

**DNA-APTAMERE:
SELEKTION UND ANWENDUNG
ZUM SPEZIFISCHEN NACHWEIS
VON AB₅-TOXINEN**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

Hamburg School of Food Science,
Institut für Lebensmittelchemie

vorgelegt von

Esther Frohnmeier

Hamburg 2019

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2015 bis Juli 2018 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. Markus Fischer an der Hamburg School of Food Science, Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg angefertigt.

1. Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Markus Fischer
2. Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. José A. C. Broekaert

Datum der Druckfreigabe: 5. April 2019

Publikationen und Poster

Aptamer Lateral Flow Assays for Rapid and Sensitive Detection of Cholera Toxin

E. Frohnmeyer, N. Tuschel, T. Sitz, C. Hermann, G. T. Dahl, F. Schulz, A. J. Baeumner, M. Fischer

Analyst (2019), doi: 10.1039/c8an01616j

Highly affine and selective aptamers against cholera toxin as capture elements in magnetic bead-based sandwich ELAA

E. Frohnmeyer, F. Frisch, S. Falke, C. Betzel, M. Fischer

Journal of Biotechnology (2018) 269 35–42, doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.01.012

Food Sensing: Aptamer-Based Trapping of *Bacillus cereus* Spores with Specific Detection via Real Time PCR in Milk

C. Fischer, T. Hünninger, J.-H. Jarck, E. Frohnmeyer, C. Kallinich, I. Haase, U. Hahn, M. Fischer

Journal of Agricultural and Food Chemistry (2015) 63(36):8050-7, doi: 10.1021/acs.jafc.5b03738

Aptamere gegen Choleratoxin für den Einsatz in Anreicherungs- und Detektionssystemen

E. Frohnmeyer, M. Fischer

Regionalverbandstagung Nord (LChG), Hamburg, Deutschland, 27.02.17

Aptamers against Cholera Toxin as Capture Agents in Magnetic Bead Sandwich ELAA

E. Frohnmeyer, F. Frisch, M. Fischer

46. Deutscher Lebensmittelchemikertag (LChG), Würzburg, Deutschland, 25.-27.09.17
& Aptamers in Bordeaux, Bordeaux, Frankreich, 22.-23.09.17

Aptamer-basierte Lateral Flow Assays zum sensitiven Nachweis von Choleratoxin

E. Frohnmeyer, M. Fischer

Regionalverbandstagung Nord (LChG), Hannover, Deutschland, 07.-08.03.18

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Markus Fischer für die Bereitstellung des Themas für meine Doktorarbeit, für die Freiheit in der Ausgestaltung meiner Forschung sowie für die Unterstützung und Motivation in schwierigen Zeiten bedanken.

Weiterhin danke ich meiner Mentorin Prof. Dr. Antje J. Bäumner für die intensive Unterstützung und wissenschaftliche Diskussion während der LFA-Entwicklung, sowie zusammen mit ihrem Team für die schöne und lehrreiche Zeit in Regensburg.

Ich danke Prof. Dr. José A. C. Broekaert für die Übernahme des Zweitgutachtens und Prof. Dr. Bernward Bisping und Dr. Thomas Hackl für die Bereitschaft, als Prüfer zur Verfügung zu stehen.

Außerdem danke ich Dr. Sven Falke und Dr. Tobias Gräwert für die Hilfe beim Durchführen und Auswerten der SAXS-Experimente und den Mitgliedern des AK Ignatova und des AK Rohn für das (teilweise sehr intensive) Mitbenutzen ihrer Geräte.

Großer Dank gilt natürlich auch meinen Diplomandinnen Riekje Reggelin, Farina Frisch und Nadine Tuschel und meinen Praktikanten Tobias Sitz und Tobias Messerschmidt für ihre Begeisterung für mein Thema und für ihr Durchhaltevermögen.

Ich danke lieb gewonnen Kollegen und Freunden, besonders Abed Albunni, Edris Riedel und Maïke Arndt für ihre moralische Unterstützung und die tolle Zeit, die ich nie vergessen werde. Außerdem danke ich meiner Aptamerschwester Joanna Fafinska für unsere Selbsthilfegruppe und die daraus entstandene Freundschaft. Großer Dank gilt auch Vika Yarmilko, die immer an mich geglaubt und mich unterstützt hat.

Besonderer Dank gebührt nicht zuletzt meinen Eltern, für die bedingungslose Liebe und immerwährende Unterstützung, und natürlich meinem Freund, Moritz Braun, der mich während unserer gemeinsamen Promotionszeit durch Höhen und Tiefen begleitet hat und es immer verstanden hat, mich wieder zum Lachen zu bringen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	viii
Abkürzungsverzeichnis	ix
Zusammenfassung	xiii
Abstract	xv
1 Einführung	1
1.1 AB ₅ -Toxine	1
1.1.1 Struktureller Aufbau der AB ₅ -Toxine	1
1.1.2 Bedeutung der AB ₅ -Toxine	2
1.1.3 Cholera toxin	5
1.1.4 Shigatoxin 1	7
1.2 Aptamere	10
1.2.1 <i>In vitro</i> Selektion	12
1.2.2 Charakterisierung der Bindungseigenschaften	16
1.2.3 Anwendungen von Aptameren	19
1.3 Strukturaufklärung von Aptamer-Protein-Komplexen	24
2 Ziel der Arbeit	26
3 Materialien	27
3.1 Chemikalien	27
3.2 Puffer und Lösungen	27
3.3 Medien	27
3.4 Bakterienstämme und Vektoren	27
3.5 Oligonukleotide	28
3.6 Proteine und Ganglioside	28
3.7 Kits	28
3.8 Molekulargewichtsmarker	29
3.9 Geräte und Software	29
4 Methoden	30
4.1 Proteinbiochemische Methoden	30
4.1.1 Transformation chemisch kompetenter Zellen	30
4.1.2 Expression der B-Untereinheiten von Cholera toxin und Shigatoxin 1	30
4.1.3 Proteinreinigung	30
4.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
4.1.5 Coomassie-Färbung	32

