aufgeführt.

Die Antikörper mit einer Affinität gegenüber den Allergenen Lysozym, Ovalbumin und Casein (siehe Tabelle 29) wurden in vorangegangenen Arbeiten durch die Immunisierung von Kaninchen produziert. (25,100) Durch die Eurogentec S. A. wurden für diesen Zweck die Weinbehandlungsmittel Viniplus (Lysozympräparat, Begerow Product Line, Eaton Electric GmbH, Bonn, Deutschland) und die Weinschönungsmittel AlbuVin (Ovalbuminpräparat, Erbslöh Geisenheim AG, Geisenheim, Deutschland) sowie Kal-Casein (Kaliumcaseinatpräparat, Erbslöh Geisenheim AG, Geisenheim, Deutschland) jeweils in Freund's Adjuvant (hitzeinaktivierte Zellen von *Mycobacterium tuberculosis* in einer Wasser-in-Öl-Emulsion) gelöst. Die entsprechenden Tiere wurden vier Mal in einem Abstand von vier Wochen immunisiert, aus den Tieren jeweils 10 Tage danach ein Anteil des Serums entnommen, mittels Affinitätschromatografie (CNBr Sepharose-Säulen, Elution durch 100 mM Glycin (pH = 2,5)) aufgereinigt und in PBS (+0,01 % Thiomersal) gelagert.

Tabelle 29: Eingesetzte Antikörper.

Antigen	Wirtstier	Konzentration	Modifikation	Hersteller
Casein (Kal-Casein)	Kaninchen	1,1 mg/L		Eurogentec S. A, Seraing, Belgien
Lysozym (Viniplus)	Kaninchen	2,4 mg/L		Eurogentec S. A, Seraing, Belgien
Ovalbumin (AlbuVin)	Kaninchen	2,2 mg/L		Eurogentec S. A, Seraing, Belgien
Proteine aus Kaninchen	Ziege	0,25 mg/L	Meerrettich-Peroxidase	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA (früher Dako)

Tabelle 30: Eingesetzte Proteine und Proteinpräparate.

Bezeichnung	CAS-Nummer	Reinheit	Anmerkung	Hersteller
Bov. Serumalbumin (BSA)	9048-46-8	>92 %	Fraktion V	Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, USA
Casein	9000-71-9	>90 %	aus Kuhmilch	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
DreamTaq Polymerase		5 U/μL	aus <i>E. coli</i> (Gen aus <i>Thermus aquaticus</i>)	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Insulin	12584-58-6	27 USP units/mg	aus Schwein	Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, USA
Lysozym	12650-88-3	>90 % (10 % Puffersalze)	kristallisiert aus Hühnereieiweiß	Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, USA

Bezeichnung	CAS-Nummer	Reinheit	Anmerkung	Hersteller
Ovalbumin	9006-59-1	>98 %	aus Hühnereieiweiß	Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, USA
Streptavidin	9013-20-1	13 U/mg Protein	aus <i>Streptomyces avidinii</i>	Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, USA
Trypsin	9002-07-7	sequencing grade	aus Schwein, modifiziert durch reduktive Methylierung	Promega Corp., Madison, USA
α -Casein	9000-71-9	>70 %	α_{S1} -Casein aus Kuhmilch	Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, USA
α -Lactalbumin	9051-29-0	>85 %	aus Kuhmilch	Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, USA
β -Casein	9000-71-9	>98 %	aus Kuhmilch	Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, USA
β -Lactoglobulin	9045-23-2	>90 %	aus Kuhmilch	Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, USA
Eiklar			aus Hühnerei	Fluka, Honeywell International Inc., New Jersey, USA
Vollei			aus Hühnerei	Fluka, Honeywell International Inc., New Jersey, USA
κ -Casein	9000-71-9	>70 %	aus Kuhmilch	Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, USA

Alle in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Nukleinsäuren wurden bei unterschiedlichen Herstellern nach Auftrag durch Festphasensynthese hergestellt, aufgereinigt und lyophilisiert. Da die jeweilige Menge an vorliegender DNA bekannt war, wurden durch Zugabe einer entsprechenden Menge an bidest. H₂O in allen Fällen eine Konzentration von 100 μ M eingestellt.

Tabelle 31: Eingesetzte Nukleinsäuren.

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
5'-Alexa488-Forward-Primer	Alexa488-CATCC GTCAC ACCTG CTC	Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgien
5'-Amin-C₁₂-Reverse-Primer	NH ₂ -C ₁₂ -GATAC GGGAC CGAAC ACC	Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgien
5'-Amin-C₁₂-Forward-Primer	NH ₂ -C ₁₂ -CATCC GTCAC ACCTG CTC	Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgien
5'-ATTO550-Aptamer 619	ATTO550-CATCC GTCAC ACCTG CTCCC TGCTA GAATT TTTCA TGATC TTGCT GTATT TCTAT TATGG TGTTT GGTCC CGTAT C	Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, USA
5'-ATTO550-Aptamer 620	ATTO550-CATCC GTCAC ACCTG CTCTT GTTAT TTTT GTTGA TGTAG GTTGG ATGAT GTATT TCCGG TGTTT GGTCC CGTAT C	Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, USA

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
5'-Biotin-C₆-Reverse-Primer	Biotin-C ₆ -GATAC GGGAC CGAAC ACC	Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgien
5'-Biotin-C₆-Forward-Primer	Biotin-C ₆ -CATCC GTCAC ACCTG CTC	Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgien
Aptamer 600	CATCC GTCAC ACCTG CTCGG CAAGT CAGCT TTGGG GAGGG TTCTG GTAGG CGGTA ACTGG TGTTT GGTCC CGTAT C	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aptamer 601	CATCC GTCAC ACCTG CTCAC GTCAT CCGTC ACACC TGCTC ACGTC ATCCG TCACA CCTGC TCCCC CCACT GGGTG TTCGG TCCCG TATC	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aptamer 602	CATCC GTCAC ACCTG CTCTT CAACG ATTCT TTTT TTTGT CACGT TCGCA TTGTC TTGGT GTTCG GTCCC GTATC	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aptamer 604	CATCC GTCAC ACCTG CTCGG TGTTT GGTCC CGTAT CATCC GTCAC ACCTG CTCGG TGTTT GGTCC CGTAT C	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aptamer 610	CATCC GTCAC ACCTG CTCTA ATTAA GATTC GCCTT TTGTT AAAAT AAAAA TATTG TGTGG TGTTT GGTCC CGTAT C	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aptamer 612	CATCC GTCAC ACCTG CTCTA TCGCG AACT GTACT GACTA TTCTT CTGTT TATTG GTTGG TGTTT GGTCC CGTAT C	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aptamer 616	CATCC GTCAC ACCTG CTCTG ATGAT GTTTT AAATT CCTTC CCTTT TCCTT TTCGA GTCGG TGTTT GGTCC CGTAT C	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aptamer 619	CATCC GTCAC ACCTG CTCCC TGCTA GAATT TTTCA TGATC TTGCT GTATT TCTAT TATGG TGTTT GGTCC CGTAT C	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aptamer 620	CATCC GTCAC ACCTG CTCTT GTTAT TTTT GTTGA TGTAG GTTTG ATGAT GTATT TCCGG TGTTT GGTCC CGTAT C	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aptamer 623	CATCC GTCAC ACCTG CTCTG TTGTC GTCCT TGTGG TGTTG GCTCC CGTAT CACGG CTGGG TGTTT GGTCC CGTAT C	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aptamer 628	CATCC GTCAC ACCTG CTCCA CCCGT CACAC TCATC CGTCA CACCT GCTCC CCACA CTGGG TGTTT GGTCC CGTAT C	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aptamer 678	CATCC GTCAC ACCTG CTCCA CCCGT CACAC CCATC CGTCA CACCT GCTCC CCACA ACCGG TCCGG TGTTT GGTCC CGTAT C	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aptamer 681	CATCC GTCAC ACCTG CTCCC AGCGT GCGTC GACCC GGACC CCTGT CAGCC CCCTC GCGGG TGTTT GGTCC CGTAT C	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aptamerbibliothek	CATCC GTCAC ACCTG CTCNN NNNNN NNNNN NNNNN NNNNN NNNNN NNNNN NNNNN NNNGG TGTTT GGTCC CGTAT C	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
FITC-Sonde (10 Basen)	FITC-GATAC GGGAC	Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, USA
FITC-Sonde (18 Basen)	FITC-GATAC GGGAC CGAAC ACC	Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, USA
Forward-Primer	CATCC GTCAC ACCTG CTC	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
M13-Forward-Primer	TGTAA AACGA CGGCC AGT	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
M13-Reverse-Primer	GGAAA CAGCT ATGAC CATG	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Reverse-Primer	GATAC GGGAC CGAAC ACC	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
TBA	GGTTG GTGTG GTTGG	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

Alle in der vorliegenden Arbeit hergestellten Puffer wurden mit bidest. H₂O hergestellt. Wenn in Tabelle 32 nicht anders angegeben, wurde der gegebenenfalls einzustellende pH-Wert durch HCl (2 M) und NaOH (0,1 M) angepasst.

Tabelle 32: Zusammensetzungen der eingesetzten Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anmerkungen
AGE-LoadingDye	50 % Glycerin, 50 % TAE-Puffer, 0,05 % Xylencynolblau	
basisches Laufmittel	2-Butanol, Pyridin, Ammoniak, bidest. Wasser (3,9/2,0/1,0/3,1; v/v/v/v)	
Binde- & Waschpuffer	0,5 mM Ethylendiamintetraessigsäure, 1 M Natriumchlorid, 5 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Säure),	pH 7,5
Citrat-Puffer	210 mM Citronensäure-Monohydrat, 300 mM Kaliumhydroxid	pH 4
HCCA-Lösung	0,3 g/L α -Cyano-4-hydroxymethylsäure in Ethanol/Aceton (2:1 v/v)	
DreamTaq-Puffer	10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Säure), 50 mM Kaliumchlorid, 1,5 mM Magnesiumchlorid	pH 8,3 Hersteller: Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Farbsubstrat-Lösung	5 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in 125 μ L Aceton lösen, Zugabe 875 μ L Methanol, Zugabe 19 mL Citrat-Puffer Zugabe 200 μ L Wasserstoffperoxid (1 % w/v)	

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anmerkungen
Kombipuffer	6,06 g/L Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Base), 8,77 g/L Natriumchlorid, 5 mL Tween-20	in dest. H ₂ O
LB-Amp-Agar	1 L LB-Medium, 15 g/L Agar, Zugabe 50 g/L Ampicillin (Natriumsalz) nach Abkühlen auf 40 °C, Verteilung auf Agarplatten (Füllhöhe ca. 1 cm)	engl.: <i>lysogeny broth</i>
LB-Amp-Medium	1 L LB-Medium Zugabe 50 g/L Ampicillin (Natriumsalz) nach Abkühlen	engl.: <i>lysogeny broth</i>
LB-Medium	10 g/L Caseinhydrolysat, 5 g/L Natriumchlorid, 5 g/L Hefeextrakt	engl.: <i>lysogeny broth</i>
MES-Puffer	0,1 M 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	pH 5,0
Natriumacetat-puffer	10 mM Natriumacetat	pH 4,5 / pH 5 / pH 5,5 / pH 6 Hersteller: SierraSensors GmbH, Hamburg, Deutschland
Natriumhydrogen-carbonatpuffer	100 mM Natriumhydrogencarbonat	pH 8,3
PBS	137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 12 mM Dinatriumhydrogenphosphat	engl.: <i>phosphate buffered saline</i> , pH 7,4
polares Laufmittel	Acetonitril, Trifluoressigsäure, bidest. Wasser (5/0.375/4.625; v/v/v)	
Precondition II-Puffer	10 mM Natriumhydroxid, 1 M Natriumchlorid	in dest. H ₂ O Hersteller: SierraSensors GmbH, Hamburg, Deutschland
Precondition I-Puffer	100 mM Salzsäure	in dest. H ₂ O Hersteller: SierraSensors GmbH, Hamburg, Deutschland
saures Laufmittel	2-Butanol, Pyridin, Eisessig, bidest. Wasser (3,9/2,0/1,0/3,1; v/v/v/v)	
SDS-Färbelösung	Lösung A: 0,05 g/mL Coomassie-Brilliant Blue, Lösung B: 80 g/L Ammoniumsulfat 76,8 mL Lösung B + 1,6 mL Phosphorsäure + 1,6 mL Lösung A (8 h Rühren) Vor Gebrauch Zugabe von 20 mL Methanol	in dest. H ₂ O
SDS-Laufpuffer	0,25 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Base), 0,2 M Glycin, 1 g/L Natriumdodecylsulfat	

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anmerkungen
SDS-Reduktionspuffer	11,2 g/L Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Base), 20 % Glycerin (w/v), 40 g/L Natriumdodecylsulfat, 5 g/L Bromphenolblau	
SDS-Sammelgelpuffer	0,25 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Säure), 1 g/L Natriumdodecylsulfat	pH 6,3
SDS-Trenngelpuffer	1,5 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Base), 2 g/L Natriumdodecylsulfat	pH 6,3
SOC-Medium	20 mM Glucose, 10 mM Magnesiumsulfat, 10 mM Magnesiumchlorid, 2,5 mM Kaliumchlorid, 5 g/L Hefeextrakt, 20 g/L Caseinhydrolysat,	
TAE-Puffer	2 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Base), 100 mM Ethylendiamintetraessigsäure	pH 8 (mit Eisessig)
TEMED-Lösung	10 % Tetramethylethylendiamin (m/v)	
Weißweinpuffer	0,75 mM Calciumchlorid, 16 mM Kaliumacetat, 3,5 mM Magnesiumacetat-Tetrahydrat, 0,75 mM Calciumacetat-Monohydrat, 1 mM Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, 4 mM Kaliumdihydrogenphosphat 108,7 mL/L Ethanol	pH 3,0-3,2 (mit H ₂ SO ₄)

Die zur Verfügung stehenden Informationen (Etiketten) über die in der Arbeit für unterschiedliche Zwecke eingesetzten Weine sind in Tabelle 33 beziehungsweise Tabelle 34 angegeben.

Tabelle 33: Eingesetzte Weine.

Bezeichnung	Abfüller	Alkohol- gehalt	Mindesthalt- barkeitsdatum	Volumen
Akzente (Müller-Thurgau, lieblich)	Erzeugerabfüllung Moselland eG Winzergenossenschaft (L-A.P. Nr. 2 576 280 0662 16)	10,5 %-vol.	nicht angegeben	0,75 L
light live (Cuvee)	Schloss Wachenheim AG	0,0 %-vol.	03/2018	0,75 L
Lorch (Müller-Thurgau, trocken)	Heinrich Lorch GmbH (L-A.P. Nr. 2 907 009 A67 15)	11,5 %-vol.	nicht angegeben	1 L
Monfleur (Cuvee)	Réunis à F. 34360	9,5 %-vol.	nicht angegeben	0,75 L
Saale-Unstrut (Müller-Thurgau, trocken)	Erzeugerabfüllung Winzervereinigung Freyburg- Unstrut eG (L-A.P. Nr. 001-079-16)	12,0 %-vol.	nicht angegeben	0,75 L

Tabelle 34: Wein für Aptastaining.

Bezeichnung	Abfüller	Alkohol- gehalt	Mindesthalt- barkeitsdatum	Volumen
Chardonnay della Venezie (Indicazione geografica tipica 2014)	Rheinberg Kellerei GmbH, Bingen (IT-TN 8)	11,5 %-vol.	12/2016	0,75 L

Da mehrere Geräte und Materialien zu unterschiedlichen Zwecken in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden, sind diese aus Gründen der Übersichtlichkeit in Tabelle 35 und Tabelle 36 angegeben.

Tabelle 35: Eingesetzte Geräte.

Gerät (ggf. spezifischer Einsatzzweck)	Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	Mettler Toledo TLE104E	Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Autoklav	Systec DX-23	Systec GmbH Labor Systemtechnik, Wettenberg, Deutschland
Autoklav	Systec VX-95	Systec GmbH Labor Systemtechnik, Wettenberg, Deutschland
Brutschrank (Kultivierung)	Heraeus/ Thermo Electron LED GmbH Typ B20 + MaxQ3000	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
Circulardichroismusspektrometer (CD-Untersuchungen)	Jasco J-815	Jasco Deutschland GmbH, Gross- Umstadt, Deutschland
Dokumentationseinheit (Aufnahme SDS-PAGE)	Molecular Imager VersaDOC 4000 MP	Biorad Laboratories Inc., Herkules, USA
Dokumentationseinheit (Aufnahme AGE)	Dark Hood DH40/50	Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
Dokumentationseinheit (Aufnahme HPTLC-Platten)	TLC Visualizer	CAMAG, Berlin, Deutschland
Elektrophoreseeinheit (AGE)	Eigenbau Uni Hamburg	Appligene, Illkirch, Frankreich
Elektrophoreseeinheit mit Gelgießstand (SDS-PAGE)	Mini-Protean Tetra Cell System	Biorad Laboratories Inc., Herkules, USA
Gefriertruhe	Ultra Low Temperature Freezer U570	VWR AG, New Jersey, USA
Grobwaage	1203MP	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Inkubator	TH-30	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
iphone (Aufnahme LFDs)	iPhone 6s	Apple Inc., Californien, USA
magnetischer Separator	KingFisher Duo	Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finnland
MALDI-TOF (MS-Untersuchungen)	MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland

Gerät (ggf. spezifischer Einsatzzweck)	Bezeichnung	Hersteller
Mikrowelle	Typ 7810	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland
NanoDrop	ND-1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
pH-Meter	PY-P11 & PB-11	Satorius AG, Göttingen, Deutschland
Photo-/Fluorimeter	Spektramax M2 T4.0 HA	Molecular Devices LLC., Californien, USA
Probenauftragungssystem	ATS 4	CAMAG, Berlin, Deutschland
real time-PCR (Schmelztemperaturbestimmung)	iQ5 Multicolor Real- Time PCR Detection System	Biorad Laboratories Inc., Herkules, USA
Rollschüttler	RM5 Assistent Nr. 248	Conrad & Co. Nfl. GmbH, Hamburg, Deutschland
Schüttelinkubator	3016	Gesellschaft für Labortechnik GmbH & Co, Hannover, Deutschland
Schüttler	SM-30A	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
SPR-Spektroskop	SPR-4	Sierra Sensors GmbH, Hamburg, Deutschland
Stromeinheit (AGE, SDS-PAGE)	peQLab EV 231	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Thermocycler (PCR)	Thermocycler T3000	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Tischzentrifuge	Microfuge 16	Beckmann Coulter Inc., Krefeld, Deutschland
Trockenschrank		Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Ultraschallbad	Transsonic Digital	Elma, Singen, Deutschland
Vortexer	peQtwist	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Wasserbad	Haake F3 C	Haake, Karlsruhe, Deutschland
Werkbank (Zellkulturarbeiten)	S2020 1.2	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Workstation (PCR-Arbeiten)	UVC-T-M-AR	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
Zentrifuge	Scanspeed 1523M	Gene Company Ltd., Chai Wang, China

Tabelle 36: Weitere eingesetzte Materialien.

Bezeichnung	Einsatzzweck	Hersteller
<i>96-well plate</i>	photometrische & fluorimetrische Untersuchungen	Greiner Bio-One GmbH, Bad Nenndorf, Deutschland
ABIL WE 09	BEAMing	Evonik Industries GmbH, Duisburg, Deutschland
Chromabond C18	Aufreinigung vor MALDI	Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland
dNTPs	PCR	Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland
Dynabeads M-280 Streptavidin	Strangtrennung	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>E. coli</i>-Zellen (Stamm XL-1)	chemisch kompetente Zellen für Klonierung	
Hefeextrakt	Herstellung LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>HybriDetect</i>-Kit	LFD-Entwicklung	Milenia Biotec GmbH, Gießen, Deutschland
<i>Low Molecular Weight Ladder</i>	DNA-Größenstandard AGE	New England BioLabs Inc., Massachusetts, USA
Mineralöl	BEAMing	Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, USA
<i>OIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Plasmidisolierung	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>Peptide calibration standard II (PEPII)</i>	Kalibrationsstandard MALDI-TOF	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
<i>peqGold Gel Extraction Kit</i>	Gelextraktion	peqlab Biotechnologie GmbH (VWR), Pennsylvania, USA
Pipetten(2,5/10/100/1000/5000 µL)	diverses	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (10, 100, 1000, 5000 µL)	diverses	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
<i>Precision Plus Protein Standards</i>	Molekulargewichtsmarker SDS-PAGE	Bio-Rad Laboratories, Inc., Californien, USA
Reagiergefäße (1,5, 2, 15, 50 mL)	diverses	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
RP-18-HPTLC-Platten (0,16-0,20 mm, 9,5-11,5 µm)	HPTLC	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
RP-18We-HPTLC-Platten (0,15-0,20 mm, 5-7 µm)	HPTLC	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
RP-8-HPTLC-Platten (0,20-0,27 mm, 9,5-11,5 µm)	HPTLC	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>Sample Vials (800 µL) & caps</i>	SPR-Messungen	Sierra Sensors GmbH, Hamburg, Deutschland

Bezeichnung	Einsatzzweck	Hersteller
Silica-HPTLC-Platten (0,15-0,20 mm, 5-7 µm)	HPTLC	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
SiMAG Carboxyl Beads (1,0 µm)	Immobilisierung	chemicell GmbH, Berlin, Deutschland
SPR-AS-AMF	SPR-Sensorchips	Sierra Sensors GmbH, Hamburg, Deutschland
SPR-AS-HCA	SPR-Sensorchip für den aptamerbasierten Biosensor	Sierra Sensors GmbH, Hamburg, Deutschland
Tauchkammer 124160	HPLTC-Fluorescaminfärbung	DESAGA GmbH, Lindenfels, Deutschland
Tegosoft DEC	BEAMing	Evonik Industries GmbH, Duisburg, Deutschland
TOPO TA Cloning Kit	Klonierung	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Vials (1,5 mL, Gewinde), Deckel (Polypropylen, Schraubkappen), Septen (Teflon/Silikon, 1,5 mm), Inserts (0,25 mL)	automatisierte Auftragung HPTLC	WICOM, Heppenheim, Deutschland

Im Folgenden sind die für unterschiedliche Zwecke eingesetzten Softwares und die jeweiligen Parameter angegeben:

Bezeichnung: ExpASy (http://web.expasy.org/peptide_mass/)

verwendet für: *in silico*-Verdau

Tabelle 37: Parameter *in silico*-Verdau.

Parameter	Wert
<i>cysteines treated with</i>	Iodoacetamide
<i>acrylamide adducts</i>	Nein
<i>methionines oxidized</i>	Nein
Ladung	[M+H] ⁺
Masse	<i>monoisotopic</i>
Enzym	Trypsin
<i>missed cleavages</i>	0
Massenbereich	≥ 500 Da

Bezeichnung: Compass IsotopePattern (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland)

verwendet für: Simulation Isotopenmuster

Tabelle 38: Parameter Berechnung Isotopenmuster.

Parameter	Wert
<i>Chemical</i>	M+H
<i>z</i>	1
<i>FWHM</i>	0,5
<i>Resolving Power</i>	-1
<i>Isotope threshold (%)</i>	0,1

Bezeichnung: *mfold* (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/dna-folding-form>)

verwendet für: Simulation Sekundärstrukturen

Tabelle 39: Parameter Berechnung Sekundärstrukturen.

Parameter	Wert
<i>DNA-Sequence</i>	linear
<i>Folding Temperature</i>	25 °C
<i>Ionic Conditions</i>	21 mM Na ⁺ , 5 mM Mg ²⁺
<i>Percent Suboptimality</i>	5
<i>Upper Bond (Number of computed foldings)</i>	50
<i>Window Parameter</i>	Default
<i>Maximum distance between paired bases</i>	no limit

Bezeichnung: *MEME suite* (<http://meme-suite.org/tools/meme>)

verwendet für: Identifikation Motive in Nukleinsäuren.

Tabelle 40: Parameter Berechnung Motive.

Parameter	Wert
<i>Discovery mode</i>	normal mode
<i>Site distribution</i>	any number of repetitions
<i>Number of motifs</i>	5

Bezeichnung: *QGRS-Mapper* (<http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/analyze.php>)

verwendet für: Identifikation G-Quadruplexe in Nukleinsäuren.

Tabelle 41: Parameter Berechnung Motive.

Parameter	Wert
<i>max-length</i>	30
<i>Min G-group</i>	3
<i>Loop size</i>	0-36

Des Weiteren wurden folgende Softwares eingesetzt, wobei hier nicht bei jeder Auswertung die gleichen Parameter eingesetzt wurden:

Tabelle 42: Weitere eingesetzte Softwares.

Bezeichnung	Hersteller/Entwickler
AnalysierR2	Sierra Sensors GmbH, Hamburg, Deutschland
BindIt	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Biostep Argus X1	Biostep GmbH, Jahndorf, Deutschland
Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmont, USA
flexAnalysis	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
GATC Viewer	GATC-Biotech AG, Konstanz, Deutschland
GENtle	M. Manske, Universität Köln, Deutschland
ImageJ	M. D. Abramoff, National Institutes of Health, USA
Nanodrop 1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
OriginPro 9.0G	
Papers3	Digital Science & Research Solutions Inc., Boston, USA
Powerpoint 2010	Microsoft Corporation, Redmont, USA
Soft Max Pro	Molecular Devices, LLC, Californien, USA
Spectra Analyse	Jasco Deutschland GmbH
Spectra Manager	Jasco Deutschland GmbH
SPR-K2	Sierra Sensors GmbH, Hamburg, Deutschland
Windows 7	Microsoft Corporation, Redmont, USA
Word 2010	Microsoft Corporation, Redmont, USA

6.2 Methoden

6.2.1 Methoden im Kontext Proteine

6.2.1.1 Immobilisierung auf magnetischen Partikeln

Die Immobilisierung der SELEX-Targets (a), die Herstellung von den im Rahmen der Gegen-SELEX genutzten Gegen-Beads (b) und auch die magnetischen Partikel mit kovalent gebundenen Reverse-Primern für das BEAMing (c) wurden unter Bildung von kovalenten Bindungen zwischen primären Aminen aus den zu immobilisierenden Molekülen und Carboxylgruppen auf der Oberfläche von magnetischen Partikeln durchgeführt.

In Anlehnung an ein vom Hersteller der Beads (SiMAG Carboxyl Beads, chemicell GmbH, Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestelltes Protokoll wurden zunächst Produktionsrückstände durch wiederholte Waschschriffe entfernt (Vorbereitung). Durch Inkubation der Carboxyl-Beads mit EDC wird dann ein O-Acylisourea-Intermediat gebildet, welches im Gegensatz zur Carbonsäure deutlich reaktiver ist (Abbildung 65). Nach Abschluss der Immobilisierung erfolgt eine Lagerung in unterschiedlichen Blocking-Puffern wodurch die verbliebenen Bindungsstellen auf der Oberfläche abgesättigt werden.

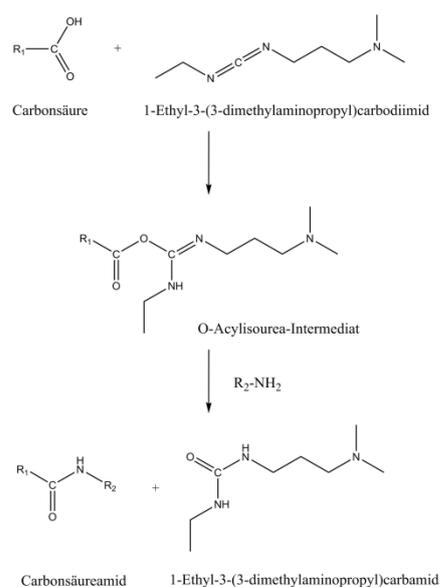


Abbildung 65: Bildung von Carbonsäureamiden nach Aktivierung durch EDC. R₁ = Beadoberfläche, R₂ = Protein.

Vorbereitung

- 200 μL (10 mg) *Beads* (SiMAG-Carboxyl) + 1 mL MES-Puffer
- Mischen (Vortexer)
- Magnetische Separation, Verwerfen des Überstandes
- 1x Wiederholen

Immobilisierung

- Aufnahme *Beads* in 250 μL EDC-MES-Puffer (40 mg/mL EDC in MES-Puffer, frisch angesetzt)
- Inkubation (10 min auf Vortexer)
- Zugabe von
 - a) 50 μg SELEX-Target
 - b) 50 μg Ethanolamin
 - c) 25 μg 5'-Amin-C₁₂-Reverse Primer
- Inkubation (2 h auf Vortexer, Raumtemperatur)

Abschluss

- Magnetische Separation, Verwerfen des Überstandes
- Zugabe 1 mL PBS-Puffer
- Mischen (Vortexer)
- 3x Wiederholen
- Zugabe von
 - a) 1 mL *Blocking*-Puffer (0,1 % (m/V) Ethanolamin, 0,05 % Natriumazid in PBS-Puffer)
 - b) 1 mL *Blocking*-Puffer (0,1 % (m/V) Ethanolamin, 0,05 % Natriumazid in PBS-Puffer)
 - c) 1 mL *Blocking*-Puffer (0,1 % (m/V) BSA, 0,05 % Natriumazid in PBS-Puffer)

Finale Konzentration: 10 mg/mL ($1,8 \cdot 10^{10}$ *Beads*/mL)

6.2.1.2 SDS-PAGE

Sowohl Ionen als auch geladene Moleküle orientieren sich in einem elektrischen Feld zur entgegengesetzt geladenen Elektrode. Die Geschwindigkeit mit der sich die Ladungsträger in Richtung der Elektrode bewegen ist sowohl von Größe des Moleküls und der Ladung als auch von der Beweglichkeit in der vorhandenen Matrix abhängig. Dieses Prinzip wird auch im Rahmen der SDS-PAGE angewendet, um die Größe von Proteinen zu bestimmen und gegebenenfalls durch einen Vergleich mit Standards eine Identifikation zu ermöglichen.

Zunächst werden die dreidimensionalen Strukturen der Proteine durch Erhitzung der Proben und das im SDS-Reduktionspuffer enthaltene β -Mercaptoethanol zerstört. Das ebenfalls im Puffer enthaltene SDS lagert sich in der Folge an die linearisierten Proteine an, wodurch eine zur Oberfläche und damit zur Masse proportionale Ladung erzeugt sowie die gegebenenfalls vorhandenen Eigenladungen unterdrückt werden. Die in der Folge negativ geladenen Makromoleküle werden auf das sogenannte Sammelgel aufgetragen und durch eine angelegte Spannung in das durch lineare Polymerisation von Acrylamid sowie vereinzelte Quervernetzungen durch Tetramethylethyldiamin (TEMED) erzeugte Polyacrylamidgel eingebracht. Das weitmaschigere Sammelgel dient zur Fokussierung der Proteine, die Trennung erfolgt im Anschluss durch das engmaschigere Trenngel, welches zwischen Sammelgel und Anode lokalisiert ist. Da die Geschwindigkeit der denaturierten und mit SDS belegten Proteine nur durch die Masse und die daraus resultierende Ladung definiert wird, kann

durch Abbruch der Elektrophorese nach einem bestimmten Zeitpunkt eine Trennung der Analyten erreicht werden.

Probenvorbereitung

- Probenverdünnung mit SDS-Reduktionspuffer (Verhältnis 1:1)
- 10 min aufkochen im Wasserbad (95 °C)

Herstellung Polyacrylamidgele

- Vorbereitung Gelgießstand (Anordnung von zwei rückstandsfreien Glasplatten in der anvisierten Größe des finalen Gels aufeinander, Trennung durch Spacer in der anvisierten Dicke des Gels, Positionierung auf inerter Gummifläche, Fixierung durch Klammern)
- Vermischung der in Tabelle 43 angegebenen Komponenten in der angegebenen Reihenfolge für das Trenngel

Tabelle 43: Zusammensetzung unterschiedlich dicht vernetzter Polyacrylamidgele.
Die angegebenen Prozentzahlen geben den Gehalt an Acrylamid in der finalen Lösung an.

Komponente	Trenngel (12 %)	Trenngel (14 %)	Sammelgel (4 %)
bidest. H ₂ O	4,5 mL	4,0 mL	2,1 mL
SDS-Sammelgelpuffer			2,5 mL
SDS-Trenngelpuffer	2,5 mL	2,5 mL	
Acrylamid	3,0 mL	3,5 mL	0,4
Ammoniumperoxodisulfat	50 mg	50 mg	50 mg
TEMED-Lösung	10 µL	5 µL	10 µL

- Luftblasenfreie Überführung in Gelgießstand mit Pipette
- Überschichtung mit 2-Propanol
- 30 min Reaktionszeit
- Entfernung 2-Propanol
- Vermischung der in Tabelle 43 angegebenen Komponenten in der angegebenen Reihenfolge für das Sammelgel
- Luftblasenfreie Überführung in Gelgießstand mit Pipette
- Positionierung Taschenkamm zur Aussparung von Probenaschen zur Probenaufgabe
- 30 min Reaktionszeit

Gelelektrophoretische Trennung

- Überführung Polyacrylamidgel in Elektrophoresekammer
- Füllung Elektrophoresekammer mit SDS-Laufpuffer
- Entfernung Taschenkamm
- Probenaufgabe (max. 10 µL) in Probenaschen
- Verschluss Elektrophoresekammer und Start der Elektrophorese mit den in Tabelle 44 angegebenen Bedingungen (ggf. Verkürzung der Zeit, wenn Probenfront (gekennzeichnet durch blaue Färbung) am Ende des Polyacrylamidgels

Tabelle 44: Physikalische Parameter SDS-PAGE.

Parameter	Größe
Spannung	200 V
Stromstärke	70 mA
Leistung	300 W
Zeit	55 min

Detektion

- Entfernung Polyacrylamidgel von Glasplatten
- Inkubation in SDS-Färbelösung über Nacht
- Entfärbung in dest. Wasser bis Hintergrundfärbung ausreichend verringert (1-2 h)

6.2.1.3 Antikörper-Bead-Assay

Zur Abschätzung ob die unter 6.2.1.1 beschriebene Kopplung erfolgreich verlief, wurde in Anlehnung an den in einer vorangegangenen Arbeit entwickelten, indirekten ELISA zum Nachweis von Lysozym in Wein ein antikörperbasierter Assay (Abbildung 66) entwickelt.(21)

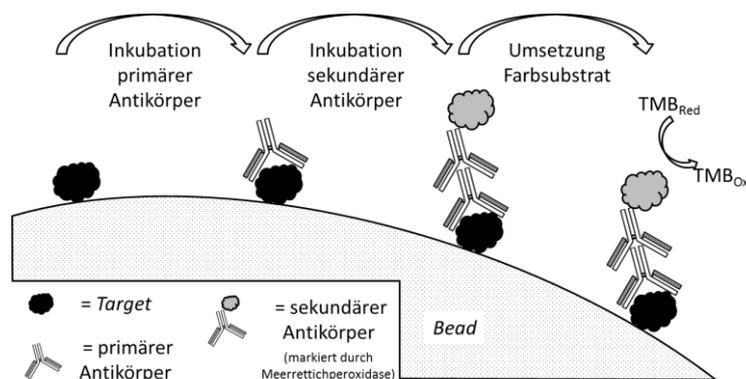


Abbildung 66: Ablauf Target-Nachweis am Bead.

Der Ablauf des antikörperbasierten Nachweises der Targets am Bead ist schematisch dargestellt. Bei einer erfolgreichen Kopplung des Targets an die Bead-Oberfläche kommt es zur Bindung eines Target-spezifischen primären Antikörpers. Dieser kann danach durch einen spezifischen sekundären Antikörper detektiert werden, welcher durch eine Markierung mit einer Meerrettichperoxidase die Umsetzung von der reduzierten Form des TMB (TMB_{Red}) zur farbigen, oxidierten Form (TMB_{Ox}) und damit eine Quantifizierung ermöglicht.

Bei allen drei Allergenen werden die hergestellten Target-Beads mit primären Antikörpern aus Kaninchen mit einer Affinität zum entsprechenden Allergen inkubiert. Dadurch kann im Folgenden Schritt ein Antikörper mit einer Affinität zu Kaninchenproteinen hinzugefügt werden, welcher an das F_C -Fragment des primären Antikörpers bindet. Durch eine Meerrettichperoxidasemarkierung des sekundären Antikörpers ist es in Anwesenheit des Allergens dann nach Zugabe von TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) möglich, eine Färbung bei 450 nm zu detektieren.

Durchführung

- 10 μ L der magnetischen Partikel nach 6.2.1.1
- Zugabe 300 μ L PBS (+0,5 % Tween-20), magnetische Separation, Verwerfen des Überstandes
- Zugabe 300 μ L PBS (+0,5 % Tween-20), magnetische Separation, Verwerfen des Überstandes
- Zugabe 300 μ L PBS (+0,5 % Tween-20), magnetische Separation, Verwerfen des Überstandes

Spaltung der Peptidbindungen auf der carboxyterminalen Seite der Aminosäuren Arginin und Lysin, sodass eine Degradierung zu definierten Peptiden erfolgt.(106,107) Nach Abschluss des enzymatischen Verdaus werden die Peptide durch den Einsatz der RP-Säulenchromatografie (engl.: *reversed-phase*) aufgereinigt, direkt auf dem für die Messung eingesetzten *Anchorchip* mit α -Cyano-4-hydroxymizsäure (4-HCCA, engl.: *α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid*) vermischt und bis zur Trockne eingedampft.

Probenaufarbeitung

- Eindampfen der Proben im Stickstoffstrom (1 mL *Bead*-Suspension nach 6.2.1.1 Variante a)
- Aufnahme der Rückstände in 50 μ L Harnstoff (6 M in bidest. H₂O)
- Zugabe von 1,3 μ L Dithiotreitol Lösung (100 mM in Natriumhydrogencarbonatpuffer)
- Inkubation (10 min, 60 °C)
- Zugabe von 1,3 μ L Iodacetamidlösung (300 mM in Natriumhydrogencarbonatpuffer)
- Inkubation (30 min, Lichtausschluss)
- Zugabe 425 μ L Natriumhydrogencarbonatpuffer
- Zugabe 6 μ L Trypsin (0,25 μ g/mL; Originalvorschrift 0,25 μ g/ μ L)
- Inkubation (12-16 h, 37 °C)
- Zugabe Ameisensäure (w = 0,2 %) bis pH 2-3

Probenaufreinigung

- Säulenkonditionierung durch 5 mL Acetonitril (w = 60 %)
- Säulenäquilibration durch 5 mL Ameisensäure (w = 0,2 %)

Da die zur Probenaufreinigung eingesetzten *reversed phase-solid phase extraction* Säulen (C18) durch die untersuchten magnetischen Partikel möglicherweise verstopfen könnten, wurde diese im Vorfeld durch magnetische Separation und Isolierung des Überstandes entfernt. Der Überstand wurde dann im Folgenden aufgereinigt.

- Probenaufgabe
- Spülen mit 5 mL Ameisensäure (w = 0,2 %)
- Elution mit 3 mL Acetonitril (w = 60 %)

Messung

Die Messung erfolgte unter Verwendung eines sogenannten *Anchorchips*, welcher mehrere voneinander abgegrenzte Messbereiche enthält. Die Oberfläche ist dabei durch entsprechende Vertiefungen so gestaltet, dass eine mechanische Anreicherung in der Mitte erfolgt:

- Aufgabe 1 μ L aufgereinigte Probenlösung
- Überschichtung mit 0,8 μ L HCCA-Lösung
- vollständige Trocknung

Nach der Trocknung wurde der *AnchorChip* für die Messung in das MALDI-TOF eingeführt. Durch die *flexAnalysis*-Software wurde ein Livebild übertragen, sodass einzelne Bereiche angesteuert und mittels des Lasers ionisiert werden können. Zur Kalibration wurden ein Peptidstandard (PEP-II-Standard, Verdünnung 1:200) sowie ein Blindwert (nur Matrix) analog präpariert.

Tabelle 45: Parameter MALDI-TOF-Messungen.

Parameter	Größe
Software	<i>flexAnalysis</i>
Target	AnchorChip
Laser	Smartbeam-II
Messmodus	Positiv
Massenbereich	600-3000 m/z
Laserintensität	20-50 %
Spannung Ionenquelle 1	20 kV
Spannung Ionenquelle 2	18,10 kV
Linsenspannung	6,7 kV
Reflektorspannung 1	21,05 kV
Reflektorspannung 2	10,75 kV

6.2.2 Methoden im Kontext Nukleinsäuren

6.2.2.1 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde durch Kary Mullis zur Amplifikation definierter DNA-Sequenzen entwickelt und 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Mittlerweile sind eine Vielzahl an unterschiedlichen Modifikationen und Einsatzzwecken für diese Methode entwickelt worden, welche jedoch alle auf den drei fundamentalen Schritten von Denaturierung, Primeranlagerung (engl.: *primer annealing*) und Elongation beruhen.

Die inter- oder intramolekularen Basenpaarungen der DNA werden dabei zu Beginn der Reaktion durch eine initiale Temperaturerhöhung aufgetrennt respektive denaturiert. Im nächsten Schritt (*primer annealing*) kommt es bei einer geringeren Temperatur zur Anlagerung der sogenannten Primer. Es handelt sich hierbei um kurze Polynukleotide (10-20 Basen), welche hinsichtlich der Sequenz der Nukleinbasen komplementär zu dem Anfang und dem Ende der zu amplifizierenden Sequenz sind. Diese Fragmente sind für die Reaktion einerseits zwingend erforderlich, da die die Elongation katalysierenden DNA-Polymerasen nicht in der Lage sind, *de novo* die Polymerisierung einer Nukleinsäure zu katalysieren. Andererseits bietet diese scheinbare Limitation die Möglichkeit, den zu amplifizierenden Abschnitt der Nukleinsäurevorlage zu definieren. Die im Anschluss stattfindende Elongation der Primer erfolgt beim Temperaturoptimum der DNA-Polymerase, indem in 5'-3'-Richtung jeweils die zur Vorlage komplementären dNTPs (Desoxynukleotide) unter Abspaltung von Pyrophosphat kovalent mit dem Ende des bereits bestehenden Polynukleotids verknüpft werden. Der gesamte Prozess wird mehrmals wiederholt, sodass durch die in jeder Runde stattfindende Amplifikation und die damit in immer größerer Zahl zur Verfügung stehenden Kopien eine exponentielle Vervielfältigung erfolgt.

Durchführung PCR

- Herstellung PCR-Mastermix nach Tabelle 46 in der dort angegebenen Reihenfolge. Das Volumen des Templats wird variiert und das gegebenenfalls fehlende Volumen durch Wasser ergänzt.

Tabelle 46: Zusammensetzung PCR-Mastermix (1-fach).

Komponente	Volumen	Ausgangskonzentration	finale Konzentration
DreamTaq-Puffer	2,5 µL	10-fach	1-fach
dNTPs	2 µL	100 µM (je 25 µM)	8 µM (je 2 µM)
Forward-Primer	0,25 µL	100 µM	1 µM
Reverse-Primer	0,25 µL	100 µM	1 µM
Wasser	8,5- 18,5 µL		
DreamTaq-Polymerase	0,5 µL	0,5 U	0,01 U
Templat	1-10 µL	variierend	variierend

- Durchführung PCR-Reaktion in Thermocycler mit dem in Tabelle 47 angegebenen Temperaturprogramm, wobei die Schritte 2 bis 4 wiederholt ausgeführt werden (hier: 15 Zyklen).

Tabelle 47: Temperaturprogramm PCR.

Schritt	Funktion	Temperatur [°C]	Dauer [s]
1	initiale Denaturierung	94	300
2	Denaturierung	94	30
3	<i>primer annealing</i>	56	30
4	Elongation	72	30
5	terminale Elongation	72	300
6	Lagerung	4	dauerhaft

Strangtrennung

Nach der Durchführung einer PCR unter Verwendung eines 5'-Biotin-C₆-Reverse-Primers (anstatt des Reverse-Primers) ist es möglich, im Anschluss das doppelsträngige Produkt zu trennen und so wieder die einzelsträngigen Aptamere zu isolieren.

- 50 µL magnetische Streptavidin-*Beads* + 50 µL Binde- & Waschpuffer
- magnetische Separation
- Zugabe 50 µL Binde- & Waschpuffer
- magnetische Separation
- Zugabe 50 µL Binde- & Waschpuffer, 25 µL PCR-Ansatz, 25 µL Binde- & Waschpuffer (2-fach konzentriert)
- Inkubation (15 min) unter Schütteln (Vortexer)
- magnetische Separation
- Zugabe 100 µL Binde- & Waschpuffer
- magnetische Separation
- Zugabe 100 µL Binde- & Waschpuffer
- magnetische Separation
- Zugabe 80 µL Binde- & Waschpuffer
- Strangtrennung durch Hitzedenaturierung (Wasserbad, 96 °C, 15 min)
- unmittelbar angeschlossene Zentrifugation (10 s, 16000 g) und magnetische Separation
- unmittelbar angeschlossene Isolation Überstand

Agarosegelelektrophorese (AGE)

- Vorbereitung Gelschlitten und Agarosegellösung (1,5 g Agarose in 50 mL TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer)
- Erhitzung (Mikrowelle) bis Agarose vollständig gelöst, Überführung in Gelschlitten nach kurzer Abkühlung (2 min)
- Positionierung Taschenkamm zur Aussparung von Probenaschen zur Probenaufgabe, 15 min Abkühlzeit
- Vorbereitung Laufkammer durch Überführung Gel in Laufkammer und auffüllen mit TAE-Puffer (Füllhöhe so das Gel vollständig bedeckt)
- Probenvorbereitung durch Zugabe 2 µL AGE-LoadingDye zu Proben
- Entfernung Taschenkamm, Aufgabe Proben (10 µL) und Low Molecular Weight Ladder (5 µL) in Probenaschen
- Verschluss Elektrophoresekammer und Start der Elektrophorese mit den in Tabelle 48 angegebenen Bedingungen (ggf. Verkürzung der Zeit, wenn Probenfront (gekennzeichnet durch blaue Färbung) am Ende des Polyacrylamidgels)

Tabelle 48: Physikalische Parameter AGE.

Parameter	Größe
Spannung	170 V
Stromstärke	1000 mA
Leistung	150 W
Zeit	20 min

Detektion

- Entfernung Agarosegel aus Gelschlitten
- Inkubation in Ethidiumbromidbad (0,001 % (v/v) in dest. H₂O) für 10 min
- Entfernung Reste Ethidiumbromidlösung durch Abspülen und fotografische Detektion unter UV-Licht (312 nm) in Geldokumentationseinheit.

Gelaufreinigung

Für eine Gelaufreinigung wird das *peqGold Gel Extraction Kit* (*peqGold*-Bindepuffer, *peqGold*-Extraktionssäulen, *peqGold*-Waschpuffer) eingesetzt, welches mehrere Puffer unbekannter Zusammensetzung beinhaltet.

- Isolierung (Skalpell) der zu isolierenden Bande unter UV-Licht
- Zugabe *peqGold*-Bindepuffer (1 µL Puffer pro 1 mg Gel)
- Inkubation im Wasserbad (7 min, 55-60 °C)
- Zugabe Natriumacetatlösung (3 M) bis Gelbfärbung (pH ≤ 7,5) erkennbar
- Überführung auf *peqGold*-Extraktionssäule, Zentrifugation (1 min, 10000 g)
- Verwerfen des Filtrats, Zugabe 750 µL *peqGold*-Waschpuffer, Inkubation (2-3 min, Raumtemperatur), Zentrifugation (1 min, 10000 g)

- Verwerfen des Filtrats, Zugabe 750 µL *peqGold*-Waschpuffer, Inkubation (2-3 min, Raumtemperatur), Zentrifugation (1 min, 10000 g)
- Verwerfen des Filtrats, Zentrifugation (1 min, 10000 g)
- Verwerfen des Filtrats, Zugabe 50 µL bidest. H₂O, Inkubation (1 min, Raumtemperatur), Zentrifugation (1 min, 10000 g), Filtrat enthält aufgereinigte DNA

6.2.2.2 Schmelztemperaturbestimmung

Bei der Bestimmung der Schmelztemperatur wird ein Aliquot des FISHing-Eluats mittels real time-PCR vervielfältigt. Außer dem Zusatz des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green handelt es sich hinsichtlich der Bedingungen um eine konventionelle PCR. Durch den Zusatz des interkalierenden Farbstoffs kann jedoch die Menge an vorhandenen Doppelsträngen durch Fluoreszenzmessung quantifiziert werden, da dieser Farbstoff in doppelsträngige Nukleinsäuren interkaliert und das Fluoreszenzsignal bedeutend verstärkt wird. Der Schmelzpunkt, also die Temperatur bei der nur noch Einzelstränge vorliegen, kann somit durch schrittweise Steigerung der Temperatur und kontinuierliche Beobachtung des Fluoreszenzsignals nach Abschluss der Vervielfältigung bestimmt werden.

Durchführung

- Herstellung PCR-Mastermix nach Tabelle 49 in der dort angegebenen Reihenfolge.

Tabelle 49: Zusammensetzung Schmelztemperatur-Mastermix (1-fach).

Komponente	Volumen	Ausgangskonzentration	finale Konzentration
DreamTaq-Puffer	2 µL	10-fach	1-fach
dNTPs	1,6 µL	100 µM (je 25 µM)	8 µM (je 2 µM)
Forward-Primer	0,2 µL	100 µM	1 µM
Reverse-Primer	0,2 µL	100 µM	1 µM
Wasser	8,5 µL		
SYBR-Green	1 µL	6,25-fach	0,3125-fach
DreamTaq-Polymerase	0,5 µL	0,5 U	0,0125 U
Aliquot BEAMing-Eluat	3 µL	variierend	variierend

- Durchführung PCR-Reaktion in Thermocycler mit dem in Tabelle 47 angegebenen Temperaturprogramm, wobei die Schritte 2 bis 4 wiederholt ausgeführt werden (hier: 25 Zyklen).
- Anstelle von Schritt 6 (Abkühlung auf 4 °C und Lagerung) werden die doppelsträngigen Amplifikate durch eine Temperaturerhöhung auf 95 °C für 2 min denaturiert
- erneute Ausbildung doppelsträngiger Produkte durch Temperatursenkung auf 76 °C für 90 min
- Aufnahme Schmelztemperaturkurve im Bereich von 55-95 °C (Geschwindigkeit 0,5 °C/0,07 min) durch Messung der Fluoreszenz (Exzitation = 494 nm, Emission = 521 nm)
- Lagerung bei 4 °C

6.2.2.3 CD-Spektroskopie

Zur Untersuchung der Anordnung der durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen miteinander in Wechselwirkung stehenden Nukleinbasen wurde die CD-Spektroskopie eingesetzt. Der vereinfachte Aufbau dieser Methode ist mit der Photometrie vergleichbar (Lichtquelle-Messzelle-Detektor), es wird jedoch nicht linear, sondern zirkular polarisiertes Licht eingesetzt. Chirale Moleküle wie die DNA, interagieren, in

Abhängigkeit der Wellenlänge, unterschiedlich mit links beziehungsweise rechts zirkular polarisiertem Licht. Infolge der Amplitudenverkleinerung eines Lichtanteils kommt es zu einer elliptischen Polarisierung, welche in der Elliptizität ausgedrückt wird. Obwohl die Zusammenhänge noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnten, ist bekannt, dass beispielsweise die parallele oder antiparallele Anordnung zweier Nukleinsäurestränge zu einer bevorzugten Absorption von rechts beziehungsweise links zirkular polarisiertem Licht definierter Wellenlängen führt und somit anhand des resultierenden Spektrums Rückschlüsse auf die Struktur geschlossen werden können.

Durchführung

- Verdünnung der Aptamere 600 und 623 mit Weißweinpuffer (3 μ M)
- Überführung in Quarzküvette (d = 10 mm)
- CD-spektroskopische Untersuchung (230-300 nm, Geschwindigkeit 100 nm/min, n = 3)
- Subtraktion Signal Weißweinpuffer, Kombination der durchgeführten Messungen

6.2.2.4 Fluoreszenzassay

Zur Charakterisierung der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Aptamere wurde unter anderem die Stabilität der gebildeten Aptamer-*Target*-Komplexe durch die Bestimmung der Dissoziationskonstanten untersucht. Neben dem etablierten Verfahren der SPR-Spektroskopie wurde ein sogenannter Fluoreszenzassay entwickelt, welcher durch Kombination einer sensitiven Detektion und einer apparativ wenig aufwendigen Durchführung mehrere Vorteile vereint.

Durch Inkubation von 5'-Alexa 647-modifizierten Aptameren (Alexa 647 = Herstellerbezeichnung sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe, Sequenzen der modifizierten Aptamere siehe Tabelle 31) und dem auf magnetischen Partikeln immobilisierten *Target* wird einerseits die Ausbildung von intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Bindungspartnern und andererseits durch magnetische Separation eine Isolation von den ungebundenen Aptameren ermöglicht. Da die Dissoziationskonstante nicht von der eingesetzten Menge an *Target* abhängig ist, sondern diese für eine Bestimmung des K_D -Wertes lediglich konstant sein muss und davon auszugehen ist, dass eine homogene Immobilisierung (siehe 6.2.1.1 Immobilisierung auf magnetischen Partikeln) stattgefunden hat, sind die magnetischen Partikel auch zur Durchführung des Fluoreszenzassays geeignet. Durch Inkubation unter kontinuierlicher Agitation und Lichtausschluss sowie mehrere angeschlossene Waschschrte wurde versucht möglicherweise auftretende Störungen zu minimieren.

Durchführung

- Fluoreszenzmarkierung der Aptamere unter Verwendung des unter 6.2.3.2 b) beschriebenen BEAMings mit dem 5'-Alexa488-*Forward*-Primer (Lichtausschluss)
- Konzentrationsbestimmung BEAMing-Eluat mittels NanoDrop (siehe 6.2.3.3) und Kontrolle bzgl. ggf. vorhandener Nebenprodukte mittels AGE gemäß 6.2.2.1
- Erstellung Konzentrationsreihe (Lichtausschluss) mit Weißweinpuffer (90 μ L)
- Zugabe 10 μ L dest. H₂O zu 10 μ L *Target-Beads* nach 6.2.1.1, magnetische Separation, Verwerfen des Überstandes
- Zugabe 10 μ L dest. H₂O, magnetische Separation, Verwerfen des Überstandes
- Zugabe 10 μ L dest. H₂O, magnetische Separation, Verwerfen des Überstandes
- Aufnahme *Target-Beads* in 10 μ L Weißweinpuffer und Zugabe 90 μ L markierter Aptamere
- Inkubation (30 min, Schütteln, Lichtausschluss)

- Zentrifugation (10 min, 18400 g), magnetische Separation, Verwerfen des Überstandes
- Zugabe 100 µL Weißweinpuffer, Zentrifugation (10 min, 18400 g), magnetische Separation, Verwerfen des Überstandes
- Zugabe 100 µL Weißweinpuffer, Zentrifugation (10 min, 18400 g), magnetische Separation, Verwerfen des Überstandes
- Resuspension in 100 µL bidest. H₂O, magnetische Separation, Verwendung des Überstandes (80 µL) zur photometrischen Untersuchung (96-well plate, Extinktion 485 nm, Emission 525 nm, 5 s schütteln)

6.2.2.5 LFD

Das von der Firma Milenia Biotec GmbH (Gießen, Deutschland) vertriebene HybriDetect-System beinhaltet vorbereitete Teststreifen die schematisch in Abbildung 68 dargestellt sind. Diese bestehen aus mehreren Bereichen, welche für die Gestaltung des zu entwickelnden Systems entscheidend sind.

Am unteren Ende befindet sich das sogenannte *sample pad*, welches in die zu untersuchende Lösung eintaucht. Durch ein vom Hersteller definiertes Maximalvolumen (100 µL) wird gewährleistet, dass das unmittelbar darüber liegende *conjugate pad* nicht direkt in die Flüssigkeit eintaucht. Dieses beinhaltet Goldpartikel, welche mit einem aus Kaninchen stammenden Antikörper mit einer Affinität zu dem Isothiocyanatderivat von Fluorescein (FITC) belegt sind. Durch Kapillarkräfte steigt die zu analysierende Lösung entlang des Teststreifens in Richtung der Test- und Kontrollbande, wobei die mit bloßem Auge erkennbaren Goldpartikel mit in diesen Bereich getragen werden. Im Bereich der Testbande ist durch den Hersteller Streptavidin und im Bereich der Kontrollbande ein Antikörper mit einer Affinität gegenüber dem F_C-Fragment von Antikörpern aus Kaninchen immobilisiert. Den Abschluss des Teststreifens bildet das *absorbent pad*, in welchem die Lösungen gesammelt werden.

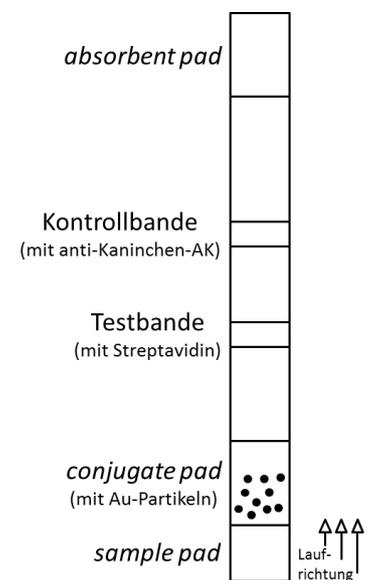


Abbildung 68: Schematische Darstellung des HybriDetect Systems.

Teststreifen des HybriDetect Systems (Milenia Biotec GmbH, Gießen, Deutschland), welcher in die zu untersuchende Lösung eingetaucht wird.

Aufgrund der Affinität der auf der Kontrollbande immobilisierten Antikörper zu den Antikörpern, welche auf der Oberfläche der Goldpartikel gebunden sind, werden die Goldpartikel in diesem Bereich zurückgehalten. Diese sind aufgrund der optischen Eigenschaften von Gold mit dem bloßen Auge erkennbar und zeigen eine erfolgreiche Durchführung des Tests an. Im Bereich der Testbande kommt es in Abhängigkeit des verwendeten Aptamers und der Anwesenheit von Lysozym sowie einer FITC-Sonde in unterschiedlichen Fällen zur Ausbildung einer Bande, siehe hierzu 5.2.3.2 und Abbildung 52.

Wie unter 5.2.3.2 beschrieben, wurden für die Methodenentwicklung unterschiedliche Konzentrationen und Volumina der eingesetzten Komponenten untersucht. Allen Variationen gemeinsam war die folgende Durchführung:

- Verdünnung FITC-Sonde und biotinylierter Aptamere 619 beziehungsweise 620 mit Weißweinpuffer
- Mischung 10 µL FITC-Sonde und 10 µL biotinylierte Aptamere
- Erhitzung auf 96 °C für 5 min, direkte Abkühlung auf 4 °C (*Refold*)

- Verdünnung Lysozym-Stammlösung (10 mg/mL) mit Weißweinpuffer
- Mischung 35 µL Weißweinpuffer, 35 µL PBS und 10 µL Lysozym
- Zugabe 20 µL Gemisch FITC-Sonde/biotinylierte Aptamere
- Eintauchen LFDs
- Laufzeit 5 min
- fotografische Detektion nach vollständiger Trocknung

6.2.2.6 HPTLC-Aptastaining

Die Dünnschichtchromatografie (TLC, engl.: *thin-layer chromatography*) stellt eine kosteneffiziente, apparativ wenig anspruchsvolle und trotzdem leistungsfähige Analytik dar, welche im Laboralltag häufig für eine schnelle Qualitätskontrolle laufender Prozesse eingesetzt wird. Dabei wird die zu untersuchende Lösung auf eine stationäre Phase, welche planar auf einer inerten Oberfläche aufgebracht ist, aufgetragen und anschließend unter Nutzung von Kapillarkräften eine mobile Phase über die dann senkrecht stehende Oberfläche geleitet (siehe Abbildung 69, links). Die durch Weiterentwicklungen im Bereich der verfügbaren stationären Phasen und die Kombination mit einer automatisierten Auftragung entwickelte HPTLC kann auch für quantitative Untersuchungen genutzt werden.(139) Wie bei allen chromatografischen Verfahren erfolgt die Trennung der zu analysierenden Komponenten infolge unterschiedlich starker Wechselwirkungen mit den beiden Phasen (siehe Abbildung 69, Mitte). Die Detektion im Anschluss an die Trennung kann bei farbigen Substanzen visuell erfolgen oder durch eine chemische Reaktion direkt auf der stationären Phase ermöglicht werden (siehe Abbildung 69, rechts).(139) Auch die Kopplung mit massenspektrometrischen Verfahren oder die Nutzung von Antikörpern zur spezifischen Detektion konnte etabliert werden.(40,140) Ein großer Vorteil der HPTLC in diesem Kontext ist, dass, im Gegensatz zur häufig eingesetzten HPLC (engl.: *high performance liquid chromatography*), auch solche Substanzen zur Detektion eingesetzt werden können, welche schädlich für die stationäre Phase sind, deren Umsetzung mehrere konsekutiv eingesetzte Komponenten erfordert oder welche eine relativ geringe Reaktionsgeschwindigkeit aufweisen.

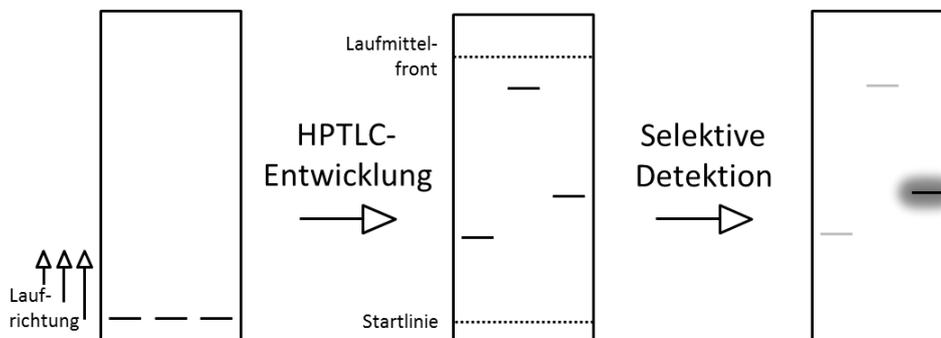


Abbildung 69: Prinzip HPTLC-Aptastaining.

Dargestellt ist das Prinzip des im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten *Aptastainings* zur selektiven Detektion von Proteinen auf HPTLC-Platten. Die Auftragung der zu untersuchenden Lösungen erfolgt automatisiert (links) auf die stationären HPTLC-Phasen. Zur chromatografischen Trennung wird die Platte in die mobile Phase gestellt, welche infolge der Kapillarkräfte über die stationäre Phase fließt und dabei die Bestandteile der Proben voneinander trennt (Mitte). Im Anschluss erfolgen die aptamerbasierte Detektion unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Aptamere und Aufnahme nach Anregung mit der für das Fluorophor spezifischen Wellenlänge (rechts).

Die Methodenentwicklung wurde bereits unter 5.2.3.3.1 ausführlich beschrieben, die hier dargestellte Vorgehensweise stellt die schlussendlich entwickelte Form dar.

Durchführung HPTLC

- Entfernung von Staubablagerungen und Produktionsrückständen durch Entwicklung der Silica-Platten unter Verwendung von Methanol (Doppeltrogkammer)
- Verdampfen des Laufmittels und Trocknung im Trockenschrank (100 °C, 10 min)
- Verdünnung der Proben und automatisierte Auftragung mit den in Tabelle 50 angegebenen Parametern.

Tabelle 50: Parameter HPTLC-Probenauftragungen.

Parameter	Größe
Applikationsmodus	Bande
Spritzenvolumen	25 µL
Auftragungsvolumen	1-10 µL
Bandenbreite	8 mm
Auftragungsgeschwindigkeit	50 nL/s
Füllgeschwindigkeit	4 µL/s
Sprühgas	Stickstoff
Spüllösung	bidest. H ₂ O/Methanol (50/50 v/v)

- Entwicklung der Platten unter Verwendung der in Tabelle 32 angegebenen Laufmittel bis zu einer Laufhöhe von 7 cm
- Verdampfen des Laufmittels bis zur vollständigen Trocknung

Durchführung Fluorescamindetektion

- vollständiges und gleichmäßiges Eintauchen der HPTLC-Platten in Fluorescaminlösung (0,1 % Fluorescamin in Aceton (w/v))
- fotografische Detektion (366 nm)

Durchführung Aptastaining

Die hier beschriebene Methode entspricht der schlussendlich entwickelten Methode, die unter 5.2.3.3.1 dargestellten Entwicklungsschritte wurden im Rahmen der Methodenentwicklung durchgeführt.

- Blockierung der HPTLC-Platte durch vollständiges Eintauchen in Weißweinpuffer (+ 0,6 % Tween-20)
- Inkubation (15 min, horizontales Schütteln)
- Entfernung Blockierungslösung
- Detektion durch vollständiges Eintauchen in Aptamerverdünnung (Konzentration variierend in Weißweinpuffer)
- Inkubation (1 min, horizontales Schütteln)
- Entfernung Inkubationslösung
- Waschen der HPTLC-Platte durch vollständiges Eintauchen in Weißweinpuffer
- Inkubation (30 s, horizontales Schütteln)
- vollständige Trocknung
- fotografische Detektion (555 nm, Belichtungszeit 10 s)

6.2.3 Methoden im Kontext SELEX

6.2.3.1 FISHing

Wie bereits erwähnt (siehe 5.2.1.1), wird für den Teilschritt des FISHing ein magnetischer Separator eingesetzt, welcher kommerziell als automatisierbares Aufreinigungssystem vertrieben wird und über eine Software (BindIt, Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finnland) gesteuert werden kann. Die für die durchzuführenden Schritte erforderlichen Komponenten werden in sogenannten *DeepWell-Plates* (12 Reihen à 8 Vertiefungen) vorgelegt, welche im Gegensatz zu den häufig bei biochemischen Methoden angewendeten 96-Lochplatten durch deutlich größere Volumina (1000 µL im Gegensatz zu 300 µL) gekennzeichnet sind und somit eine größere Flexibilität ermöglichen. Durch den magnetischen Kamm können magnetisch aktive Komponenten zwischen den Vertiefungen transportiert und Mischvorgänge durch vertikale Bewegungen des Kamms induziert werden. Ähnliche Durchführungen wurden bereits in der Vergangenheit von anderen Arbeitsgruppen publiziert und stellen einen der Ausgangspunkte für die entwickelte Methode dar.(53,70,75) Zur Trennung von nicht-kovalenten Bindungen, wie sie im Rahmen der SELEX zwischen den Aptameren und dem jeweiligen *Target* zu erwarten sind, dient ein separater, beheizbarer Bereich (engl.: *elutionstrip*). Da die eingesetzten *DeepWell-Plates*, im Gegensatz zum magnetischen Kamm, auf einem drehbaren Teller positioniert sind, kann auch eine weitere Platte in den Prozess eingebunden werden und so die Anzahl der durchführbaren Schritte verdoppelt werden.

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten SELEX-Prozesse wurde für das FISHing in den ersten vier Runden das in Abbildung 70 dargestellte Layout der *DeepWell-Plates* eingesetzt. Zu Beginn wird durch den magnetischen Kamm der in Reihe B positionierte Schutzkamm aus Plastik aufgenommen. Dabei stellt der Schutzkamm eine chemisch inerte Hülle aus Plastik dar, um einen direkten Kontakt des magnetischen Kamms zur Lösung zu vermeiden. Der Kamm (magnetischer Kamm umhüllt vom Schutzkamm) wird danach in Reihe F bewegt, wo sich die vorgelegten *Gegen-Beads* durch magnetische Wechselwirkung auf dem Schutzkamm anlagern und in Reihe G bewegt werden können. Durch Entfernung des magnetischen Kamms und vertikale Bewegungen des Schutzkamms kommt es zur Verteilung der Partikel im Binde- & Waschpuffer in Reihe G, sodass gegebenenfalls vorhandene Verunreinigungen oder Produktionsrückstände entfernt werden. Die *Gegen-Beads* werden im Anschluss durch Eintauchen des magnetischen Kamms in den Schutzkamm und der daraus resultierenden Anlagerung auf dem Schutzkamm aufgenommen und in Reihe D auf die gleiche Art und Weise (Transport Partikel in Reihe D, Entfernung des magnetischen Kamms, Verteilung der magnetischen Partikel in der Lösung, Durchmischung durch vertikale Bewegungen des Schutzkamms) mit dem Aptamerpool inkubiert. Aptamere mit einer Affinität zum Ethanolamin, welches sowohl zur Blockierung verbliebener Bindungsstellen auf den *Target-Beads* als auch zur Herstellung der *Gegen-Beads* eingesetzt wurde (siehe 5.2.1.1 und 6.2.1.1), gehen eine nicht-kovalente Bindung mit diesen Molekülen ein und können im Anschluss mit den *Gegen-Beads* aus der Lösung entfernt und in Reihe H entsorgt werden. Durch diese Vorgehensweise wird der Aptamerpool verkleinert, sodass eine Selektion von Aptameren, welche neben einer Affinität zum *Target* auch eine Affinität zu Ethanolamin aufweisen, weniger wahrscheinlich wird. Um eine möglichst vollständige Eliminierung solcher Aptamere zu erreichen, wurde diese sogenannte *Gegen-SELEX* in jeder der ersten vier Runden durchgeführt.(52,57,69)

Nach der Gegen-SELEX werden die *Target-Beads* aus Reihe A in Reihe C gewaschen und anschließend mit dem Aptamerpool in Reihe D inkubiert. Wie bereits erwähnt, wird die Ausbildung von Sekundärstrukturen, welche die Affinität des Aptamers zum *Target* beeinflussen, in diesem Schritt durch den Selektionspuffer (hier: Weißweinpuffer) definiert. Nach Inkubation wird der an die magnetischen Partikel gebundene Aptamer-*Target*-Komplex in den Binde- & Waschpuffer in Reihe E überführt. Durch diesen Schritt soll erreicht werden, dass durch den gesamten SELEX-Prozess solche Aptamere selektiert werden, deren Bindung an das Zielmolekül eine gewisse Robustheit gegenüber äußeren Einflüssen aufweist. Würde auch dieser Schritt mit dem Selektionspuffer durchgeführt werden, so wäre es denkbar, dass durch den Gesamtprozess Aptamere identifiziert werden, deren Bindung zum

Target bei geringsten Änderungen der äußeren Bedingungen sofort gelöst werden würde. Dies wäre beispielsweise von Nachteil, wenn die Aptamere in einem Verfahren eingesetzt werden, welches die Inkubation mit unterschiedlichen Puffern erfordert. Ab Runde Fünf wird die oben beschriebene Gegen-SELEX nicht mehr durchgeführt, sodass die entsprechenden Reihen nicht mehr mit den dafür erforderlichen Lösungen belegt sind. Durch die Befüllung der Reihen F und G mit Binde- & Waschpuffer konnten deswegen in den folgenden Runden weitere Waschschrte durchgeführt werden (siehe auch 6.2.3.1). Durch diese zusätzlichen Waschschrte, welche in den späteren Runden auch mit größeren Volumina durchgeführt wurden, und schrittweise verkürzte Inkubationszeiten von Aptamerpool und *Target*, konnte im Laufe des SELEX-Prozesses die Stringenz, und damit der Selektionsdruck, immer weiter erhöht werden.

Den Abschluss bildet die Elution der aus dem vorgelegten Aptamerpool selektierten Aptamere in die oben genannte, separate Reihe I (*elutionsstrip*). Da die Bindung zwischen den Aptameren und dem *Target* auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen beruht und die DNA generell ein thermodynamisch stabiles Molekül darstellt, kann die Trennung durch die Einwirkung von Hitze erfolgen. Im Rahmen des in dieser Arbeit durchgeführten SELEX-Prozesses wurde nach dem Transfer der Aptamer-*Target*-Komplexe in Reihe I eine Temperatur von 70 °C angelegt. Diese Temperatur liegt zwar unter der beispielsweise bei der PCR zur Denaturierung von doppelsträngigen DNA-Molekülen eingesetzten Temperatur von 95 °C, da jedoch keine komplementären Basenpaare getrennt werden sollen, erscheint diese durch das Gerät definierte Maximaltemperatur ausreichend. Da die Elution in bidest. Wasser erfolgte, ist eine Aufreinigung nicht erforderlich und die Lösung kann direkt für die nachfolgende Amplifikation eingesetzt werden.

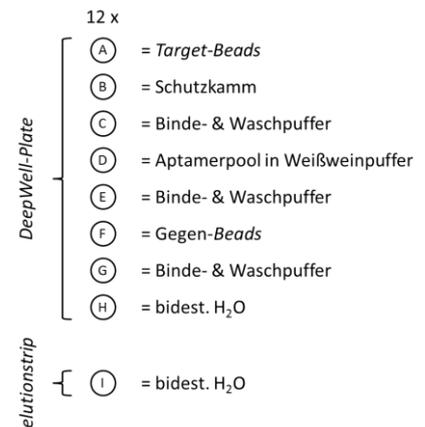


Abbildung 70: Belegung der *DeepWell-Plate* für das FISHing in Runde 1-4.

Runde 1

- Erhitzung Aptamerbibliothek auf 96 °C für 5 min, direkte Abkühlung auf 4 °C (*Refold*)
- Belegung *DeepWell-Plate* gemäß Tabelle 51.

Tabelle 51: Belegung *DeepWell-Plates* Runde 1.

Reihe	Lösung	Volumina
A	<i>Target-Bead</i> -Lösung	16 µL <i>Target-Beads</i> ($2,88 \cdot 10^{10}$ <i>Beads</i> /mL) nach 6.2.1.1 a), 184 µL Binde- & Waschlösung
B	Plastikschiebkamm zur Trennung von Lösung und magnetischem Separator	
C	Binde- & Waschlösung	200 µL Binde- & Waschlösung
D	Aptamerbibliothek	20 µL Aptamerbibliothek (2 µM), 980 µL Weißweinpuffer
E	Binde- & Waschlösung	200 µL Binde- & Waschlösung
F	<i>Gegen-Bead</i> -Lösung	16 µL <i>Gegen-Beads</i> ($2,88 \cdot 10^{10}$ <i>Beads</i> /mL) nach 6.2.1.1 b), 184 µL Binde- & Waschlösung
G	Binde- & Waschlösung	200 µL Binde- & Waschlösung
H	Wasser	200 µL bidest. H ₂ O
elutionstrip	Wasser	60 µL bidest. H ₂ O

- Aufnahme Plastikschiebkamm
- Eintauchen in Reihe F, Aktivierung Magnet, Überführung *Gegen-Beads* in Reihe G
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe G durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe G, Aktivierung Magnet, Überführung *Gegen-Beads* in Reihe D
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe D durch vertikale Bewegung Separator, Inkubation (30 min)
- Eintauchen in Reihe D, Aktivierung Magnet, Überführung *Gegen-Beads* in Reihe H, Deaktivierung Magnet
- Eintauchen in Reihe A, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe C
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe C durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe C, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe D
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe D durch vertikale Bewegung Separator, Inkubation (40 min)
- Eintauchen in Reihe D, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in Reihe E
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe E durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe E, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in *elutionstrip*
- Hitzeelution Aptamere (75 °C), Überführung *Target-Beads* in Reihe H, Deaktivierung Magnet
- Aufnahme Aptamerlösung aus *elutionstrip* und BEAMing nach 6.2.3.2 a)

Runde 2-4

- Erhitzung BEAMing-Eluats nach 6.2.3.2 a) aus vorhergehender Runde auf 96 °C für 5 min, direkte Abkühlung auf 4 °C (*Refold*)
- Belegung *DeepWell-Plate* gemäß Tabelle 51.

Tabelle 52: Belegung *DeepWell-Plates* Runde 2-4.

Reihe	Lösung	Volumina
A	<i>Target-Bead</i> -Lösung	16 µL <i>Target-Beads</i> ($2,88 \cdot 10^{10}$ <i>Beads</i> /mL) nach 6.2.1.1 a), 184 µL Binde- & Waschpuffer
B	Plastikschutzkamm zur Trennung von Lösung und magnetischem Separator	
C	Binde- & Waschpuffer	200 µL Binde- & Waschpuffer
D	Inkubationsmedium	50 µL BEAMing- <i>Eluat</i> aus vorhergehender Runde, 950 µL Weißweinpuffer
E	Binde- & Waschpuffer	200 µL Binde- & Waschpuffer
F	<i>Gegen-Bead</i> -Lösung	16 µL <i>Gegen-Beads</i> ($2,88 \cdot 10^{10}$ <i>Beads</i> /mL) nach 6.2.1.1 b), 184 µL Binde- & Waschpuffer
G	Binde- & Waschpuffer	200 µL Binde- & Waschpuffer
H	Wasser	200 µL bidest. H ₂ O
<i>elutionstrip</i>	Wasser	60 µL bidest. H ₂ O

- Aufnahme Plastikschutzkamm
- Eintauchen in Reihe F, Aktivierung Magnet, Überführung *Gegen-Beads* in Reihe G
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe G durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe G, Aktivierung Magnet, Überführung *Gegen-Beads* in Reihe D
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe D durch vertikale Bewegung Separator, Inkubation (30 min)
- Eintauchen in Reihe D, Aktivierung Magnet, Überführung *Gegen-Beads* in Reihe H, Deaktivierung Magnet
- Eintauchen in Reihe A, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe C
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe C durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe C, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe D
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe D durch vertikale Bewegung Separator, Inkubation (40 min)
- Eintauchen in Reihe D, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in Reihe E
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe E durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe E, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in *elutionstrip*

- Hitzeelution Aptamere (75 °C), Überführung *Target-Beads* in Reihe H, Deaktivierung Magnet
- Aufnahme Aptamerlösung aus *elutionstrip* und BEAMing nach 6.2.3.2 a)

Runde 5-6

- *Refold* des BEAMing-Eluats nach 6.2.3.2 a) aus vorhergehender Runde durch Erhitzung auf 96 °C für 5 min
- Direkte Abkühlung auf 4 °C
- Belegung *DeepWell-Plate* gemäß Tabelle 53.

Tabelle 53: Belegung *DeepWell-Plates* Runde 5-10.

Reihe	Lösung	Volumina
A	<i>Target-Bead</i> -Lösung	16 µL <i>Target-Beads</i> ($2,88 \cdot 10^{10}$ <i>Beads</i> /mL) nach 6.2.1.1 a), 184 µL Binde- & Waschlösung
B	Plastikschutzkamm zur Trennung von Lösung und magnetischem Separator	
C	Binde- & Waschlösung	200 µL Binde- & Waschlösung
D	Inkubationsmedium	50 µL BEAMing- <i>Eluat</i> aus vorhergehender Runde, 950 µL Weißweinpuffer
E	Binde- & Waschlösung	200 µL Binde- & Waschlösung
F	Binde- & Waschlösung	200 µL Binde- & Waschlösung
G	Binde- & Waschlösung	200 µL Binde- & Waschlösung
H	Wasser	200 µL bidest. H ₂ O
<i>elutionstrip</i>	Wasser	60 µL bidest. H ₂ O

- Aufnahme Plastikschutzkamm
- Eintauchen in Reihe A, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe C
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe C durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe C, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe D
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe D durch vertikale Bewegung Separator, Inkubation (40 min)
- Eintauchen in Reihe D, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in Reihe E
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe E durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe E, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in Reihe F
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe F durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe F, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in *elutionstrip*
- Hitzeelution Aptamere (75 °C), Überführung *Target-Beads* in Reihe H, Deaktivierung Magnet
- Aufnahme Aptamerlösung aus *elutionstrip* und BEAMing nach 6.2.3.2 a)

Runde 7

- *Refold* des BEAMing-Eluats nach 6.2.3.2 a) aus vorhergehender Runde durch Erhitzung auf 96 °C für 5 min
- Direkte Abkühlung auf 4 °C
- Belegung *DeepWell-Plate* gemäß Tabelle 53.
- Aufnahme Plastikschutzkamm
- Eintauchen in Reihe A, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe C
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe C durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe C, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe D
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe D durch vertikale Bewegung Separator, Inkubation (35 min)
- Eintauchen in Reihe D, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in Reihe E
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe E durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe E, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in Reihe F
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe F durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe F, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in *elutionstrip*
- Hitzeelution Aptamere (75 °C), Überführung *Target-Beads* in Reihe H, Deaktivierung Magnet
- Aufnahme Aptamerlösung aus *elutionstrip* und BEAMing nach 6.2.3.2 a)

Runde 8

- *Refold* des BEAMing-Eluats nach 6.2.3.2 a) aus vorhergehender Runde durch Erhitzung auf 96 °C für 5 min
- Direkte Abkühlung auf 4 °C
- Belegung *DeepWell-Plate* gemäß Tabelle 53.
- Aufnahme Plastikschutzkamm
- Eintauchen in Reihe A, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe C
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe C durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe C, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe D
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe D durch vertikale Bewegung Separator, Inkubation (30 min)
- Eintauchen in Reihe D, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in Reihe E
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe E durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe E, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in Reihe F
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe F durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe F, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in *elutionstrip*
- Hitzeelution Aptamere (75 °C), Überführung *Target-Beads* in Reihe H, Deaktivierung Magnet
- Aufnahme Aptamerlösung aus *elutionstrip* und BEAMing nach 6.2.3.2 a)

Runde 9

- *Refold* des BEAMing-Eluats nach 6.2.3.2 a) aus vorhergehender Runde durch Erhitzung auf 96 °C für 5 min
- Direkte Abkühlung auf 4 °C
- Belegung *DeepWell-Plate* gemäß Tabelle 53.
- Aufnahme Plastikschutzkamm
- Eintauchen in Reihe A, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe C
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe C durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe C, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe D
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe D durch vertikale Bewegung Separator, Inkubation (25 min)
- Eintauchen in Reihe D, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in Reihe E
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe E durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe E, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in Reihe F
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe F durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe F, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in G
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe G durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe G, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in *elutionstrip*
- Hitzeelution Aptamere (75 °C), Überführung *Target-Beads* in Reihe H, Deaktivierung Magnet
- Aufnahme Aptamerlösung aus *elutionstrip* und BEAMing nach 6.2.3.2 a)

Runde 10

- *Refold* des BEAMing-Eluats nach 6.2.3.2 a) aus vorhergehender Runde durch Erhitzung auf 96 °C für 5 min
- Direkte Abkühlung auf 4 °C
- Belegung *DeepWell-Plate* gemäß Tabelle 53.
- Aufnahme Plastikschutzkamm
- Eintauchen in Reihe A, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe C
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe C durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe C, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe D
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe D durch vertikale Bewegung Separator, Inkubation (20 min)
- Eintauchen in Reihe D, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in Reihe E
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe E durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe E, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in Reihe F
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe F durch vertikale Bewegung Separator

- Eintauchen in Reihe F, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in G
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe G durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe G, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in *elutionstrip*
- Hitzeelution Aptamere (75 °C), Überführung *Target-Beads* in Reihe H, Deaktivierung Magnet
- Aufnahme Aptamerlösung aus *elutionstrip* und BEAMing nach 6.2.3.2 a)

Runde 11

- *Refold* des BEAMing-Eluats nach 6.2.3.2 a) aus vorhergehender Runde durch Erhitzung auf 96 °C für 5 min
- Direkte Abkühlung auf 4 °C
- Belegung *DeepWell-Plate* gemäß Tabelle 54.

Tabelle 54: Belegung *DeepWell-Plates* Runde 11.

Reihe	Lösung	Volumina
A	<i>Target-Bead</i> -Lösung	16 µL <i>Target-Beads</i> ($2,88 \cdot 10^{10}$ <i>Beads</i> /mL) nach 6.2.1.1 a), 184 µL Binde- & Waschpuffer
B	Plastikschutzkamm zur Trennung von Lösung und magnetischem Separator	
C	Binde- & Waschpuffer	200 µL Binde- & Waschpuffer
D	Inkubationsmedium	50 µL BEAMing- <i>Eluat</i> aus vorhergehender Runde, 950 µL Weißweinpuffer
E	Binde- & Waschpuffer	400 µL Binde- & Waschpuffer
F	Binde- & Waschpuffer	400 µL Binde- & Waschpuffer
G	Binde- & Waschpuffer	400 µL Binde- & Waschpuffer
H	Wasser	200 µL bidest. H ₂ O
<i>elutionstrip</i>	Wasser	60 µL bidest. H ₂ O

- Aufnahme Plastikschutzkamm
- Eintauchen in Reihe A, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe C
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe C durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe C, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe D
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe D durch vertikale Bewegung Separator, Inkubation (15 min)
- Eintauchen in Reihe D, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in Reihe E
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe E durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe E, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in Reihe F

- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe F durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe F, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in G
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe G durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe G, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in *elutionstrip*
- Hitzeelution Aptamere (75 °C), Überführung *Target-Beads* in Reihe H, Deaktivierung Magnet
- Aufnahme Aptamerlösung aus *elutionstrip* und BEAMing nach 6.2.3.2 a)

Runde 12

- *Refold* des BEAMing-Eluats nach 6.2.3.2 a) aus vorhergehender Runde durch Erhitzung auf 96 °C für 5 min
- Direkte Abkühlung auf 4 °C
- Belegung *DeepWell-Plate* gemäß Tabelle 55.

Tabelle 55: Belegung *DeepWell-Plates* Runde 12.

Reihe	Lösung	Volumina
A	<i>Target-Bead</i> -Lösung	16 µL <i>Target-Beads</i> ($2,88 \cdot 10^{10}$ <i>Beads</i> /mL) nach 6.2.1.1 a), 184 µL Binde- & Waschpuffer
B	Plastikschutzkamm zur Trennung von Lösung und magnetischem Separator	
C	Binde- & Waschpuffer	200 µL Binde- & Waschpuffer
D	Inkubationsmedium	50 µL BEAMing- <i>Eluat</i> aus vorhergehender Runde, 950 µL Weißweinpuffer
E	Binde- & Waschpuffer	600 µL Binde- & Waschpuffer
F	Binde- & Waschpuffer	600 µL Binde- & Waschpuffer
G	Binde- & Waschpuffer	600 µL Binde- & Waschpuffer
H	Wasser	200 µL bidest. H ₂ O
<i>elutionstrip</i>	Wasser	60 µL bidest. H ₂ O

- Aufnahme Plastikschutzkamm
- Eintauchen in Reihe A, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe C
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe C durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe C, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe D
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe D durch vertikale Bewegung Separator, Inkubation (15 min)
- Eintauchen in Reihe D, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in Reihe E
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe E durch vertikale Bewegung Separator

- Eintauchen in Reihe E, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in Reihe F
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe F durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe F, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in G
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe G durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe G, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in *elutionstrip*
- Hitzeelution Aptamere (75 °C), Überführung *Target-Beads* in Reihe H, Deaktivierung Magnet
- Aufnahme Aptamerlösung aus *elutionstrip* und BEAMing nach 6.2.3.2 a)

Runde 13

- *Refold* des BEAMing-Eluats nach 6.2.3.2 a) aus vorhergehender Runde durch Erhitzung auf 96 °C für 5 min
- Direkte Abkühlung auf 4 °C
- Belegung *DeepWell-Plate* gemäß Tabelle 56.

Tabelle 56: Belegung *DeepWell-Plates* Runde 13.

Reihe	Lösung	Volumina
A	<i>Target-Bead</i> -Lösung	16 µL <i>Target-Beads</i> ($2,88 \cdot 10^{10}$ <i>Beads</i> /mL) nach 6.2.1.1 a), 184 µL Binde- & Waschlösung
B	Plastikschutzkamm zur Trennung von Lösung und magnetischem Separator	
C	Binde- & Waschlösung	200 µL Binde- & Waschlösung
D	Inkubationsmedium	50 µL BEAMing- <i>Eluat</i> aus vorhergehender Runde, 950 µL Weißweinschlamm
E	Binde- & Waschlösung	800 µL Binde- & Waschlösung
F	Binde- & Waschlösung	800 µL Binde- & Waschlösung
G	Binde- & Waschlösung	800 µL Binde- & Waschlösung
H	Wasser	200 µL bidest. H ₂ O
<i>elutionstrip</i>	Wasser	60 µL bidest. H ₂ O

- Aufnahme Plastikschutzkamm
- Eintauchen in Reihe A, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe C
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe C durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe C, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe D
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe D durch vertikale Bewegung Separator, Inkubation (15 min)
- Eintauchen in Reihe D, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in Reihe E

- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe E durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe E, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in Reihe F
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe F durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe F, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in G
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe G durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe G, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in *elutionstrip*
- Hitzeelution Aptamere (75 °C), Überführung *Target-Beads* in Reihe H, Deaktivierung Magnet
- Aufnahme Aptamerlösung aus *elutionstrip* und BEAMing nach 6.2.3.2 a)

Runde 14-15

- *Refold* des BEAMing-Eluats nach 6.2.3.2 a) aus vorhergehender Runde durch Erhitzung auf 96 °C für 5 min
- Direkte Abkühlung auf 4 °C
- Belegung *DeepWell-Plate* gemäß Tabelle 57.

Tabelle 57: Belegung *DeepWell-Plates* Runde 14-15.

Reihe	Lösung	Volumina
A	<i>Target-Bead</i> -Lösung	16 µL <i>Target-Beads</i> ($2,88 \cdot 10^{10}$ <i>Beads</i> /mL) nach 6.2.1.1 a), 184 µL Binde- & Waschpuffer
B	Plastikschutzkamm zur Trennung von Lösung und magnetischem Separator	
C	Binde- & Waschpuffer	200 µL Binde- & Waschpuffer
D	Inkubationsmedium	50 µL BEAMing- <i>Eluat</i> aus vorhergehender Runde, 950 µL Weißweinpuffer
E	Binde- & Waschpuffer	1000 µL Binde- & Waschpuffer
F	Binde- & Waschpuffer	1000 µL Binde- & Waschpuffer
G	Binde- & Waschpuffer	1000 µL Binde- & Waschpuffer
H	Wasser	200 µL bidest. H ₂ O
<i>elutionstrip</i>	Wasser	60 µL bidest. H ₂ O

- Aufnahme Plastikschutzkamm
- Eintauchen in Reihe A, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe C
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe C durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe C, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* in Reihe D
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe D durch vertikale Bewegung Separator, Inkubation (15 min)

- Eintauchen in Reihe D, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in Reihe E
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe E durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe E, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in Reihe F
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe F durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe F, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in G
- Deaktivierung Magnet, Durchmischung Reihe G durch vertikale Bewegung Separator
- Eintauchen in Reihe G, Aktivierung Magnet, Überführung *Target-Beads* und anhaftende Aptamere in *elutionstrip*
- Hitzeelution Aptamere (75 °C), Überführung *Target-Beads* in Reihe H, Deaktivierung Magnet
- Aufnahme Aptamerlösung aus *elutionstrip* und BEAMing nach 6.2.3.2 a)

6.2.3.2 BEAMing

Da hinsichtlich der Größe oder Ladung keine Unterschiede zwischen Aptamer und Komplementärstrang vorhanden sind, können die durch eine klassische PCR (siehe 6.2.2.1) generierten Doppelstränge nicht durch chromatografische Methoden voneinander separiert werden. Eine Möglichkeit ist die Nutzung von modifizierten Primern, wodurch über zusätzliche Schritte die einzelsträngige DNA isoliert werden kann. So kann beispielsweise durch den Einsatz eines modifizierten Primers ein größeres Molekül in einen der beiden Stränge eingeführt werden, welches dann im Rahmen einer denaturierenden Gelelektrophorese eine Trennung im elektrischen Feld bedingt. Durch anschließende Extraktion und gegebenenfalls Aufreinigung kann die einzelsträngige DNA isoliert werden. Auch die Einführung von solchen Gruppen, welche eine spezifische Wechselwirkung mit anderen Gruppen eingehen, kann für die Strangtrennung genutzt werden. So wird im Rahmen des SELEX-Prozesses häufig ein biotinylierter *Reverse*-Primer eingesetzt, sodass der Gegenstrang nach Abschluss der Amplifikation ebenfalls biotinyliert vorliegt und nach einer Denaturierung des Doppelstranges unter Verwendung von mit Streptavidin belegten magnetischen Partikeln von den Aptameren separiert werden kann (siehe auch 5.2.1.3 und 6.2.2.1). Die Nutzung von 5'-dephosphorylierten *Forward*-Primern und der Einsatz der Lambda-Exonuklease zum Verdau des 5'-phosphorylierten Gegenstranges kann ebenfalls zur Isolierung der einzelsträngigen Aptamere genutzt werden.(109) Ohne den Einsatz von modifizierten Primern kann eine Synthese von einzelsträngiger DNA auch durch die sogenannte asymmetrische PCR erreicht werden. Bei dieser Technik wird einer der beiden Primer in größerer Konzentration dem Reaktionsansatz zugefügt, sodass der Strang in welchen dieser Primer inkorporiert wird, in entsprechend größerem Maße durch die Polymerase synthetisiert wird. Da durch diese Vorgehensweise jedoch auch doppelsträngige DNA gebildet wird, geht eine Aufreinigung mit entsprechenden Verlusten einher.(109)

Die Bildung von Nebenprodukten, welche insbesondere bei hohen Templatdiversitäten zu beobachten ist, stellt ein weiteres Argument gegen den Einsatz der klassischen PCR innerhalb des SELEX-Prozesses dar. Verkürzte Nebenprodukte können beispielsweise durch solche Sekundärstrukturen induziert werden, welche zu einer Ablösung der Polymerase führen (Stamm-Schleife-Strukturen), sodass kein vollständiger Komplementärstrang und im nächsten Zyklus auch kein vollständiges Aptamer gebildet werden kann.(31) Bei der hohen Diversität des Aptamerpools ist es ebenso denkbar, dass die Primer bei einzelnen Aptameren nicht nur an die dafür vorgesehenen, terminalen Bereiche binden, sondern auch innerhalb des randomisierten Bereichs Bindungen auftreten und so nur Teile des Aptamers vervielfältigt werden. Da diese verkürzten Fragmente im Rahmen der PCR bevorzugt vervielfältigt werden, kann es infolgedessen zu einer

Diskriminierung bei der Amplifikation vollständiger Aptamere kommen, da beispielsweise nach Anreicherung der verkürzten Aptamere die Bindung der Primer an diese auch statistisch wahrscheinlicher wird.(31,111) Sekundärstrukturen oder Bindungen unterschiedlicher Aptamere aneinander können außerdem die Anlagerung der Primer inhibieren oder die Amplifikationsgeschwindigkeit soweit herabsetzen, dass einzelne Aptamere nur in sehr geringem Maße amplifiziert werden. Die Bindung von Aptameren aneinander kann auch zur Bildung von verlängerten Nebenprodukten führen.(110) Ursächlich hierfür ist die DNA-Polymerase, welche nicht in der Lage ist *de novo* einen komplementären Gegenstrang zu synthetisieren, weswegen die Zugabe von entsprechenden Primern, welche dann im Laufe der Reaktion verlängert werden, zum Reaktionsansatz erforderlich ist. Kommt es infolge komplementärer Bereiche in zwei unterschiedlichen Aptameren zur Ausbildung eines doppelsträngigen Bereiches, so kann anstatt des Primers auch eines der Aptamere in 5'-3'-Richtung verlängert werden.(112)

Sowohl für die Herausforderung der Strangtrennung zur Isolierung der einzelsträngigen Aptamere als auch zur Verringerung der lokalen Templatdiversität wurde das von Diehl et al. etablierte BEAMing den Anforderungen innerhalb des SELEX-Prozesses angepasst.(113) Die Isolierung der amplifizierten Sequenzen erfolgt bei der publizierten Methode durch die Verwendung von biotinylierten *Reverse*-Primern und magnetischen Partikeln auf denen Streptavidin immobilisiert ist. Durch die hochspezifische und hochaffine Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin sind die Amplifikate auf den magnetischen Partikeln immobilisiert und können so aus der Lösung isoliert werden. In einer vorangegangenen Arbeit wurde der Prozess des BEAMing dahingehend optimiert, dass die Nutzung der Streptavidin-Partikel durch eine direkte, kovalente Immobilisierung des *Reverse*-Primers ersetzt wurde (siehe Abbildung 71). Umfangreiche Optimierungen und Untersuchungen erfolgten beim verwendeten Blockierungsreagenz (BSA; engl.: *bovine serum albumin*), sowie bei den im Rahmen der kovalenten Immobilisierung genutzten funktionellen Gruppen und beim Einsatz eines *Spacers* zwischen Primer und *Bead*, um sterische Hinderungen zu vermeiden. Außerdem wurde festgestellt, dass eine initiale Beschleunigung der Amplifikation durch eine geringe Menge an ungebundenem *Reverse*-Primer für die Gesamtausbeute von Vorteil ist.(59)

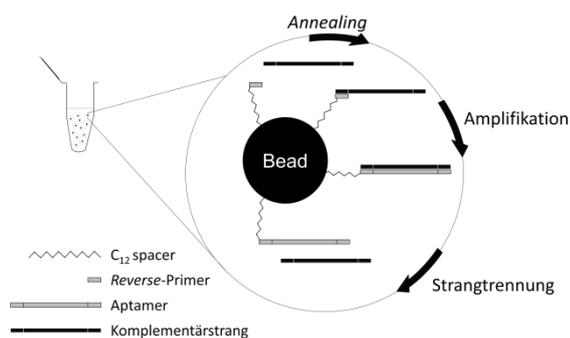


Abbildung 71: Schematischer Ablauf BEAMing.

Dargestellt ist der Ablauf des im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten BEAMings. Nach der Anlagerung (*Annealing*) der Aptamere an den immobilisierten *Reverse*-Primer kommt es zu Amplifikation und Bildung eines doppelsträngigen Produktes. Durch Hitzeeinwirkung wird eine Strangtrennung induziert, der Komplementärstrang verbleibt am magnetischen Partikel. Abbildung modifiziert nach (60).

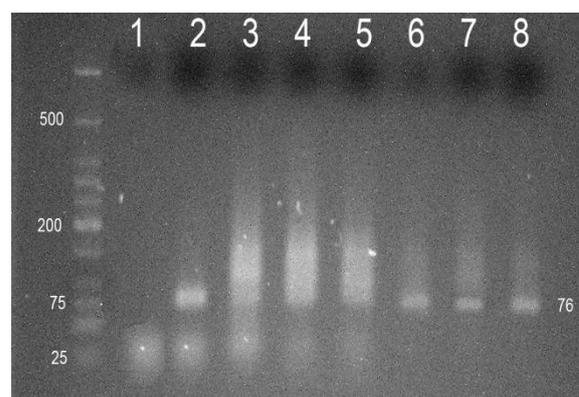


Abbildung 72: Vergleich zwischen konventioneller PCR und BEAMing.

Agarosegel der Produkte von konventioneller PCR und BEAMing (nach konventioneller PCR). 1 = Blindwert; 2 = Positivkontrolle nachgeschalteter konventioneller PCR; 3, 4, 5 = Produkte konventionelle PCR (200, 20, 2 amol Templat); 6, 7, 8 = Produkte BEAMing (200, 20, 2 amol Templat). Abbildung entnommen aus (60).

Der Unterschied in der Menge an Nebenprodukten durch eine Amplifikation mittels konventioneller PCR im Vergleich mit dem BEAMing ist in Abbildung 72 dargestellt. Nach der Amplifikation wurde hierbei eine weitere, konventionelle PCR nachgeschaltet um so wieder doppelsträngige Produkte, welche mittels Ethidiumbromidinterkalation visualisiert werden können, zu generieren. Von entscheidender Bedeutung ist dabei die Herstellung einer Emulsion aus einer öligen Phase und der die PCR-Komponenten enthaltenden wässrigen Phase, sodass eine Vielzahl an voneinander unabhängigen Reaktionsräumen geschaffen werden, die einzelnen Sequenzen nicht mehr miteinander interagieren können und keine Sequenzen aufgrund einer verringerten Amplifikationsgeschwindigkeit gegenüber anderen Sequenzen bei der Amplifikation unterrepräsentiert sind.

Durchführung:

Festphasenbasierte Emulsions-PCR für a) Amplifikation Aptamerpools im Kontext SELEX
b) Modifizierung und Isolierung Aptamere

- Präparation wässrige Phase nach Tabelle 58 in der dort angegebenen Reihenfolge. Das Volumen des Templats wird variiert und das gegebenenfalls fehlende Volumen durch Wasser ergänzt.

Tabelle 58: Zusammensetzung wässrige Phase BEAMing.

Komponente	Volumen	Ausgangs-konzentration	finale Konzentration
DreamTaq-Puffer	15 µL	10-fach	1-fach
dNTPs	6 µL	100 µM (je 25 µM)	4 µM
<i>Reverse-Primer</i>	1 µL	2,5 µM	16 nM
a) <i>Forward-Primer</i> b) <i>modifizierte Forward-Primer</i>	4 µL	100 µM	2,66 µM
magnetische Partikel mit <i>Reverse-Primer</i> (nach 6.2.1.1 c)	6 µL	10 mg/mL	0,4 mg/mL
Wasser	79-108 µL		
DreamTaq-Polymerase	9 µL	0,5 U	0,03 U
Templat	1-30 µL	variierend	variierend

- Ergänzung organische Phase nach Tabelle 59 in der dort angegebenen Reihenfolge.

Tabelle 59: Zusammensetzung organische Phase BEAMing.

Komponente	Volumen
ABIL WE 09	46 µL
Mineralöl	132 µL
Tegosoft DEC	438 µL

- Aufbau Emulsion durch Vortexen bei maximaler Geschwindigkeit (5 min)
- gleichmäßige Verteilung (ca. 80 µL) auf Reaktionsgefäße

- Durchführung PCR mit dem in Tabelle 47 angegebenen Temperaturprogramm und einer Zyklenzahl von 30
- Vereinigung der Emulsion in einem Reaktionsgefäß
- Auflösung der Emulsion durch Zugabe von 1,5 mL Isobutanol (Temperatur -21 °C) und kurze Durchmischung
- Zentrifugation (5 min, 16000 g)
- magnetische Separation und möglichst vollständige Entfernung der Flüssigkeiten
- Aufnahme *Beads* in 80 µL bidest. H₂O
- Strangtrennung durch Hitzedenaturierung (Wasserbad, 96 °C, 10 min)
- unmittelbar angeschlossene Zentrifugation (10 s, 16000 g) und magnetische Separation
- unmittelbar angeschlossene Isolation Überstand (=BEAMing-Eluat)

6.2.3.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde extern durch die GATC Biotech GmbH unter Verwendung des 3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) durchgeführt, welcher auf den Prinzipien des Sanger-Verfahrens basiert.(115,116) In diesem Verfahren werden neben den für eine durch DNA-Polymerasen katalysierte Verlängerung erforderlichen Desoxynukleotiden (dNTPs), Didesoxynukleotide (ddNTPs) der Reaktionsmischung zugesetzt. Durch die fehlende 3'-Hydroxygruppe an der zentralen Ribose kann eine Verlängerung des komplementären Stranges nicht erfolgen, sodass Fragmente unterschiedlicher Länge gebildet werden. Durch Isotopen- oder Fluoreszenzmarkierungen der ddNTPs und eine gelelektrophoretische Trennung kann im Anschluss die jeweilige Sequenz identifiziert werden.(31)

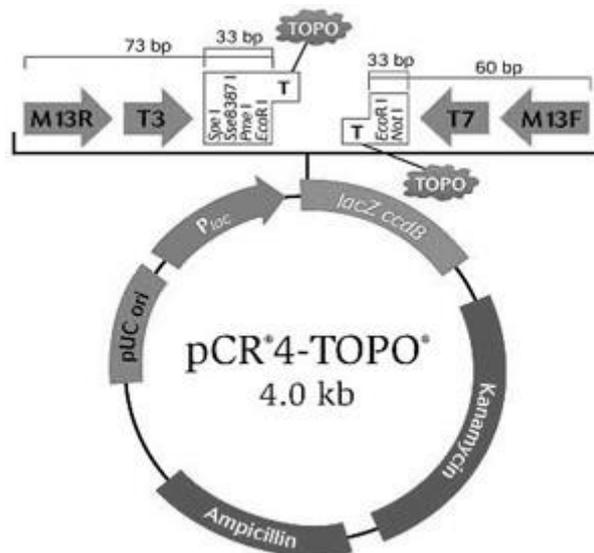


Abbildung 73: pCR™ 4-TOPO® TA Vektor.
Aufbau des verwendeten Vektors, entnommen aus (119).

Für die Sequenzierung waren in der vorliegenden Arbeit mehrere Schritte erforderlich, in diesem Kontext wurden zwei unterschiedlichen Kits eingesetzt, welche wiederum vereinzelt Lösungen unbekannter Zusammensetzung enthalten. Zunächst wurde im Anschluss an den Abschluss der finalen SELEX-Runde das erhaltene BEAMing-Eluat einer PCR nach 6.2.2.1 (4-facher Ansatz) unterworfen, um wieder doppelsträngige Produkte (= *insert*-DNA) zu generieren. Wie bereits unter 5.2.1.3 beschrieben ist dies für die Ligation in die eingesetzten Plasmide erforderlich.

Klonierung & Kultivierung

Für die Klonierung wurde das *TOPO TA Cloning Kit* (Salzlösung, PCR 4-TOPO-Vektor, bidest. H₂O) eingesetzt.

- Vermischung von 1 µL Salzlösung, 1 µL PCR 4-TOPO-Vektor, 1 µL *insert*-DNA, 3 µL bidest. H₂O und Herstellung des Reaktionsansatzes
- Inkubation (30 min, Raumtemperatur), Inkubation (5 min, 4 °C)
- Mischung 50 µL chemisch kompetente Zellen (*E. coli*, Stamm XL-1) + 3 µL Reaktionsansatz

- Inkubation (20 min, 4 °C)
- Hitzeschock im Wasserbad (30 s, 42 °C), Zugabe 250 µL SOC (engl.: *super optimal broth*)-Medium unter Eiskühlung
- Inkubation (2 h, 37 °C)
- Ausplattierung von 10, 50 und 90 µL auf LB-Amp-Agar
- Kultivierung (24 h, 37 °C)
- Vereinzeln (Aufteilung eines LB-Amp-Agar in 6 Sektoren und Ausplattierung einzelner Kolonien in diesem Bereich)
- Kultivierung (24 h, 37 °C)

Kolonie-PCR & Plasmidisolierung

Für die Kontrolle bezüglich des Erfolges der Klonierung und Kultivierung wurden unterschiedliche Kolonie-PCRs durchgeführt. Dafür wurde der in Tabelle 46 angegebene Mastermix unter Verwendung des M13-*Forward*- und M13-*Reverse*-Primers (anstelle der im übrigen Verlauf der Arbeit eingesetzten *Forward*- und *Reverse*-Primer) vorbereitet, mit einer sterilen Pipettenspitze eine einzelne Kolonie von der Agarplatte aufgenommen und diese durch mechanische Reibung an der Gefäßwand aufgeschlossen. Hierbei sollte beachtet werden, dass einerseits die Menge an aufgenommenem Zellmaterial nicht zu groß ist, andererseits sollte nach der Verteilung in der Flüssigkeit eine Trübung oder einzelne Fragmente erkennbar sein. Im Anschluss wurde das in Tabelle 47 angegebene Temperaturprogramm (20 Zyklen) durchgeführt und die unter 6.2.2.1 beschriebene AGE und Detektion mit Ethidiumbromid durchgeführt. Bei positiven Befunden (Amplifikat mit einer Größe von ungefähr 240 bp) wurde im Anschluss analog eine entsprechende Kolonie-PCR unter Verwendung der im übrigen Verlauf der Arbeit eingesetzten *Forward*- und *Reverse*-Primer durchgeführt. Nur die Kolonien, welche auch hier das zu erwartende Fragment mit einer Größe von ungefähr 76 bp aufwiesen, wurden im Anschluss folgendermaßen kultiviert:

- Isolierung 1 cm³ LB-Amp-Agar mit anhaftendem Zellmaterial eines Sektors
- Überführung in 50 mL LB-Medium
- Kultivierung (24 h, 37 °C)
- Bei Trübung Zentrifugation (20 min, 1500 g, 4 °C)
- Verwerfen des Überstandes, Resuspension Zellpellet in 1,5 mL NaCl (0,09 % (w/v))
- Zentrifugation (20 min, 1500 g, 4 °C)
- Verwerfen des Überstandes, Nutzung Zellpellet für Plasmidisolierung

Für die Plasmidisolierung wurde das *Kit QIAprep Spin Miniprep* (Puffer P1, P2, P3, PB, PE, QIA Prep Säule) eingesetzt.

- Resuspension Zellpellet in 250 µL Puffer-P1
- Zusatz 250 µL Puffer P2, Mischung
- Zusatz 350 µL Puffer P3, Schwenken, Zentrifugation (10 min, 10000 g)
- Überführung Überstand auf QIA Prep Säule, Zentrifugation (1 min, 10000 g)
- Waschen Säule mit 500 µL Puffer PB, Zentrifugation (1 min, 10000 g)
- Waschen Säule mit 750 µL Puffer PE, Zentrifugation (1 min, 10000 g)
- Trockenzentrifugation (1 min, 10000 g)
- Zugabe 50 µL bidest. H₂O, Inkubation (1 min), Zentrifugation (1 min, 10000 g)

Im Anschluss an die Plasmidisolierung wurde der Erfolg durch eine PCR und AGE nach 6.2.2.1 kontrolliert. Bei Anwesenheit eines Fragments mit einer Größe von ungefähr 76 bp wurde die Konzentration mittels NanoDrop bestimmt. Dafür wird ein Aliquot (1 µL) auf den Messbereich des NanoDrops gegeben, die Messvorrichtung geschlossen und die Absorption bei der für Nukleinsäuren spezifischen Wellenlänge von 260 nm aufgenommen. Vor und nach der Messung wird durch die Aufnahme eines Blindwertes der Einfluss des Mediums berücksichtigt und Reste vorangegangener Messungen durch Reinigung mit einem Papiertuch entfernt. Durch diesen Wert kann durch die Software (ohne Kalibration) die Konzentration abgeschätzt werden und im Anschluss die Konzentration auf einen Wert zwischen 30 und 100 ng/µL eingestellt werden. Die Proben wurden im Anschluss durch GATC Biotech unter Verwendung des auf dem Plasmid vorhandenen M13-Forward-Primer sequenziert (*SurpremeRun*).

6.2.4 SPR

Alle SPR-Experimente wurden unter Verwendung von Puffern mit einem Zusatz von 0,05 % Tween-20 und einer Fließgeschwindigkeit von 25 µL/min durchgeführt. Die hier dargestellten Vorgehensweise stellen einen allgemeinen Überblick dar, zu weiteren Details hinsichtlich der immobilisierten Bindungspartner sei auf die jeweiligen Kapitel (5.1.1, 5.1.2, 5.2.2.2.2, 5.2.3.1) verwiesen.

Immobilisierung

- 4x Spülen des Systems mit PBS
- softwaregestützte Bestimmung des SPR-Winkels (Variation Winkel des eingestrahltten Lichtes und Aufnahme des reflektierten Lichts)
- Entfernung von Produktionsrückständen (engl.: *Precondition*) von der Sensoroberfläche durch das in Tabelle 60 angegebene Programm

Tabelle 60: Parameter Precondition .

injizierte Lösung	adressierte spots	Volumen [µL]	Dissoziationszeit [s]
Precondition I-Puffer	1, 2, 3, 4	15	1
Precondition II-Puffer	1, 2, 3, 4	15	1
Precondition I-Puffer	1, 2	15	1
Precondition II-Puffer	1, 2	15	1
Precondition I-Puffer	3, 4	15	1
Precondition II-Puffer	3, 4	15	1

Obwohl die SPR-Sensorchips kommerziell hergestellt werden und auch die anderen Parameter (Raumtemperatur, Gerät, Laufpuffer, Aktivierungslösung) möglichst konstant gehalten wurden, sind bei jeder Immobilisierung geringfügige Schwankungen hinsichtlich der Menge an kovalent gebundenem Protein zu erkennen gewesen. Da auf jedem Sensorchip vier separat adressierbare spots verfügbar sind, wurden im Rahmen der Sensorchipherstellung zur Aptamer- und Antikörpercharakterisierung stets unterschiedliche Volumina der Proteinlösungen eingesetzt. Durch Vergleich des resultierenden SPR-Winkels vor und nach der Immobilisierung (1 RU entspricht laut Karlsson et al. einer Menge von 1,1 pg/mm²) ist dann möglich vergleichbare Immobilisierungslevel für die zusammenfassende Berechnung des K_D-Wertes zu nutzen.(149) In Tabelle 61 und Tabelle 62 sind beispielhaft die Schritte zur Herstellung von unterschiedlichen Sensorchips dargestellt.

Tabelle 61: beispielhafte Parameter Herstellung Lysozymsensorchip.

injizierte Lösung	adressierte spots	Volumen [μL]	Dissoziationszeit [s]
Aktivierungslösung (100 mM EDC, 400 mM NHS)	1, 2, 3, 4	200	1
Verdünnung 1 Lysozym (0,1 mg/mL)	2	15	1
Verdünnung 2 Lysozym (0,1 mg/mL)	3	25	1
Verdünnung 3 Lysozym (0,1 mg/mL)	4	40	1
Ethanolamin (1 M)	1, 2, 3, 4	200	1

Tabelle 62: beispielhafte Parameter Herstellung aptamerbasierter Biosensorchip.

injizierte Lösung	adressierte spots	Volumen [μL]	Dissoziationszeit [s]
Aktivierungslösung (100 mM EDC, 400 mM NHS)	1, 2, 3, 4	200	1
Verdünnung Streptavidin (50 μg/mL)	1, 2, 3, 4	100	1
Verdünnung BEAMing-Eluat 5'-NH ₂ -Aptamer 619	3	200	1
Verdünnung BEAMing-Eluat 5'-NH ₂ -Aptamer 619	4	200	1
Verdünnung Biotin (0,5 mg/mL)	1	200	1
Ethanolamin (1 M)	1, 2, 3, 4	200	1

Die wie beschrieben hergestellten Sensorchips können durch Benetzung der Sensoroberfläche und Lagerung in der mit Parafilm umschlossenen Transportbox mehrere Wochen gelagert und wieder genutzt werden. Der zu Beginn festgestellte SPR-Winkel wird auch für weitere Messungen genutzt.

Messungen

In Abhängigkeit der durchzuführenden Messungen wurde gegebenenfalls der entsprechende Sensorchip im SPR installiert und der entsprechende Laufpuffer durch Spülen (4 x) im System etabliert. Die zu untersuchenden Lösungen wurden gegebenenfalls durch Verdünnungen mit dem Laufpuffer hergestellt und bei der Injektion von Aptameren durch einen *Refold* (Erhitzung auf 96 °C für 5 min, direkte Abkühlung auf 4 °C) vorbereitet. Vor der ersten Injektion wurde die eingesetzte Regenerationsprozedur drei Mal durchgeführt, um für alle Messungen vergleichbare Bedingungen zu schaffen. Die entsprechenden Bedingungen für die jeweiligen Messungen sind im Anhang angegeben.

Tabelle 63: beispielhafte Durchführung Antikörpercharakterisierung.

injizierte Lösung	adressierte spots	Volumen [μL]	Dissoziationszeit [s]
Laufpuffer	1, 2, 3, 4	200	300
Regenerationslösung (H ₃ PO ₄ /SDS)	1, 2, 3, 4	25	1
Spüllösung (PBS)	1, 2, 3, 4	25	1
Antikörperverdünnung	1, 2, 3, 4	200	300
Regenerationslösung (H ₃ PO ₄ /SDS)	1, 2, 3, 4	25	1
Spüllösung (PBS)	1, 2, 3, 4	25	1
Antikörperverdünnung	1, 2, 3, 4	200	300
Regenerationslösung (H ₃ PO ₄ /SDS)	1, 2, 3, 4	25	1
Spüllösung (PBS)	1, 2, 3, 4	25	1
Laufpuffer	1, 2, 3, 4	200	300
Regenerationslösung (H ₃ PO ₄ /SDS)	1, 2, 3, 4	25	1
Spüllösung (PBS)	1, 2, 3, 4	25	1

6.2.5 Formeln

Im Folgenden sind die in der vorliegenden Arbeit genutzten Formeln angegeben, welche nicht bereits an anderer Stelle definiert wurden.

Mittelwert:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (8)$$

x_i = Messwerte, n = Anzahl der Messwerte, \bar{x} = Mittelwert der Messwerte

Standardabweichung:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (9)$$

x_i = Messwerte, n = Anzahl der Messwerte, \bar{x} = Mittelwert der Messwerte, σ = Standardabweichung

Varianz:

$$\sigma^2 = \frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2 \quad (10)$$

x_i = Messwerte, n = Anzahl der Messwerte, \bar{x} = Mittelwert der Messwerte, σ^2 = Varianz

Wiederfindung:

$$\text{Wiederfindung} = \frac{\text{vermessener Wert}}{\text{theoretischer Wert}} \times 100\% \quad (11)$$

relativer Fehler 4-Parameter-Gleichung:

$$r = \frac{s}{x \cdot m} \quad (12)$$

$$\text{mit } m = \frac{B(D-A)}{C} \cdot \left(\frac{C}{x}\right)^{1-B} \cdot \left(1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B\right)^{-2} \quad (13)$$

x = Messwert, s = Standardabweichung, $A/B/C/D$ = Parameter Gleichung, m = Steigung, r = relativer Fehler

Ausreißertest nach Grubbs

$$G = \frac{\text{Maximum } |x_i - \bar{x}|}{s} \quad (14)$$

x_i = Messwerte, s = Standardabweichung, \bar{x} = Mittelwert der Messwerte

F-Test

Um bei zwei verfügbaren Regressionsmodellen festzustellen, welches der beiden für die vorliegenden Daten das geeignetere ist, wurde der F-Test angewendet. Grundlegende Annahme der Überlegungen ist, dass wenn zwei verschachtelte Regressionsmodelle beide einen Zusammenhang zwischen vermessenen Werten abbilden, jenes Modell mit einer größeren Anzahl an Parametern das zu bevorzugende darstellt. Um festzustellen, ob es sich hierbei um ein signifikant besseres Modell handelt, werden die Residuenquadratsummen (Abweichung der beobachteten Werte von den Modellwerten) der beiden Regressionsmodelle herangezogen und unter Berücksichtigung der Anzahl der Messwerte sowie Parameter mit der F-Verteilung verglichen.

$$F = \frac{\frac{RSS_1 - RSS_2}{p_2 - p_1}}{\frac{RSS_2}{n - p_2}} \quad (15)$$

RSS_i = Residuenquadratsumme, p_i = Anzahl Parameter in Gleichung i , n = Anzahl der Messwerte

Residuenquadratsumme

$$RSS = \frac{1}{n-1} \sum (y_i - f(x_1, \dots, x_i))^2 \quad (16)$$

y_i = Messwerte, n = Anzahl der Messwerte, $f(x_1, \dots, x_i)$ = berechnete Regressionsfunktion

Da diese Methode nicht anwendbar ist wenn die beiden zu untersuchenden Regressionsmodelle nicht miteinander verschachtelt sind, also wenn das Modell mit einer größeren Anzahl an Parametern nicht durch Elimination von Parametern auf das andere zurückgeführt werden kann (dies ist bei der Hill-Funktion und der Michaelis-Menten-Gleichung durch das Setzen von $n=1$ möglich, siehe 3.4.2), ist eine alternative Vorgehensweise erforderlich. Für diesen Zweck wurde in der vorliegenden Arbeit auf das sogenannte Akaike Informationskriterium (AIC, engl.: *Akaike's information criterion*) zurückgegriffen. Da die Parameter der zu untersuchenden Regressionen durch Iteration (mittels der Software OriginPro 9.0G) ermittelt wurden, kann nach Berechnung der resultierenden Varianzen auf folgende Definition zurückgegriffen werden:

$$AIC = n \log \sigma^2 + 2p$$

p = Anzahl Parameter, n = Anzahl der Messwerte, σ^2 = Varianz, AIC = *Akaike's information criterion*

Es ergibt sich, dass die Gleichung welche eine geringere Varianz (unter Berücksichtigung der Anzahl an Parametern) und somit den geringeren AIC-Wert aufweist, zu bevorzugen ist.

Der Vergleich zwischen unterschiedlichen Regressionsmodellen wurde stets unter Verwendung der Software OriginPro 9.0G durchgeführt.

7 Literatur

1. Lieberei, R., Reisdorff, C., Franke, W., 2007. *Nutzpflanzenkunde*. Stuttgart/New York: Georg Thieme-Verlag.
2. Terral, J.F., Tabard, E., Bouby, L., Ivorra, S., Pastor, T., Figueiral, I., Picq, S., Chevance, J.B., Jung, C., Fabre, L. and Tardy, C., 2010. Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Annals of botany*, 105(3), pp.443-455.
3. Verordnung (EU) Nr. 1308/2013 des europäischen Parlaments und des Rates vom 17. Dezember 2013 über eine gemeinsame Marktorganisation für landwirtschaftliche Erzeugnisse und zur Aufhebung der Verordnungen (EWG) Nr. 922/72, (EWG) Nr. 234/79, (EG) Nr. 1037/2001 und (EG) Nr. 1234/2007 des Rates in der Fassung vom 31.07.2016.
4. Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P., 2007. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag.
5. Weingesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Januar 2011 (BGBl. I S. 66), das zuletzt durch Artikel 3 des Gesetzes vom 16. Januar 2016 (BGBl. I S. 52) geändert worden ist.
6. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. Datenbanken und Statistiken OIV. Online unter: <http://www.oiv.int/de/datenbank-und-statistiken-vornehmen/statistiken> (10.10.2016).
7. Verordnung (EG) Nr. 607/2009 der Kommission vom 14. Juli 2009 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 479/2008 des Rates hinsichtlich der geschützten Ursprungsbezeichnungen und geografischen Angaben, der traditionellen Begriffe sowie der Kennzeichnung und Aufmachung bestimmter Weinbauerzeugnisse in der Fassung vom 01.07.2013.
8. Verordnung (EG) Nr. 606/2009 der Kommission vom 10. Juli 2009 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 479/2008 des Rates hinsichtlich der Weinbauerzeugniskategorien, der önologischen Verfahren und der diesbezüglichen Einschränkungen in der Fassung vom 25.05.2016.
9. Verordnung (EG) Nr. 555/2008 der Kommission vom 27. Juni 2008 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 479/2008 des Rates über die gemeinsame Marktorganisation für Wein hinsichtlich der Stützungsprogramme, des Handels mit Drittländern, des Produktionspotenzials und der Kontrollen im Weinsektor vom 18.07.2009.
10. Weinverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 21. April 2009 (BGBl. I S. 827), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 4. Januar 2016 (BGBl. I S. 2) geändert worden ist.
11. Baltes, W., 2007. *Lebensmittelchemie*. Berlin/Heidelberg/New York: Springer-Verlag.
12. Wagner, K., Mahlmeister, K., 2006. *Wein* in Frede, W. (Hg.) *Taschenbuch für Lebensmittelchemiker*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag.
13. BMEL, Weinbau in Deutschland. Online unter: http://www.bmel.de/DE/Landwirtschaft/Pflanzenbau/Weinbau/weinbau_node.html (10.10.2016).

14. de Barros Lopes, M.A., Bartowsky, E.J., Pretorius, I.S., 2006. *The Application of Gene Technology in the Wine Industry* in Hui, Y.H. (Hg.) *Handbook of food science, technology and engineering*. Boca Raton: CRC Press.
15. Rangan, C. and Barceloux, D.G., 2009. Food additives and sensitivities. *Disease-a-month*, 55(5), pp.292-311.
16. Ough, C.S. and Crowell, E.A., 1987. Use of sulfur dioxide in winemaking. *Journal of food science*, 52(2), pp.386-388.
17. Gerbaux, V., Villa, A., Monamy, C. and Bertrand, A., 1997. Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. *American journal of enology and viticulture*, 48(1), pp.49-54.
18. Bartowsky, E., Costello, P.J. and McCarthy, J.M., 2008. MLF-adding an "extra dimension" to wine flavour and quality. *Australian and New Zealand grapegrower and winemaker*, (533), pp.60-65.
19. Bartowsky, E.J., Xia, D., Gibson, R.L., Fleet, G.H. and Henschke, P.A., 2003. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in applied microbiology*, 36(5), pp.307-314.
20. Bartowsky, E.J., 2009. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in applied microbiology*, 48(2), pp.149-156.
21. Carstens, C., Deckwart, M., Webber-Witt, M., Schäfer, V., Eichhorn, L., Brockow, K., Fischer, M., Christmann, M. and Paschke-Kratzin, A., 2014. Evaluation of the efficiency of enological procedures on lysozyme depletion in wine by an indirect ELISA method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(26), pp.6247-6253.
22. Blake, C.C.F., Johnson, L.N., Mair, G.A., North, A.C.T., Phillips, D.C. and Sarma, V.R., 1967. Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 167(1009), pp.378-388.
23. Peñas, E., di Lorenzo, C., Uberti, F. and Restani, P., 2015. Allergenic proteins in enology: a review on technological applications and safety aspects. *Molecules*, 20(7), pp.13144-13164.
24. Deckwart, M., Carstens, C., Webber-Witt, M., Schäfer, V., Eichhorn, L., Schröter, F., Fischer, M., Brockow, K., Christmann, M. and Paschke-Kratzin, A., 2014. Impact of wine manufacturing practice on the occurrence of fining agents with allergenic potential. *Food additives & contaminants: Part A*, 31(11), pp.1805-1817.
25. Weber, P., Steinhart, H. and Paschke, A., 2007. Investigation of the allergenic potential of wines fined with various proteinogenic fining agents by ELISA. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(8), pp.3127-3133.
26. Steinhart, H., Paschke, A. and Zunker, K., 2001. Lebensmittelallergie—eine individuelle Gefahr: Wenn das Immunsystem falsch reagiert. *Biologie in unserer Zeit*, 31(6), pp.398-407.
27. ENDA Panel, 2014. Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. *EFSA journal*, 12, p.3894.
28. Sathe, S.K., Liu, C. and Zaffran, V.D., 2016. Food allergy. *Annual review of food science and technology*, 7, pp.191-220.

29. Burks, A.W., Tang, M., Sicherer, S., Muraro, A., Eigenmann, P.A., Ebisawa, M., Fiocchi, A., Chiang, W., Beyer, K., Wood, R. and Hourihane, J., 2012. ICON: food allergy. *Journal of allergy and clinical immunology*, 129(4), pp.906-920.
30. Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., Myrtek, D., 2014. Der Experimentator: Immunologie. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag.
31. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2007. Biochemie. München: Spektrum Akademischer Verlag (Elsevier).
32. International Organisation of Vine and Wine. Resolution OIV/OENO 427/2010, Criteria for the methods of quantification of potentially allergenic residues of fining agent proteins in wine. (in der Fassung vom 25.06.2010).
33. International Organisation of Vine and Wine. Resolution OIV-COMEX 502-2012. Revision of the limit of detection and limit of quantification related to potentially allergenic residues of fining agent proteins in wine. (in der Fassung vom 17.03.2012)..
34. Deckwart, M., Carstens, C., Webber-Witt, M., Schäfer, V., Eichhorn, L., Kang, S., Fischer, M., Brockow, K., Christmann, M. and Paschke-Kratzin, A., 2014. Development of a sensitive ELISA for the detection of casein-containing fining agents in red and white wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(28), pp.6803-6812.
35. Ansorge, S., 2006. *Immunsystem* in Löffler, G., Petrides, P.E., Heinrich, P.C. (Hg.) *Biochemie und Pathobiochemie* Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
36. Chen, K. and Cerutti, A., 2011. The function and regulation of immunoglobulin D. *Current opinion in immunology*, 23(3), pp.345-352.
37. Dong, S., Zhang, C., Zhang, X., Liu, Y., Zhong, J., Xie, Y., Xu, C., Ding, Y., Zhang, L. and Liu, X., 2016. Production and Characterization of Monoclonal Antibody Broadly Recognizing Cry1 Toxins by Use of Designed Polypeptide as Hapten. *Analytical chemistry*, 88(14), pp.7023-7032.
38. Liu, H.F., Ma, J., Winter, C. and Bayer, R., 2010. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *Mabs*, 2(5), pp. 480-499.
39. Lequin, R.M., 2005. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical chemistry*, 51(12), pp.2415-2418.
40. Morschheuser, L., Mükusch, S., Riedner, M., Seitz, H. and Rohn, S., 2016. High-performance thin-layer chromatography as a fast screening tool for phosphorylated peptides. *Journal of chromatography b*, 1008, pp.198-205.
41. Watson, J.D. and Crick, F.H., 1953. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *JAMA*, 269(15), pp.1967-1969.
42. Watson, J.D. and Crick, F.H., 2004. Molecular structure of nucleic acids. *Resonance*, 9(11), pp.96-98.
43. Yakovchuk, P., Protozanova, E. and Frank-Kamenetskii, M.D., 2006. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic acids research*, 34(2), pp.564-574.

44. Hoogsteen, K., 1963. The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta crystallographica*, 16(9), pp.907-916.
45. Burge, S., Parkinson, G.N., Hazel, P., Todd, A.K. and Neidle, S., 2006. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic acids research*, 34(19), pp.5402-5415.
46. Mukundan, V.T., Do, N.Q. and Phan, A.T., 2011. HIV-1 integrase inhibitor T30177 forms a stacked dimeric G-quadruplex structure containing bulges. *Nucleic acids research*, p.gkr540.
47. Macaya, R.F., Schultze, P., Smith, F.W., Roe, J.A. and Feigon, J., 1993. Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proceedings of the national academy of sciences*, 90(8), pp.3745-3749.
48. Kikin, O., D'Antonio, L. and Bagga, P.S., 2006. QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic acids research*, 34(suppl 2), pp.W676-W682.
49. Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M.S., Zou, X., Brown, K.L. and Breaker, R.R., 2002. Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chemistry & biology*, 9(9), pp.1043-1049.
50. Ellington, A.D. and Szostak, J.W., 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287), p.818.
51. Tuerk, C. and Gold, L., 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249(4968), pp.505-510.
52. Kulbachinskiy, A.V., 2007. Methods for selection of aptamers to protein targets. *Biochemistry (Moscow)*, 72(13), pp.1505-1518.
53. Schütze, T., Wilhelm, B., Greiner, N., Braun, H., Peter, F., Mörl, M., Erdmann, V.A., Lehrach, H., Konthur, Z., Menger, M. and Arndt, P.F., 2011. Probing the SELEX process with next-generation sequencing. *PLoS one*, 6(12), p.e29604.
54. Hianik, T., Ostatná, V., Sonlajtnerova, M. and Grman, I., 2007. Influence of ionic strength, pH and aptamer configuration for binding affinity to thrombin. *Bioelectrochemistry*, 70(1), pp.127-133.
55. Hartwig, A., 2001. Role of magnesium in genomic stability. *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 475(1), pp.113-121.
56. Bartnicki, F., Kowalska, E., Pels, K. and Strzalka, W., 2015. Imidazole-free purification of His 3-tagged recombinant proteins using ssDNA aptamer-based affinity chromatography. *Journal of chromatography A*, 1418, pp.130-139.
57. Hünninger, T., Fischer, C., Wessels, H., Hoffmann, A., Paschke-Kratzin, A., Haase, I. and Fischer, M., 2015. Food sensing: selection and characterization of DNA aptamers to *Alicyclobacillus* spores for trapping and detection from orange juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(8), pp.2189-2197.
58. Girardot, M., Gareil, P. and Varenne, A., 2010. Interaction study of a lysozyme-binding aptamer with mono- and divalent cations by ACE. *Electrophoresis*, 31(3), pp.546-555.

59. Hünninger T., 2016. Aptamere: Strategien zur Prozessoptimierung und Anwendung in der Lebensmittelanalytik. Dissertation Universität Hamburg.
60. Hünninger, T., Wessels, H., Fischer, C., Paschke-Kratzin, A. and Fischer, M., 2014. *Just in time-selection: A rapid semiautomated SELEX of DNA aptamers using magnetic separation and BEAMing. Analytical chemistry, 86(21)*, pp.10940-10947.
61. Stoltenburg, R., Reinemann, C. and Strehlitz, B., 2005. FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Analytical and bioanalytical chemistry, 383(1)*, pp.83-91.
62. Mosing, R.K. and Bowser, M.T., 2009. Isolating aptamers using capillary electrophoresis–SELEX (CE–SELEX). *Nucleic acid and peptide aptamers: methods and protocols*, pp.33-43.
63. Jing, M. and Bowser, M.T., 2013. Tracking the emergence of high affinity aptamers for rhVEGF165 during capillary electrophoresis-systematic evolution of ligands by exponential enrichment using high throughput sequencing. *Analytical chemistry, 85(22)*, pp.10761-10770.
64. Sefah, K., Shangguan, D., Xiong, X., O'donoghue, M.B. and Tan, W., 2010. Development of DNA aptamers using Cell-SELEX. *Nature protocols, 5(6)*, pp.1169-1185.
65. Mayer, G., Ahmed, M.S.L., Dolf, A., Endl, E., Knolle, P.A. and Famulok, M., 2010. Fluorescence-activated cell sorting for aptamer SELEX with cell mixtures. *Nature protocols, 5(12)*, pp.1993-2004.
66. Qu, H., Csordas, A.T., Wang, J., Oh, S.S., Eisenstein, M.S. and Soh, H.T., 2016. Rapid and label-free strategy to isolate aptamers for metal ions. *ACS nano, 10(8)*, pp.7558-7565.
67. Tran, D.T., Janssen, K.P., Pollet, J., Lammertyn, E., Anné, J., Van Schepdael, A. and Lammertyn, J., 2010. Selection and characterization of DNA aptamers for egg white lysozyme. *Molecules, 15(3)*, pp.1127-1140.
68. Cox, J., Rajendran, M., Riedel, T., Davidson, E.A., Sooter, L.J., Bayer, T.S., Schmitz-Brown, M. and Ellington, A.D., 2002. Automated acquisition of aptamer sequences. *Combinatorial chemistry & high throughput screening, 5(4)*, pp.289-299.
69. Stoltenburg, R., Reinemann, C. and Strehlitz, B., 2007. SELEX—a (r) evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular engineering, 24(4)*, pp.381-403.
70. Wochner, A., Cech, B., Menger, M., Erdmann, V.A. and Glokler, J., 2007. Semi-automated selection of DNA aptamers using magnetic particle handling. *BioTechniques, 43(3)*, p.344.
71. Chen, X., Huang, Y., Duan, N., Wu, S., Ma, X., Xia, Y., Zhu, C., Jiang, Y. and Wang, Z., 2013. Selection and identification of ssDNA aptamers recognizing zearalenone. *Analytical and bioanalytical chemistry, 405(20)*, pp.6573-6581.
72. Blind, M. and Blank, M., 2015. Aptamer selection technology and recent advances. *Molecular therapy—nucleic acids, 4(1)*, p.e223.
73. Song, K.M., Lee, S. and Ban, C., 2012. Aptamers and their biological applications. *Sensors, 12(1)*, pp.612-631.

74. Wochner, A., Menger, M., Orgel, D., Cech, B., Rimmelé, M., Erdmann, V.A. and Glökler, J., 2008. A DNA aptamer with high affinity and specificity for therapeutic anthracyclines. *Analytical biochemistry*, 373(1), pp.34-42.
75. Cox, J.C. and Ellington, A.D., 2001. Automated selection of anti-protein aptamers. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 9(10), pp.2525-2531.
76. Li, L., Li, B., Qi, Y. and Jin, Y., 2009. Label-free aptamer-based colorimetric detection of mercury ions in aqueous media using unmodified gold nanoparticles as colorimetric probe. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 393(8), pp.2051-2057.
77. Toh, S.Y., Citartan, M., Gopinath, S.C. and Tang, T.H., 2015. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosensors and bioelectronics*, 64, pp.392-403.
78. Zhou, W., Huang, P.J.J., Ding, J. and Liu, J., 2014. Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics. *Analyst*, 139(11), pp.2627-2640.
79. General Biosystems, High-throughput Gene Synthesis. Online unter: <http://www.generalbiosystems.com/index.php?m=Home&c=Services&a=show&cid=59&catid=49> (13.03.2017).
80. ThermoFisher Scientific, Pricing for Oligonucleotides. Online unter: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/products-and-services/product-types/primers-oligonucleotides/invitrogen-custom-dna-oligos/oligo-ordering-details/pricing-for-oligonucleotides.html> (13.03.2017).
81. GenScript. Gene Synthesis Service. Online unter: http://www.genscript.com/gene_synthesis.html (13.03.2017).
82. Opazo, F., Levy, M., Byrom, M., Schäfer, C., Geisler, C., Groemer, T.W., Ellington, A.D. and Rizzoli, S.O., 2012. Aptamers as potential tools for super-resolution microscopy. *Nature methods*, 9(10), pp.938-939.
83. Shin, S., Kim, I.H., Kang, W., Yang, J.K. and Hah, S.S., 2010. An alternative to Western blot analysis using RNA aptamer-functionalized quantum dots. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(11), pp.3322-3325.
84. Walter, J.G. and Stahl, F., 2008. Aptamere in der Biosensorik. *Chemie Ingenieur Technik*, 80(6), pp.771-781.
85. Ng, E.W., Shima, D.T., Calias, P., Cunningham, E.T., Guyer, D.R. and Adamis, A.P., 2006. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nature reviews drug discovery*, 5(2), pp.123-132.
86. Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A. and Wilson, G.S., 1999. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure and applied chemistry*, 71(12), pp.2333-2348.
87. Damborský, P., Švitel, J. and Katrlík, J., 2016. Optical biosensors. *Essays in biochemistry*, 60(1), pp.91-100.
88. Ferrigno, P.K., 2016. Non-antibody protein-based biosensors. *Essays in biochemistry*, 60(1), pp.19-25.
89. Dzyadevych, S.V., Arkhypova, V.N., Soldatkin, A.P., El'Skaya, A.V., Martelet, C. and Jaffrezic-Renault, N., 2008. Amperometric enzyme biosensors: past, present and future. *Irbm*, 29(2), pp.171-180.

90. Bush, D.L. and Rechnitz, G.A., 1987. Monoclonal antibody biosensor for antigen monitoring. *Analytical letters*, 20(11), pp.1781-1790.
91. Vallée-Bélisle, A. and Plaxco, K.W., 2010. Structure-switching biosensors: inspired by Nature. *Current opinion in structural biology*, 20(4), pp.518-526.
92. Kooyman, R.P.H., 2008. *Physics of Surface Plasmon Resonance* in Schasfoort, R.B.M and Tudos, A.J. (Hg.) *Handbook of surface plasmon resonance*. England: Royal Society of Chemistry.
93. Schasfoort, R.B.M and Tudos, A.J., 2008. *Introduction to Surface Plasmon Resonance* in Schasfoort, R.B.M and Tudos, A.J. (Hg.) *Handbook of surface plasmon resonance*. England: Royal Society of Chemistry.
94. Schasfoort, R.B.M and McWhirter, A., 2008. *SPR Instrumentation* in Schasfoort, R.B.M and Tudos, A.J. (Hg.) *Handbook of surface plasmon resonance*. England: Royal Society of Chemistry.
95. Sharma, S., Byrne, H. and O'Kennedy, R.J., 2016. Antibodies and antibody-derived analytical biosensors. *Essays in biochemistry*, 60(1), pp.9-18.
96. Alves, R.C., Barroso, M.F., González-García, M.B., Oliveira, M.B.P. and Delerue-Matos, C., 2016. New Trends in Food Allergens Detection: Toward Biosensing Strategies. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(14), pp.2304-2319.
97. Ashley, J., Piekarska, M., Segers, C., Trinh, L., Rodgers, T., Willey, R. and Tothill, I.E., 2017. An SPR based sensor for allergens detection. *Biosensors and bioelectronics*, 88, pp.109-113.
98. Pilolli, R., Visconti, A. and Monaci, L., 2015. Rapid and label-free detection of egg allergen traces in wines by surface plasmon resonance biosensor. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(13), pp.3787-3797.
99. Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober 2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1924/2006 und (EG) Nr. 1925/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinie 87/250/EWG der Kommission, der Richtlinie 90/496/EWG des Rates, der Richtlinie 1999/10/EG der Kommission, der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 2002/67/EG und 2008/5/EG der Kommission und der Verordnung (EG) Nr. 608/2004 der Kommission in der Fassung vom 19.02.2014.
100. Carstens, C., 2016. Immunologische und chemische Untersuchung allergener Weinbehandlungsmittel. Dissertation Universität Hamburg.
101. de Mol, N.J., Fischer, M.J.E., 2008. *Kinetic and thermodynamic analysis of ligand-receptor interactions: SPR applications in drug development* in Schasfoort, R.B.M and Tudos, A.J. (Hg.) *Handbook of surface plasmon resonance*. England: Royal Society of Chemistry.
102. Andersson, K., Areskoug, D. and Hardenborg, E., 1999. Exploring buffer space for molecular interactions. *Journal of molecular recognition*, 12(5), pp.310-315.
103. Abcam, K_D value: a quantitative measurement of antibody affinity. Online unter: <http://www.abcam.com/primary-antibodies/kd-value-a-quantitative-measurement-of-antibody-affinity> (12.11.2016).

104. Souci, S.W., Fachmann, W., Kraut, H., 2015. *Food composition and nutrition tables*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
105. Mülhardt, C., 2013. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag.
106. Rehm, H., Letzel, T., 2010. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag.
107. Rombouts, I., Lagrain, B., Brunnbauer, M., Delcour, J.A. and Koehler, P., 2013. Improved identification of wheat gluten proteins through alkylation of cysteine residues and peptide-based mass spectrometry. *Scientific reports*, 3, p.2279.
108. Gabler Wirtschaftslexikon, Stichwort: Just in Time (JIT). Online unter: <http://wirtschaftslexikon.gabler.de/Archiv/57306/just-in-time-jit-v6.html> (13.03.2017)
109. Avci-Adali, M., Paul, A., Wilhelm, N., Ziemer, G. and Wendel, H.P., 2009. Upgrading SELEX technology by using lambda exonuclease digestion for single-stranded DNA generation. *Molecules*, 15(1), pp.1-11.
110. Shao, K., Ding, W., Wang, F., Li, H., Ma, D. and Wang, H., 2011. Emulsion PCR: a high efficient way of PCR amplification of random DNA libraries in aptamer selection. *PloS one*, 6(9), p.e24910.
111. Schütze, T., Rubelt, F., Repkow, J., Greiner, N., Erdmann, V.A., Lehrach, H., Konthur, Z. and Glökler, J., 2011. A streamlined protocol for emulsion polymerase chain reaction and subsequent purification. *Analytical biochemistry*, 410(1), pp.155-157.
112. Tolle, F., Wilke, J., Wengel, J. and Mayer, G., 2014. By-product formation in repetitive PCR amplification of DNA libraries during SELEX. *PloS one*, 9(12), p.e114693.
113. Diehl, F., Li, M., He, Y., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Dressman, D., 2006. BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nature methods*, 3(7), pp.551-559.
114. Schütze, T., Arndt, P.F., Menger, M., Wochner, A., Vingron, M., Erdmann, V.A., Lehrach, H., Kaps, C. and Glökler, J., 2010. A calibrated diversity assay for nucleic acid libraries using DiStRO—a Diversity Standard of Random Oligonucleotides. *Nucleic acids research*, 38(4), pp.e23-e23.
115. ThermoFisher Scientific, Produktinformationen Applied Biosystems Genetic Analyzers. Online unter: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/brochure-ab-genetic-analyzers.pdf> (19.11.2016).
116. GATC Biotech, Produktinformationen Supreme Run. Online unter: <https://www.gatc-biotech.com/shop/de/produkt-uebersicht/sanger/supremesrun/supremesrun-tube-barcode.html> (19.11.2016).
117. Fiala, K.A., Brown, J.A., Ling, H., Kshetry, A.K., Zhang, J., Taylor, J.S., Yang, W. and Suo, Z., 2007. Mechanism of template-independent nucleotide incorporation catalyzed by a template-dependent DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 365(3), pp.590-602.
118. Geng, L., Xin, W., Huang, D.W. and Feng, G., 2006. A universal cloning vector using vaccinia topoisomerase I. *Molecular biotechnology*, 33(1), pp.23-28.

119. ThermoFisher Scientific, Produktinformation TOPO TA for sequencing. Online unter: <http://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cloning/topo/topo-ta-cloning/topo-ta-for-sequencing.html> (19.11.2016).
120. Fischer, C., Hünninger, T., Jarck, J.H., Frohnmeyer, E., Kallinich, C., Haase, I., Hahn, U. and Fischer, M., 2015. Food sensing: aptamer-based trapping of *Bacillus cereus* spores with specific detection via real time PCR in milk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(36), pp.8050-8057.
121. Illumina, Sequencing by Synthesis (SBS) Technology. Online unter: <https://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.html> (13.03.2017).
122. Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research*, 31(13), pp.3406-3415.
123. Bailey, T.L. and Elkan, C., 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in bipolymers.
Online unter: http://www.cs.toronto.edu/~brudno/csc2417_15/10.1.1.121.7056.pdf (17.03.2017)
124. Nagatoishi, S., Tanaka, Y. and Tsumoto, K., 2007. Circular dichroism spectra demonstrate formation of the thrombin-binding DNA aptamer G-quadruplex under stabilizing-cation-deficient conditions. *Biochemical and biophysical research communications*, 352(3), pp.812-817.
125. Benz, A., 2011. Artifizielle G-Quadruplexe und Identifizierung von neuen G-Quadruplexliganden. Dissertation Universität Konstanz.
126. Viegas, A., Manso, J., Nobrega, F.L. and Cabrita, E.J., 2011. Saturation-transfer difference (STD) NMR: a simple and fast method for ligand screening and characterization of protein binding. *Journal of chemical education*, 88(7), pp.990-994.
127. Aboul-Ela, F., Koh, D., Tinoco, I. and Martin, F.H., 1985. Base-base mismatches. Thermodynamics of double helix formation for dCA3XA3G+ dCT3YT3G (X, Y= A, C, G, D). *Nucleic acids research*, 13(13), pp.4811-4824.
128. Olson, A.C., Patro, J.N., Urban, M. and Kuchta, R.D., 2013. The energetic difference between synthesis of correct and incorrect base pairs accounts for highly accurate DNA replication. *Journal of the american chemical society*, 135(4), pp.1205-1208.
129. Fischer, C., Klockmann, S., Wessels, H., Hünninger, T., Schrader, J., Paschke-Kratzin, A. and Fischer, M., 2016. Aptamer-based trapping of phytosphingosine in urine samples. *Journal of biotechnology*, 238, pp.30-34.
130. Zhou, W., Ding, J. and Liu, J., 2016. A highly specific sodium aptamer probed by 2-aminopurine for robust Na⁺ sensing. *Nucleic acids research*, p.gkw845.
131. Piran, U. and Riordan, W.J., 1990. Dissociation rate constant of the biotin-streptavidin complex. *Journal of immunological methods*, 133(1), pp.141-143.
132. Kromidas, S., 2011. *Handbuch Validierung in der Analytik*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag.

133. Jayasena, S.D., 1999. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical chemistry*, 45(9), pp.1628-1650.
134. Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A. and Polisky, B., 1994. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science*, 263(1425), pp.1425-1425.
135. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), pp.403-410.
136. Kruspe, S. and Hahn, U., 2014. An Aptamer Intrinsically Comprising 5-Fluoro-2'-deoxyuridine for Targeted Chemotherapy. *Angewandte Chemie international edition*, 53(39), pp.10541-10544.
137. Tang, J., Xie, J., Shao, N. and Yan, Y., 2006. The DNA aptamers that specifically recognize ricin toxin are selected by two in vitro selection methods. *Electrophoresis*, 27(7), pp.1303-1311.
138. Vaagt, F., Haase, I. and Fischer, M., 2013. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based method for rapid mushroom species identification. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(8), pp.1833-1840.
139. Biller, J., Morschheuser, L., Riedner, M. and Rohn, S., 2015. Development of optimized mobile phases for protein separation by high performance thin layer chromatography. *Journal of chromatography A*, 1415, pp.146-154.
140. Meisen, I., Friedrich, A.W., Karch, H., Witting, U., Peter-Katalinić, J. and Müthing, J., 2005. Application of combined high-performance thin-layer chromatography immunostaining and nanoelectrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry to the structural characterization of high-and low-affinity binding ligands of Shiga toxin 1. *Rapid communications in mass spectrometry*, 19(24), pp.3659-3665.
141. Håkanson, R., Larsson, L.I. and Sundler, F., 1974. Fluorescamine: A novel reagent for the histochemical detection of amino groups. *Histochemistry*, 39(1), pp.15-23.
142. Kaiser, E., Colecott, R.L., Bossinger, C.D. and Cook, P.I., 1970. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical biochemistry*, 34(2), pp.595-598.
143. Morschheuser, L., Wessels, H., Pille, C., Fischer, J., Hünninger, T., Fischer, M., Paschke-Kratzin, A. and Rohn, S., 2016. HPTLC-aptastaining—Innovative protein detection system for high-performance thin-layer chromatography. *Scientific reports*, 6, pp.26665.
144. Uhrínová, S., Smith, M.H., Jameson, G.B., Uhrín, D., Sawyer, L. and Barlow, P.N., 2000. Structural Changes Accompanying pH-Induced Dissociation of the β -Lactoglobulin Dimer. *Biochemistry*, 39(13), pp.3565-3574.
145. Steinhoff, M., Fischer, M. and Paschke-Kratzin, A., 2011. Comparison of extraction conditions for milk and hen's egg allergens. *Food additives and contaminants*, 28(4), pp.373-383.
146. Chang, D., Zakaria, S., Deng, M., Allen, N., Tram, K. and Li, Y., 2016. Integrating Deoxyribozymes into Colorimetric Sensing Platforms. *Sensors*, 16(12), p.2061.
147. Schneider, C.A., Rasband, W.S. and Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), p.671.

148. Han, H. and Hurley, L.H., 2000. G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design. *Trends in pharmacological sciences*, 21(4), pp.136-142.

149. Karlsson, R., 2004. SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas. *Journal of molecular recognition*, 17(3), pp.151-161.

8 Anhang

8.1 Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS

In Tabelle 64 sind die verwendeten Gefahrstoffe, deren Einstufung nach GHS (global harmonisiertes System im Sinne der VO (EG) Nr. 1272/2008), die zugehörigen H- und P-Sätze (engl.: *hazard* und *precautionary statements*), die Entsorgung in den an der Universität Hamburg verfügbaren Möglichkeiten (1 = andere Basen, 2 = andere Säuren, 3 = nitrathaltige Säuren, 4 = halogenfreie organische Lösungsmittel, 5 = halogenhaltige und giftige organische Lösungsmittel, 6 = kontaminierte Betriebsmittel, 7 = Schwermetallsalze) sowie der Hersteller angegeben. Die in der Spalte GHS angegebene Kodierung kann den in Abbildung 74 angegebenen Piktogrammen gleichgesetzt werden.



Abbildung 74: GHS-Piktogramme.

Tabelle 64: Auflistung der verwendeten Gefahrstoffe.

Name	GHS	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller	Entsorgung
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	05	314	280, 305 + 351 + 338, 310	Applichem	2
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	07	315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338	Sigma-Aldrich	2
2-Butanol	02, 07	226, 319, 335, 336	210, 304 + 340, 305 + 351 + 338	Roth	4
2-Propanol	02, 07			Sigma-Aldrich	4
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	07	315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338	Sigma-Aldrich	4
Aceton	02, 07	225, 319, 336	210, 233, 305 + 351 + 338	eigene Abfüllung	4
Acetonitril	02, 07	225, 302 + 312 + 332, 319	210, 305 + 351 + 338, 403 + 235	eigene Abfüllung	4
Acrylamid (40 % w/v)	08	302 + 312, 315, 319, 317, 340, 350, 361f, 372	260, 280, 321, 305 + 351 + 338, 405, 501	Roth	5
Agar	-	-	-	Roth	6
Agarose	-	-	-	Serva	6

Name	GHS	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller	Entsorgung
Ameisensäure	02, 06, 05	226, 302, 314, 331, EUH71	210, 280, 303 + 361 + 353, 304 + 340 + 310, 305 + 351 + 338, 403 + 233	Sigma- Aldrich	2
Ammoniak	06, 05, 09	221, 280, 331, 314, 400	210, 260, 280, 273, 304 + 340, 303 + 361 + 353, 305 + 351 + 338, 315, 377, 381, 405, 403	Roth	2
Ammoniumperoxo- disulfat	03, 07, 08	372, 302, 315, 319, 335, 334, 317	280, 305 + 351 + 338, 302 + 352, 304 + 341, 342 + 311	Roth	2
Ammoniumsulfat	-	-	-	Sigma- Aldrich	2
Ampicillin	08	315, 317, 319, 334, 335	261, 280, 305 + 351 + 338, 342 + 311	Roth	2
Biotin	-	-	-	Fluka	2
Bromphenolblau	-	-	-	Sigma- Aldrich	2
Calciumacetat- Monohydrat	-	-	-	Sigma- Aldrich	2
Calciumchlorid	07	319	305 + 351 + 338	Sigma- Aldrich	2
Cetyltrimethyl- ammoniumbromid	05, 08, 09	302, 315, 318, 335, 373, 410	273, 280, 302 + 352, 305 + 351 + 338, 314	Sigma- Aldrich	5
Citronensäure- Monohydrat	07	319	280, 305 + 351 + 338, 337 + 313	Merck	2
Coomassie-Brilliant Blue	-	-	-	Thermo Fisher	2
Dinatriumhydrogen- phosphat	-	-	-	Roth	2
Dithiotreitol (DTT)	07	302, 315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338	Sigma- Aldrich	2
Essigsäure (99 %, Eisessig)	02, 05	226, 290, 314	210, 280, 301 + 330 + 331, 305 + 351 + 338, 308 + 310	Roth	2
Ethanol (96 %)	02, 07	225, 319	210, 240, 305 + 351 + 338, 403 + 233	Eigene Abfüllung	2

Name	GHS	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller	Entsorgung
Ethanolamin (Feststoff)	05, 07	302, 312, 332, 314, 335, 412	261, 273, 301 + 312, 330, 303 + 361 + 353, 304 + 340 + 310, 305 + 351 + 338	Roth	2
Ethanolamin (Lösung für SPR-Untersuchungen)	05, 07	302, 312, 332, 314, 335, 412	261, 273, 301 + 312, 330, 303 + 361 + 353, 304 + 340 + 310, 305 + 351 + 338	Sierra Sensors	2
Ethidiumbromid	06, 08	302, 330, 341	260, 281, 284, 310	Sigma-Aldrich	5
Ethylendiamintetra-essigsäure (EDTA)	07	319	305 + 351 + 338	Sigma-Aldrich	2
Fluorescamin	-	-	-	Merck	2
Glucose	-	-	-	Applichem	2
Glycerin	-	-	-	Roth	2
Harnstoff	-	-	-	Roth	2
Iodacetamid	06, 08	301, 317, 334, 413	261, 280, 301 + 310, 342 + 311	Merck	2
Kaliumacetat	-	-	-	Roth	2
Kaliumchlorid	-	-	-	Roth	2
Kaliumdihydrogenphosphat	-	-	-	Roth	2
Kaliumhydroxid	05	290, 302, 314	280, 301 + 330 + 331, 305 + 351 + 338, 308 + 310	Roth	1
Magnesiumacetat-Tetrahydrat	-	-	-	Sigma-Aldrich	2
Magnesiumchlorid	-	-	-	Grüssing	2
Magnesiumsulfat-Hexahydrat	-	-	-	Grüssing	2
Malonsäure	05	302, 318	280, 305 + 351 + 338	Sigma-Aldrich	2
Methanol	02, 06, 08	225, 331, 311, 301, 370	210, 233, 280, 302 + 352, 304 + 340, 308 + 310, 403 + 235	Sigma-Aldrich	2
Natriumchlorid	-	-	-	Roth	2
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	-	-	-	Roth	2
Natriumdodecylsulfat (engl.: Sodiumdodecylsulfat)	02, 05	228, 302 + 332, 315, 318, 335, 412	210, 261, 280, 301 + 312 + 330, 305 + 351 + 338 + 310, 370 + 378	Merck	2
Natriumhydrogencarbonat	-	-	-	Roth	2

Name	GHS	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller	Entsorgung
Natriumhydroxid	05	290, 314	280, 301 + 330 + 331, 305 + 351 + 338, 308 + 310	Merck	1
N-Hydroxysuccinimid	-	-	-	Applichem	2
Phosphorsäure	05	314, 290	280, 301 + 330 + 331, 305 + 351 + 338, 309 + 310	Merck	2
Pyridin	02, 07	225, 332, 302, 312, 319, 315	210, 280, 305 + 351 + 338	Roth	4
Salzsäure	05	290, 314, 335	260, 280, 303 + 361 + 353, 304 + 340 + 310, 305 + 351 + 338	Merck	2
Schwefelsäure	05	290, 314	280, 301 + 330 + 331, 305 + 351 + 338, 308 + 310	Merck	2
SYBR-Green	-	-	-	Sigma- Aldrich	2
Tetramethylethylen- diamin (TEMED)	02, 05	225, 332, 302, 314	210, 280, 305 + 351 + 338, 310	Roth	2
Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (Base)	07	315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338	Roth	2
Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (Säure)	07	315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338	Sigma- Aldrich	2
Tween-20	-	-	-	Roth	2
Wasserstoffperoxid	03, 05	271, 302, 314, 332, 335, 412	210, 220, 260, 280, 305 + 351 + 338, 370 + 378	Merck	2
Xylencyanolblau	07	315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338	unbekannt	2
α-Cyano-4- hydroxymethylsäure	07	315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338	Bruker	2
β-Mercaptoethanol	06, 05, 08, 09	301 + 331, 310, 315, 317, 318, 373, 410	273, 280, 302 + 352, 304 + 340, 305 + 351 + 338, 308 + 310	Roth	2

8.2 Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Antikörper

K_D-Wert-Bestimmung Antikörper mit einer Affinität gegen Lysozym

Die hier dargestellten Daten stellen eine Ergänzung zu den bereits unter 5.1.1 gezeigten Daten dar.

Sensorchip: Amin-Sensorchip (SPR-AS-AMF)
Laufpuffer: PBS (+0,05 % Tween-20)
Immobilisiert: 12-18 pg Lysozym
Referenzen: Sensoroberfläche (Blockierungsreagenz Ethanolamin) & Laufpuffer
Injektionsvolumen: 200 µL
Dissoziationszeit: 300 s
Regeneration: 25 µL H₃PO₄/SDS + 25 µL PBS (+0,05 % Tween-20)
Auswertungszeitpunkt: 25/15/5s vor dem Ende der Injektion

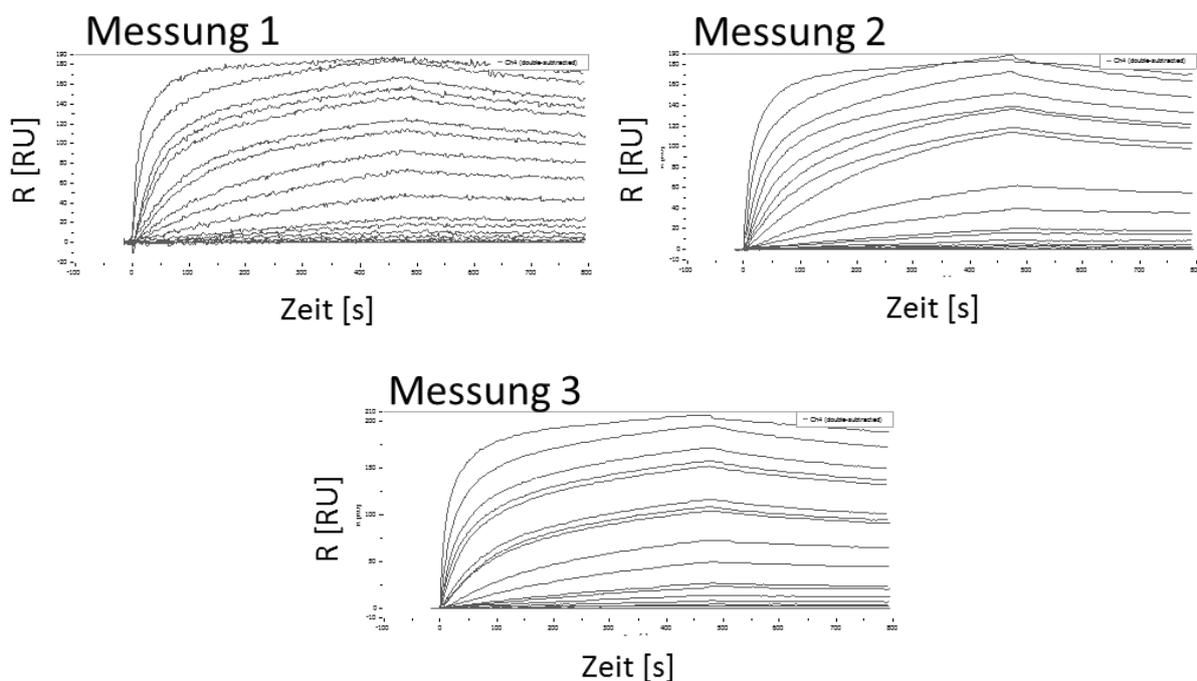


Abbildung 75: referenzierte Sensogramme K_D-Wert-Bestimmung Antikörper mit einer Affinität gegen Lysozym.

K_D-Wert-Bestimmung Antikörper mit einer Affinität gegen Ovalbumin

Sensorchip: Amin-Sensorchip (SPR-AS-AMF)
Laufpuffer: PBS (+0,05 % Tween-20)
Immobilisiert: 55 pg Ovalbumin
Referenzen: Sensoroberfläche (Blockierungsreagenz Ethanolamin) & Laufpuffer
Injektionsvolumen: 200 µL
Dissoziationszeit: 300 s
Regeneration: 25 µL H₃PO₄/SDS + 25 µL PBS (+0,05 % Tween-20)
Auswertungszeitpunkt: 25/15/5s vor dem Ende der Injektion

Tabelle 65: Werte K_D -Wert-Bestimmung Antikörper mit einer Affinität gegen Ovalbumin.
 Ggf. vorhandene Ausreißer wurden anhand des Grubbs-Test ($p = 0,05$) identifiziert.

Konzentration [nM]	R [RU]				Mittelwert \pm Standardabweichung
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	
0,149	1,34	1,19	1,26	1,04	1,21 \pm 0,13
0,298	1,84	1,81	1,79	2,19	1,91 \pm 0,19
0,597	3,53	3,19	2,78	3,32	3,21 \pm 0,32
1,095	6,19	5,12	5,61	5,23	5,54 \pm 0,48
2,240	12,7	11,64	9,65	10,76	11,19 \pm 1,30
2,986	16,55	15,03	13,61	12,99	14,55 \pm 1,59
7,466	35,42	33,15	28,89	27,23	31,17 \pm 3,77
14,93	57,63	52,99	49,18	44,52	51,08 \pm 5,57
29,87	91,4	81,85	77,02	63,11	78,35 \pm 11,78
49,78	99,82	96,94	92,71	93,14	95,65 \pm 3,37
74,67	118,71	112,85	103,43	94,47	107,37 \pm 10,65
149,3	139,62	143,11	136,56	132,39	137,92 \pm 4,56
199,1	143,37	147,97	141,78	135,7	142,21 \pm 5,07
298,7	159,12	168,16	159,11	158,13	161,13 \pm 4,71
597,3	150,01	171,04	155,5	166,51	160,77 \pm 9,69
995,6	141,41	179,56	135,83	171,36	157,04 \pm 21,65

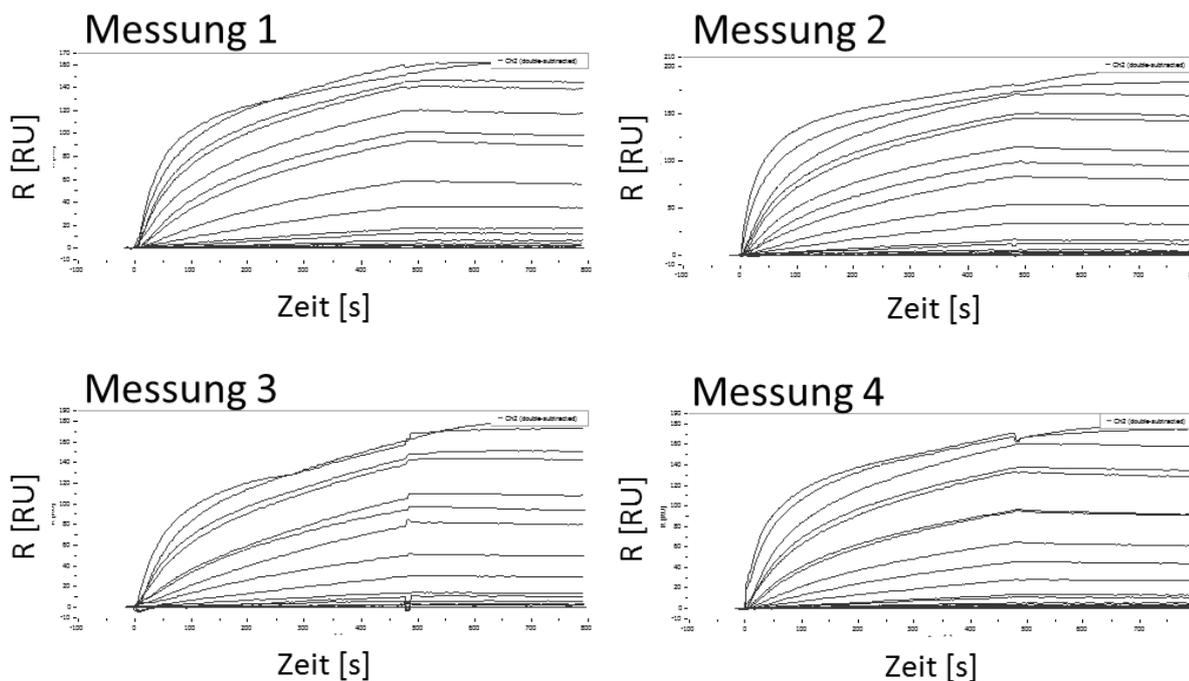


Abbildung 76: referenzierte Sensogramme K_D -Wert-Bestimmung Antikörper mit einer Affinität gegen Ovalbumin.

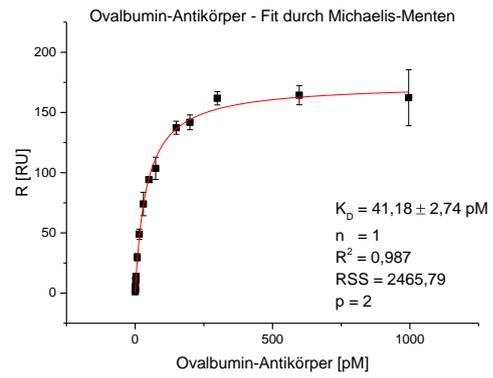
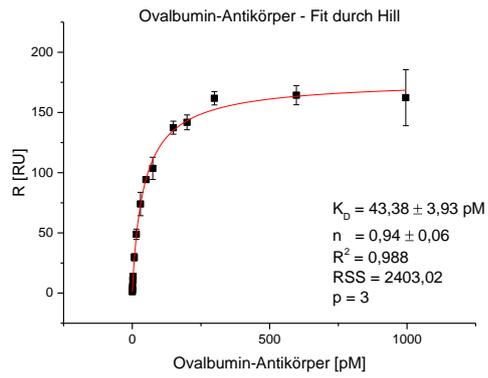


Abbildung 77: SPR-Spektroskopie Ovalbumin-Antikörper, Vergleich unterschiedlicher Regressionen.

Laut F-Test ($F = 1,18$) ist die Regression unter Verwendung der Michaelis Menten-Gleichung signifikant ($p = 0,05$) besser.

8.3 Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Aptamere

K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 600 mit einer Affinität gegen Lysozym (SPR)

Sensorchip: Amin-Sensorchip (SPR-AS-AMF)
 Laufpuffer: Weinpuffer (+0,05 % Tween-20)
 Immobilisiert: 182 µg Lysozym
 Referenzen: Sensoroberfläche (Blockierungsreagenz Ethanolamin) & Laufpuffer
 Injektionsvolumen: 125 µL
 Dissoziationszeit: 300 s
 Regeneration: 15 µL Precondition I-Puffer
 Auswertungszeitpunkt: 25/15/5s vor dem Ende der Injektion

Tabelle 66: Werte K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 600 mit einer Affinität gegen Lysozym (SPR).
 Ggf. vorhandene Ausreißer wurden anhand des Grubbs-Test ($p = 0,05$) identifiziert.

Konzentration [nM]	R [RU]			Mittelwert ± Standardabweichung
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	
1	-4,47	-14,34	2,28	-5,51 ± 8,36
2,5	6,51	18,29	10,96	11,92 ± 5,95
5	14,78	32,02	37,19	28,00 ± 11,73
7,5	42,57	59,35	85,68	62,53 ± 21,73
10	75,36	87,87	103,19	88,81 ± 13,94
15	147,17	156,76	172,62	158,85 ± 12,85
20	253,43	227,2	255,15	245,26 ± 15,66
30	354,85	406,19	444,3	401,78 ± 44,89
40	401,97	545,17	581,03	509,39 ± 94,74
50	583,03	660,52	666,96	636,84 ± 46,71
60	728,85	695,59	649,59	691,34 ± 39,80
75	686,76	776,29	790,7	751,25 ± 56,31
100	704,13	803,03	891,32	799,49 ± 93,65
200	794,16	878,74	769,69	814,20 ± 57,22

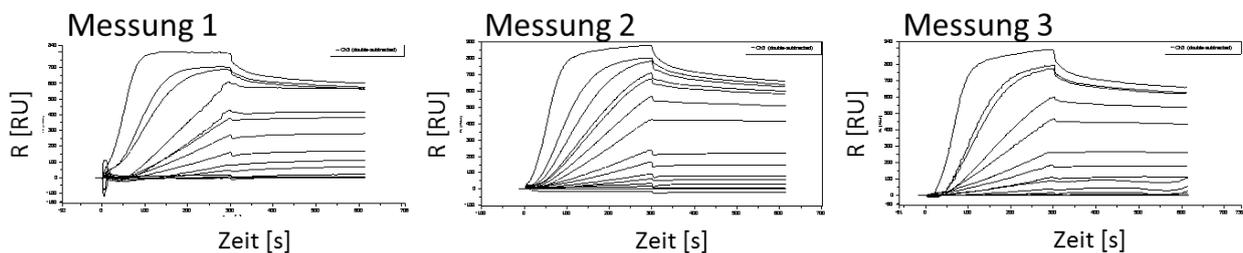


Abbildung 78: referenzierte Sensogramme K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 600 mit einer Affinität gegen Lysozym.

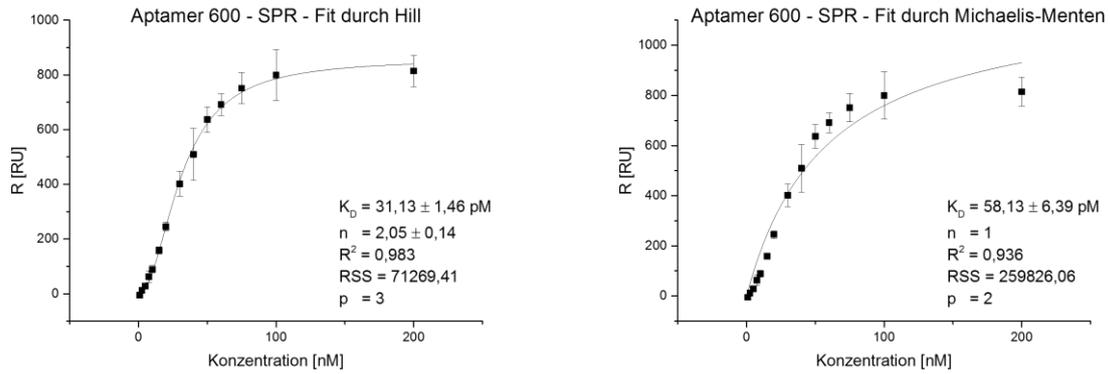


Abbildung 79: Zusammenfassung SPR-Spektroskopie Aptamer 600, Vergleich unterschiedlicher Regressionen.
Laut F-Test ($F = 103,18$) ist die Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung signifikant ($p = 0,05$) besser.

K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 600 mit einer Affinität gegen Lysozym (Fluoreszenzassay)

Tabelle 67: Werte K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 600 mit einer Affinität gegen Lysozym (Fluoreszenzassay).
Ggf. vorhandene Ausreißer wurden anhand des Grubbs-Test ($p = 0,05$) identifiziert.

Konzentration [nM]	Fluoreszenz [FU]				Mittelwert ± Standardabweichung
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	
50	11,315	13,193	13,557	13,565	12,91 ± 1,08
100	26,062	25,453	22,380	18,761	23,16 ± 3,35
200	41,881	42,807	38,524	43,041	41,56 ± 2,09
300	53,326	56,363	46,214		51,97 ± 5,21
500	60,664	69,726	53,820	53,565	59,44 ± 7,60

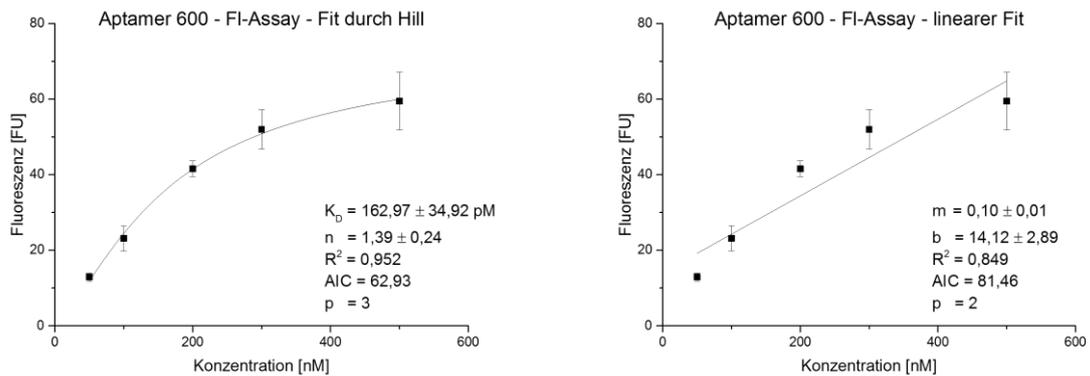


Abbildung 80: Zusammenfassung Fluoreszenzassay Aptamer 600, Vergleich unterschiedlicher Regressionen.
Laut AIC ist die Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung signifikant besser.

K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 601 mit einer Affinität gegen Lysozym (Fluoreszenzassay)

Tabelle 68: Werte K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 601 mit einer Affinität gegen Lysozym (Fluoreszenzassay).
Ggf. vorhandene Ausreißer wurden anhand des Grubbs-Test ($p = 0,05$) identifiziert.

Konzentration [nM]	Fluoreszenz [FU]		
	Messung 1	Messung 2	Mittelwert ± Standardabweichung
50	8,84	9,853	9,35 ± 0,72
100	14,391	14,203	14,30 ± 0,13
200	24,862	25,583	25,22 ± 0,51
300	37,741	38,351	38,05 ± 0,43
500	48,568	56,564	52,57 ± 5,65

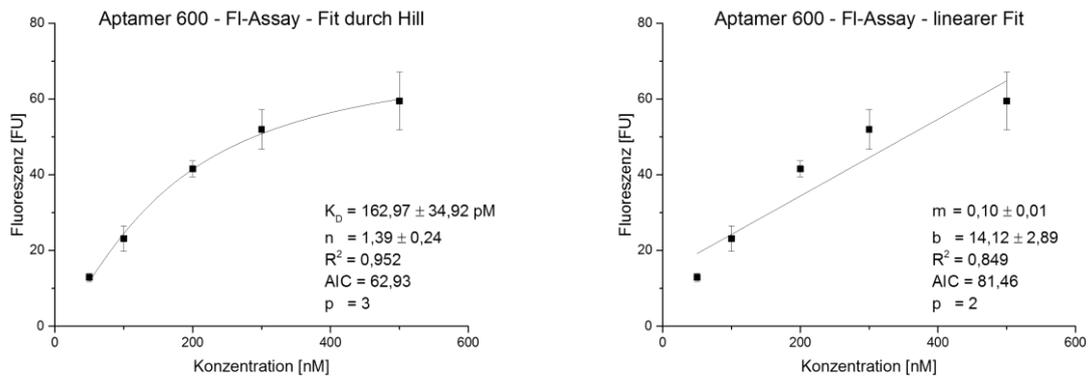


Abbildung 81: Zusammenfassung Fluoreszenzassay Aptamer 601, Vergleich unterschiedlicher Regressionen.
Laut AIC ist die Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung signifikant besser.

K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 602 mit einer Affinität gegen Lysozym (SPR)

Sensorchip: Amin-Sensorchip (SPR-AS-AMF)
 Laufpuffer: Weinpuffer (+0,05 % Tween-20)
 Immobilisiert: 484 pg Lysozym
 Referenzen: Sensoroberfläche (Blockierungsreagenz Ethanolamin) & Laufpuffer
 Injektionsvolumen: 125 µL
 Dissoziationszeit: 300 s
 Regeneration: 15 µL Precondition I-Puffer
 Auswertungszeitpunkt: 25/15/5s vor dem Ende der Injektion

Tabelle 69: Werte K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 602 mit einer Affinität gegen Lysozym (SPR).

Ggf. vorhandene Ausreißer wurden anhand des Grubbs-Test ($p = 0,05$) identifiziert.

Konzentration [nM]	R [RU]			Mittelwert ± Standardabweichung
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	
1	-1,68	0,15	-5,73	-2,42 ± 3,01
2,5	-3,44	1,57	-10,19	-4,02 ± 5,90
5	-7,77	-3,83	-6,3	-5,97 ± 1,99
7,5	-10,64	-7,52	-1,2	-6,45 ± 4,81
10	-2,19	-1,64	26,69	7,62 ± 16,52
15	31,38	44,18	52,78	42,78 ± 10,77
20	71,24	79,24	96,94	82,47 ± 13,15
30	112,27	116,15	116,44	114,95 ± 2,33
40	123,01	123,93	122,13	123,02 ± 0,90
50	120,85	139,3	136,33	132,16 ± 9,91
60	145,45	143,99	144,72	144,72 ± 1,03
75	157,97	155,02	144,7	152,56 ± 6,97
100	162,08	154,97	151,73	156,26 ± 5,29
200	182,61	177,91	181,07	180,53 ± 2,40

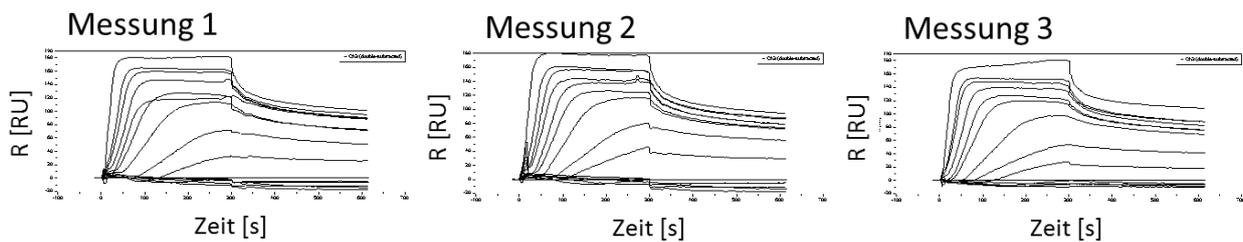


Abbildung 82: referenzierte Sensogramme K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 602 mit einer Affinität gegen Lysozym.

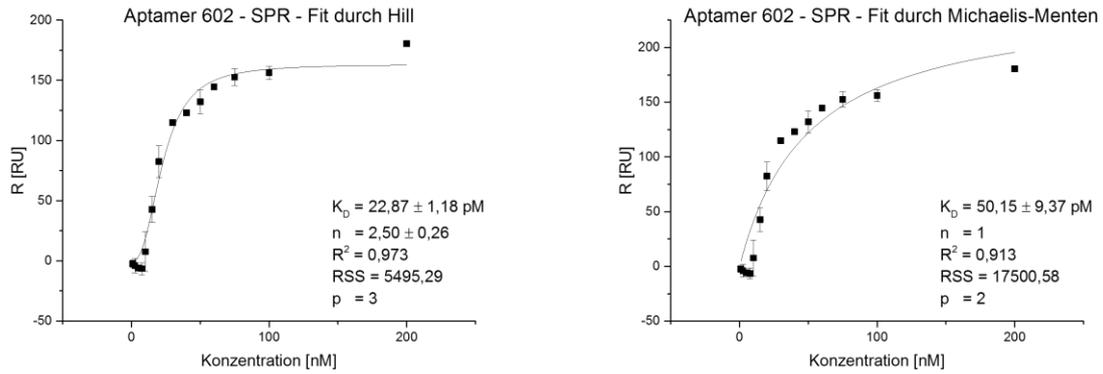


Abbildung 83: Zusammenfassung SPR-Spektroskopie Aptamer 602, Vergleich unterschiedlicher Regressionen. Laut F-Test ($F = 85,20$) ist die Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung signifikant ($p = 0,05$) besser.

K_D -Wert-Bestimmung Aptamer 602 mit einer Affinität gegen Lysozym (Fluoreszenzassay)

Tabelle 70: Werte K_D -Wert-Bestimmung Aptamer 602 mit einer Affinität gegen Lysozym (Fluoreszenzassay). Ggf. vorhandene Ausreißer wurden anhand des Grubbs-Test ($p = 0,05$) identifiziert.

Konzentration [nM]	Fluoreszenz [FU]				Mittelwert ± Standardabweichung
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	
50	9,872	9,615	9,863	11,185	10,13 ± 0,71
100	16,847		17,142	15,395	16,46 ± 0,94
200		25,562	25,562	28,033	26,39 ± 1,43
300	36,941	28,828	34,026	32,711	33,13 ± 3,37
500	35,116	31,076	35,179	35,767	34,28 ± 2,16

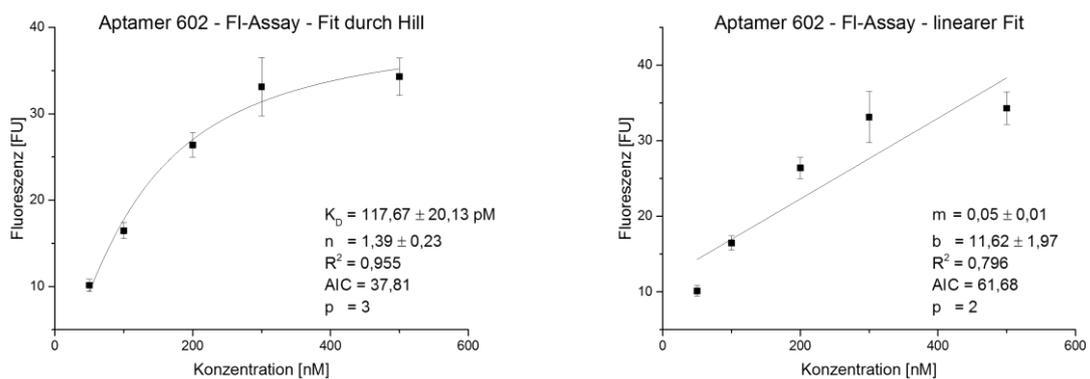


Abbildung 84: Zusammenfassung Fluoreszenzassay Aptamer 602, Vergleich unterschiedlicher Regressionen. Laut AIC ist die Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung signifikant besser.

K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 604 mit einer Affinität gegen Ovalbumin (SPR)

Sensorchip: Amin-Sensorchip (SPR-AS-AMF)
 Laufpuffer: Weinpuffer (+0,05 % Tween-20)
 Immobilisiert: 194 µg Ovalbumin
 Referenzen: Sensoroberfläche (Blockierungsreagenz Ethanolamin) & Laufpuffer
 Injektionsvolumen: 125 µL
 Dissoziationszeit: 300 s
 Regeneration: 15 µL Precondition I-Puffer
 Auswertungszeitpunkt: 25/15/5s vor dem Ende der Injektion

Tabelle 71: Werte K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 604 mit einer Affinität gegen Ovalbumin (SPR).
 Ggf. vorhandene Ausreißer wurden anhand des Grubbs-Test ($p = 0,05$) identifiziert.

Konzentration [nM]	R [RU]			Mittelwert ± Standardabweichung
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	
1	6,96	-7,47	-4,55	-1,69 ± 7,63
2,5	5,14	-3,29	1,87	1,24 ± 4,25
5	2,47	-1,64	-7,09	-2,09 ± 4,80
7,5	0,04	-2,55	-0,73	-1,08 ± 1,33
10	1,77	-4,73	-1,32	-1,43 ± 3,25
15	3,06	-5,36	4,06	0,59 ± 5,17
20	4,77	-2,42	2,81	1,72 ± 3,72
30	19,66	-1,57	2,35	6,81 ± 11,30
40	26,87	-0,98	15,89	13,93 ± 14,03
50	38,84	18,62	34,16	30,54 ± 10,58
60	51,44	28,25	46,32	42,00 ± 12,18
75	65,6	42,62	70,97	59,73 ± 15,06
100	81,24	55,18	92,82	76,41 ± 19,28
200	102,2	72,15	106,59	93,65 ± 18,75
300	107,36	87,34	116,03	103,58 ± 14,71
400	112,93	88,12	131,76	110,94 ± 21,89
500	119,56	90,79	140,7	117,02 ± 25,05

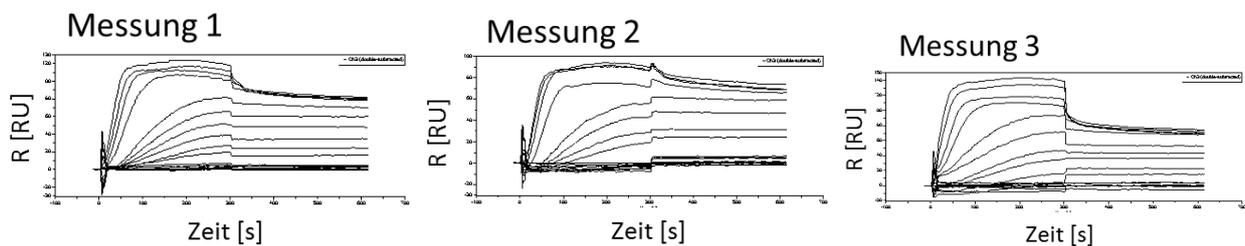


Abbildung 85: referenzierte Sensogramme K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 604 mit einer Affinität gegen Ovalbumin.

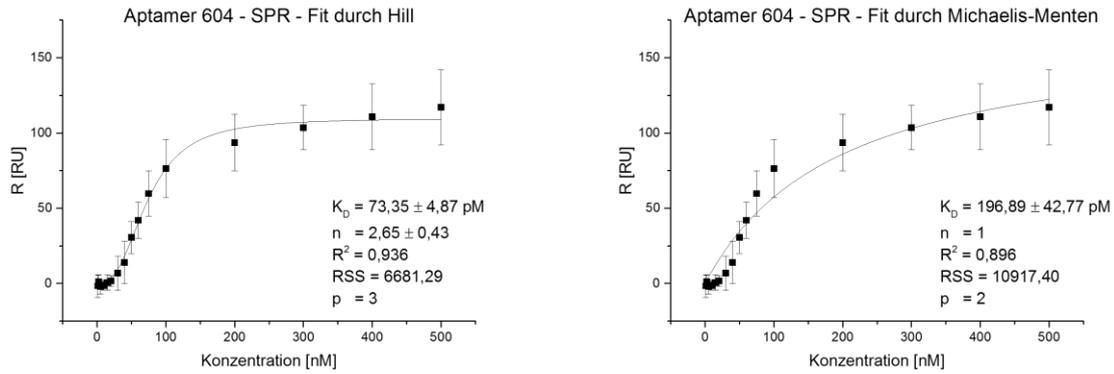


Abbildung 86: Zusammenfassung SPR-Spektroskopie Aptamer 604, Vergleich unterschiedlicher Regressionen. Laut F-Test ($F = 30,43$) ist die Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung signifikant ($p = 0,05$) besser.

K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 604 mit einer Affinität gegen Ovalbumin (Fluoreszenzassay)

Tabelle 72: Werte K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 604 mit einer Affinität gegen Ovalbumin (Fluoreszenzassay). Ggf. vorhandene Ausreißer wurden anhand des Grubbs-Test ($p = 0,05$) identifiziert.

Konzentration [nM]	Fluoreszenz [FU]					Mittelwert ± Standardabweichung
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	
50	21,210	18,803	23,931	22,350	20,765	21,41 ± 1,90
100	43,564	48,816	40,033	44,203	45,127	44,35 ± 3,16
200	75,989	83,381	82,516	84,407	80,454	81,35 ± 3,33
300	102,67	95,459	108,14	107,22	108,85	104,74 ± 5,58
500	109,00	101,84	127,57	113,97	125,55	115,59 ± 10,93

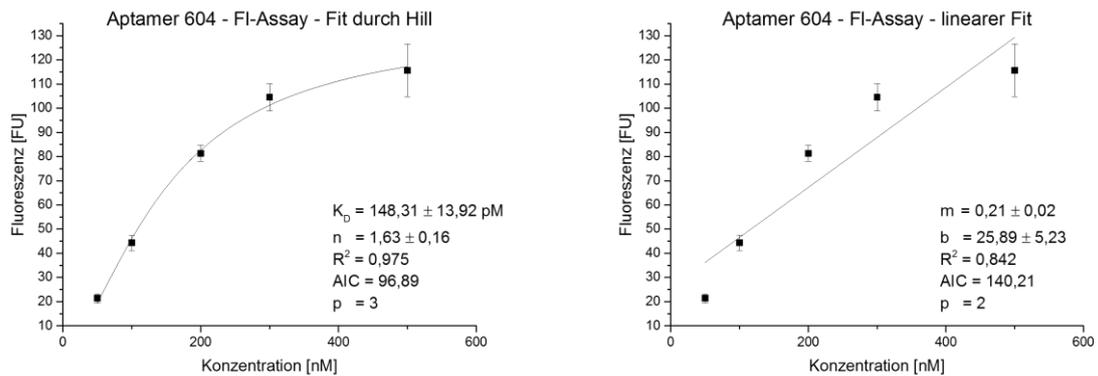


Abbildung 87: Zusammenfassung Fluoreszenzassay Aptamer 604, Vergleich unterschiedlicher Regressionen. Laut AIC ist die Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung signifikant besser.

K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 619 mit einer Affinität gegen Lysozym (SPR)

Sensorchip: Amin-Sensorchip (SPR-AS-AMF)
 Laufpuffer: Weinpuffer (+0,05 % Tween-20)
 Immobilisiert: 484 pg Lysozym
 Referenzen: Sensoroberfläche (Blockierungsreagenz Ethanolamin) & Laufpuffer
 Injektionsvolumen: 125 µL
 Dissoziationszeit: 300 s
 Regeneration: 15 µL Precondition I-Puffer
 Auswertungszeitpunkt: 25/15/5s vor dem Ende der Injektion

Tabelle 73: Werte K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 619 mit einer Affinität gegen Lysozym (SPR).
 Ggf. vorhandene Ausreißer wurden anhand des Grubbs-Test ($p = 0,05$) identifiziert.

Konzentration [nM]	R [RU]			Mittelwert ± Standardabweichung
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	
1	4,36	15,77	7,37	9,17 ± 5,91
2,5	34,5	40,2	41,19	38,63 ± 3,61
5	92,54	87,55	90,4	90,16 ± 2,50
7,5	142,54	130,47	149,65	140,89 ± 9,70
10	152,44	157,8	163,02	157,75 ± 5,29
15	172,21	177,14	174,35	174,57 ± 2,47
20	162,15	184,03	187,59	177,92 ± 13,78
30	175,22	189,72	194,41	186,45 ± 10,00
40	183,55	196,08	201,05	193,56 ± 9,02
50	191,78	201,09	201,29	198,05 ± 5,43
60	195,63	207,9	203,57	202,37 ± 6,22
75	198,29	206,94	202,79	202,67 ± 4,33
100	202,14	213,26	211,48	208,96 ± 5,97
200	229,04	206,13	237,8	224,32 ± 16,35

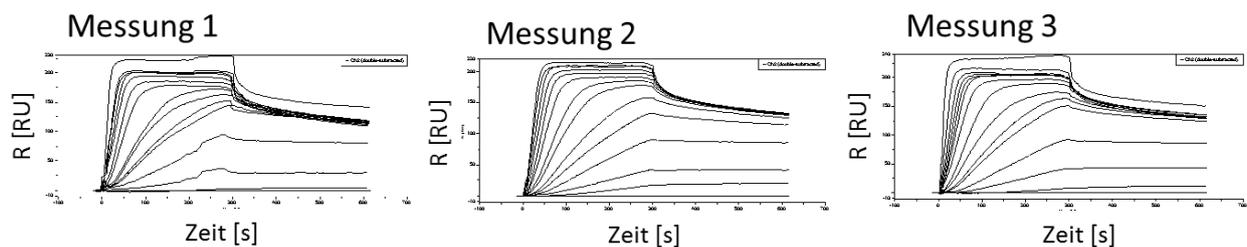


Abbildung 88: referenzierte Sensogramme K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 619 mit einer Affinität gegen Lysozym.

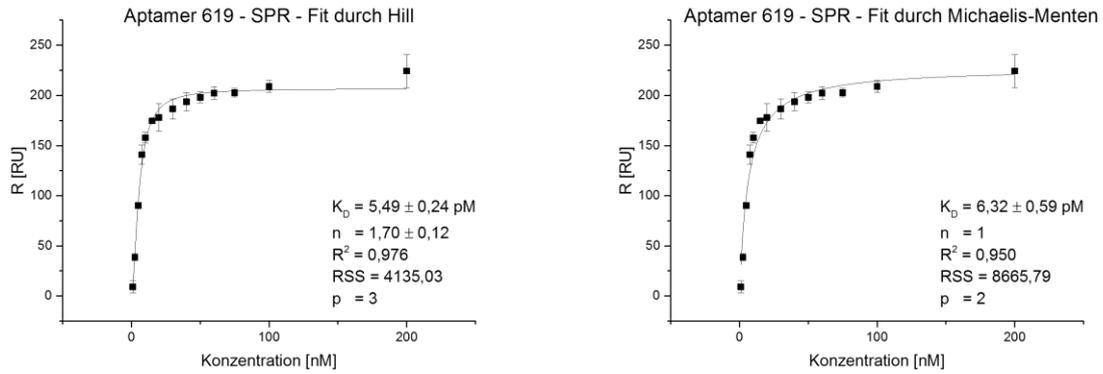


Abbildung 89: Zusammenfassung SPR-Spektroskopie Aptamer 619, Vergleich unterschiedlicher Regressionen. Laut F-Test ($F = 42,73$) ist die Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung signifikant ($p = 0,05$) besser.

K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 619 mit einer Affinität gegen Lysozym (Fluoreszenzassay)

Tabelle 74: Werte K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 619 mit einer Affinität gegen Lysozym (Fluoreszenzassay). Ggf. vorhandene Ausreißer wurden anhand des Grubbs-Test ($p = 0,05$) identifiziert.

Konzentration [nM]	Fluoreszenz [FU]				Mittelwert ± Standardabweichung
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	
50	14,509	13,055	11,376	9,706	12,16 ± 2,08
100	25,756	26,577	21,515	19,711	23,39 ± 3,31
200	43,323	38,378	40,855	40,925	40,87 ± 2,02
300	45,634	44,018	59,088	48,807	49,39 ± 6,77
500	31,846	46,983	59,406	65,729	50,99 ± 14,95

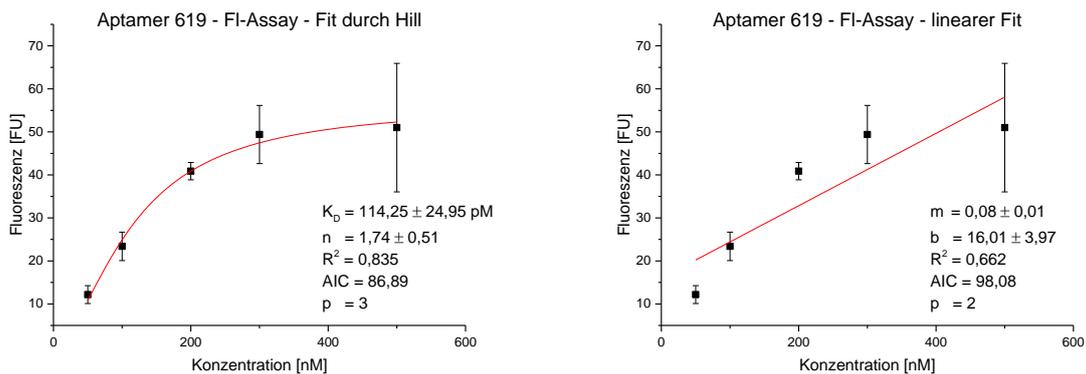


Abbildung 90: Zusammenfassung Fluoreszenzassay Aptamer 619, Vergleich unterschiedlicher Regressionen. Laut AIC ist die Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung signifikant besser.

K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 620 mit einer Affinität gegen Lysozym (SPR)

Sensorchip: Amin-Sensorchip (SPR-AS-AMF)
 Laufpuffer: Weinpuffer (+0,05 % Tween-20)
 Immobilisiert: 605 pg Lysozym (Messung 1), 666 pg Lysozym (Messung 2 & 3)
 Referenzen: Sensoroberfläche (Blockierungsreagenz Ethanolamin) & Laufpuffer
 Injektionsvolumen: 125 µL
 Dissoziationszeit: 300 s
 Regeneration: 15 µL Precondition I-Puffer
 Auswertungszeitpunkt: 25/15/5s vor dem Ende der Injektion

Tabelle 75: Werte K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 620 mit einer Affinität gegen Lysozym (SPR).
 Ggf. vorhandene Ausreißer wurden anhand des Grubbs-Test ($p = 0,05$) identifiziert.

Konzentration [nM]	R [RU]			Mittelwert ± Standardabweichung
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	
2,5	68,71	8,24	-43,58	11,12 ± 56,20
5	79,81	46,74	-0,12	42,14 ± 40,16
7,5	124,26	75,77	33,71	77,91 ± 45,31
10	135,48	116,27	71,59	107,78 ± 32,78
15	191,83	175,52	123,26	163,54 ± 35,82
20	218,95	173,57	131,74	174,75 ± 43,62
30	227,79	200,47	142,35	190,20 ± 43,64
40	221,84	212,55	145,62	193,34 ± 41,58
50	217,48	202,87	149,91	190,09 ± 35,55
60	234,93	201,23	145,09	193,75 ± 45,38
75	240,74	217,2	154,27	204,07 ± 44,71
100	245,81	214,53	161,33	207,22 ± 42,71
200	269,83	238,41	169,72	225,99 ± 51,20

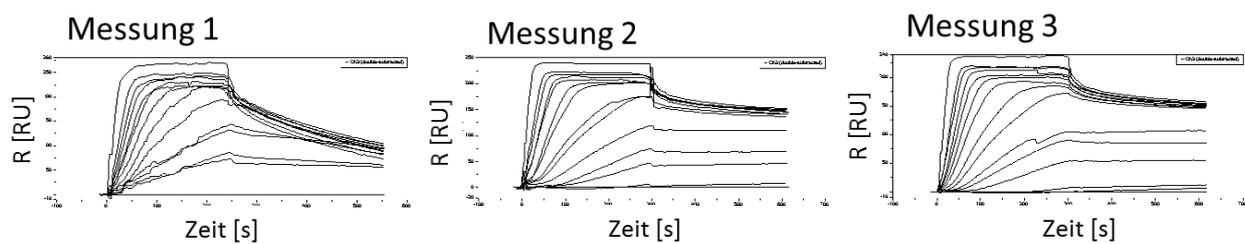


Abbildung 91: referenzierte Sensogramme K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 620 mit einer Affinität gegen Lysozym.

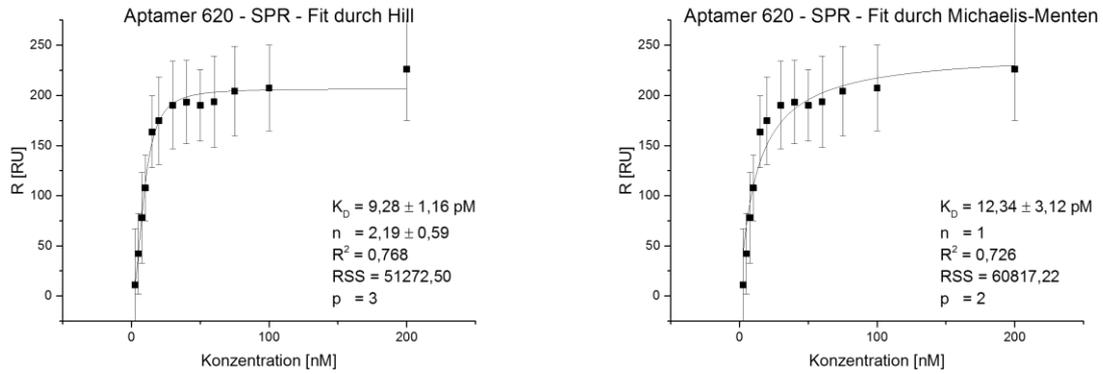


Abbildung 92: Zusammenfassung SPR-Spektroskopie Aptamer 620, Vergleich unterschiedlicher Regressionen.
Laut F-Test ($F = 6,70$) ist die Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung signifikant ($p = 0,05$) besser.

K_D -Wert-Bestimmung Aptamer 620 mit einer Affinität gegen Lysozym (Fluoreszenzassay)

Tabelle 76: Werte K_D -Wert-Bestimmung Aptamer 620 mit einer Affinität gegen Lysozym (Fluoreszenzassay).
Ggf. vorhandene Ausreißer wurden anhand des Grubbs-Test ($p = 0,05$) identifiziert.

Konzentration [nM]	Fluoreszenz [FU]				Mittelwert ± Standardabweichung
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	
50	9,78	13,123	13,111	9,313	11,33 ± 2,07
100	16,357	17,353	20,655	20,583	18,74 ± 2,21
200	21,855	29,825	26,056	26,833	26,14 ± 3,29
300	24,268		26,937	32,632	27,95 ± 4,27
500	23,678	24,064	27,224	21,707	24,17 ± 2,28

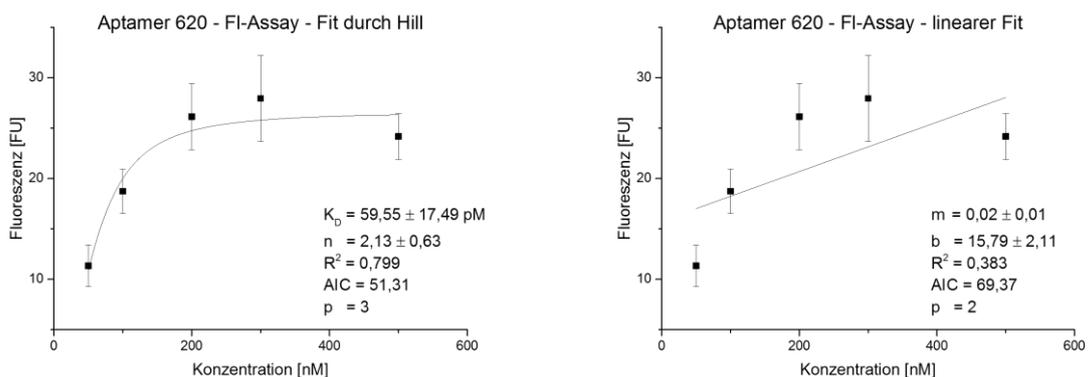


Abbildung 93: Zusammenfassung Fluoreszenzassay Aptamer 620, Vergleich unterschiedlicher Regressionen.
Laut AIC ist die Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung signifikant besser.

K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 623 mit einer Affinität gegen Lysozym (SPR)

Sensorchip: Amin-Sensorchip (SPR-AS-AMF)
 Laufpuffer: Weinpuffer (+0,05 % Tween-20)
 Immobilisiert: 484 pg Lysozym
 Referenzen: Sensoroberfläche (Blockierungsreagenz Ethanolamin) & Laufpuffer
 Injektionsvolumen: 125 µL
 Dissoziationszeit: 300 s
 Regeneration: 15 µL Precondition I-Puffer
 Auswertungszeitpunkt: 25/15/5s vor dem Ende der Injektion

Tabelle 77: Werte K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 623 mit einer Affinität gegen Lysozym (SPR).
 Ggf. vorhandene Ausreißer wurden anhand des Grubbs-Test ($p = 0,05$) identifiziert.

Konzentration [nM]	R [RU]			Mittelwert ± Standardabweichung
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	
1	0,31	-3,07	7,65	0,31 ± 5,48
2,5	-9,47	14,63	-4,42	0,25 ± 12,71
5	-10,17	11,08	-9,91	-3,00 ± 12,19
7,5	-10,24	-20,46	3,15	-9,18 ± 11,84
10	2,94	-6,9	17,43	4,49 ± 12,24
15	46,03	53,27	65,44	54,91 ± 9,81
20	75,94	75,73	79,56	77,08 ± 2,15
30	110,04	102,59	104,28	105,64 ± 3,91
40	116,34	115,45	111,35	114,38 ± 2,66
50	127,4	129,89	132,23	129,84 ± 2,42
60	131,65	128,97	132,92	131,18 ± 2,02
75	138,57	137,85	151,71	142,71 ± 7,80
100	143,94	129,24	154,68	142,62 ± 12,77
200	154,92	172,41	177,11	168,15 ± 11,69

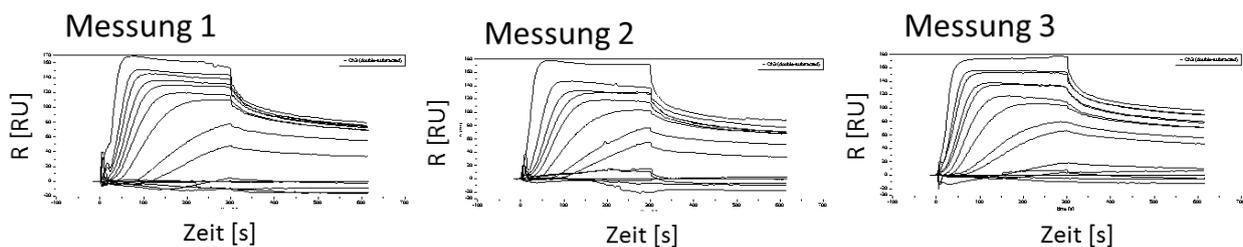


Abbildung 94: referenzierte Sensogramme K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 623 mit einer Affinität gegen Lysozym.

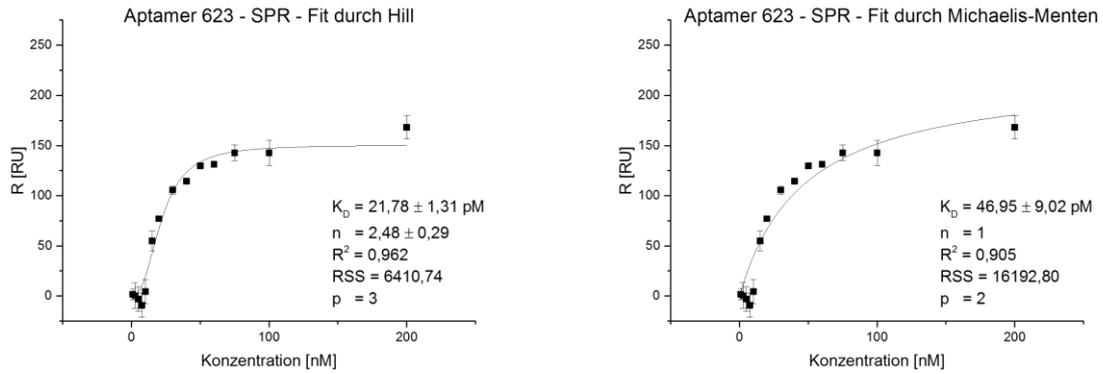


Abbildung 95: Zusammenfassung SPR-Spektroskopie Aptamer 623, Vergleich unterschiedlicher Regressionen. Laut F-Test ($F = 59,51$) ist die Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung signifikant ($p = 0,05$) besser.

K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 623 mit einer Affinität gegen Lysozym (Fluoreszenzassay)

Tabelle 78: Werte K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 623 mit einer Affinität gegen Lysozym (Fluoreszenzassay). Ggf. vorhandene Ausreißer wurden anhand des Grubbs-Test ($p = 0,05$) identifiziert.

Konzentration [nM]	Fluoreszenz [FU]				Mittelwert ± Standardabweichung
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	
50	11,549	13,514	10,58	13,345	12,25 ± 1,42
100	18,197	21,129	21,311	20,902	20,38 ± 1,47
200	37,749	39,483	35,075	39,813	38,03 ± 2,17
300	48,057	50,669	43,251	49,019	47,75 ± 3,19
500	52,344	53,586	46,58	46,473	49,75 ± 3,75

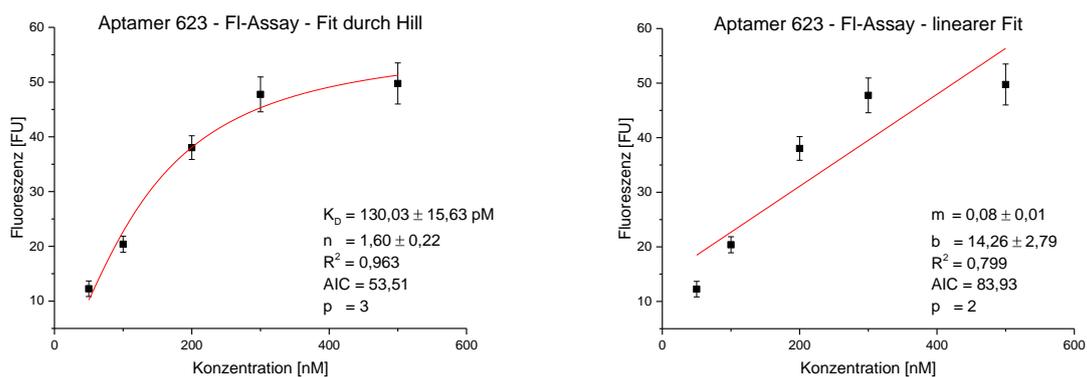


Abbildung 96: Zusammenfassung Fluoreszenzassay Aptamer 623, Vergleich unterschiedlicher Regressionen. Laut AIC ist die Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung signifikant besser.

K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 628 mit einer Affinität gegen Ovalbumin (SPR)

Sensorchip: Amin-Sensorchip (SPR-AS-AMF)
 Laufpuffer: Weinpuffer (+0,05 % Tween-20)
 Immobilisiert: 302 pg Ovalbumin
 Referenzen: Sensoroberfläche (Blockierungsreagenz Ethanolamin) & Laufpuffer
 Injektionsvolumen: 125 µL
 Dissoziationszeit: 300 s
 Regeneration: 15 µL Precondition I-Puffer
 Auswertungszeitpunkt: 25/15/5s vor dem Ende der Injektion

Tabelle 79: Werte K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 628 mit einer Affinität gegen Ovalbumin (SPR).
 Ggf. vorhandene Ausreißer wurden anhand des Grubbs-Test (p = 0,05) identifiziert.

Konzentration [nM]	R [RU]			Mittelwert ± Standardabweichung
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	
1	2,32	5,69	8,5	5,50 ± 3,09
2,5	2,98	-8,21	15	3,26 ± 11,61
5	9,28	34,66	24,71	22,88 ± 12,79
7,5	20,56	39,25	30,93	30,25 ± 9,36
10	25,95	63,45	49,84	46,41 ± 18,98
15	62,29	96,53	53,23	70,68 ± 22,84
20	83,74/80,15	109,24	74,35	86,87 ± 18,70
30	116,59	113,63	94,67	108,30 ± 11,89
40	129,99	116,57	117,23	121,26 ± 7,56
50	136,11	124,57	118,61	126,43 ± 8,90
60	138,9	126,71	121,74	129,12 ± 8,83
75	135,83	129,48	126,75	130,69 ± 4,66
100	139,55	137,37	132,38	136,43 ± 3,68
200		152,12	152,17	152,15 ± 0,04

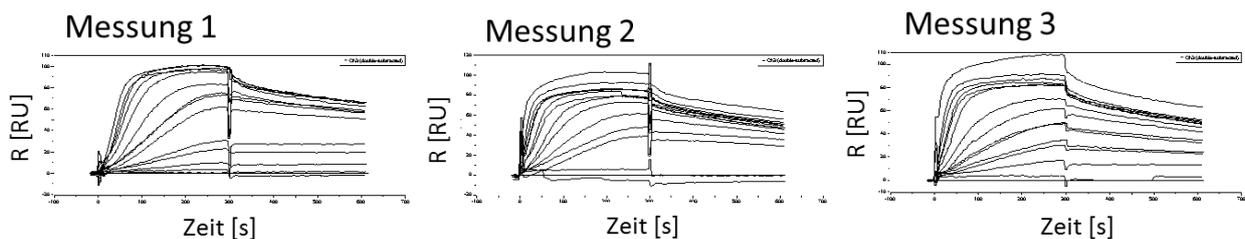


Abbildung 97: referenzierte Sensogramme K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 628 mit einer Affinität gegen Ovalbumin.

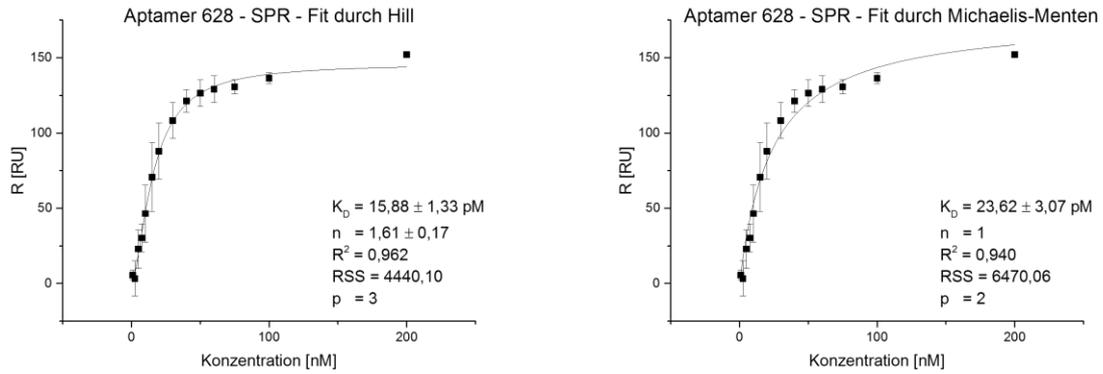


Abbildung 98: Zusammenfassung SPR-Spektroskopie Aptamer 628, Vergleich unterschiedlicher Regressionen. Laut F-Test ($F = 17,37$) ist die Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung signifikant ($p = 0,05$) besser.

K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 628 mit einer Affinität gegen Ovalbumin (Fluoreszenzassay)

Tabelle 80: Werte K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 628 mit einer Affinität gegen Ovalbumin (Fluoreszenzassay). Ggf. vorhandene Ausreißer wurden anhand des Grubbs-Test ($p = 0,05$) identifiziert.

Konzentration [nM]	Fluoreszenz [FU]					Mittelwert ± Standardabweichung
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	
50	21,896	21,698	23,071	24,780	24,042	23,10 ± 1,33
100	47,727	41,716	39,810	43,288	44,832	43,47 ± 3,02
200	83,653	76,275	82,728	83,348	90,986	83,40 ± 5,22
300	124,51	111,77	121,51	116,48	125,05	119,86 ± 5,66
500	133,11	136,84	147,44	159,35	154,22	146,19 ± 11,16

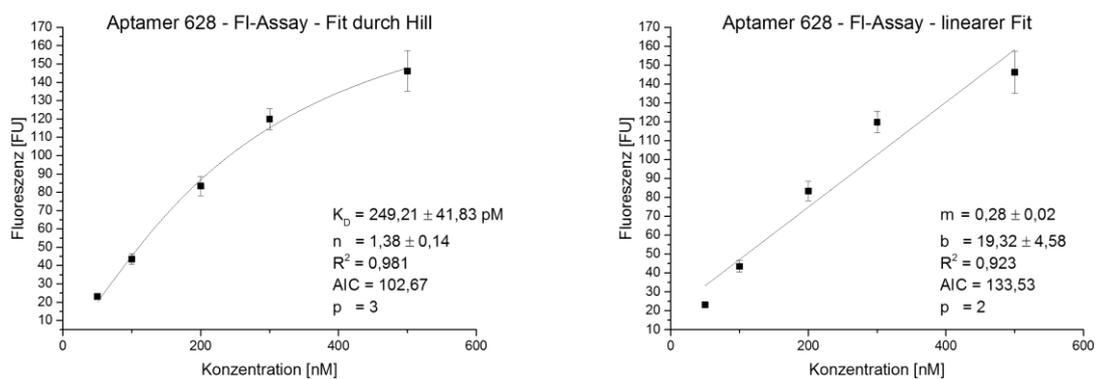


Abbildung 99: Zusammenfassung Fluoreszenzassay Aptamer 628, Vergleich unterschiedlicher Regressionen. Laut AIC ist die Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung signifikant besser.

K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 678 mit einer Affinität gegen Ovalbumin (SPR)

Sensorchip: Amin-Sensorchip (SPR-AS-AMF)
 Laufpuffer: Weinpuffer (+0,05 % Tween-20)
 Immobilisiert: 424 pg Ovalbumin
 Referenzen: Sensoroberfläche (Blockierungsreagenz Ethanolamin) & Laufpuffer
 Injektionsvolumen: 125 µL
 Dissoziationszeit: 300 s
 Regeneration: 15 µL Precondition I-Puffer
 Auswertungszeitpunkt: 25/15/5s vor dem Ende der Injektion

Tabelle 81: Werte K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 678 mit einer Affinität gegen Ovalbumin (SPR).
 Ggf. vorhandene Ausreißer wurden anhand des Grubbs-Test (p = 0,05) identifiziert.

Konzentration [nM]	R [RU]			Mittelwert ± Standardabweichung
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	
1	15,3	17,06	--	16,18 ± 1,24
2,5	25,43	21,35	41,53	29,44 ± 10,67
5	36,72	34,17	49,72	40,20 ± 8,34
7,5	43,01	41,78	84,65	56,48 ± 24,40
10	50,09	61,62	110,16	73,96 ± 31,88
15	76,83	113,12	104,83	98,26 ± 19,02
20	82,91	122,83	111,44	105,73 ± 20,56
30	123,89	129,81	117,69	123,80 ± 6,06
40	128,05	137,66	129,93	131,88 ± 5,09
50	126,18	136,9	132,13	131,74 ± 5,37
60	133,5	143,07	121,4	132,66 ± 10,86
75	136,67	138,13	126,77	133,86 ± 6,18
100	138,92	145,93	135,34	140,06 ± 5,39
200	153,45	146,29	140,76	146,83 ± 6,36

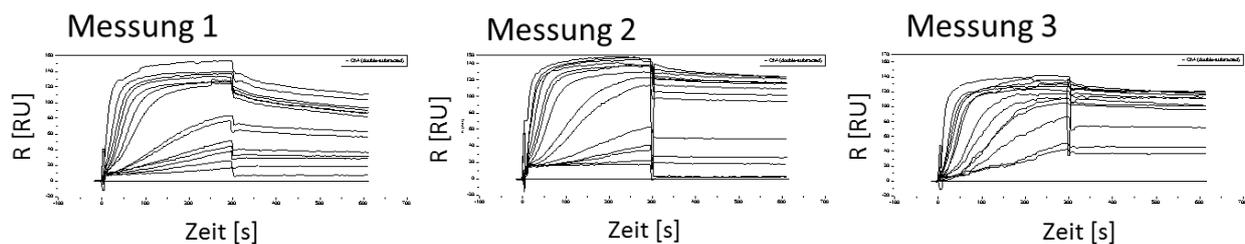


Abbildung 100: referenzierte Sensogramme K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 678 mit einer Affinität gegen Ovalbumin.

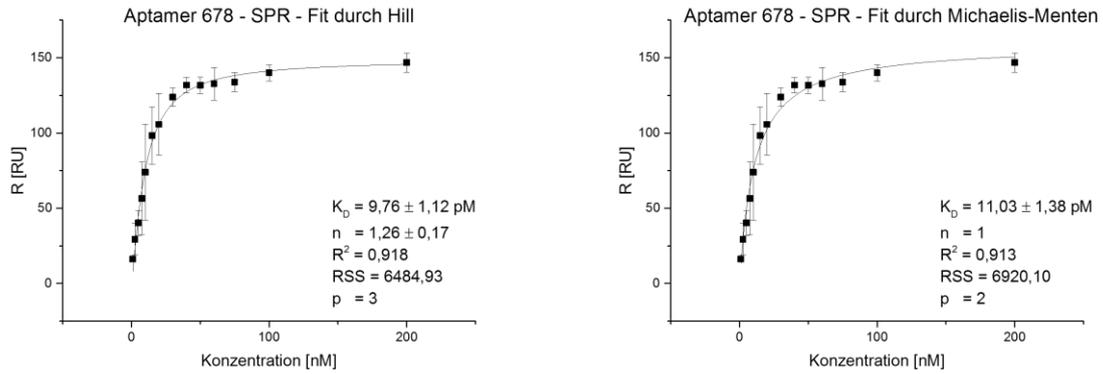


Abbildung 101: Zusammenfassung SPR-Spektroskopie Aptamer 678, Vergleich unterschiedlicher Regressionen.
Laut F-Test ($F = 2,55$) ist die Regression unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung signifikant ($p = 0,05$) besser.

K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 678 mit einer Affinität gegen Ovalbumin (Fluoreszenzassay)

Tabelle 82: Werte K_D-Wert-Bestimmung Aptamer 678 mit einer Affinität gegen Ovalbumin (Fluoreszenzassay).
Ggf. vorhandene Ausreißer wurden anhand des Grubbs-Test ($p = 0,05$) identifiziert.

Konzentration [nM]	Fluoreszenz [FU]					Mittelwert ± Standardabweichung
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	
50	18,931	20,491	21,590	24,614	24,139	21,95 ± 2,41
100	36,444	41,684	43,813	42,903	50,867	43,41 ± 5,18
200	82,079	86,652	90,169	93,048	96,167	89,62 ± 5,49
300	105,88	103,96	132,68	119,85	131,39	118,75 ± 13,60
500	141,74	155,16	170,82	161,02	168,77	159,50 ± 11,73

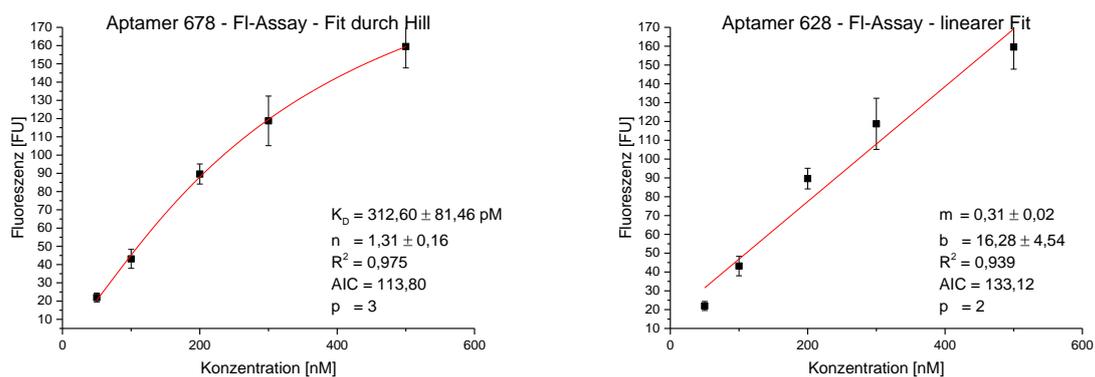


Abbildung 102: Zusammenfassung Fluoreszenzassay Aptamer 678, Vergleich unterschiedlicher Regressionen.
Laut AIC ist die Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung signifikant besser.

8.4 Antikörperbasierter SPR-Biosensor

Antikörperbasierter SPR-Biosensor zur Detektion von Ovalbumin in Wein.

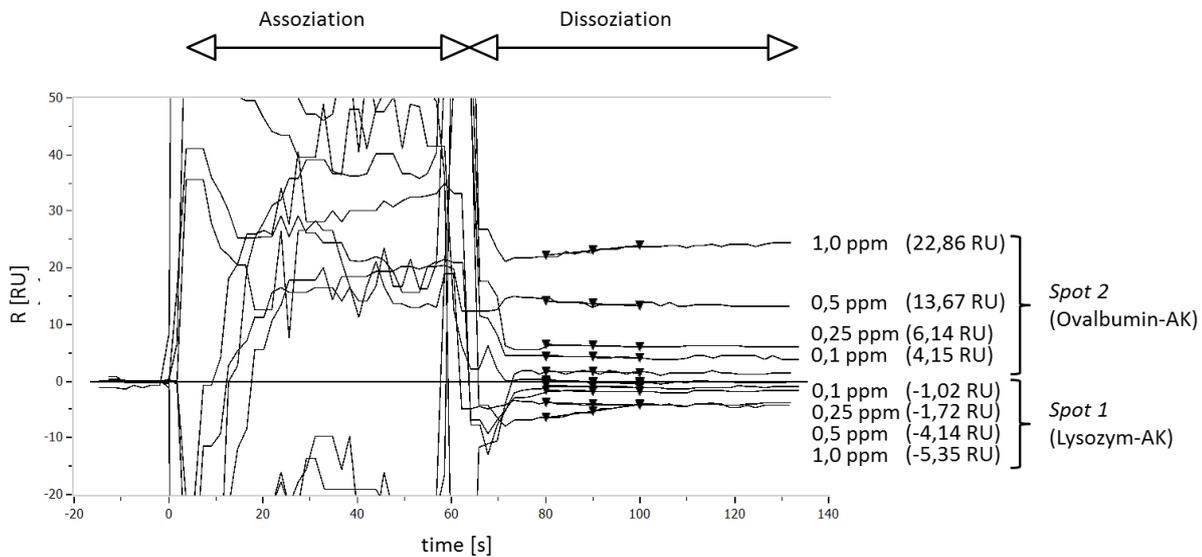


Abbildung 103: Bindungsfähigkeit des Biosensor von Ovalbumin in Weinproben.

Dargestellt sind Sensogramme unterschiedlicher konzentrierter Ovalbuminlösungen (0,1/0,25/0,5/1,0 ppm) in Wein (Weißwein, Monfleur Fruit, siehe Tabelle 33), Laufpuffer PBS (+0,5 % Tween-20). Resultierende Sensogramme mit Referenzierung (Referenzkanal (Ethanolamin) + Blindproben), während der Injektion (Assoziation) resultieren weiterhin keine auswertbaren Signale. Infolge der Interaktion zwischen Antikörper und Antigen können Unterschiede zwischen den spots identifiziert werden. Die Veränderungen des SPR-Winkels (R) sind in Klammern angegeben.

Regressionsfunktion des antikörperbasierten Biosensors zur Detektion von Lysozym in PBS.

$$y = \frac{8,99 - 102,31}{1 + \frac{x}{0,08}^{2,07}} + 102,31$$

$$R^2 = 0,986$$

Nachweis- und Bestimmungsgrenze des antikörperbasierten Biosensors zur Detektion von Lysozym in PBS.

Nullwerte (normiert auf Mittelwert 0,5 ppm (106,37 RU):

Tabelle 83: Nullwerte des antikörperbasierten Biosensors zur Detektion von Lysozym in PBS.

Nullwerte [RU]		
0,39	1,91	1,12
0,10	2,91	0,50
-0,39	1,37	0,36
0,11	1,50	0,45
-0,78	1,58	0,36
-1,18	1,22	-0,09
-1,33		

Mittelwert $\bar{x} = 0,53$ RU

Standardabweichung $\sigma = 1,08$ RU

$$\text{LOD} = 0,53 \text{ RU} + 3 \times 1,08 \text{ RU} = 3,76 \text{ RU}$$

$$\text{LOQ} = 0,53 \text{ RU} + 9 \times 1,08 \text{ RU} = 10,23 \text{ RU} \hat{=} 0,009 \text{ ppm}$$

Wiederfindung des antikörperbasierten Biosensors zur Detektion von Lysozym in PBS.

Tabelle 84: Ergebnisse der Wiederfindung des antikörperbasierten Biosensors zur Detektion von Lysozym in PBS.

Ergebnisse der Vermessung einer Verdünnungsreihe von Lysozym mit dem antikörperbasierten Biosensor zur Detektion von Lysozym (je 50 µL, Laufpuffer: PBS (+0,5 % Tween-20)). Zur Berechnung wurde der Mittelwert des Signals an drei Zeitpunkten (20/30/40 s) nach Abschluss der Injektion (Dissoziationszeit) aus den Sensogrammen extrahiert und die Daten gegenüber der Sensoroberfläche und periodisch injizierten Pufferlösungen referenziert. Die erhaltenen Daten wurden auf den Mittelwert der höchsten Konzentration normiert. Zur Berechnung (Spalte 5) wurde die oben angegebene 4-Parameter-Regression genutzt.

Konzentration [ppm]	gemessenes Signal in Dissoziationszeit [rel. RU]			berechnete Konzentration [ppm]	Wiederfindung [%]
	Messung 1	Messung 2	Messung 3		
0,500	99,25	100,71	100,4	0,453	90,65
0,330	98,35	99,71	97,16	0,349	105,68
0,200	89,66	89,43	88,95	0,186	92,81
0,160	88,21	86,14	85,79	0,167	104,39
0,125	80,47	76,26	83,28	0,135	107,62
0,100	73,24	56,12	67,41	0,095	94,75
0,066	55,96	40,31	50,85	0,067	101,47
0,050	36,25	30,32	35,53	0,047	94,69
0,033	25,53	18,36	31,54	0,036	109,39
0,025	18,38	14,63	18,45	0,025	99,02
0,020	14,90	18,95	12,68	0,022	109,98
0,013	9,50	10,60	8,81	0,007	53,55

Regressionsfunktion des antikörperbasierten Biosensors zur Detektion von Lysozym in Wein.

$$y = \frac{6,53 - 119,46}{1 + \frac{x}{1,99}^{1,01}} + 119,46$$

$$R^2 = 0,993$$

Nachweis- und Bestimmungsgrenze des antikörperbasierten Biosensors zur Detektion von Lysozym in Wein.

Nullwerte (normiert auf Mittelwert 0,5 ppm (106,37 RU):

Tabelle 85: Nullwerte des antikörperbasierten Biosensors zur Detektion von Lysozym in Wein.

Ausreißer wurden anhand des Grubbs-Test ($p = 0,05$) identifiziert und sind in der Tabelle durchgestrichen angegeben.

Nullwerte [RU]		
4,93	5,44	5,28
5,56	3,98	5,72
4,36	4,34	6,00
5,41	5,16	5,51
6,02	4,77	5,29

Mittelwert $\bar{x} = 2,04$ RU

Standardabweichung $\sigma = 0,25$ RU

LOD = $2,04$ RU + $3 \times 0,25$ RU = $7,13$ RU $\triangleq 0,01$ ppm

LOQ = $2,04$ RU + $9 \times 0,25$ RU = $10,97$ RU $\triangleq 0,08$ ppm

Wiederfindung des antikörperbasierten Biosensors zur Detektion von Lysozym in Wein.

Tabelle 86: Ergebnisse der Wiederfindung des antikörperbasierten Biosensors zur Detektion von Lysozym in Wein.

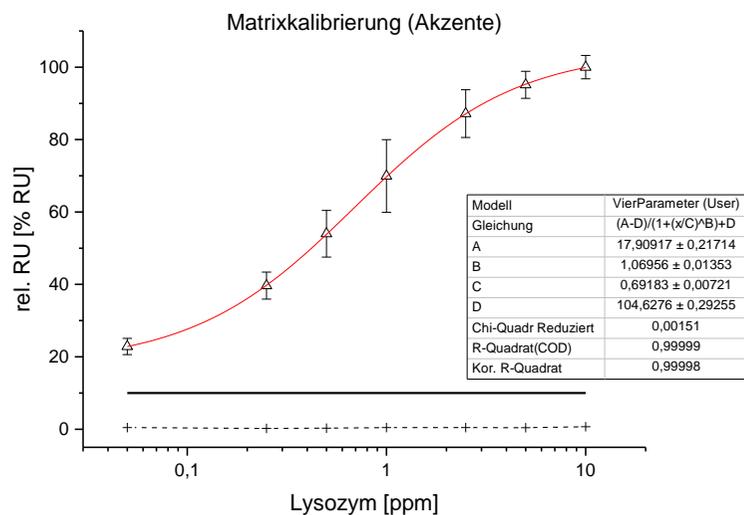
Ergebnisse der Vermessung einer Verdünnungsreihe von Lysozym mit dem antikörperbasierten Biosensor zur Detektion von Lysozym in Wein (je 50 μ L Weißwein, Monfleur Fruit, siehe Tabelle 33, Laufpuffer: PBS (+0,5 % Tween-20)). Zur Berechnung wurde der Mittelwert des Signals an drei Zeitpunkten (20/30/40 s) nach Abschluss der Injektion (Dissoziationszeit) aus den Sensogrammen extrahiert und die Daten gegenüber der Sensoroberfläche referenziert. Die erhaltenen Daten wurden auf den Mittelwert der höchsten Konzentration normiert. Zur Berechnung (Spalte 5) wurde die oben angegebene 4-Parameter-Regression genutzt.

Konzentration [ppm]	gemessenes Signal in Dissoziationszeit [rel. RU]			berechnete Konzentration [ppm]	Wiederfindung [%]
	Messung 1	Messung 2	Messung 3		
10,00	105,09	96,49	98,43	9,43	94,32
5,00	93,12	85,64	89,65	5,45	109,10
2,50	70,94	65,04	69,45	2,41	96,54
1,00	44,72	42,6	42,7	0,97	96,81
0,50	31,22	25,65	31,75	0,52	103,01
0,25	19,88	18,25	21,14	0,27	107,39
0,05	9,78	6,36	9,7	0,04	77,37

Tabelle 87: Daten Matrixkalibration Weißwein Akzente.

Anwendung des antikörperbasierten SPR-Biosensors zur Detektion von Lysozym (10/5/2,5/1/0,5/0,25/0,05 ppm) in Weißwein (Akzente, siehe Tabelle 33). Die Messwerte der unterschiedlichen Messungen (n≥3) wurden auf den Mittelwert der höchsten Konzentration normiert. Die in Abbildung 104 angegebene Regression wurde zur Berechnung des relativen Fehlers genutzt.

Konzentration [ppm]	gemessenes Signal in Dissoziationszeit [RU]			normalisiertes Signal in Dissoziationszeit [rel. RU]			Mittelwert [rel. RU]	Standardabweichung [rel. RU]	relativer Fehler
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 1	Messung 2	Messung 3			
10,00	76,83	76,22	72,35	102,26	101,45	96,30	100,00	3,23	0,68
5,00	69,03	74,54	70,87	91,88	99,21	94,33	95,14	3,73	0,42
2,50	60,03	69,70	66,73	79,90	92,77	88,82	87,16	6,59	0,44
1,00	45,06	52,43	60,15	59,97	69,78	80,06	69,94	10,04	0,45
0,50	36,26	39,64	45,81	48,26	52,76	60,97	54,00	6,45	0,29
0,25	27,35	29,18	32,86	36,40	38,84	43,74	39,66	3,74	0,21
0,05	16,75	19,02	15,72	22,29	25,31	20,92	22,84	2,25	0,45



$$y = \frac{17,91 - 104,63}{1 + \frac{x}{0,69}^{1,07}} + 104,63$$

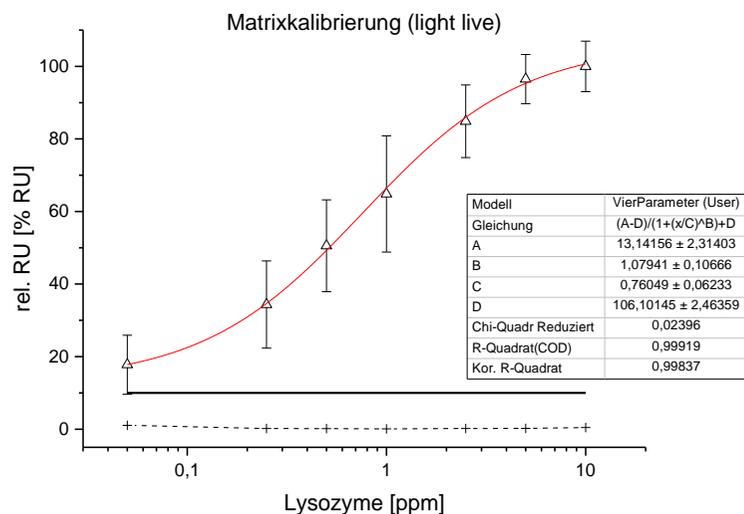
Abbildung 104: Matrixkalibration Weißwein Akzente.

Anwendung des antikörperbasierten SPR-Biosensors zur Detektion von Lysozym (10/5/2,5/1/0,5/0,25/0,05 ppm) in Weißwein (Akzente, siehe Tabelle 33). Die Messwerte der unterschiedlichen Messungen (n≥3) wurden normiert, die resultierenden Mittelwerte sowie Standardabweichungen zur Berechnung einer Regression unter Verwendung der 4-Parameter-Gleichung genutzt. Die gepunktete Linie stellt den Verlauf des relativen Fehlers dar, die durchgezogene schwarze Linie ist zur Verdeutlichung eines Niveaus von 10 % eingezeichnet.

Tabelle 88: Daten Matrixkalibration Weißwein light live.

Anwendung des antikörperbasierten SPR-Biosensors zur Detektion von Lysozym (10/5/2,5/1/0,5/0,25/0,05 ppm) in Weißwein (light live, siehe Tabelle 33). Die Messwerte der unterschiedlichen Messungen (n≥3) wurden auf den Mittelwert der höchsten Konzentration normiert. Die in Abbildung 105 angegebene Regression wurde zur Berechnung des relativen Fehlers genutzt.

Konzentration [ppm]	gemessenes Signal in Dissoziationszeit [RU]			normalisiertes Signal in Dissoziationszeit [rel. RU]			Mittelwert [rel. RU]	Standardabweichung [rel. RU]	relativer Fehler
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 1	Messung 2	Messung 3			
10,00	78,78	71,59	68,93	107,77	97,93	94,30	100,00	6,97	1,26
5,00	68,64	76,17	66,83	93,90	104,20	91,42	96,51	6,78	0,66
2,50	56,09	70,21	59,81	76,73	96,05	81,82	84,87	10,01	0,59
1,00	37,27	60,21	44,70	50,98	82,37	61,15	64,83	16,01	0,65
0,50	32,04	47,62	31,21	43,83	65,14	42,69	50,56	12,65	0,53
0,25	24,28	34,30	16,77	33,21	46,92	22,94	34,36	12,03	0,67
0,05	16,28	16,57	6,15	22,27	22,67	8,41	17,78	8,12	1,69



$$y = \frac{13,14 - 106,10}{1 + \frac{x}{0,76}^{1,08}} + 106,10$$

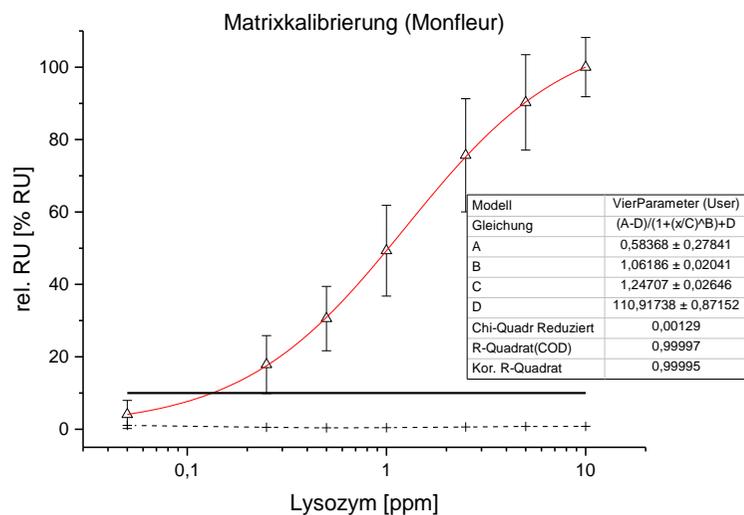
Abbildung 105: Matrixkalibrationen Weißwein light live.

Anwendung des antikörperbasierten SPR-Biosensors zur Detektion von Lysozym (10/5/2,5/1/0,5/0,25/0,05 ppm) in Weißwein (light live, siehe Tabelle 33). Die Messwerte der unterschiedlichen Messungen (n≥3) wurden normiert, die resultierenden Mittelwerte sowie Standardabweichungen zur Berechnung einer Regression unter Verwendung der 4-Parameter-Gleichung genutzt. Die gepunktete Linie stellt den Verlauf des relativen Fehlers dar, die durchgezogene schwarze Linie ist zur Verdeutlichung eines Niveaus von 10 % eingezeichnet.

Tabelle 89: Daten Matrixkalibration Weißwein Monfleur.

Anwendung des antikörperbasierten SPR-Biosensors zur Detektion von Lysozym (10/5/2,5/1/0,5/0,25/0,05 ppm) in Weißwein (Monfleur, siehe Tabelle 33). Die Messwerte der unterschiedlichen Messungen (n≥3) wurden auf den Mittelwert der höchsten Konzentration normiert. Die in Abbildung 106 angegebene Regression wurde zur Berechnung des relativen Fehlers genutzt.

Konzentration [ppm]	gemessenes Signal in Dissoziationszeit [RU]			normalisiertes Signal in Dissoziationszeit [rel. RU]			Mittelwert [rel. RU]	Standardabweichung [rel. RU]	relativer Fehler
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 1	Messung 2	Messung 3			
10,00	51,58	60,77	56,16	91,83	108,19	99,98	100,00	8,18	0,78
5,00	42,55	56,99	52,57	75,75	101,46	93,59	90,27	13,17	0,74
2,50	32,36	47,66	47,48	57,61	84,85	84,53	75,66	15,63	0,61
1,00	19,59	31,22	32,28	34,88	55,58	57,47	49,31	12,53	0,43
0,50	11,41	20,1	19,99	20,31	35,78	35,59	30,56	8,88	0,38
0,25	4,84	12,46	12,78	8,62	22,18	22,75	17,85	8,00	0,53
0,05	-0,22	3,43	3,65	-0,39	6,11	6,50	4,07	3,87	1,07



$$y = \frac{0,58 - 110,92}{1 + \frac{x}{1,25}^{1,06}} + 110,92$$

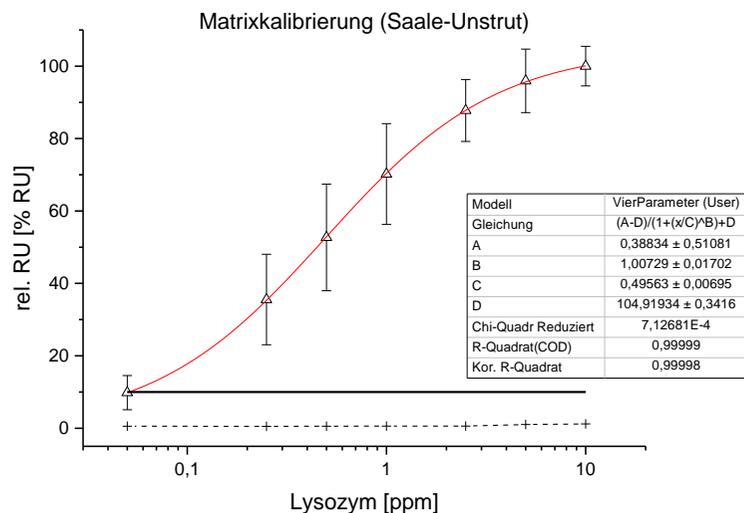
Abbildung 106: Matrixkalibrationen Weißwein Monfleur.

Anwendung des antikörperbasierten SPR-Biosensors zur Detektion von Lysozym (10/5/2,5/1/0,5/0,25/0,05 ppm) in Weißwein (Monfleur, siehe Tabelle 33). Die Messwerte der unterschiedlichen Messungen (n≥3) wurden normiert, die resultierenden Mittelwerte sowie Standardabweichungen zur Berechnung einer Regression unter Verwendung der 4-Parameter-Gleichung genutzt. Die gepunktete Linie stellt den Verlauf des relativen Fehlers dar, die durchgezogene schwarze Linie ist zur Verdeutlichung eines Niveaus von 10 % eingezeichnet.

Tabelle 90: Daten Matrixkalibration Weißwein Saale-Unstrut.

Anwendung des antikörperbasierten SPR-Biosensors zur Detektion von Lysozym (10/5/2,5/1/0,5/0,25/0,05 ppm) in Weißwein (Saale-Unstrut, siehe Tabelle 33). Die Messwerte der unterschiedl. Messungen (n≥3) wurden auf den Mittelwert der höchsten Konzentration normiert. Die in Abbildung 107 angegebene Regression wurde zur Berechnung des relativen Fehlers genutzt.

Konzentration [ppm]	gemessenes Signal in Dissoziationszeit [RU]			normalisiertes Signal in Dissoziationszeit [rel. RU]			Mittelwert [rel. RU]	Standardabweichung [rel. RU]	relativer Fehler
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 1	Messung 2	Messung 3			
10,00	59,06	65,86	61,95	94,81	105,73	99,45	100,00	5,48	1,18
5,00	53,79	64,48	61,02	86,35	103,52	97,96	95,94	8,76	1,03
2,50	48,55	58,25	57,21	77,94	93,51	91,84	87,77	8,55	0,59
1,00	34,21	45,79	51,2	54,92	73,51	82,20	70,21	13,93	0,60
0,50	24,58	31,2	42,7	39,46	50,09	68,55	52,70	14,72	0,56
0,25	15,58	20,09	30,74	25,01	32,25	49,35	35,54	12,50	0,53
0,05	3,11	6,25	8,98	4,99	10,03	14,42	9,81	4,72	0,55



$$y = \frac{0,39 - 104,92}{1 + \frac{x}{0,50}^{1,01}} + 104,92$$

Abbildung 107: Matrixkalibrationen Weißwein Saale-Unstrut.

Anwendung des antikörperbasierten SPR-Biosensors zur Detektion von Lysozym (10/5/2,5/1/0,5/0,25/0,05 ppm) in Weißwein (Saale-Unstrut, siehe Tabelle 33). Die Messwerte der unterschiedlichen Messungen (n≥3) wurden normiert, die resultierenden Mittelwerte sowie Standardabweichungen zur Berechnung einer Regression unter Verwendung der 4-Parameter-Gleichung genutzt. Die gepunktete Linie stellt den Verlauf des relativen Fehlers dar, die durchgezogene schwarze Linie ist zur Verdeutlichung eines Niveaus von 10 % eingezeichnet.

8.5 Agarosegelelektrophoreseabbildungen SELEX

Im Folgenden sind Fotos der durchgeführten AGEs aufgeführt. Da im Rahmen der SELEX mehrmals Versuche unternommen wurden, welche nicht zum anvisierten Erfolg führten, sind auf den abgebildeten Gelen mitunter mehrere mit X beschriftete Banden zu erkennen. Die für die entsprechenden Kontroll-PCRs genutzten FISHing-beziehungsweise BEAMing-Eluate wurden in der schlussendlich zur Klonierung eingesetzten SELEX nicht eingesetzt. Tabelle 91 ist zu entnehmen, auf welchen Abbildungen die Kontroll-PCRs der unterschiedlichen SELEX-Prozesse zu erkennen sind.

Tabelle 91: Abbildungen der Kontroll-PCRs aus den Eluaten der Selektionsprozesse.

Runde	Lysozym	Ovalbumin	Casein
1	Abbildung 108	Abbildung 108	Abbildung 108
2	Abbildung 108	Abbildung 108	Abbildung 108
3	Abbildung 109	Abbildung 109	Abbildung 109
4	Abbildung 111	Abbildung 110	Abbildung 110
5	Abbildung 112	Abbildung 112	Abbildung 112
6	Abbildung 113	Abbildung 113	Abbildung 112
7	Abbildung 115	Abbildung 115	Abbildung 114
8	Abbildung 116	Abbildung 116	Abbildung 117
9	Abbildung 118	Abbildung 118	Abbildung 119
10	Abbildung 120	Abbildung 120	Abbildung 120
Gelextraktion (Aufreinigung)	Abbildung 121	Abbildung 121	-
11	Abbildung 122	Abbildung 122	Abbildung 120
Anreicherung	Abbildung 123, Abbildung 128	Abbildung 123	-
12	Abbildung 129	Abbildung 124	Abbildung 125
13	Abbildung 130	Abbildung 127	Abbildung 126
14	-	Abbildung 129	Abbildung 128
Anreicherung	-	Abbildung 130	-
Gelextraktion (Aufreinigung)	-	Abbildung 131	-
15	-	Abbildung 133	Abbildung 132
Vorbereitung Klonierung	Abbildung 134	Abbildung 134	Abbildung 134

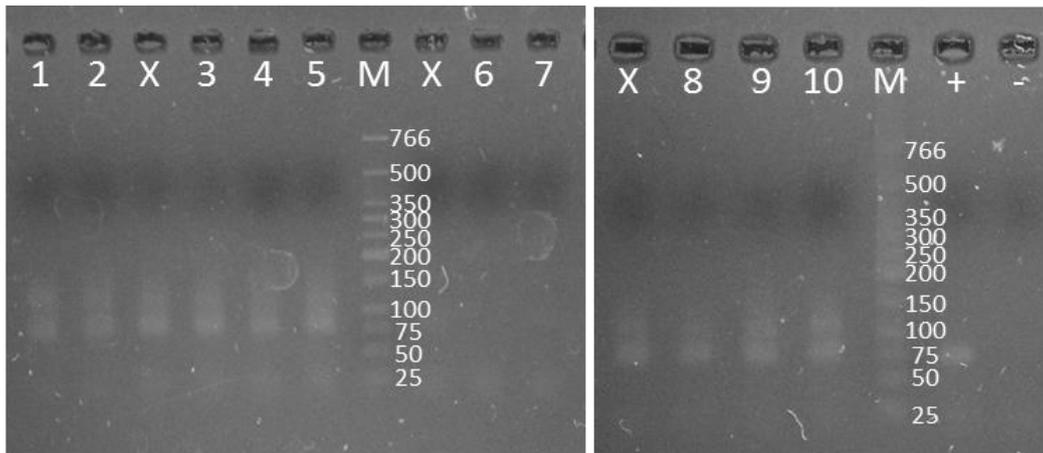


Abbildung 108: Gelelektrophorese Runde 1 und Runde 2.

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 1 und Runde 2 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluat. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 92 angegeben.

Tabelle 92: Belegung der Bahnen in Abbildung 108.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	F	1	Ovalbumin
2	F	1	Casein
3	B	1	Lysozym
4	B	1	Ovalbumin
5	B	1	Casein
6	F	2	Ovalbumin
7	F	2	Casein
8	B	2	Lysozym
9	B	2	Ovalbumin
10	B	2	Casein
X	Fehlschlag, nicht weiter im Rahmen der SELEX genutzt		
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

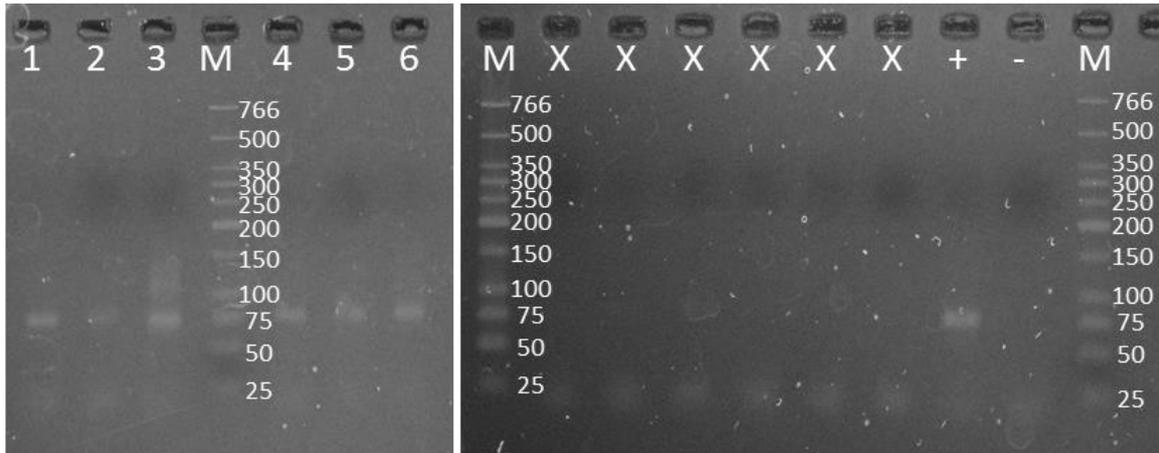


Abbildung 109: Gelelektrophorese Runde 3.

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 3 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 93 angegeben.

Tabelle 93: Belegung der Bahnen in Abbildung 109.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	F	3	Lysozym
2	F	3	Ovalbumin
3	F	3	Casein
4	B	3	Lysozym
5	B	3	Ovalbumin
6	B	3	Casein
X	Fehlschlag, nicht weiter im Rahmen der SELEX genutzt		
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

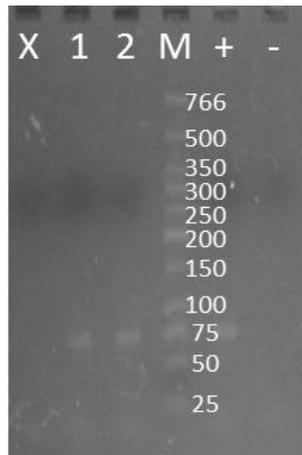


Abbildung 110: Gelelektrophorese Runde 4 (Ovalbumin, Casein).

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 4 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 94 angegeben.

Tabelle 94: Belegung der Bahnen in Abbildung 110.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	B	4	Ovalbumin
2	B	4	Casein
X	Fehlschlag, nicht weiter im Rahmen der SELEX genutzt		
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

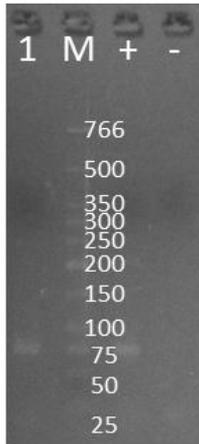


Abbildung 111: Gelelektrophorese Runde 4 (Lysozym).

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 4 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 95 angegeben.

Tabelle 95: Belegung der Bahnen in Abbildung 111.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	B	4	Lysozym
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

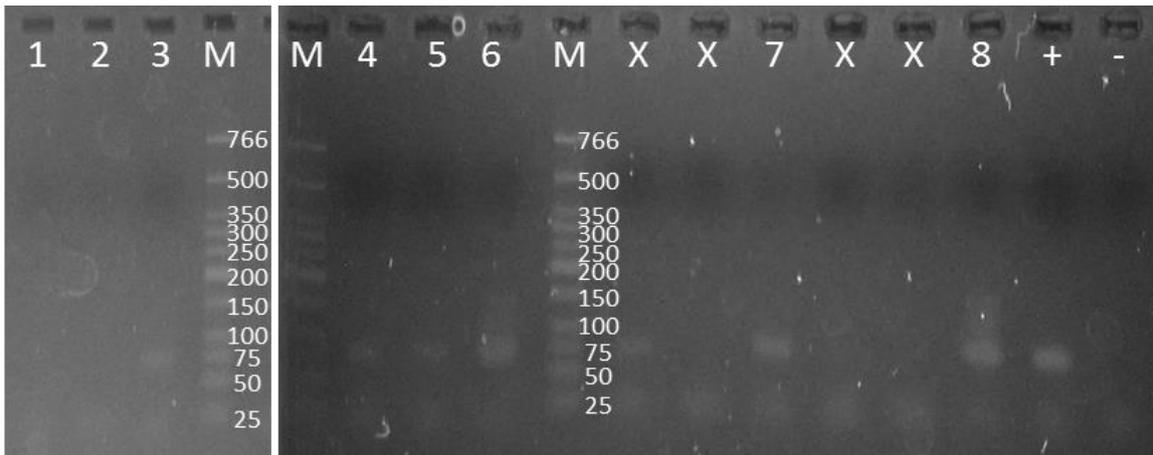


Abbildung 112: Gelelektrophorese Runde 5 und Runde 6 (Casein).

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 4 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 96 angegeben.

Tabelle 96: Belegung der Bahnen in Abbildung 112.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	F	5	Lysozym
2	F	5	Ovalbumin
3	F	5	Casein
4	B	5	Lysozym
5	B	5	Ovalbumin
6	B	5	Casein
7	F	6	Casein
8	B	6	Casein
X	Fehlschlag, nicht weiter im Rahmen der SELEX genutzt		
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

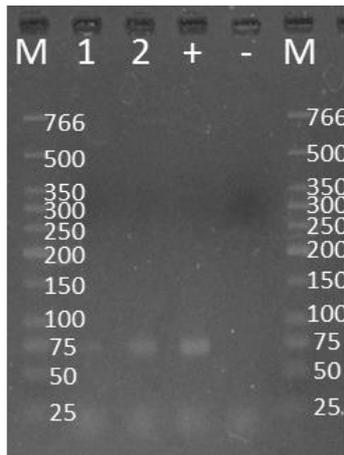


Abbildung 113: Gelelektrophorese Runde 6 (Lysozym, Ovalbumin).

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 6 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 97 angegeben.

Tabelle 97: Belegung der Bahnen in Abbildung 113.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	B	6	Lysozym
2	B	6	Ovalbumin
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

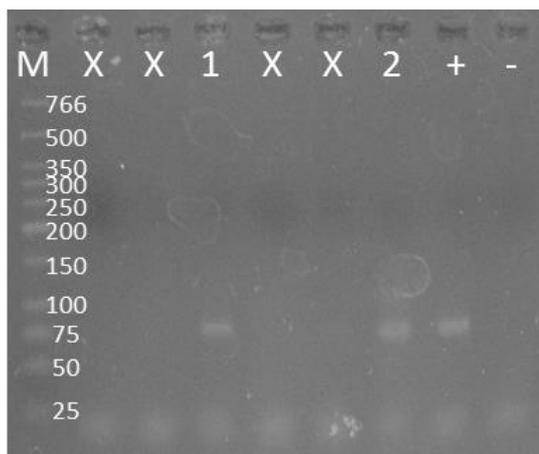


Abbildung 114: Gelelektrophorese Runde 7 (Casein).

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 7 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 98 angegeben.

Tabelle 98: Belegung der Bahnen in Abbildung 114.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	F	7	Casein
2	B	7	Casein
X	Fehlschlag, nicht weiter im Rahmen der SELEX genutzt		
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

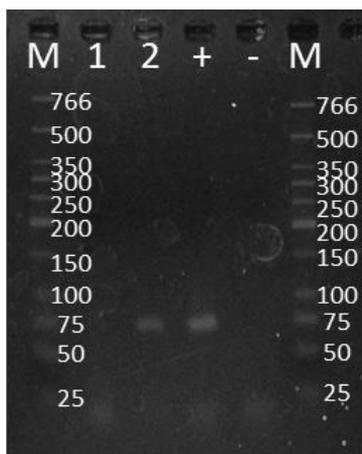


Abbildung 115: Gelelektrophorese Runde 7 (Lysozym, Ovalbumin).

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 7 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 99 angegeben. Bei der Lysozymprobe ist keine Bande erkennbar, das entsprechende Eluat wurde trotzdem für das folgende FISHing eingesetzt.

Tabelle 99: Belegung der Bahnen in Abbildung 115.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	B	7	Lysozym
2	B	7	Ovalbumin
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

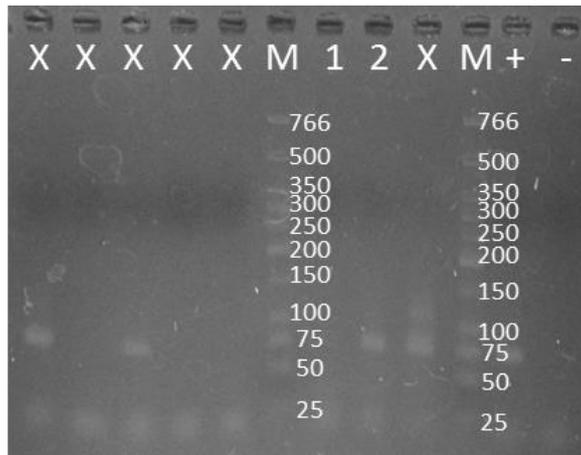


Abbildung 116: Gelelektrophorese Runde 8 (Lysozym, Ovalbumin).

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 8 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 100 angegeben. Bei der Lysozymprobe ist keine Bande erkennbar, das entsprechende Eluat wurde trotzdem für das folgende FISHing eingesetzt.

Tabelle 100: Belegung der Bahnen in Abbildung 116.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	B	8	Lysozym
2	B	8	Ovalbumin
X	Fehlschlag, nicht weiter im Rahmen der SELEX genutzt		
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

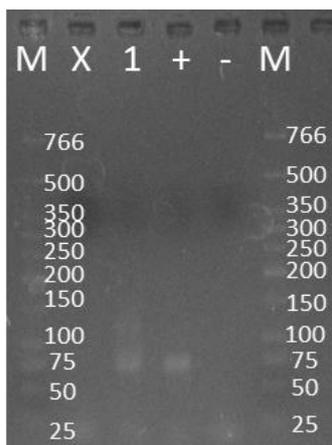


Abbildung 117: Gelelektrophorese Runde 8 (Casein).

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 8 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 101 angegeben.

Tabelle 101: Belegung der Bahnen in Abbildung 117.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	B	8	Casein
X	Fehlschlag, nicht weiter im Rahmen der SELEX genutzt		
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

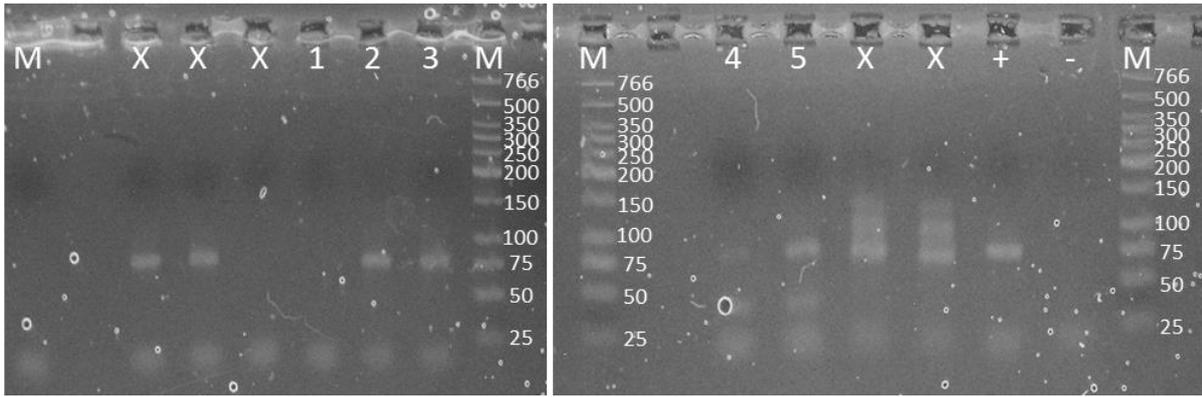


Abbildung 118: Gelelektrophorese Runde 9.

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 9 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 102 angegeben.

Tabelle 102: Belegung der Bahnen in Abbildung 118.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	F	9	Lysozym
2	F	9	Ovalbumin
3	F	9	Casein
4	B	9	Lysozym
5	B	9	Ovalbumin
X	Fehlschlag, nicht weiter im Rahmen der SELEX genutzt		
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

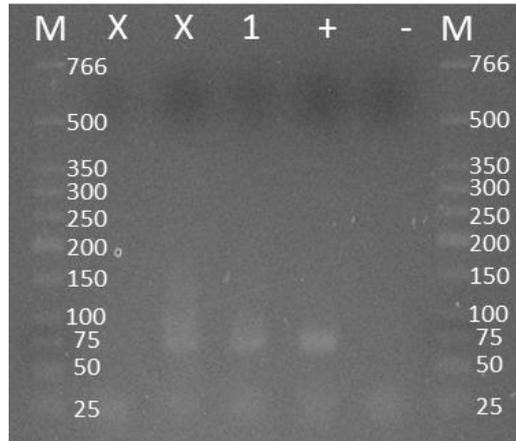


Abbildung 119: Gelelektrophorese Runde 9 (Casein).

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 9 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 103 angegeben.

Tabelle 103: Belegung der Bahnen in Abbildung 119.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	B	9	Casein
X	Fehlschlag, nicht weiter im Rahmen der SELEX genutzt		
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

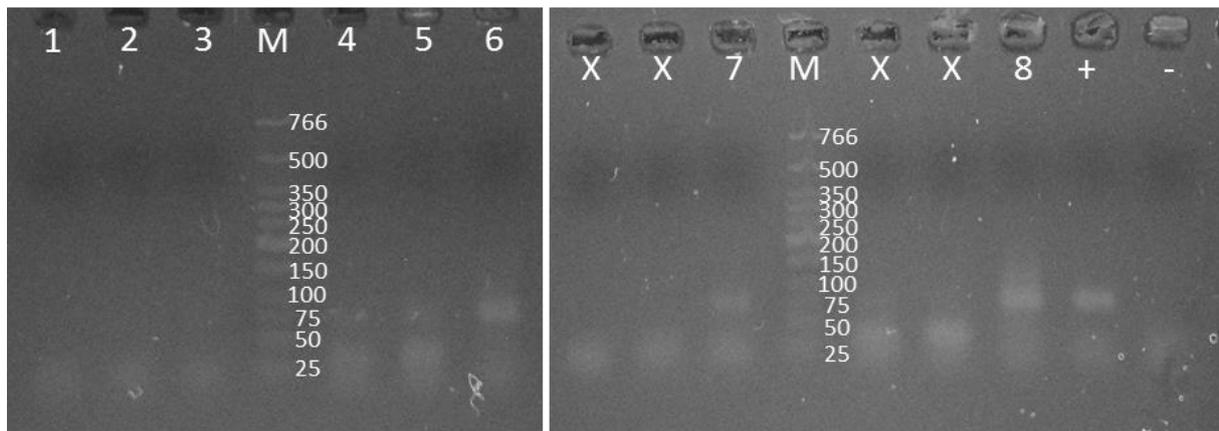


Abbildung 120: Gelelektrophorese Runde 10 und Runde 11 (Casein).

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 10 und Runde 11 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 104 angegeben. Die Banden der Kontroll-PCR welche anhand der BEAMing-Eluate von Lysozym und Ovalbumin im Rahmen der jeweiligen SELEX generiert wurden, sind nur schwach erkennbar.

Tabelle 104: Belegung der Bahnen in Abbildung 120.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	F	10	Lysozym
2	F	10	Ovalbumin
3	F	10	Casein
4	B	10	Lysozym
5	B	10	Ovalbumin
6	B	10	Casein
7	F	11	Casein
8	B	11	Casein
X	Fehlschlag, nicht weiter im Rahmen der SELEX genutzt		
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

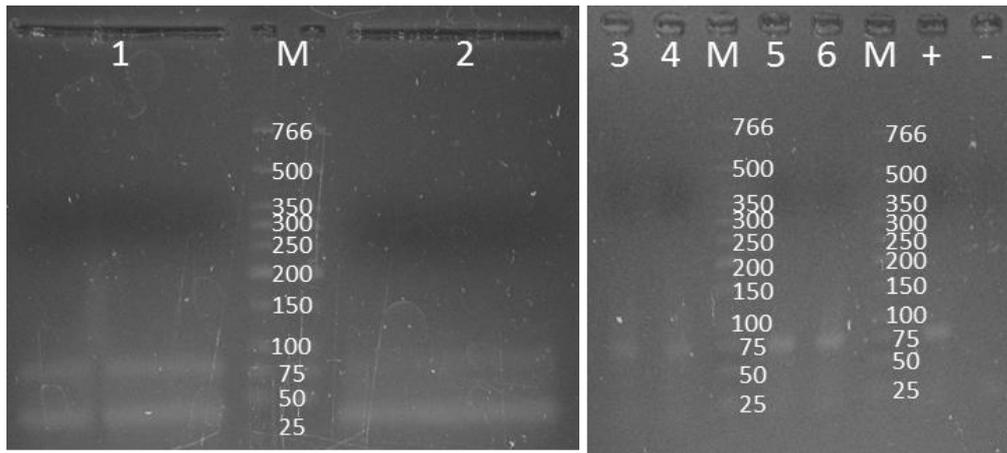


Abbildung 121: Gelaufreinigung Runde 10 (Lysozym, Ovalbumin).

Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 105 angegeben.

Links: Abgebildet ist ein Foto der mit dem BEAMing-Eluat von Runde 10 durchgeführten Kontroll-PCR (mit Biotin-C₆-Reverse-Primern) und anschließend durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm). Die kleineren Nebenprodukte sind deutlich zu erkennen und wurden gemäß der in 6.2.2.1 beschriebenen Vorgehensweise (Gelaufreinigung) vom eigentlichen Produkt mit einer Größe von 76 bp isoliert.

Rechts: Abgebildet ist ein Foto der nach der Gelaufreinigung durchgeführten Kontroll-PCR und anschließend durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm). Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 105 angegeben.

Tabelle 105: Belegung der Bahnen in Abbildung 121.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	B	10	Lysozym
2	B	10	Ovalbumin
3	B	10	Lysozym
4	B	10	Lysozym
5	B	10	Ovalbumin
6	B	10	Ovalbumin
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

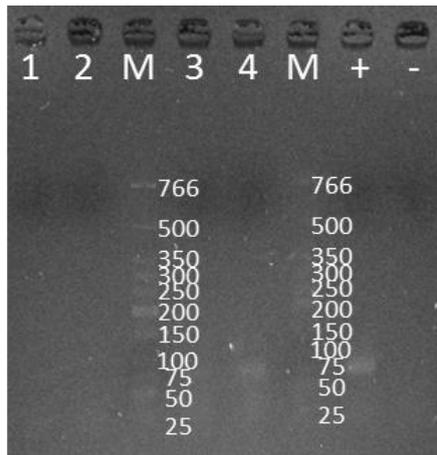


Abbildung 122: Gelelektrophorese Runde 11 (Lysozym, Ovalbumin).

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 11 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 106 angegeben.

Tabelle 106: Belegung der Bahnen in Abbildung 122.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	F	11	Lysozym
2	F	11	Ovalbumin
3	B	11	Lysozym
4	B	11	Ovalbumin
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

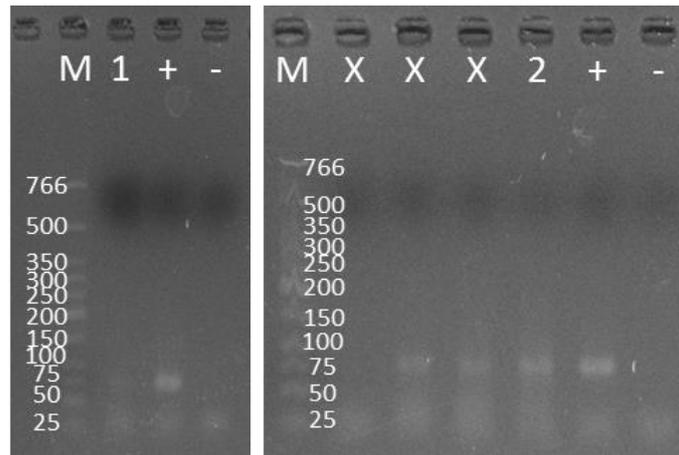


Abbildung 123: Anreicherung Runde 11 (Lysozym, Ovalbumin).

Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 107 angegeben.

Links: Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 11 (Lysozym, Abbildung 122 Bahn 3)) durchgeführten Amplifikation (4-faches Volumen, Strangtrennung nach 6.2.2.1) und der anschließend mit einem Aliquot durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm). Die Bande 1 ist nur schwach erkennbar, war jedoch im bei unmittelbarer Betrachtung unter dem UV-Licht klar ersichtlich. Durch eine Verkleinerung des Volumens wurde eine Anreicherung erreicht, diese ist in Abbildung 128 (Bahn 3) deutlich zu erkennen

Rechts: Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 11 durchgeführten Anreicherung unter Verwendung des BEAMing-Eluats von Runde 11 (Ovalbumin, Abbildung 122 Bahn 4) und der anschließend durch eine konventionelle PCR vervielfältigten Eluate.

Tabelle 107: Belegung der Bahnen in Abbildung 123.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	B	11	Lysozym
2	B	11	Ovalbumin
X	Fehlschlag, nicht weiter im Rahmen der SELEX genutzt		
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

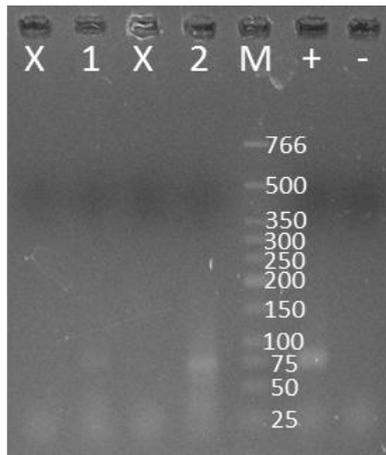


Abbildung 124: Gelelektrophorese Runde 12 (Ovalbumin).

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 12 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 108 angegeben.

Tabelle 108: Belegung der Bahnen in Abbildung 124.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	F	12	Ovalbumin
2	B	12	Ovalbumin
X	Fehlschlag, nicht weiter im Rahmen der SELEX genutzt		
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

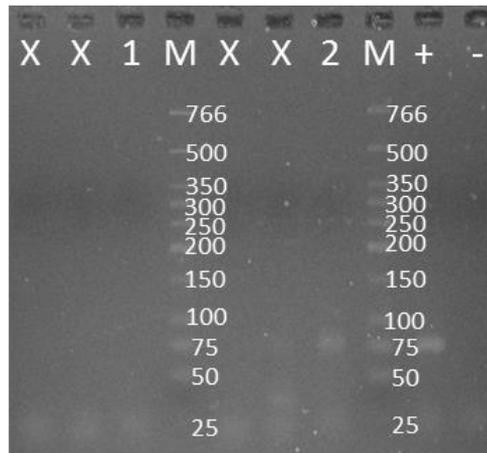


Abbildung 125: Gelelektrophorese Runde 12 (Casein).

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 12 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 109 angegeben.

Tabelle 109: Belegung der Bahnen in Abbildung 125.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	F	12	Casein
2	B	12	Casein
X	Fehlschlag, nicht weiter im Rahmen der SELEX genutzt		
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

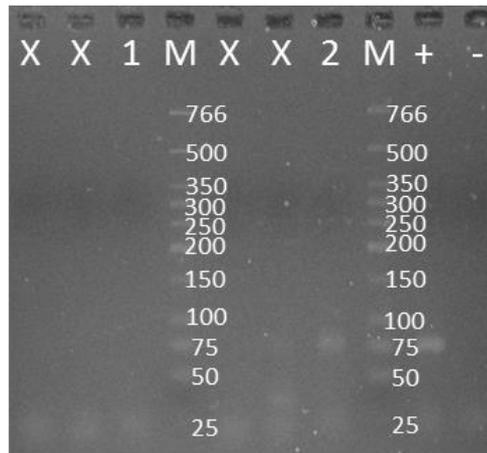


Abbildung 126: Gelelektrophorese Runde 13 (Casein).

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 13 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 110 angegeben.

Tabelle 110: Belegung der Bahnen in Abbildung 126.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	F	13	Casein
2	B	13	Casein
X	Fehlschlag, nicht weiter im Rahmen der SELEX genutzt		
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

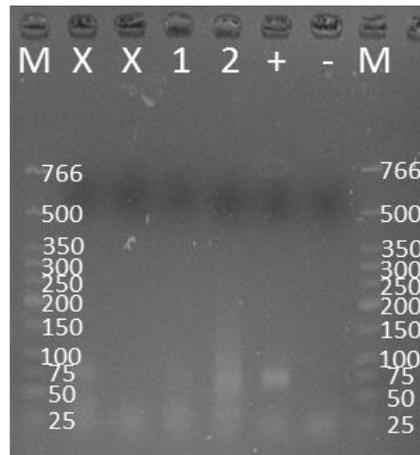


Abbildung 127: Gelelektrophorese Runde 13 (Ovalbumin).

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 13 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 111 angegeben.

Tabelle 111: Belegung der Bahnen in Abbildung 127.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	F	13	Ovalbumin
2	B	13	Ovalbumin
X	Fehlschlag, nicht weiter im Rahmen der SELEX genutzt		
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

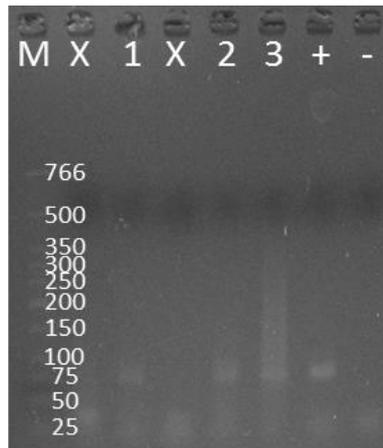


Abbildung 128: Anreicherung Runde 11 (Lysozym) und Gelelektrophorese Runde 14 (Casein).

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 11 erfolgten Anreicherung (Lysozym) unter Verwendung des in Abbildung 123 (Bahn 1) dargestellten Eluats und der nach Runde 14 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten (Casein). Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 112 angegeben.

Tabelle 112: Belegung der Bahnen in Abbildung 128.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	F	14	Casein
2	B	14	Casein
3	B	14	Lysozym
X	Fehlschlag, nicht weiter im Rahmen der SELEX genutzt		
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

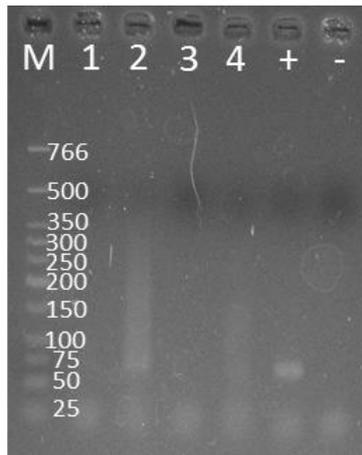


Abbildung 129: Gelelektrophorese Runde 12 (Lysozym) und Runde 14 (Ovalbumin).

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 12 und Runde 14 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 113 angegeben.

Tabelle 113: Belegung der Bahnen in Abbildung 129.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	F	12	Lysozym
2	B	12	Ovalbumin
3	F	14	Lysozym
4	B	14	Ovalbumin
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

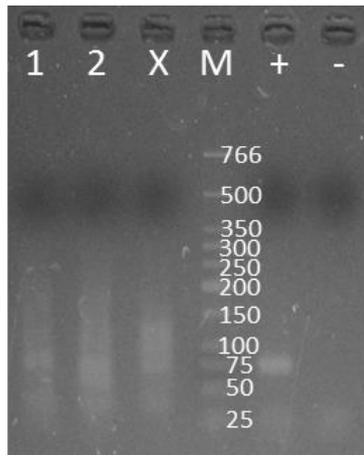


Abbildung 130: Gelelektrophorese Runde 13 (Lysozym) und Anreicherung Runde 14 (Ovalbumin).

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 13 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten (Lysozym) und der nach Runde 14 durchgeführten Anreicherung unter Verwendung des in Abbildung 127 (Bahn 2) dargestellten Eluats. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 114 angegeben.

Tabelle 114: Belegung der Bahnen in Abbildung 130.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	B	13	Lysozym
2	B	14	Ovalbumin
X	Fehlschlag, nicht weiter im Rahmen der SELEX genutzt		
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

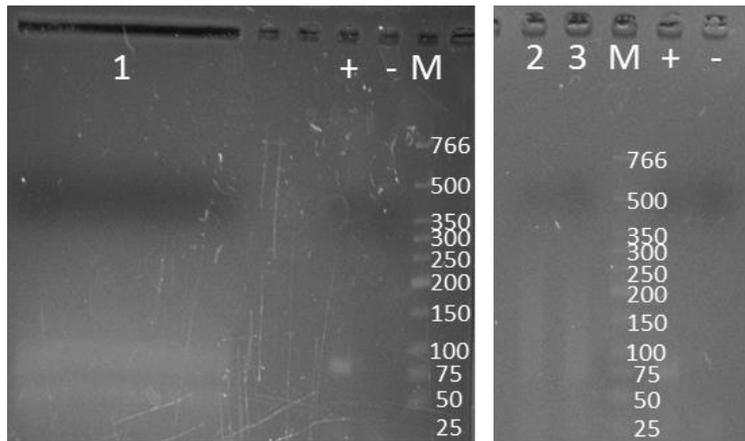


Abbildung 131: Gelaufreinigung Runde 14 (Ovalbumin).

Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 115 angegeben.

Links: Abgebildet ist ein Foto der mit dem BEAMing-Eluaten von Runde 14 durchgeführten Kontroll-PCR (mit Biotin-C₆-Reverse-Primern) und anschließend durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm). Die kleineren Nebenprodukte sind deutlich zu erkennen und wurden gemäß der in 6.2.2.1 beschriebenen Vorgehensweise (Gelaufreinigung) vom eigentlichen Produkt mit einer Größe von 76 bp isoliert.

Rechts: Abgebildet ist ein Foto der nach der Gelaufreinigung durchgeführten Kontroll-PCR und anschließend durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm). Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 115 angegeben.

Tabelle 115: Belegung der Bahnen in Abbildung 131.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	B	14	Ovalbumin
2	B	14	Ovalbumin
3	B	14	Ovalbumin
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

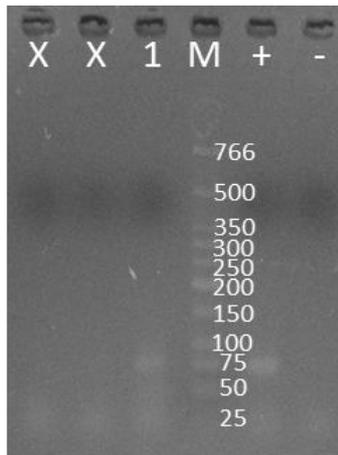


Abbildung 132: Gelelektrophorese Runde 15 (Casein).

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 15 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 116 angegeben.

Tabelle 116: Belegung der Bahnen in Abbildung 132.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	B	15	Casein
X	Fehlschlag, nicht weiter im Rahmen der SELEX genutzt		
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

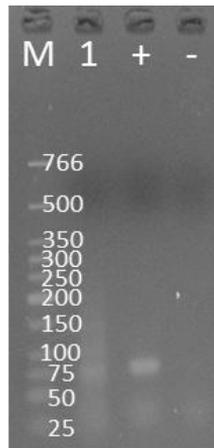


Abbildung 133: Gelelektrophorese Runde 15 (Ovalbumin).

Abgebildet ist ein Foto der nach Runde 15 durchgeführten AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten. Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 117 angegeben.

Tabelle 117: Belegung der Bahnen in Abbildung 133.

Die Spalte BEAMing/FISHing zeigt an (B = BEAMing, F = FISHing), ob ein BEAMing- oder ein FISHing-Eluat zur Kontroll-PCR eingesetzt wurde.

Bahn	BEAMing/ FISHing/	Runde	Target
1	B	15	Ovalbumin
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR		
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR		
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)		

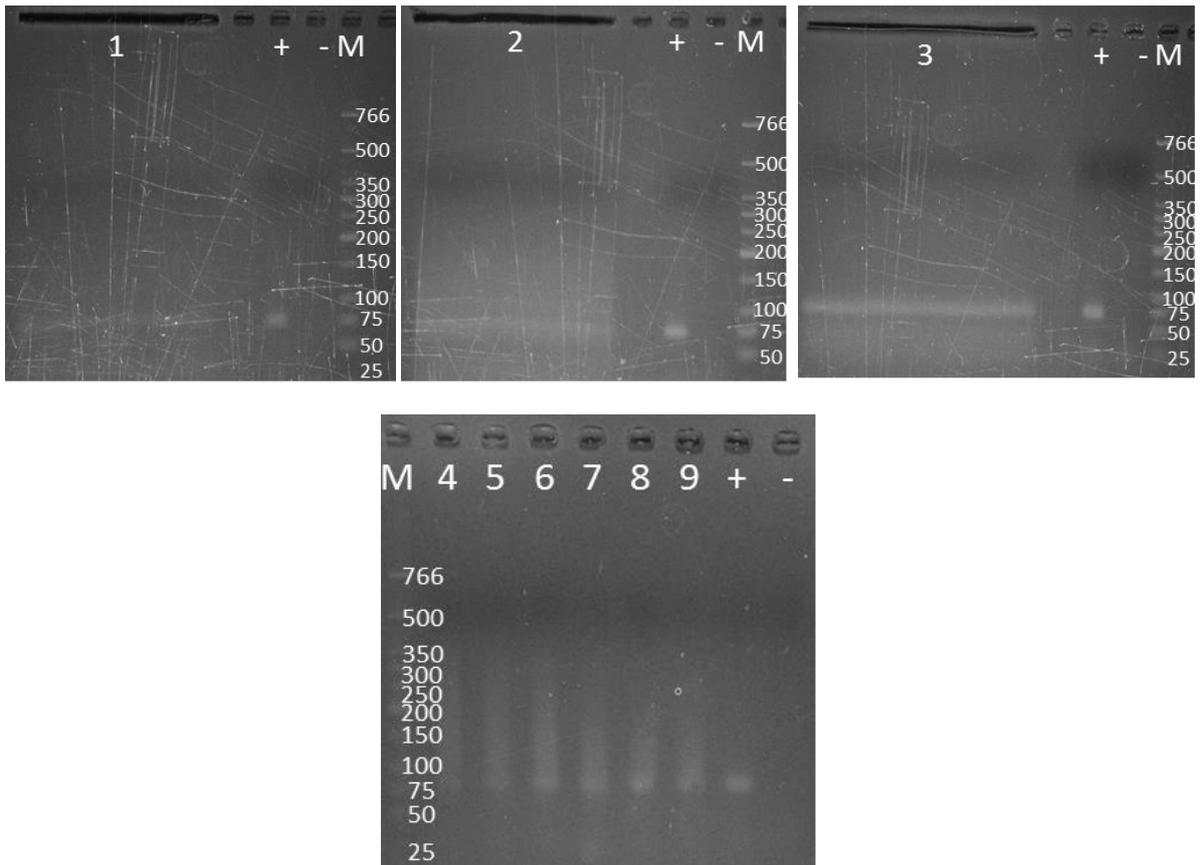


Abbildung 134: Gelaufreinigung zur Vorbereitung der Klonierung.

Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 118 angegeben.

Oben: Abgebildet sind Fotos der nach Abschluss der SELEX durchgeführten konventionellen PCRs zur Herstellung doppelsträngiger Produkte für die Klonierung (AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm)).

Unten: Die vorhandenen Nebenprodukte wurden durch Gelaufreinigungen nach 6.2.2.1 entfernt (AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluat).

Tabelle 118: Belegung der Bahnen in Abbildung 134.

Bahn	Templat	Target
1	BEAMing R13	Lysozym
2	BEAMing R15	Ovalbumin
3	BEAMing R15	Casein
4	Klonierungsreagenz	Lysozym
5	Klonierungsreagenz	Lysozym
6	Klonierungsreagenz	Ovalbumin
7	Klonierungsreagenz	Ovalbumin
8	Klonierungsreagenz	Casein
9	Klonierungsreagenz	Casein
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR	
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR	
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)	

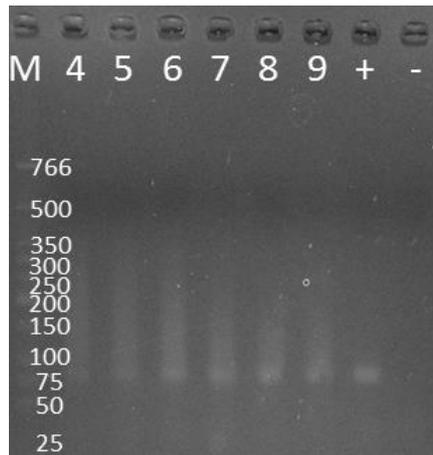


Abbildung 135: Gelaufreinigung zur Vorbereitung der Klonierung.

Die Belegung der jeweiligen Bahnen ist in Tabelle 119 angegeben.

Oben: Abgebildet sind Fotos der nach Abschluss der SELEX durchgeführten konventionellen PCRs zur Herstellung doppelsträngiger Produkte für die Klonierung (AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm)).

Unten: Die vorhandenen Nebenprodukte wurden durch Gelaufreinigungen nach 6.2.2.1 entfernt (AGE (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) mit den durch konventionelle PCR vervielfältigten Eluaten).

Tabelle 119: Belegung der Bahnen in Abbildung 135.

Bahn	Templat	Target
1	BEAMing R13	Lysozym
2	BEAMing R15	Ovalbumin
3	BEAMing R15	Casein
4	Klonierungsreagenz	Lysozym
5	Klonierungsreagenz	Lysozym
6	Klonierungsreagenz	Ovalbumin
7	Klonierungsreagenz	Ovalbumin
8	Klonierungsreagenz	Casein
9	Klonierungsreagenz	Casein
+	Positiv-Probe Kontroll-PCR	
-	Negativ-Probe Kontroll-PCR	
M	Marker (<i>low molecular weight ladder</i>)	

8.6 Agarosegelelektrophoreseabbildungen Klonierung

Im Rahmen der Klonierung zur Vorbereitung der Sequenzierung (siehe auch 6.2.3.3) wurden diverse Kolonie-PCRs durchgeführt, die in diesem Kontext erstellten AGEs (Färbung durch Ethidiumbromid, Detektion bei 254 nm) sind im Folgenden abgebildet.

Tabelle 120, Tabelle 121 und Tabelle 122 enthalten für die jeweiligen SELEX-*Targets* Übersichten. Nachdem die Vektoren durch einen Hitzeschock in die chemisch kompetenten Zellen eingebracht wurden, wurden unterschiedliche Volumina der Zellsuspensionen ausplattiert. Das dabei eingesetzte Volumen ist in der Spalte „Volumen“ angegeben. Nach der initialen Inkubation über Nacht wurden einzelne Kolonien wiederum in einzelnen Sektoren ausplattiert. Die entsprechende Nummerierung ist in der Spalte „Sektor“ angegeben, ob nach der Inkubation über Nacht ein Wachstum stattgefunden hat, ist in der Spalte „Wachstum“ angegeben.

Da sowohl Kolonie-PCRs unter Verwendung der M13-Primer als auch unter Verwendung der auch im sonstigen Verlauf der Arbeit eingesetzten Primer durchgeführt wurden, sind entsprechend unterschiedliche Fragmentgrößen zu erwarten. Zu Beginn wurden aus allen Sektoren, in denen nach der Vereinzelnung ein Wachstum stattgefunden hat, eine PCR unter Verwendung der M13-Primer durchgeführt. Wenn in diesem Kontext ein Fragment mit einer Größe von ungefähr 240 bp zu erkennen war, wurde unter Verwendung der Aptamer-Primer eine weitere Kolonie-PCR durchgeführt. Wenn ein entsprechendes Fragment detektiert werden konnte, ist in den Spalten „Fragmentgröße M13-Primer“ beziehungsweise „Fragmentgröße Standard-Primer“ die Abbildung (und die entsprechende Bahn) angegeben, in der die AGE abgebildet ist.

Tabelle 120: Übersicht der (erfolgreichen) Klonierungen aus der SELEX mit dem *Target* Lysozym.

Volumen [μ L]	Sektor	Wachstum	Fragmentgröße M13-Primer	Fragmentgröße Standard-Primer
10	1	ja	240 bp (Abbildung 136, L1)	75 bp (Abbildung 143, L1)
10	2	ja		
10	3	ja	240 bp (Abbildung 136, L3)	75 bp (Doppelbande) (Abbildung 143, L3 & Abbildung 145 L3)
10	4	ja		
10	5	ja		
10	6	ja		
50	7	ja		
50	8	ja		
50	9	ja		
50	10	nein		
50	11	ja		
50	12	ja		
90	13	ja		
90	14	ja		
90	15	ja		
90	16	ja		
90	17	ja		
90	18	ja		

Volumen [μ L]	Sektor	Wachstum	Fragmentgröße M13-Primer	Fragmentgröße Standard-Primer
50	19	ja		
50	20	ja		
50	21	ja	240 bp (Abbildung 138, L21)	75 bp (Abbildung 144, L21 & Abbildung 145, L21)
50	22	ja		
50	23	ja		
50	24	ja		
50	25	ja		
50	26	ja		
50	27	ja		
90	28	ja		
90	29	ja		
90	30	ja	240 bp (Abbildung 138, L30)	75 bp (Abbildung 144, L30)
90	31	ja		
90	32	ja		
90	33	ja		
90	34	ja		
90	35	ja		
90	36	ja		
50	37	ja		
50	38	ja		
50	39	nein		
50	40	nein		
50	41	ja		
50	42	nein		
50	43	nein		
50	44	nein		
50	45	nein		
90	46	ja	240 bp (Abbildung 139, L46)	75 bp (Abbildung 145, L46)
90	47	ja	240 bp (Abbildung 139, L47)	verschmiert Abbildung 145, L47)
90	48	nein		
90	49	ja		
90	50	nein		
90	51	nein		
90	52	nein		
90	53	ja		
90	54	ja		
50	55	ja		
50	56	ja		
50	57	ja		

Volumen [μ L]	Sektor	Wachstum	Fragmentgröße M13-Primer	Fragmentgröße Standard-Primer
50	58	ja		
50	59	ja		
50	60	ja		
50	61	ja		
50	62	ja		
50	63	ja	240 bp (Abbildung 140, L63)	75 bp (Abbildung 146, L63 & Abbildung 147, L63)
50	64	ja		
50	65	ja		
50	66	ja	240 bp (Abbildung 140, L66)	75 bp (Abbildung 146, L66 & Abbildung 147, L66)
50	67	ja		
50	68	nein		
50	69	nein		
90	70	nein		
90	71	ja		
90	72	ja		
90	73	ja		
90	74	ja		
90	75	nein		
90	76	ja	240 bp (Abbildung 140, L76)	
90	77	nein		
90	78	ja		
90	79	ja	240 bp (Abbildung 140, L79)	75 bp (Abbildung 146, L79 & Abbildung 147, L79)
90	80	ja		
90	81	ja	240 bp (Abbildung 140, L81)	verschmiert, schwache Bande (Abbildung 146, L81 & Abbildung 147, L81)
90	82	ja		
90	83	ja		
90	84	ja		
50	85	ja		
50	86	ja		
50	87	ja	240 bp (Abbildung 141, L87)	75 bp (Abbildung 147, L87)
50	88	ja	240 bp (Abbildung 141, L88)	verschmiert, sehr schwache Bande (Abbildung 147, L88)
50	89	ja		

Volumen [μ L]	Sektor	Wachstum	Fragmentgröße M13-Primer	Fragmentgröße Standard-Primer
50	90	ja		
90	91	ja		
90	92	ja	240 bp (Abbildung 141, L92)	75 bp (Abbildung 147, L92)
90	93	ja		
90	94	ja		
90	95	ja		
90	96	ja		

Tabelle 121: Übersicht der (erfolgreichen) Klonierungen aus der SELEX mit dem *Target* Ovalbumin.

*Nachträglich sequenzierte Ansätze aus der im Rahmen der Methodenentwicklung unter Verwendung des Binde- und Waschpuffers durchgeführten Ovalbumin-SELEX:

Volumen [μ L]	Sektor	Wachstum	Fragmentgröße M13-Primer	Fragmentgröße Standard-Primer
10	1	ja		
10	2	ja		
10	3	nein		
10	4	ja		
10	5	ja		
10	6	ja		
50	7	ja		
50	8	ja		
50	9	ja		
50	10	ja		
50	11	ja		
50	12	ja		
90	13	ja		
90	14	ja	240 bp (Abbildung 137, O14)	75 bp (verschmiert) (Abbildung 143, O14 & Abbildung 144, O14)
90	15	ja		
90	16	ja		
90	17	ja		
90	18	ja		
50	19	ja		
50	20	ja		
50	21	ja		
50	22	ja		
50	23	ja		
50	24	ja		
50	25	ja		
50	26	ja		
50	27	ja		

Volumen [μ L]	Sektor	Wachstum	Fragmentgröße M13-Primer	Fragmentgröße Standard-Primer
90	28	ja		
90	29	ja		
90	30	ja		
90	31	ja		
90	32	ja		
90	33	ja		
90	34	nein		
90	35	ja	240 bp (Abbildung 138, O35)	75 bp (Abbildung 144, O35)
90	36	nein		
50	37	ja		
50	38	ja		
50	39	ja		
50	40	ja		
50	41	nein		
50	42	ja		
50	43	nein		
50	44	ja		
50	45	ja		
90	46	ja		
90	47	ja		
90	48	ja		
90	49	ja		
90	50	nein		
90	51	ja	240 bp (Abbildung 139, O51)	75 bp (Abbildung 145, O51)
90	52	nein		
90	53	nein		
90	54	ja		
50	55	ja		
50	56	ja		
50	57	ja		
50	58	ja		
50	59	ja		
50	60	ja		
50	61	nein		
50	62	ja	240 bp (Abbildung 140, O62)	75 bp (Abbildung 146, O62 & Abbildung 147, O62)
50	63	ja		
50	64	ja		
50	65	ja		
50	66	ja		

Volumen [μ L]	Sektor	Wachstum	Fragmentgröße M13-Primer	Fragmentgröße Standard-Primer
50	67	ja		
50	68	ja		
50	69	nein		
90	70	nein		
90	71	ja		
90	72	ja		
90	73	ja		
90	74	nein		
90	75	nein		
90	76	nein		
90	77	ja	240 bp (Abbildung 140, O77)	75 bp (Abbildung 146, O77 & Abbildung 147, O77)
90	78	nein		
90	79	ja	240 bp (Abbildung 140, O79)	75 bp (Abbildung 146, O79 & Abbildung 147, O79)
90	80	ja		
90	81	nein		
90	82	ja		
90	83	ja		
90	84	ja		
50	85	ja		
50	86	ja		
50	87	ja		
50	88	ja	240 bp (Abbildung 141, O88)	kaum zu erkennen, durch RNA-Wolke (Abbildung 147, O88)
50	89	nein		
50	90	ja		
50	91	nein		
50	92	nein		
50	93	ja		
90	94	ja		
90	95	ja		
90	96	ja		
90	97	ja		
90	98	ja		
90	99	ja		
90	100	ja		
90	101	ja		
90	102	nein		
50	103	ja	240 bp (Abbildung 142, O103)	75 bp (Abbildung 148, O103)

Volumen [μ L]	Sektor	Wachstum	Fragmentgröße M13-Primer	Fragmentgröße Standard-Primer
50	104	ja	240 bp (Abbildung 142, O104)	
50	105	ja	240 bp (Abbildung 142, O105)	75 bp (Abbildung 148, O105)
50	106	ja	240 bp (Abbildung 142, O106)	
50	107	ja	240 bp (Abbildung 142, O107)	
50	108	ja	240 bp (Abbildung 142, O108)	75 bp (Abbildung 148, O108)
90	109	ja	240 bp (Abbildung 142, O109)	75 bp (Abbildung 148, O109)
90	110	ja	230 bp (Abbildung 142, O110)	
90	111	ja	240 bp (Abbildung 142, O111)	75 bp (Abbildung 148, O111)
90	112	ja	240 bp (Abbildung 142, O112)	
90	113	ja	230 bp (Abbildung 142, O113)	
90	114	ja		
90	115	ja		
90	116	ja	240 bp (Abbildung 142, O116)	
90	117	ja	240 bp (Abbildung 142, O117)	
90	118	ja	240 bp (Abbildung 142, O118)	75 bp (Abbildung 148, O118)
90	119	ja	240 bp (Abbildung 142, O119)	75 bp (Abbildung 148, O119)
90	120	ja	240 bp (Abbildung 142, O120)	
50	121*	ja	240 bp (Abbildung 142, O121*)	75 bp (Abbildung 149, O121)
50	122*	ja	240 bp (Abbildung 142, O122*)	
50	123*	ja		
50	124*	ja	240 bp (Abbildung 142, O124*)	75 bp (Abbildung 149, O124)
50	125*	ja	240 bp (Abbildung 142, O125*)	75 bp (Abbildung 149, O125)
50	126*	ja	240 bp (Abbildung 142, O126*)	
90	127*	ja	240 bp (Abbildung 142, O127*)	75 bp (Abbildung 149, O127)

Volumen [μ L]	Sektor	Wachstum	Fragmentgröße M13-Primer	Fragmentgröße Standard-Primer
90	128*	ja	240 bp (Abbildung 142, O128*)	
90	129*	ja	240 bp (Abbildung 142, O129*)	
90	130*	ja	240 bp (Abbildung 142, O130*)	75 bp (Abbildung 149, O130)
90	131*	ja	240 bp (Abbildung 142, O131*)	75 bp (Abbildung 149, O131)
90	132*	ja	240 bp (Abbildung 142, O132*)	75 bp (Abbildung 149, O132)
90	133*	ja	240 bp (Abbildung 142, O133*)	75 bp (Abbildung 149, O133)
90	134*	ja	240 bp (Abbildung 142, O134*)	75 bp (Abbildung 149, O134)
90	135*	ja	240 bp (Abbildung 142, O135*)	75 bp (Abbildung 149, O135)
90	136*	ja	240 bp (Abbildung 142, O136*)	
90	137*	ja	240 bp (Abbildung 142, O137*)	75 bp (Abbildung 149, O137)
90	138*	ja	240 bp (Abbildung 142, O138*)	75 bp (Abbildung 149, O138)

Tabelle 122: Übersicht der (erfolgreichen) Klonierungen aus der SELEX mit dem *Target Casein*.

Volumen [μ L]	Sektor	Wachstum	Fragmentgröße M13-Primer	Fragmentgröße Standard-Primer
10	1	ja		
10	2	ja		
10	3	ja		
10	4	ja		
10	5	ja	240 bp (Abbildung 137, C5)	75 bp (Abbildung 143, C5)
10	6	ja		
50	7	ja	240 bp (Abbildung 137, C7)	75 bp (Abbildung 143, C7)
50	8	ja		
50	9	ja	240 bp (Abbildung 137, C9)	75 bp (teilw. kleiner) (Abbildung 143, C9)
50	10	ja	240 bp (Abbildung 137, C10)	75 bp (Abbildung 143, C10)
50	11	ja	240 bp (Abbildung 137, C11)	75 bp (Abbildung 143, C11)
50	12	ja		
90	13	ja		

Volumen [μ L]	Sektor	Wachstum	Fragmentgröße M13-Primer	Fragmentgröße Standard-Primer
90	14	ja	240 bp (Abbildung 137, C14)	75 bp (Abbildung 143, C14)
90	15	ja		
90	16	ja		
90	17	ja	240 bp (Abbildung 137, C17)	75 bp (Abbildung 143, C17)
90	18	ja		
50	19	ja		
50	20	ja		
50	21	ja		
50	22	ja	240 bp (Abbildung 138, C22)	75 bp (Abbildung 144, C22 & Abbildung 145, C22)
50	23	ja	240 bp (Abbildung 138, C23)	75 bp (Abbildung 144, C23)
50	24	ja		
50	25	ja	240 bp (Abbildung 138, C25)	75 bp (Abbildung 144, C25)
50	26	ja		
50	27	ja		
90	28	ja		
90	29	ja	240 bp (Abbildung 138, C29 & Abbildung 139, C29)	75 bp (Abbildung 144, C29 & Abbildung 145, C29)
90	30	ja	240 bp (Abbildung 138, C30 & Abbildung 139, C30)	75 bp (Abbildung 144, C30 & Abbildung 145, C30)
90	31	ja		
90	32	ja		
90	33	ja		
90	34	ja	240 bp (Abbildung 138, C34 & Abbildung 139, C34)	
90	35	ja		
90	36	ja	240 bp (Abbildung 138, C36 & Abbildung 139, C36)	75 bp (Abbildung 144, C36 & Abbildung 145, C36)

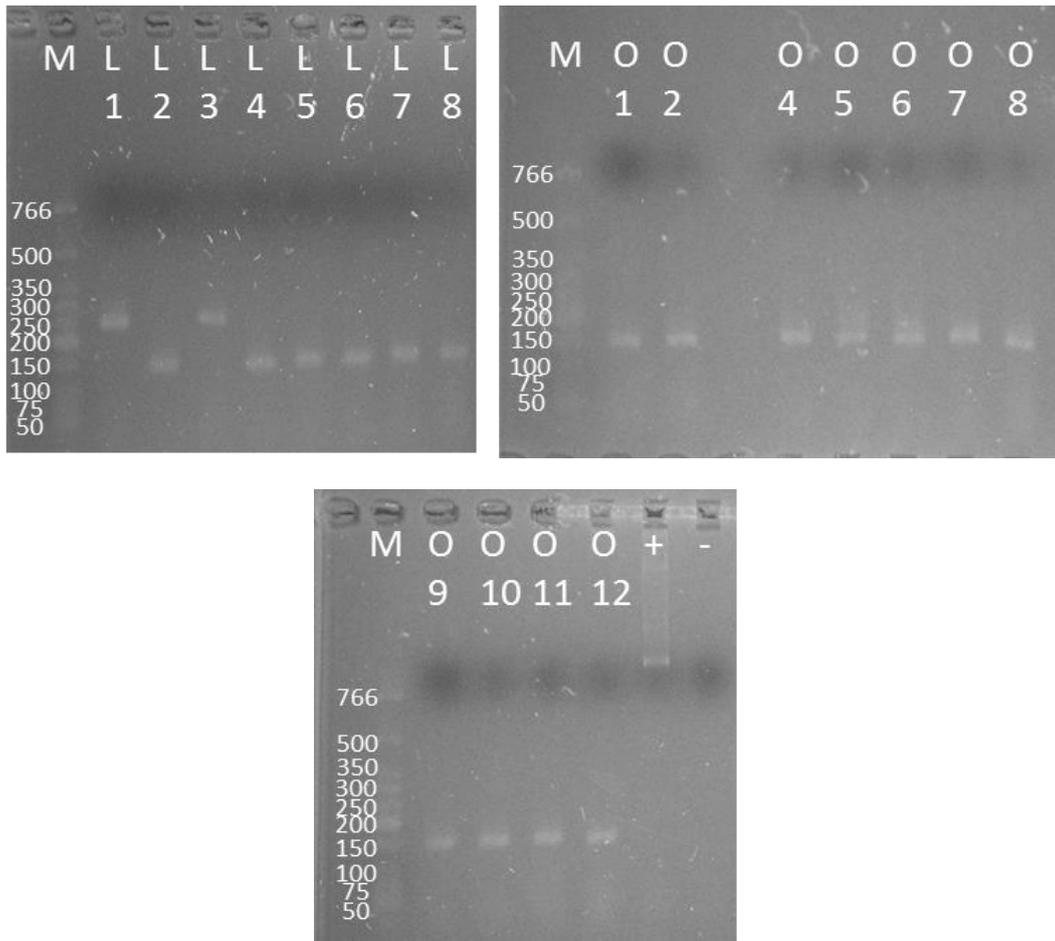


Abbildung 136: AGEs der Kolonie-PCRs (Lysozym Sektor 1-8; Ovalbumin Sektor 1-12).

L = Lysozym, O = Ovalbumin, C = Casein. Nummerierung entspricht den Sektoren in Tabelle 120, Tabelle 121 und Tabelle 122. + = Positiv (750 bp) aus *TOPO TA Cloning Kit*. - = Blindwert (Wasser). M = *low molecular weight ladder*. Primer = M13.

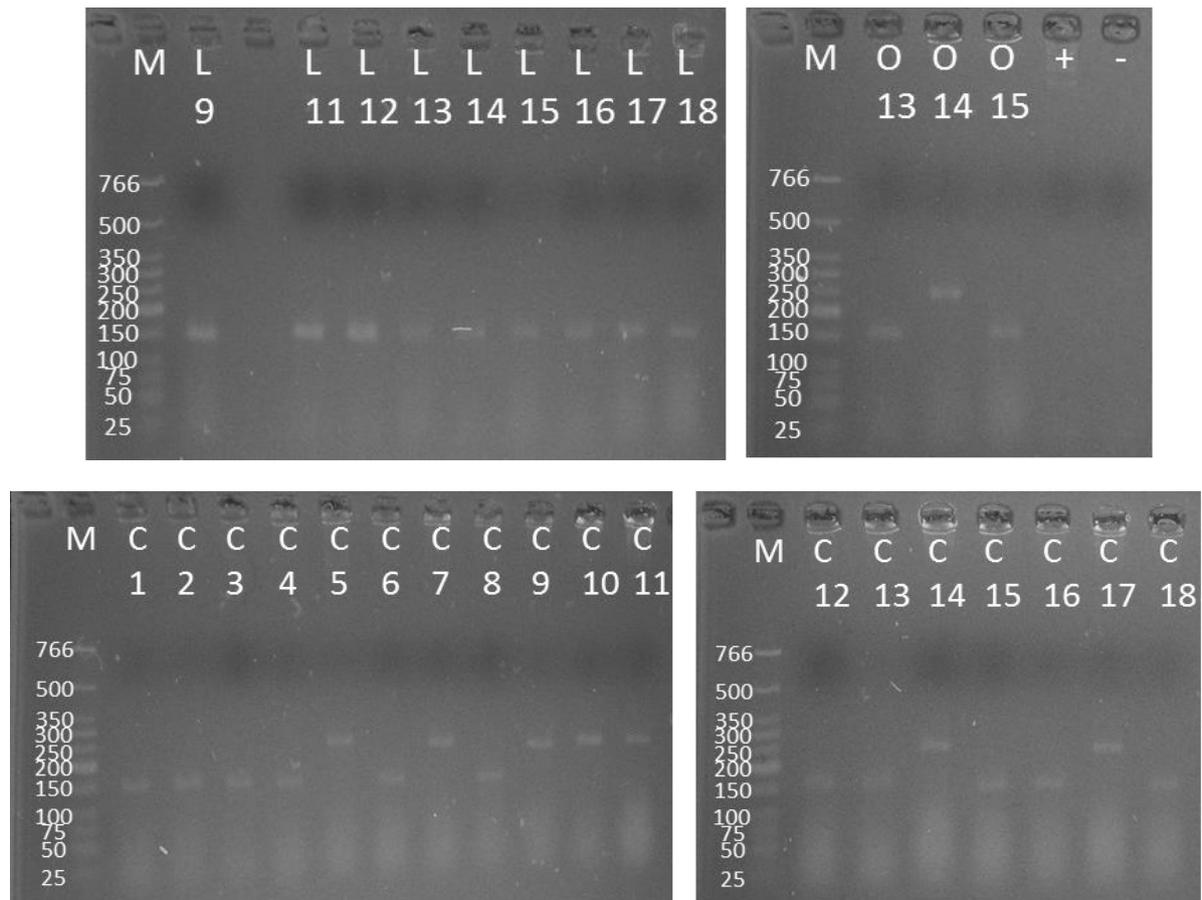


Abbildung 137: AGEs der Kolonie-PCRs (Lysozym Sektor 9, 11-18; Ovalbumin Sektor 13-15; Casein Sektor 1-18).

L = Lysozym, O = Ovalbumin, C = Casein. Nummerierung entspricht den Sektoren in Tabelle 120, Tabelle 121 und Tabelle 122. + = Positiv (750 bp) aus *TOPO TA Cloning Kit*. - = Blindwert (Wasser). M = *low molecular weight ladder*. Primer = M13.

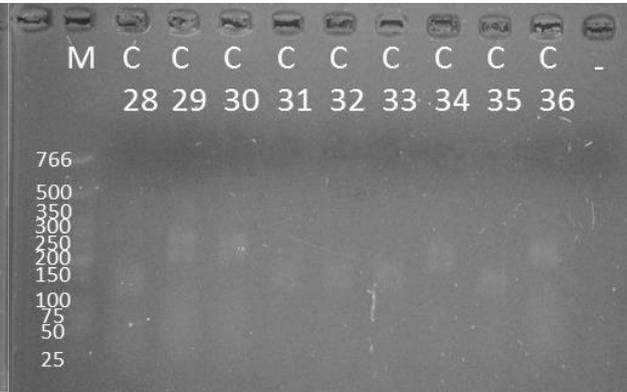
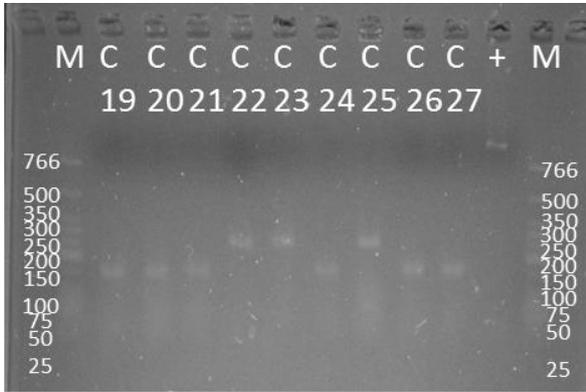
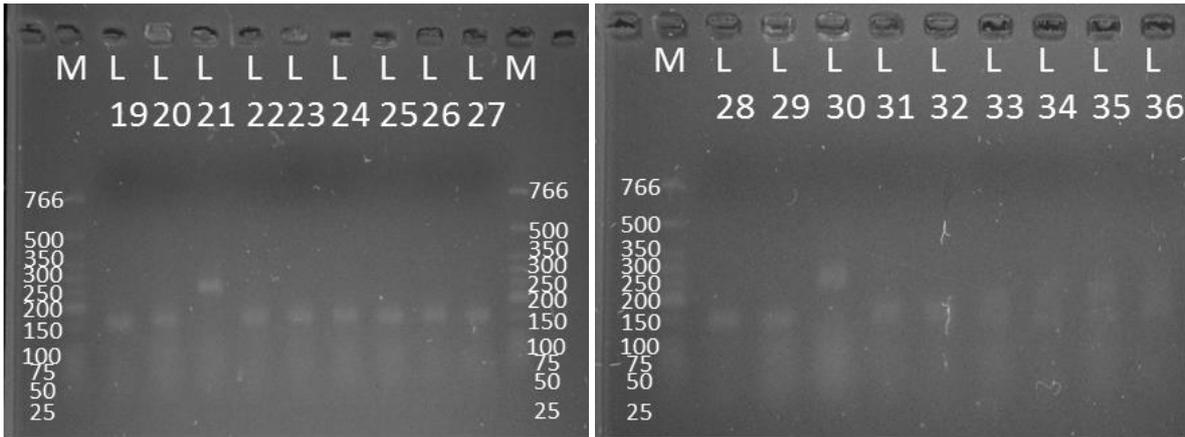


Abbildung 138: AGEs der Kolonie-PCRs (Lysozym Sektor 19-36; Ovalbumin Sektor 19-33, 35; Casein Sektor 19-36).

L = Lysozym, O = Ovalbumin, C = Casein. Nummerierung entspricht den Sektoren in Tabelle 120, Tabelle 121 und Tabelle 122. + = Positiv (750 bp) aus *TOPO TA Cloning Kit*. - = Blindwert (Wasser). M = *low molecular weight ladder*. Primer = M13.

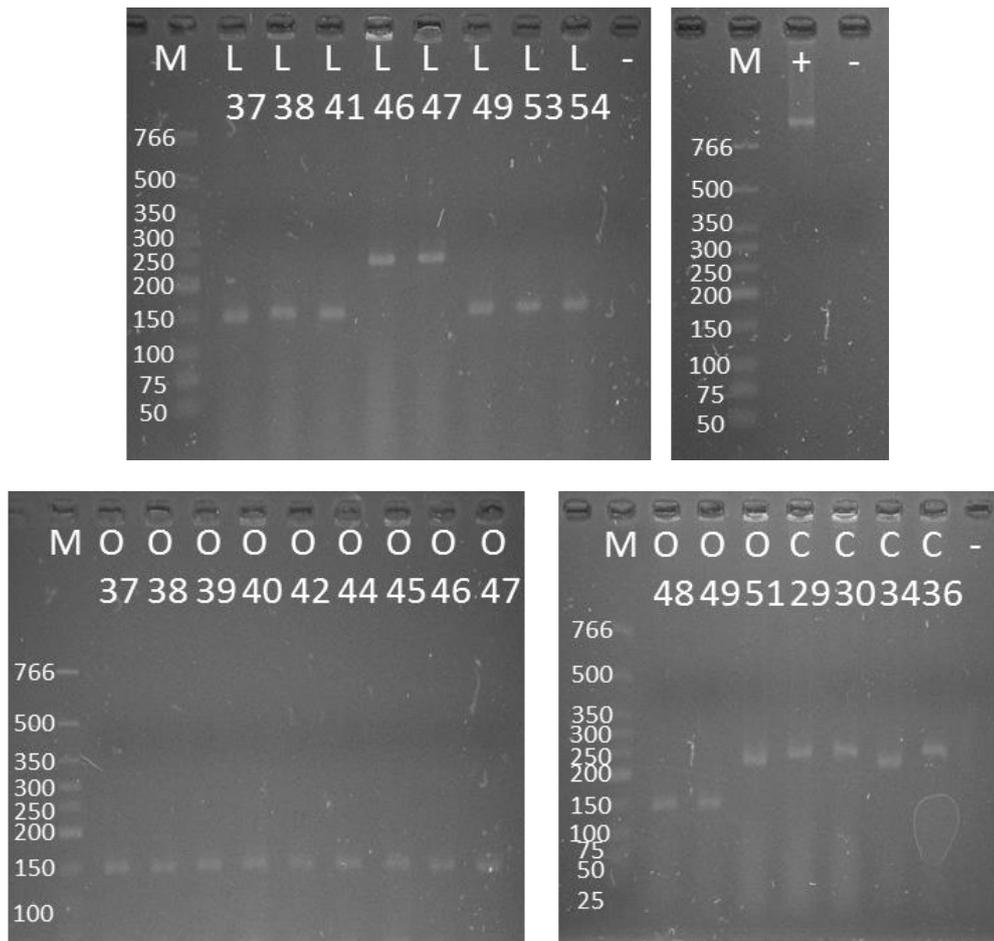


Abbildung 139: AGEs der Kolonie-PCRs (Lysozym Sektor 37, 38, 41, 46, 47, 49, 53, 54; Ovalbumin Sektor 37-40, 42, 44-49, 51; Casein Sektor 29, 30, 34, 36).

L = Lysozym, O = Ovalbumin, C = Casein. Nummerierung entspricht den Sektoren in Tabelle 120, Tabelle 121 und Tabelle 122. + = Positiv (750 bp) aus *TOPO TA Cloning Kit*. - = Blindwert (Wasser). M = *low molecular weight ladder*. Primer = M13.

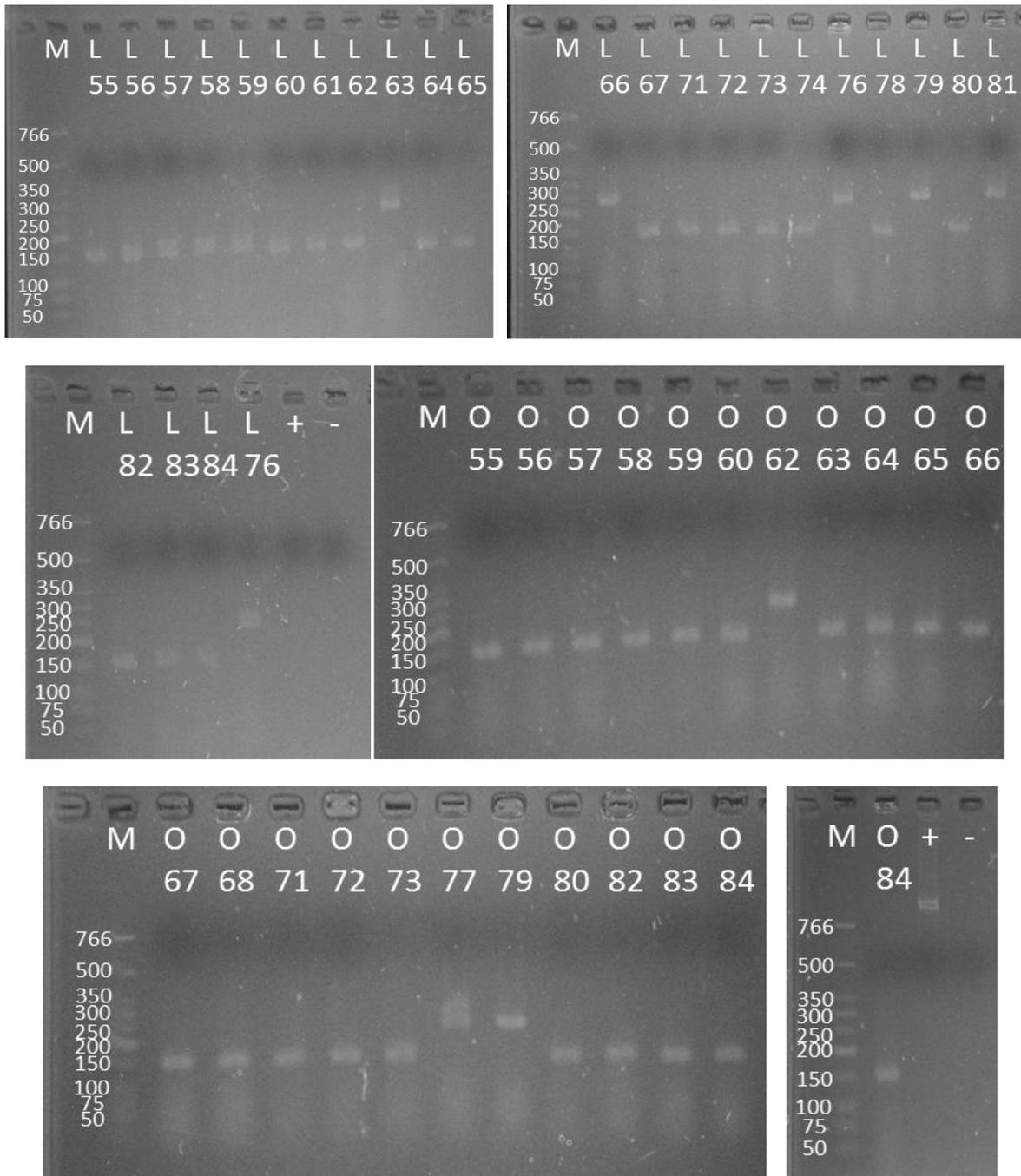


Abbildung 140: AGEs der Kolonie-PCRs (Lysozym Sektor 55-68, 71-74, 76, 78-84; Ovalbumin Sektor 55-60, 62-68, 71-73, 77, 79, 80, 82-84).

L = Lysozym, O = Ovalbumin, C = Casein. Nummerierung entspricht den Sektoren in Tabelle 120, Tabelle 121 und Tabelle 122. + = Positiv (750 bp) aus *TOPO TA Cloning Kit*. - = Blindwert (Wasser). M = *low molecular weight ladder*. Primer = M13.

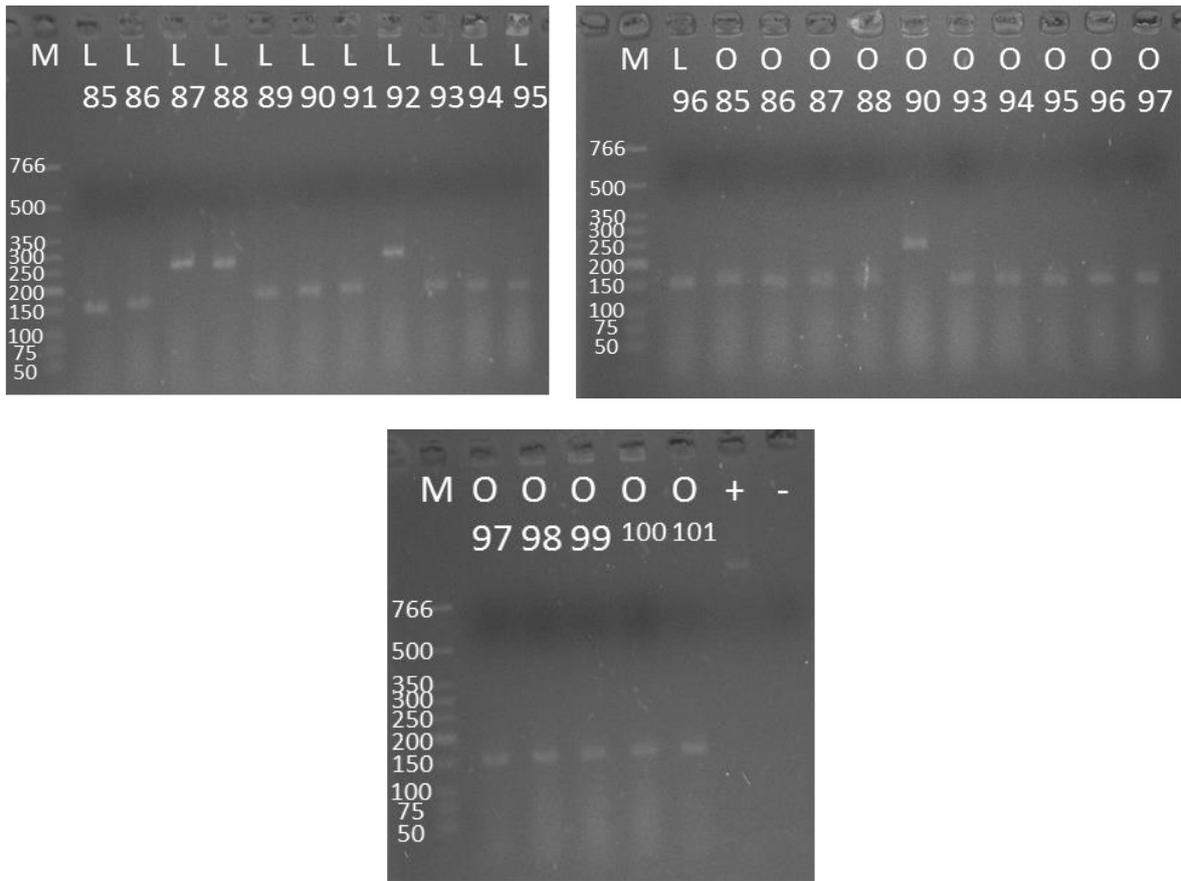


Abbildung 141: AGEs der Kolonie-PCRs (Lysozym Sektor 85-96; Ovalbumin Sektor 85-90, 93-101).

L = Lysozym, O = Ovalbumin, C = Casein. Nummerierung entspricht den Sektoren in Tabelle 120, Tabelle 121 und Tabelle 122. + = Positiv (750 bp) aus *TOPO TA Cloning Kit*. - = Blindwert (Wasser). M = *low molecular weight ladder*. Primer = M13.

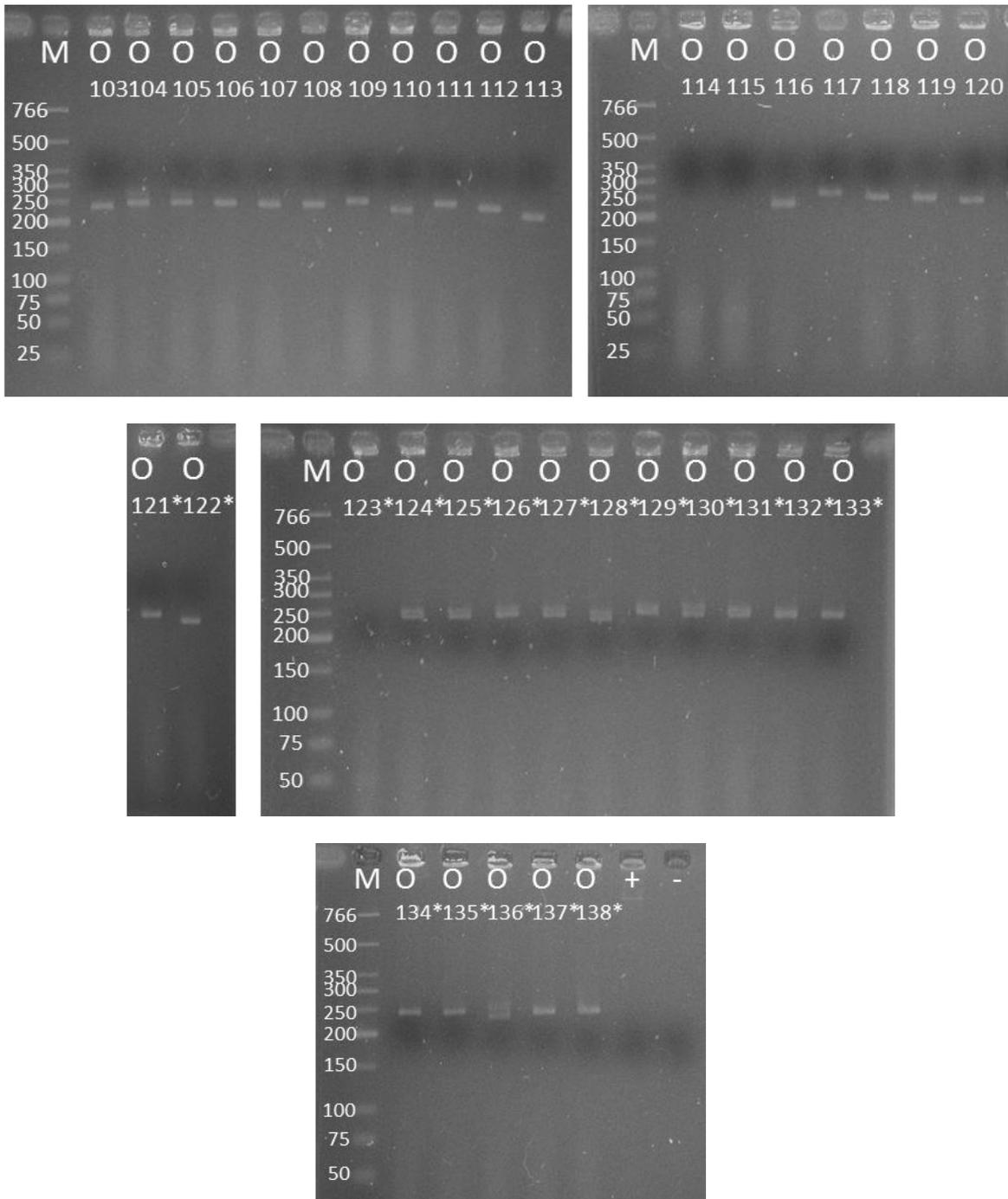


Abbildung 142: AGEs der Kolonie-PCRs (Ovalbumin Sektor 103-120, 121*-138*).

L = Lysozym, O = Ovalbumin, C = Casein. Nummerierung entspricht den Sektoren in Tabelle 120, Tabelle 121 und Tabelle 122. + = Positiv (750 bp) aus *TOPO TA Cloning Kit*. - = Blindwert (Wasser). M = *low molecular weight ladder*. Primer = M13.



Abbildung 143: AGEs der Kolonie-PCRs (Lysozym Sektor 1,3; Ovalbumin Sektor 14; Casein Sektor 5, 7, 9, 10, 11, 14, 17).

L = Lysozym, O = Ovalbumin, C = Casein. Nummerierung entspricht den Sektoren in Tabelle 120, Tabelle 121 und Tabelle 122. + = Positiv (750 bp) aus *TOPO TA Cloning Kit*. - = Blindwert (Wasser). M = *low molecular weight ladder*. Primer = Standard.

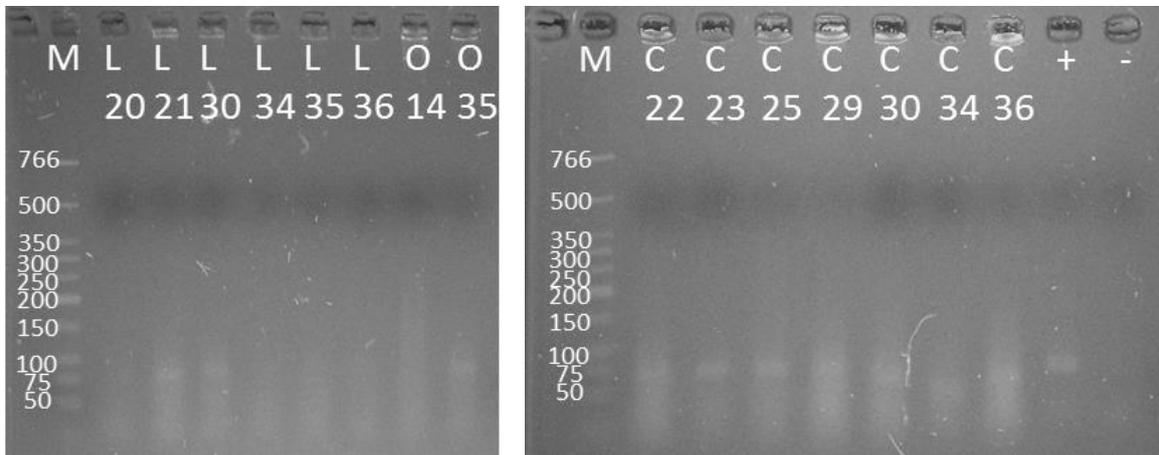


Abbildung 144: AGEs der Kolonie-PCRs (Lysozym Sektor 20, 21, 30, 34-36; Ovalbumin Sektor 14, 35; Casein Sektor 22, 23, 25, 29, 30, 34, 36).

L = Lysozym, O = Ovalbumin, C = Casein. Nummerierung entspricht den Sektoren in Tabelle 120, Tabelle 121 und Tabelle 122. + = Positiv (750 bp) aus *TOPO TA Cloning Kit*. - = Blindwert (Wasser). M = *low molecular weight ladder*. Primer = Standard.

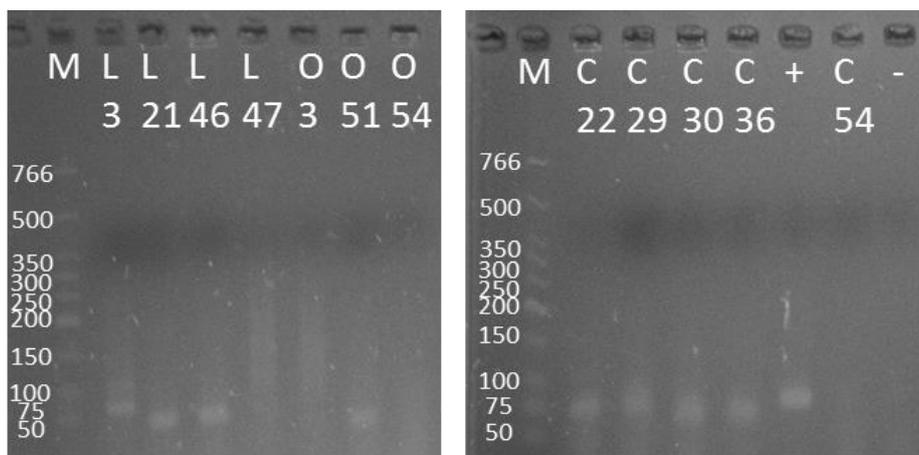


Abbildung 145: AGEs der Kolonie-PCRs (Lysozym Sektor 3, 21, 46, 47; Ovalbumin Sektor 3, 51, 54; Casein Sektor 22, 29, 30, 36, 54).

L = Lysozym, O = Ovalbumin, C = Casein. Nummer. entspricht den Sektoren in Tabelle 120, Tabelle 121 und Tabelle 122. + = Positiv (750 bp) aus *TOPO TA Cloning Kit*. - = Blindwert (Wasser). M = *low molecular weight ladder*. Primer = Standard.



Abbildung 146: AGEs der Kolonie-PCRs (Lysozym Sektor 63, 66, 76, 79, 81; Ovalbumin Sektor 62, 77, 79).

L = Lysozym, O = Ovalbumin, C = Casein. Nummerierung entspricht den Sektoren in Tabelle 120, Tabelle 121 und Tabelle 122. += Positiv (750 bp) aus *TOPO TA Cloning Kit*. - = Blindwert (Wasser). M = *low molecular weight ladder*. Primer = Standard.

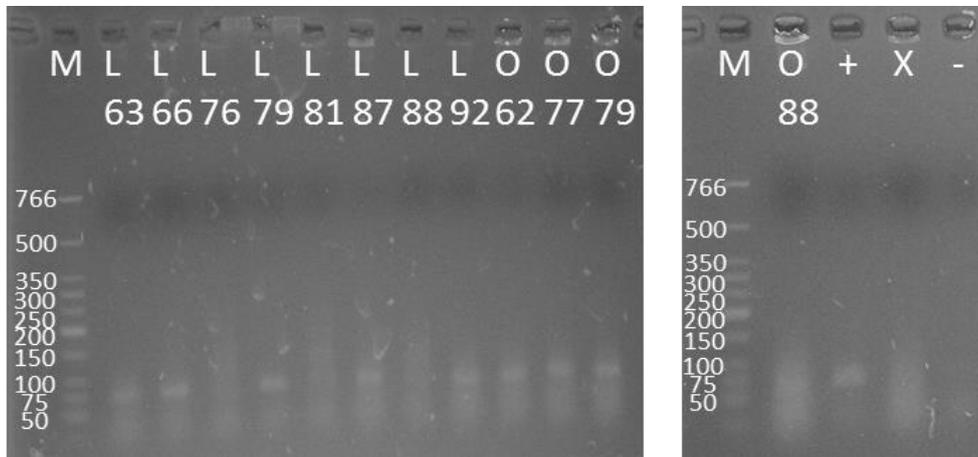


Abbildung 147: AGEs der Kolonie-PCRs (Lysozym Sektor 63, 66, 76, 79, 81, 87, 88, 92; Ovalbumin Sektor 62, 77, 79, 88).

L = Lysozym, O = Ovalbumin, C = Casein. Nummerierung entspricht den Sektoren in Tabelle 120, Tabelle 121 und Tabelle 122. += Positiv (750 bp) aus *TOPO TA Cloning Kit*. - = Blindwert (Wasser), X = Blindwert (Zellen ohne 240 bp-Fragment), M = *low molecular weight ladder*. Primer = Standard.

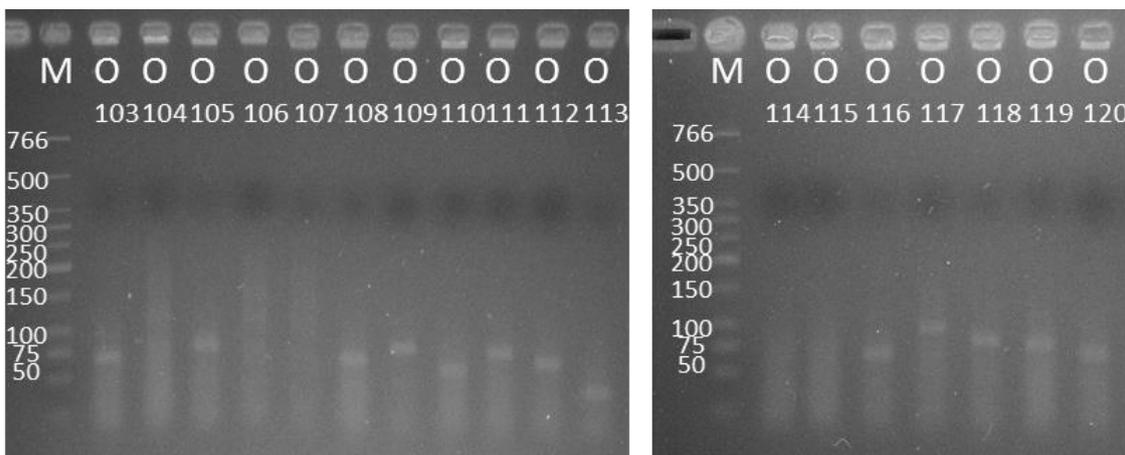


Abbildung 148: AGEs der Kolonie-PCRs (Ovalbumin Sektor 103-120).

L = Lysozym, O = Ovalbumin, C = Casein. Nummerierung entspricht den Sektoren in Tabelle 120, Tabelle 121 und Tabelle 122. += Positiv (750 bp) aus *TOPO TA Cloning Kit*. - = Blindwert (Wasser), M = *low molecular weight ladder*. Primer = Standard.

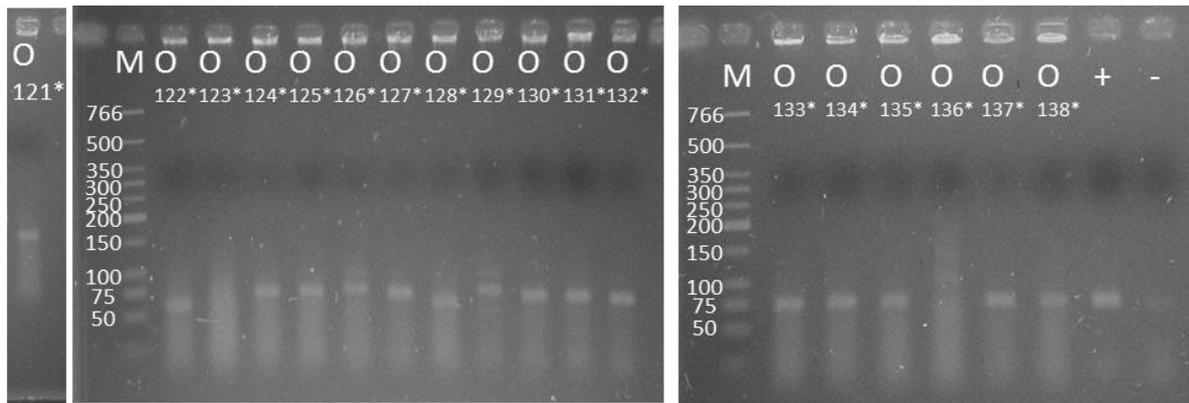


Abbildung 149: AGEs der Kolonie-PCRs (Ovalbumin Sektor 121*-138*).

L = Lysozym, O = Ovalbumin, C = Casein. Nummerierung entspricht den Sektoren in Tabelle 120, Tabelle 121 und Tabelle 122. + = Positiv (750 bp) aus TOPO TA Cloning Kit. - = Blindwert (Wasser), M = low molecular weight ladder. Primer = Standard.

8.7 Sekundärstrukturen Aptamere

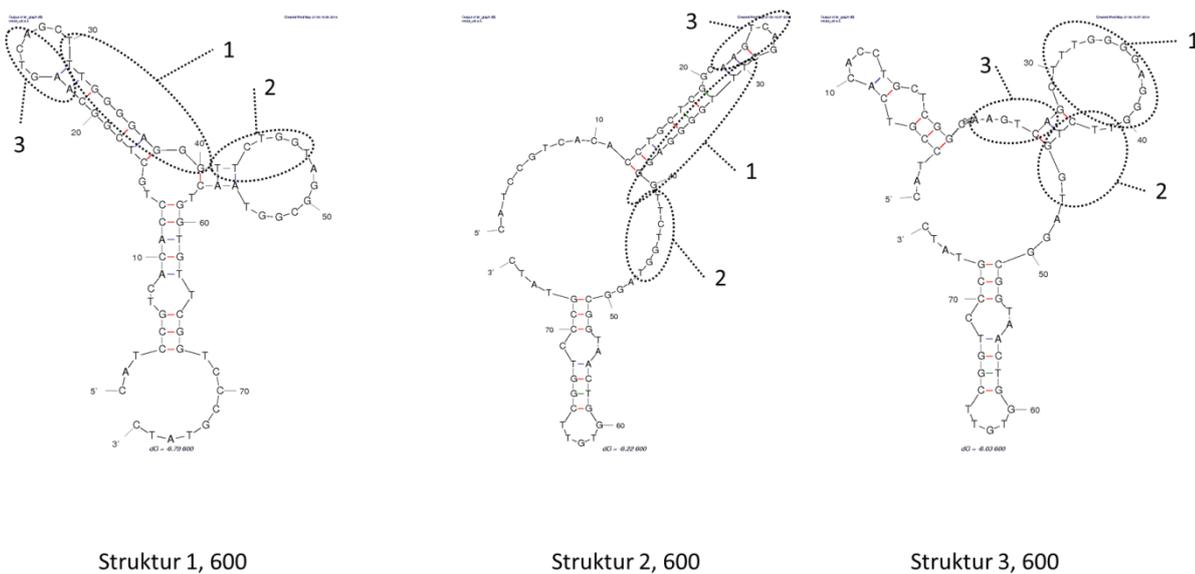
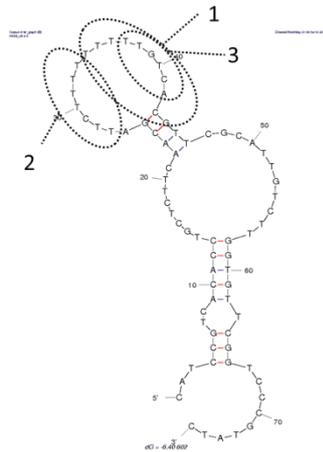
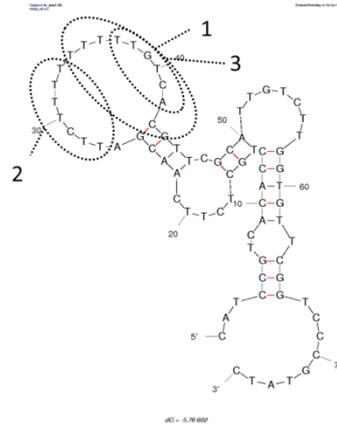


Abbildung 150: Sekundärstrukturen und Motive Aptamer 600.

Dargestellt sind die Sekundärstrukturen (erstellt mittels *mfold*) des Aptamers 600. Die in Tabelle 18 aufgeführten Motive sind markiert (Motiv 1: TTTGA TGATG T; Motiv 2: TTCTA TT; Motiv 3: TTGTC A).



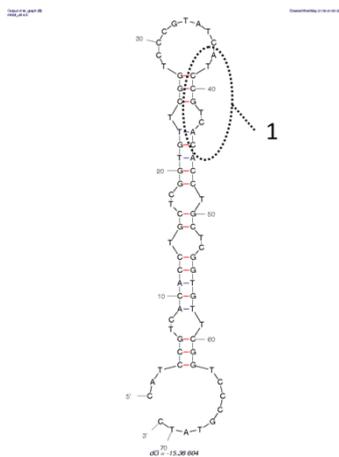
Struktur 1, 602



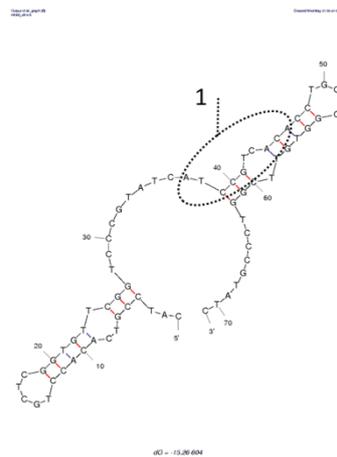
Struktur 2, 602

Abbildung 151: Sekundärstrukturen und Motive Aptamer 602.

Dargestellt sind die Sekundärstrukturen (erstellt mittels *mfold*) des Aptamers 602. Die in Tabelle 18 aufgeführten Motive sind markiert (Motiv 1: TTTGA TGATG T; Motiv 2: TTCTA TT; Motiv 3: TTGTC A).



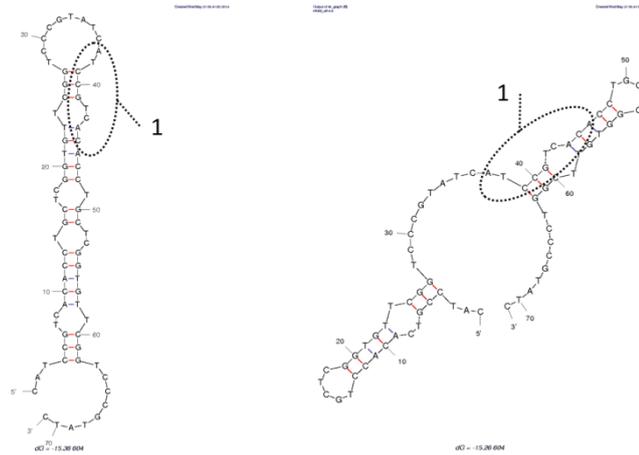
Struktur 1, 604



Struktur 2, 604

Abbildung 152: Sekundärstrukturen und Motive Aptamer 604.

Dargestellt sind die Sekundärstrukturen (erstellt mittels *mfold*) des Aptamers 604. Die in Tabelle 19 aufgeführten Motive sind markiert (Motiv 1: ACCCG TCACA; Motiv 2: AACCG GA; Motiv 3: CACCG G).

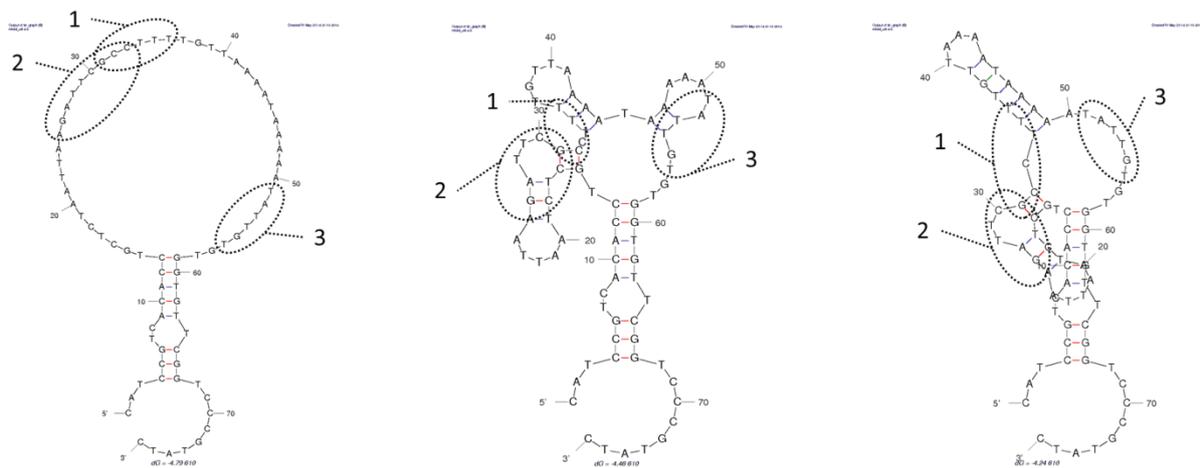


Struktur 1, 604

Struktur 2, 604

Abbildung 153: Sekundärstrukturen und Motive Aptamer 606.

Dargestellt sind die Sekundärstrukturen (erstellt mittels *mfold*) des Aptamers 606. Die in Tabelle 20 aufgeführten Motive sind markiert (Motiv 1: CCCTT T; Motiv 2: AGATT CGC; Motiv 3: TGATG T).



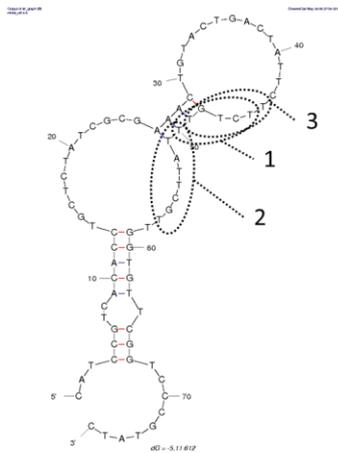
Struktur 1, 610

Struktur 2, 610

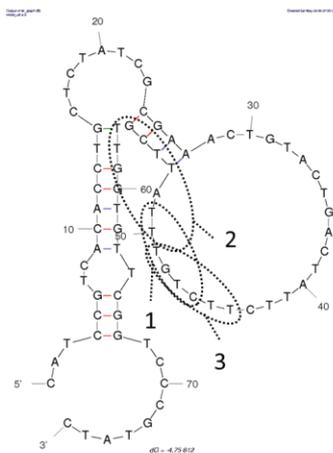
Struktur 3, 610

Abbildung 154: Sekundärstrukturen und Motive Aptamer 610.

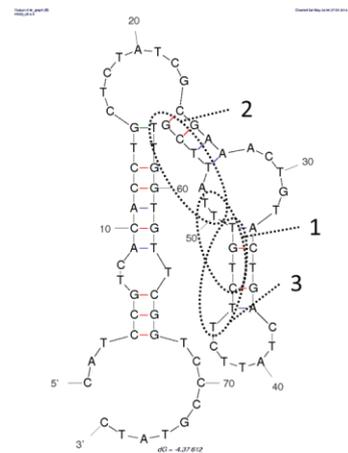
Dargestellt sind die Sekundärstrukturen (erstellt mittels *mfold*) des Aptamers 610. Die in Tabelle 20 aufgeführten Motive sind markiert (Motiv 1: CCCTT T; Motiv 2: AGATT CGC; Motiv 3: TGATG T).



Struktur 1, 612



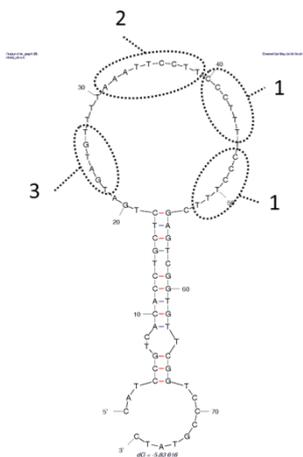
Struktur 2, 612



Struktur 3, 612

Abbildung 155: Sekundärstrukturen und Motive Aptamer 612.

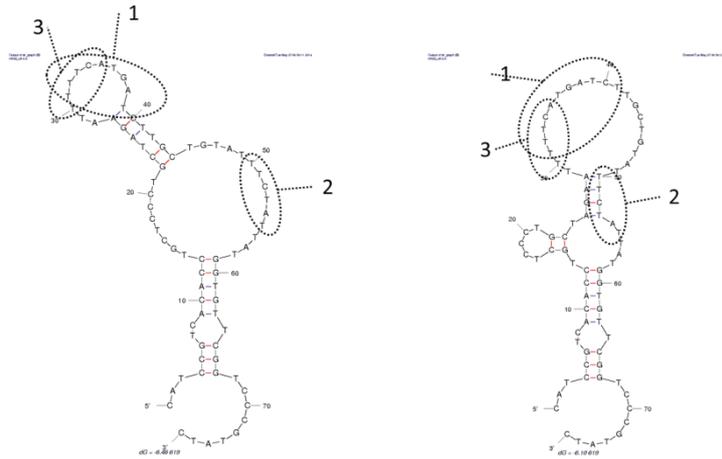
Dargestellt sind die Sekundärstrukturen (erstellt mittels *mfold*) des Aptamers 612. Die in Tabelle 20 aufgeführten Motive sind markiert (Motiv 1: CCCTT T; Motiv 2: AGATT CGC; Motiv 3: TGATG T).



Struktur 1, 616

Abbildung 156: Sekundärstrukturen und Motive Aptamer 616.

Dargestellt ist die Sekundärstruktur (erstellt mittels *mfold*) des Aptamers 616. Die in Tabelle 20 aufgeführten Motive sind markiert (Motiv 1: CCCTT T; Motiv 2: AGATT CGC; Motiv 3: TGATG T).

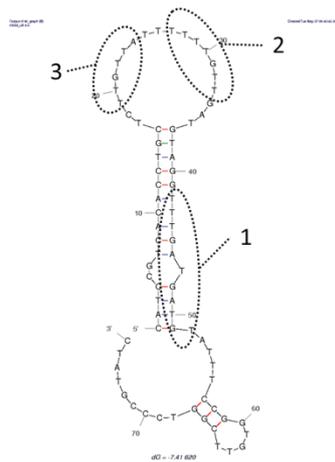


Struktur 1, 619

Struktur 2, 619

Abbildung 157: Sekundärstrukturen und Motive Aptamer 619.

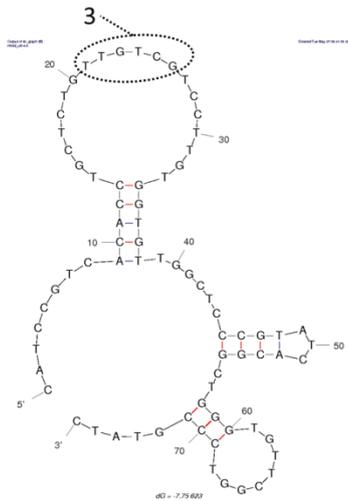
Dargestellt sind die Sekundärstrukturen (erstellt mittels *mfold*) des Aptamers 619. Die in Tabelle 18 aufgeführten Motive sind markiert (Motiv 1: TTTGA TGATG T; Motiv 2: TTCTA TT; Motiv 3: TTGTC A).



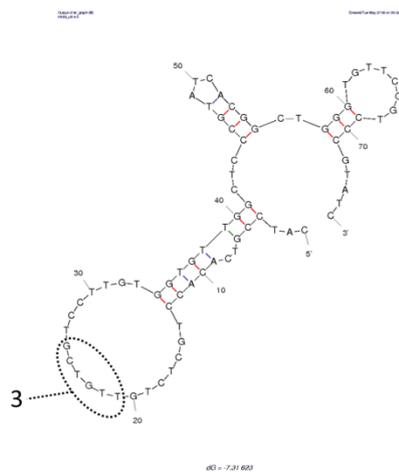
Struktur 1, 620

Abbildung 158: Sekundärstruktur und Motive Aptamer 620.

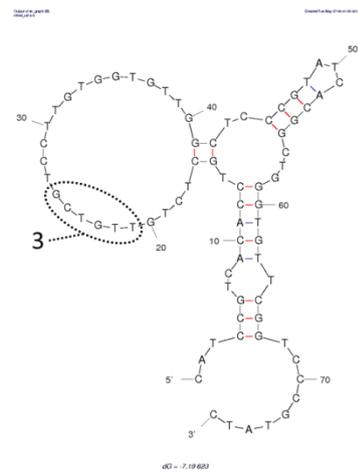
Dargestellt ist die Sekundärstruktur (erstellt mittels *mfold*) des Aptamers 620. Die in Tabelle 18 aufgeführten Motive sind markiert (Motiv 1: TTTGA TGATG T; Motiv 2: TTCTA TT; Motiv 3: TTGTC A).



Struktur 1, 623



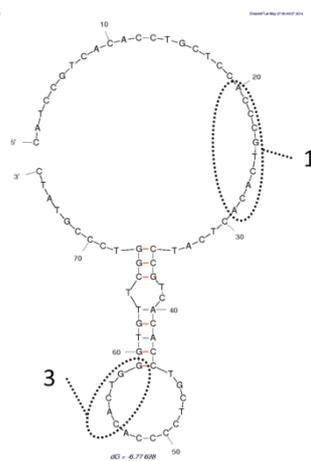
Struktur 2, 623



Struktur 3, 623

Abbildung 159: Sekundärstrukturen und Motive Aptamer 623.

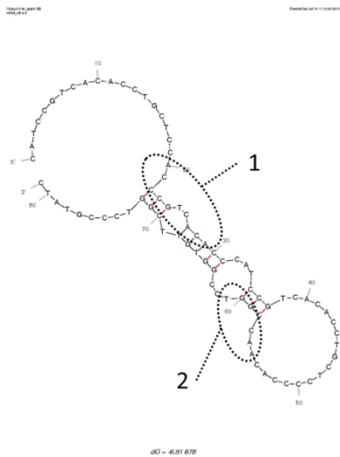
Dargestellt sind die Sekundärstrukturen (erstellt mittels *mfold*) des Aptamers 623. Die in Tabelle 18 aufgeführten Motive sind markiert (Motiv 1: TTTGA TGATG T; Motiv 2: TTCTA TT; Motiv 3: TTGTC A).



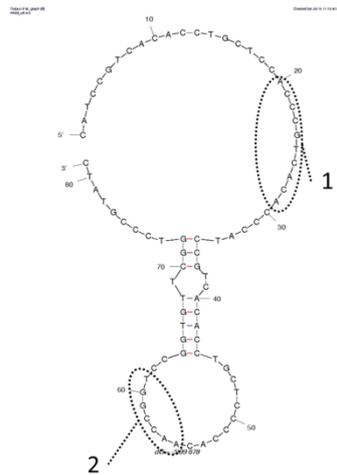
Struktur 1, 628

Abbildung 160: Sekundärstrukturen und Motive Aptamer 628.

Dargestellt ist die Sekundärstruktur (erstellt mittels *mfold*) des Aptamers 604. Die in Tabelle 19 aufgeführten Motive sind markiert (Motiv 1: ACCCG TCACA; Motiv 2: AACCG GA; Motiv 3: CACCG G).



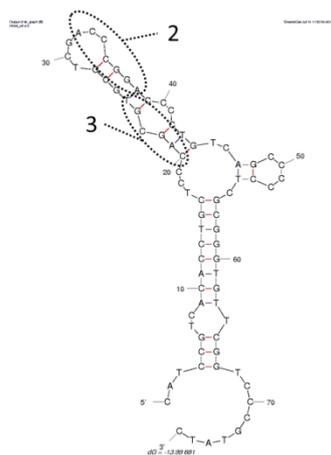
Struktur 1, 678



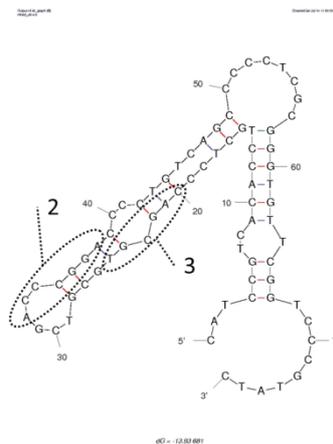
Struktur 2, 678

Abbildung 161: Sekundärstrukturen und Motive Aptamer 678.

Dargestellt sind die Sekundärstrukturen (erstellt mittels *mfold*) des Aptamers 604. Die in Tabelle 19 aufgeführten Motive sind markiert (Motiv 1: ACCCG TCACA; Motiv 2: AACCG GA; Motiv 3: CACCG G).



Struktur 1, 681



Struktur 2, 681

Abbildung 162: Sekundärstrukturen und Motive Aptamer 681.

Dargestellt sind die Sekundärstrukturen (erstellt mittels *mfold*) des Aptamers 604. Die in Tabelle 19 aufgeführten Motive sind markiert (Motiv 1: ACCCG TCACA; Motiv 2: AACCG GA; Motiv 3: CACCG G).

8.8 Aptamerbasierter SPR-Biosensor

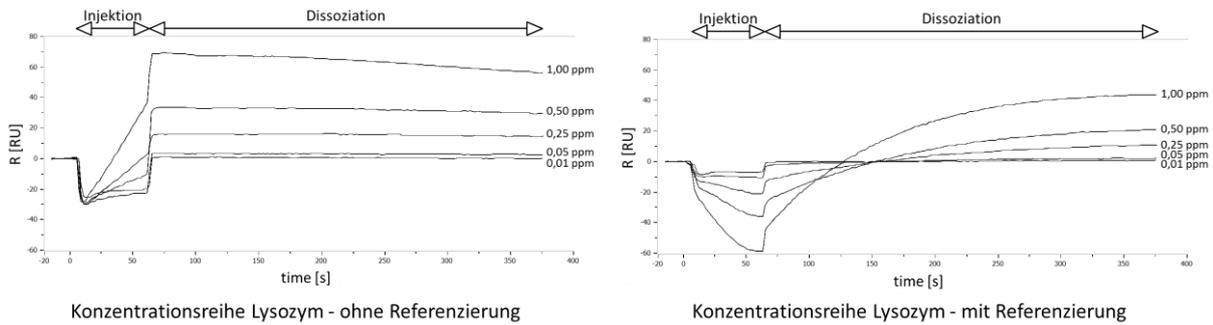


Abbildung 163: Vergleich Konzentrationsreihe Lysozym SPR-Biosensor des Aptamers 619 mit und ohne Referenzierung. Sensogramme einer Konzentrationsreihe von Lysozym in Weißweinpuffer, vermessen unter Verwendung des beschriebenen SPR-Biosensors mit dem Aptamer 619. Links: Generierte Sensogramme ohne Referenzierung. Rechts: Sensogramme mit Referenzierung gegenüber Sensoroberfläche und Streptavidin/Biotin.

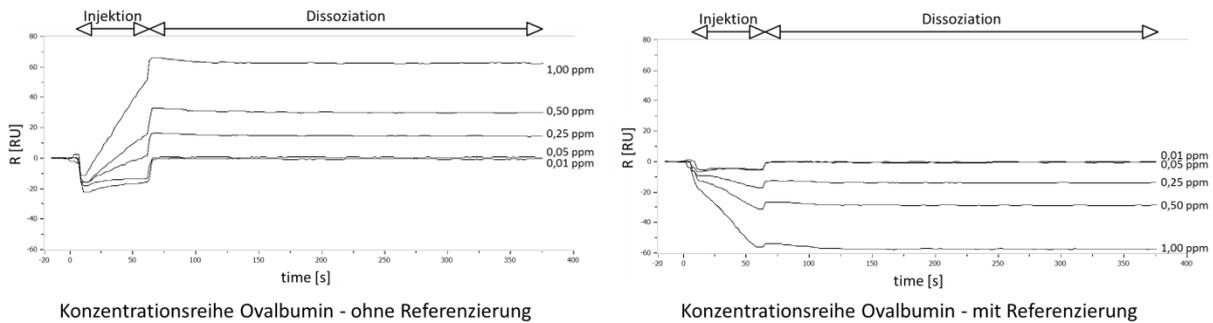


Abbildung 164: Vergleich Konzentrationsreihe Ovalbumin SPR-Biosensor des Aptamers 619 mit und ohne Referenzierung. Sensogramme einer Konzentrationsreihe von Ovalbumin in Weißweinpuffer, vermessen unter Verwendung des beschriebenen SPR-Biosensors mit dem Aptamer 619. Links: Generierte Sensogramme ohne Referenzierung. Rechts: Sensogramme mit Referenzierung gegenüber Sensoroberfläche und Streptavidin/Biotin.

Tabelle 123: Messwerte Kalibrationsreihe Lysozym (aptamerbasierter Biosensor).

Angegeben sind die im Rahmen des Funktionstests gemessenen Signale am Ende der Dissoziationszeit (siehe Abbildung 163). Die Proteinlösungen wurden mit Weißweinpuffer verdünnt und mit dem SPR-Biosensor (basierend auf dem Aptamer 619) vermessen.

Konzentration Lysozym [ppm]	R [RU]
1	43,61
0,5	20,64
0,25	10,66
0,05	2,32
0,01	0,92

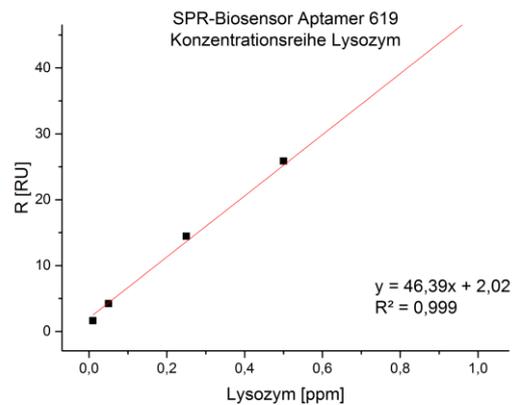


Abbildung 165: Kalibrationsgerade Lysozym (aptamerbasierter Biosensor).

Dargestellt ist die Regression der in Tabelle 123 angegebenen Daten unter Verwendung der allgemeinen Geradengleichung, die resultierende Funktion sowie das Bestimmtheitsmaß.

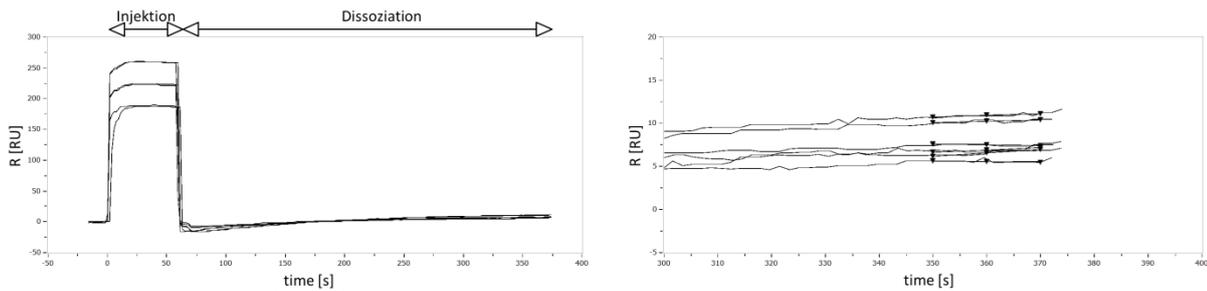


Abbildung 166: Sensogramme der Realproben (Vermessung mit SPR-Biosensor, basierend auf Aptamer 619).

Dargestellt sind die Sensogramme der mit Lysozym (0,25 ppm) versetzten Weine nach Referenzierung zur blockierten Sensoroberfläche. Links: Überblick mit deutlich erkennbarer Veränderung des Brechungsindex während der Injektion. Rechts: Ende der Dissoziationszeit (vergrößert). Die von einem Nullwert deutlich zu unterscheidenden Signale sind gut zu erkennen und die zur Auswertung genutzten Datenpunkte sind durch Markierung hervorgehoben.

Tabelle 124: Messwerte Weinproben mit Lysozym (aptamerbasierter Biosensor).

Die Weinproben A-C wurden mit 0,25 ppm Lysozym versetzt, die Untersuchung erfolgte mit dem auf dem Aptamer 619 basierenden SPR-Biosensor. In Spalte 3 sind die gemessenen Signale am Ende der Dissoziationszeit (siehe

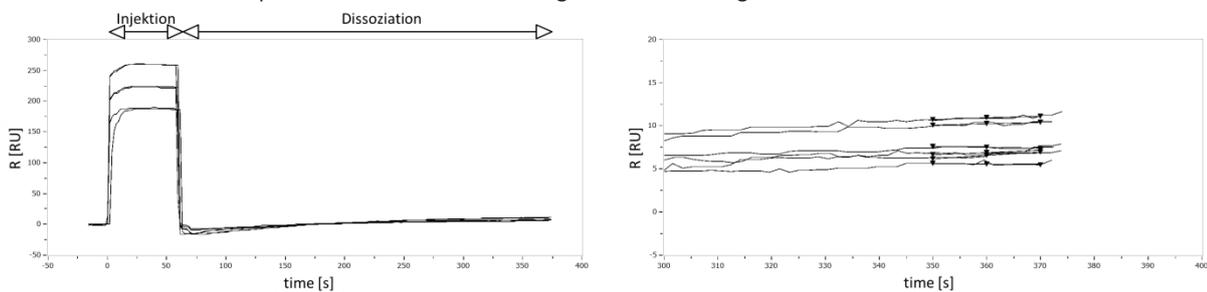


Abbildung 166) angegeben. Zur Berechnung der Wiederfindung (siehe 6.2.5) wurde die Geradengleichung aus Abbildung 165 verwendet.

Weinprobe	Konzentration Lysozym [ppm]	R [RU]	Wiederfindung [%]
A	0,25	16,64	126,06
A	0,25	17,33	132,01
B	0,25	23,03	181,16
B	0,25	24,22	191,42
C	0,25	15,42	115,54
C	0,25	14,53	107,87

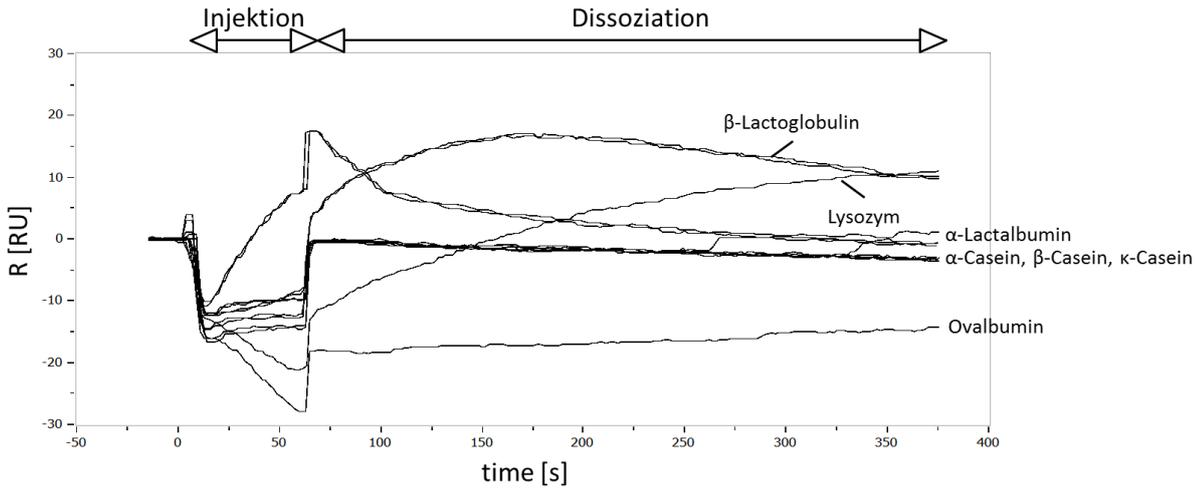


Abbildung 167: Sensogramme Spezifität Aptamer 619.

Sensogramme unterschiedlicher Proteinlösungen (Je 25 μ l, 0,25 ppm; α -Casein, β -Casein, κ -Casein, α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin, Lysozym, Ovalbumin). Aptamer 619-SPR-Biosensor, Laufpuffer: Weißweinpuffer (+0,5 % Tween-20), referenziert gegenüber dem Referenzkanal (Streptavidin/Biotin), Doppelbestimmung.

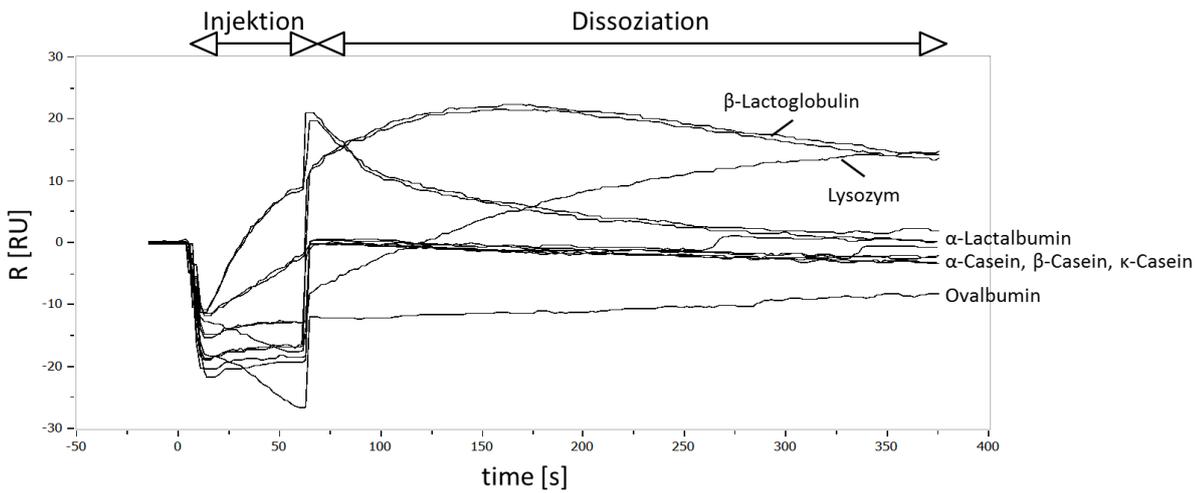


Abbildung 168: Sensogramme Spezifität Aptamer 620.

Sensogramme unterschiedlicher Proteinlösungen (Je 25 μ l, 0,25 ppm; α -Casein, β -Casein, κ -Casein, α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin, Lysozym, Ovalbumin). Aptamer 620-SPR-Biosensor, Laufpuffer: Weißweinpuffer (+0,5 % Tween-20), referenziert gegenüber dem Referenzkanal (Streptavidin/Biotin), Doppelbestimmung.

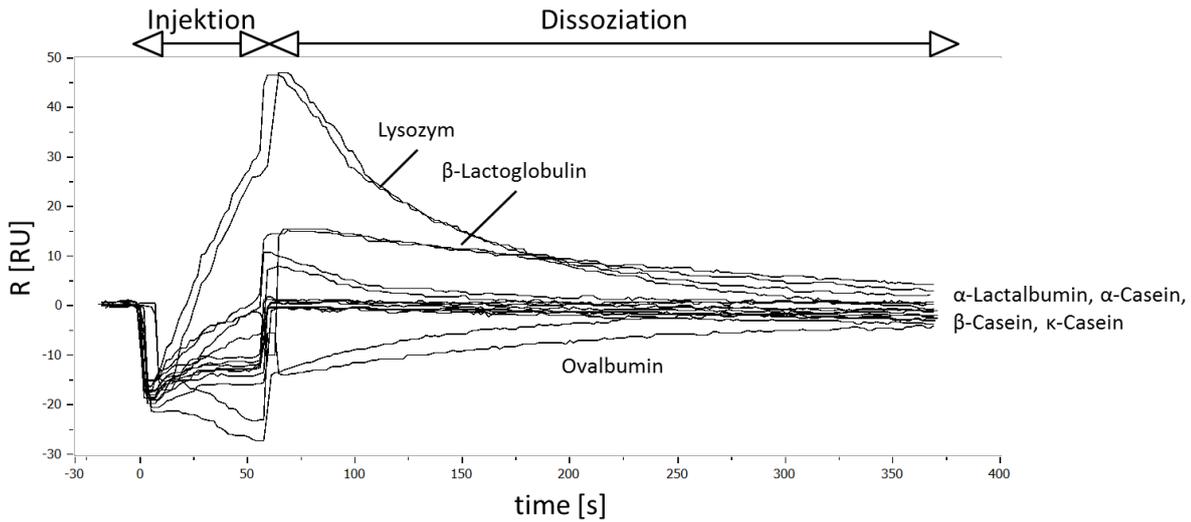


Abbildung 169: Sensogramme Spezifität Aptamer 604.

Sensogramme unterschiedlicher Proteinlösungen (Je 25 μ l, 0,25 ppm; α -Casein, β -Casein, κ -Casein, α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin, Lysozym, Ovalbumin). Aptamer 604-SPR-Biosensor, Laufpuffer: Weißweinpuffer (+0,5 % Tween-20), referenziert gegenüber dem Referenzkanal (Streptavidin/Biotin), Doppelbestimmung.

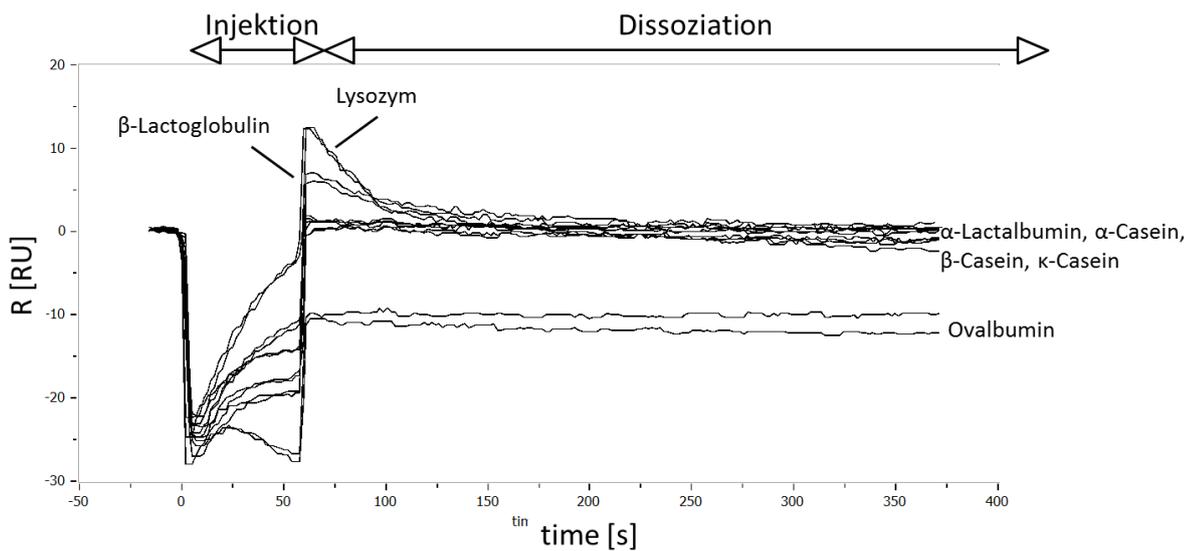


Abbildung 170: Sensogramme Spezifität Aptamer 678.

Sensogramme unterschiedlicher Proteinlösungen (Je 25 μ l, 0,25 ppm; α -Casein, β -Casein, κ -Casein, α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin, Lysozym, Ovalbumin). Aptamer 678-SPR-Biosensor, Laufpuffer: Weißweinpuffer (+0,5 % Tween-20), referenziert gegenüber dem Referenzkanal (Streptavidin/Biotin), Doppelbestimmung.

8.9 Bestimmung der Aptamer 620-LFD-Nachweisgrenze in Wein

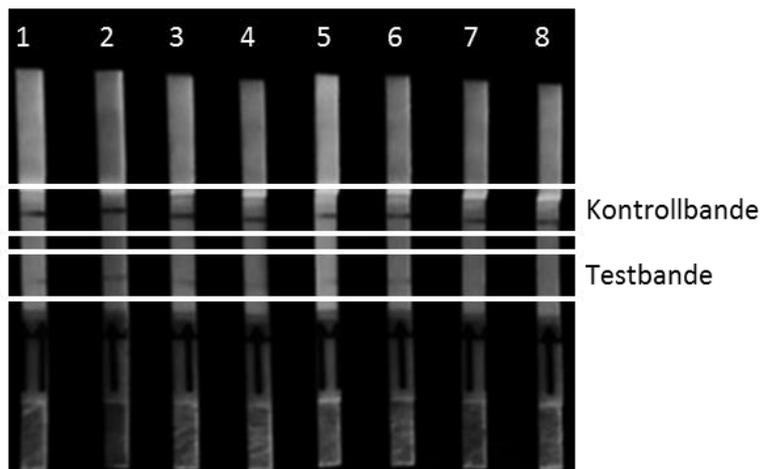


Abbildung 171: Detektion von Lysozym durch Aptamer 620-LFD in Wein.

Abgebildet sind die LFDs einer Verdünnungsreihe von Lysozym in PBS/Weißwein-Gemisch (Monfleur Fruit (Tabelle 33), 1: 100 ppm, 2: 80 ppm, 3: 50 ppm, 4: 40 ppm, 5: 30 ppm, 6: 20 ppm, 7: 10 ppm, 8: 8 ppm) durchgeführt mit den in Tabelle 28 angegebenen Bedingungen.

8.10 Aptastaining

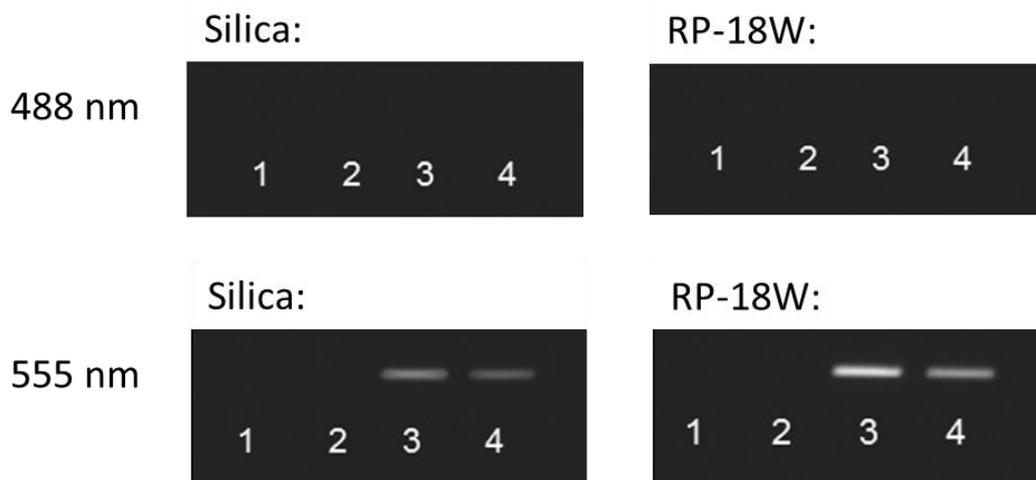


Abbildung 172: Evaluierung ATTO-550 zur Verwendung im Aptastaining.

Dargestellt sind unterschiedliche HPTLC-Phasen (Silica und RP-18W) mit unterschiedlichen Proben (1: Lysozym, 2: Aptamer 619, 3: 5'-ATTO 550-Aptamer 619, 4: ATTO-550) in Detektion bei 488 und 555 nm.

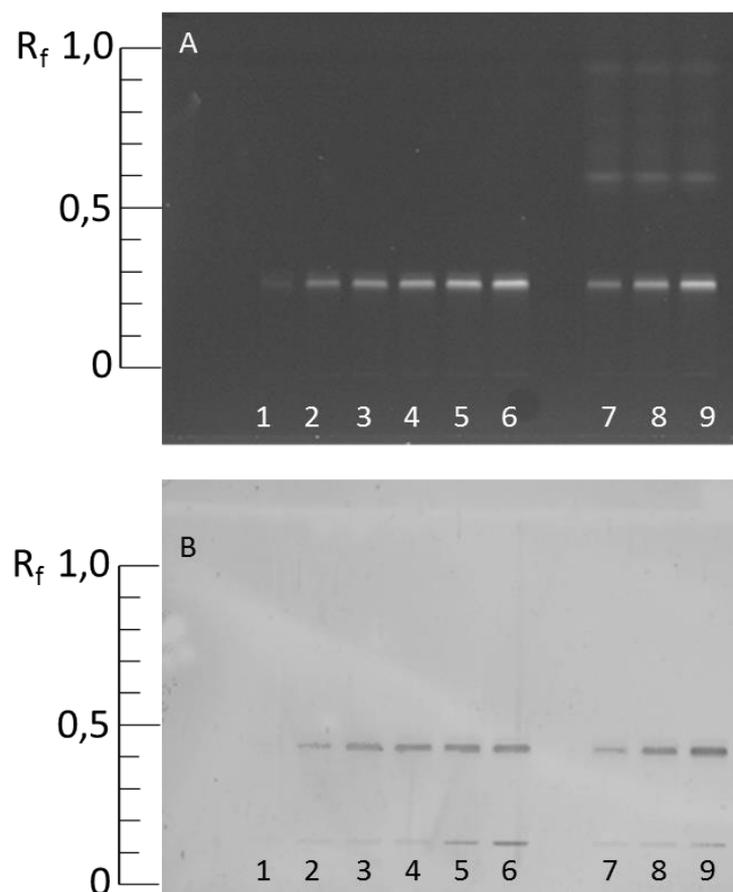


Abbildung 173: Aptastaining und Fluorescaminfärbung auf RP-18W durch Aptamer 619.

Verdünnungsreihe von Lysozym in Weißweinpuffer (1-6: 0,25 μg , 0,5 μg , 0,75 μg , 1 μg , 1,25 μg , 1,5 μg) und Verdünnungen von Lysozym in Weißwein (7-9: 0,5 μg , 1 μg , 1,5 μg). A: Fluorescaminfärbung (Detektion 366 nm), B: Aptastaining mit 5'-ATTO 550 Aptamer 619 (Detektion bei 555 nm, 15 s Belichtung).

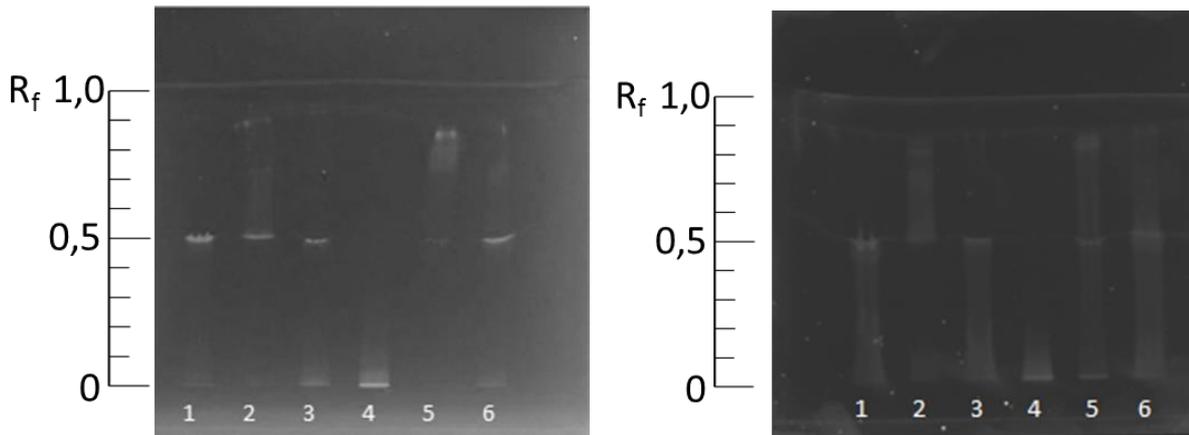


Abbildung 174: HPTLC-Trennung Caseine, Fluorescaminfärbung und Aptastaining auf Silica durch Apt. 606.

Dargestellt sind Zwillingssplatten der Trennung unterschiedlicher Caseine, automatisiert aufgetragen (1 µg): α_{S1} -Casein (Bahn 1), β -Casein (Bahn 2), κ -Casein (Bahn 3), Lysozym (Bahn 4), α -Lactalbumin (Bahn 5) und β -Lactoglobulin (Bahn 6). Links: Fluorescaminfärbung (Detektion 366 nm). Rechts: Aptastaining mit 5'-ATTO 550 Aptamer 606 (Detektion bei 555 nm, 15 s Belichtung)

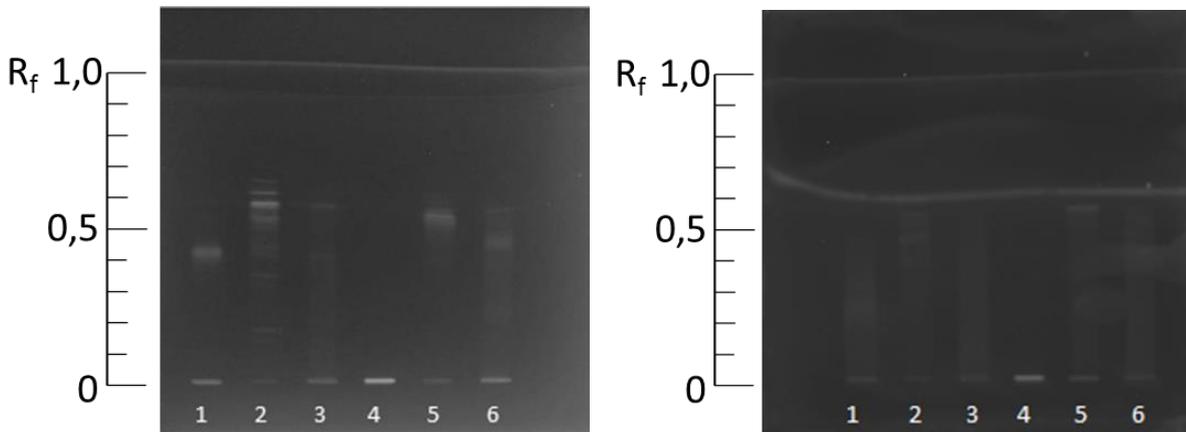


Abbildung 175: HPTLC-Trennung Caseine, Fluorescaminfärbung und Aptastaining auf Silica durch Apt. 610.

Dargestellt sind Zwillingssplatten der Trennung unterschiedlicher Caseine, automatisiert aufgetragen (1 µg): α_{S1} -Casein (Bahn 1), β -Casein (Bahn 2), κ -Casein (Bahn 3), Lysozym (Bahn 4), α -Lactalbumin (Bahn 5) und β -Lactoglobulin (Bahn 6). Links: Fluorescaminfärbung (Detektion 366 nm). Rechts: Aptastaining mit 5'-ATTO 550 Aptamer 610 (Detektion bei 555 nm, 15 s Belichtung)

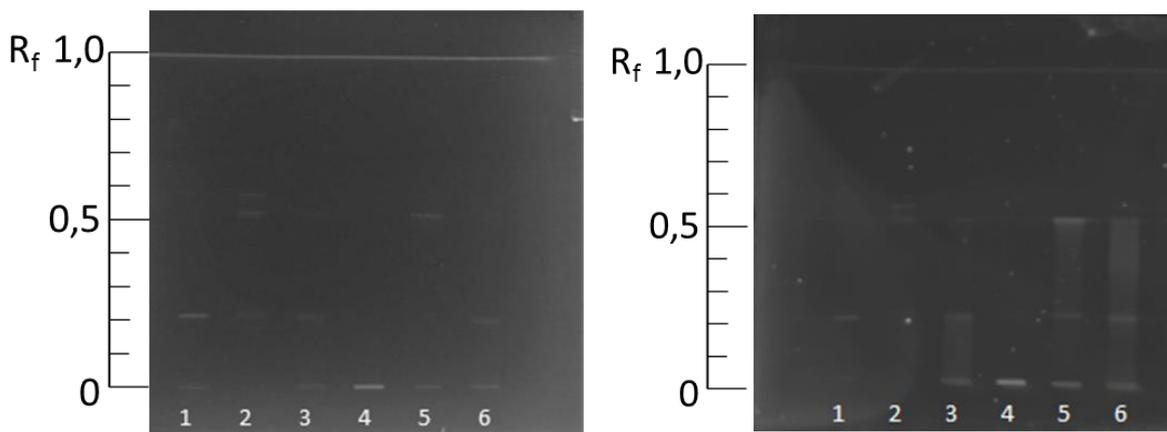


Abbildung 176: HPTLC-Trennung Caseine, Fluorescaminfärbung und Aptastaining auf Silica durch Apt. 612.

Dargestellt sind Zwillingssplatten der Trennung unterschiedlicher Caseine, automatisiert aufgetragen (1 µg): α_{S1} -Casein (Bahn 1), β -Casein (Bahn 2), κ -Casein (Bahn 3), Lysozym (Bahn 4), α -Lactalbumin (Bahn 5) und β -Lactoglobulin (Bahn 6). Links: Fluorescaminfärbung (Detektion 366 nm). Rechts: Aptastaining mit 5'-ATTO 550 Aptamer 612 (Detektion bei 555 nm, 15 s Belichtung)

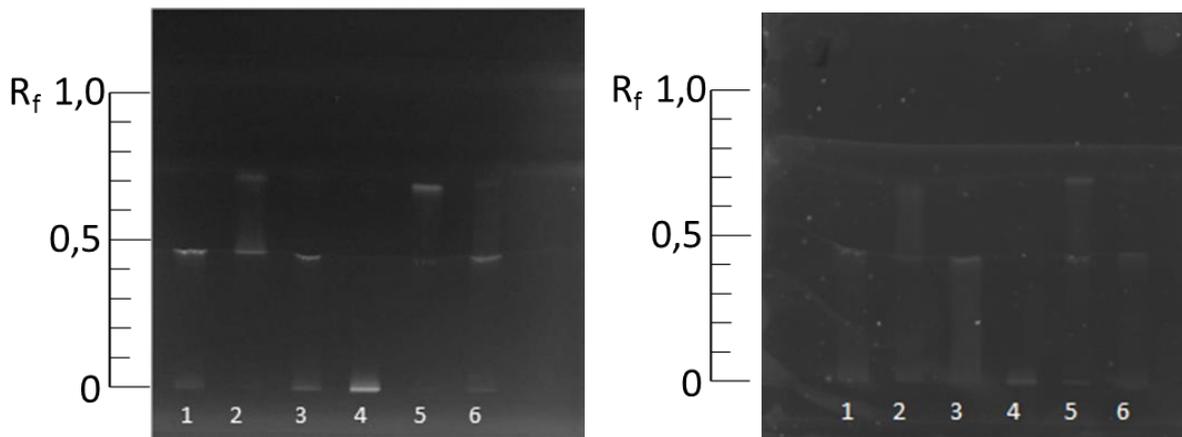


Abbildung 177: HPTLC-Trennung Caseine, Fluorescaminfärbung und Aptastaining auf Silica durch Apt. 616.

Dargestellt sind Zwillingsplatten der Trennung unterschiedlicher Caseine, automatisiert aufgetragen (1 µg): α_{S1} -Casein (Bahn 1), β -Casein (Bahn 2), κ -Casein (Bahn 3), Lysozym (Bahn 4), α -Lactalbumin (Bahn 5) und β -Lactoglobulin (Bahn 6). Links: Fluorescaminfärbung (Detektion 366 nm). Rechts: Aptastaining mit 5'-ATTO 550 Aptamer 616 (Detektion bei 555 nm, 15 s Belichtung)

9 Danksagung

Diesen persönlichsten Teil der Arbeit möchte ich nutzen um mich bei den Menschen zu bedanken, welche alle auf ihre eigene Art und Weise einen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

Meiner Betreuerin Dr. Angelika Paschke-Kratzin möchte ich zuerst danken, da ich ohne sie wahrscheinlich nie an der Universität Hamburg gelandet wäre. Du hast dich für den Unbekannten von außen entschieden und mir die Möglichkeit gegeben dieses interessante Thema zu bearbeiten. Du warst für mich stets erreichbar und hast mir nie das Gefühl gegeben alleine da zu stehen, vielen Dank!

Auch meinem zweiten Betreuer Prof. Dr. Markus Fischer möchte ich danken. Auch Sie waren ein entscheidender Teil für die vorliegende Arbeit und auch Sie haben sich auf das Unbekannte von außen eingelassen. Sie haben mir in verschiedenen Situationen die Augen geöffnet und mich sicherlich auch über das Ende dieser Arbeit hinaus geprägt. Vielen Dank!

Für die Bereitschaft als Gutachter beziehungsweise Prüfer zur Verfügung zu stehen möchte ich Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart, Prof. Dr. Peter Heisig, Prof. Dr. Sascha Rohn sowie Dr. Albrecht Sakmann herzlich danken.

Unter den vielen Mitgliedern des Instituts für Lebensmittelchemie möchte ich einige Personen hervorheben. Zunächst Dr. Tim Hünninger, ohne deine Unterstützung und Einarbeitung wäre die gesamte Arbeit sicherlich deutlich anders verlaufen. Freundschaften über das tägliche Miteinander auf der Arbeit hinaus haben sich auch mit vielen anderen entwickelt, besonders hervorheben und danken möchte ich an dieser Stelle Christin Fischer, Christine Felbinger, Sven Klockmann, Juliane Klare, Lena Morschheuser und Maren Vollmer. Auch bei Carsten Möller sowie Dr. Monika Körs möchte ich mich für die mit mir geteilten Erfahrungen und die Unterstützung bedanken.

Bei Sophie Ingwersen, Judith Fischer, Christina Pille, Lisa Mersmann und Esma Ören möchte ich mich für die im Rahmen unterschiedlicher Abschlussarbeiten erzielten Ergebnisse bedanken. Die Arbeit mit euch hat mir viel Spaß gemacht! Für die geduldige Unterstützung bei der Arbeit mit dem SPR möchte ich außerdem Sven Malik danken.

Um überhaupt bis zu diesem Punkt in meinem Leben zu kommen, hat es nicht nur mich viel Zeit und Energie gekostet. Auch meine Familie hat mich in großartiger Art und Weise unterstützt und entsprechende Lasten auf sich genommen. Ein einfacher Dank reicht für diese Unterstützung eigentlich gar nicht aus, aber ich werde es trotzdem versuchen: Danke Papa, Danke Mama, Danke Wiebke und Danke Uwe.

Zum Schluss möchte ich mich natürlich auch bei der wichtigsten Person in meinem Leben bedanken. Ich habe in den letzten Jahren häufig Respekt für meine Entscheidung zur Durchführung dieser Arbeit erhalten, sei es aus Anerkennung der Leistung, für den Willen diese in Summe 9-jährige Ausbildung durchzuziehen oder auch für die Energie jeden Tag 3 Stunden mit der Bahn nach Hamburg zu fahren. Ohne deine Unterstützung, ohne das Verständnis für schlechte Laune und auch ohne dein Wesen wäre es für mich nicht möglich gewesen diese Arbeit in dieser Form hinzubekommen. Du weißt was du mir bedeutest und wie glücklich du mich machst. Danke Annika.

10 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

.....

Bremen, 09. August 2017