4.1.6	Western Blot.....	32
4.1.7	Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD	33
4.1.8	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Absorption	33
4.1.9	Lyophilisation und Biotinylierung	33
4.1.10	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	34
4.2	Molekularbiologische Methoden.....	35
4.2.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
4.2.2	BEAMing	36
4.2.3	Real-time PCR (qPCR)	36
4.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	37
4.2.5	Ethidiumbromidfärbung	38
4.2.6	Präparative Aufreinigung von DNA.....	38
4.2.7	Bestimmung der Konzentration von ssDNA mittels UV-Absorption	38
4.2.8	Bestimmung der Konzentration von ssDNA mittels Quantus Fluorometer	38
4.2.9	Klonierung, Kolonie-PCR, Plasmidisolierung	38
4.2.10	Sequenzierung	39
4.2.11	Modifizierung von DNA	39
4.3	<i>In vitro</i> Selektionen	40
4.3.1	Kopplung der Zielproteine an Magnetpartikel	40
4.3.2	Überprüfung der Kopplung	40
4.3.3	Kopplung der Rückwärtsprimer an Magnetpartikel	40
4.3.4	Erste <i>in vitro</i> Selektion	41
4.3.5	Zweite <i>in vitro</i> Selektion	42
4.4	Strukturvorhersage und Motivanalyse.....	43
4.4.1	<i>Mfold</i>	43
4.4.2	<i>MEME Suite</i>	43
4.4.3	<i>QGRS Mapper</i>	43
4.5	Allgemeine biophysikalische Methoden	43
4.5.1	Dynamische Lichtstreuung	43
4.5.2	Circulardichroismus-Spektroskopie	44
4.6	Charakterisierung von Aptamer-Protein-Interaktionen	44
4.6.1	Fluoreszenzbasierte Affinitätschromatographie	44
4.6.2	Microscale Thermophoresis	45
4.6.3	Affinitätschromatographie mit qPCR.....	45
4.6.4	Direkter Enzyme-linked Aptamer Assay.....	46
4.7	Affinitätsanreicherung.....	47
4.7.1	Kopplung der Aptamere an Magnetpartikel	47
4.7.2	Affinitätsanreicherung aus Zellpellets.....	47
4.8	Enzyme-Linked Aptamer Assay.....	48

4.8.1	Magnetpartikel Sandwich Enzyme-Linked Aptamer Assay zum Nachweis von Cholera-toxin	48
4.8.2	Magnetpartikel Sandwich Enzyme-Linked Aptamer Assay zum Nachweis von Shiga-toxin 1	50
4.9	Lateral Flow Assay	52
4.9.1	AuNP Synthese	52
4.9.2	Charakterisierung der AuNPs	53
4.9.3	Kopplung der Aptamere an AuNPs	52
4.9.4	Herstellung der GM1-Liposomen	54
4.9.5	Charakterisierung der GM1-Liposomen	55
4.9.6	Kompetitiver Assay	55
4.9.7	Aptamer-Antikörper Sandwich	57
4.9.8	Aptamer-Antikörper-Antikörper Sandwich	58
4.9.9	Duales Aptamer Sandwich	59
4.9.10	GM1-Aptamer Sandwich	60
4.10	Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXS)	61
4.10.1	Probenvorbereitung	61
4.10.2	SAXS Experimente	61
4.10.3	Datenanalyse	62
5	Ergebnisse und Diskussion	63
5.1	Expression, Reinigung und Charakterisierung der B-Untereinheiten von Cholera-toxin und Shiga-toxin 1	63
5.2	Selektion von Aptameren gegen Cholera-toxin	66
5.2.1	Immobilisierung von CT-B auf Magnetpartikeln	66
5.2.2	Verlauf der Selektion	67
5.2.3	Sequenzierung	70
5.2.4	Strukturanalyse	71
5.2.5	Bindungsstudien	74
5.2.6	Selektivitätsmessungen	76
5.2.7	DLS des Aptamer-Cholera-toxin B-Komplexes	77
5.3	Selektion von Aptameren gegen Shiga-toxin 1	78
5.3.1	Immobilisierung von ST1-B auf Magnetpartikeln	79
5.3.2	Verlauf der Selektion	80
5.3.3	Sequenzierung	82
5.3.4	Strukturanalyse	83
5.3.5	Bindungsstudien	85
5.3.6	DLS des Aptamer-Shiga-toxin 1-Komplexes	89
5.4	Charakterisierung des Anti-Cholera-toxin-Antikörpers und des Taubeneiweißes	89
5.4.1	Anti-Cholera-toxin-Antikörper	90
5.4.2	Taubeneiweiß	91

5.5	Anwendungen des Aptamers CT916.....	93
5.5.1	Affinitätsanreicherung aus Zellpellets.....	93
5.5.2	Magnetpartikel-basiertes Sandwich Enzyme-Linked Aptamer Assay	95
5.5.3	Lateral Flow Assays	101
5.6	Anwendungen der Aptamere ST1065 und ST1076.....	122
5.6.1	Affinitätsanreicherung aus Zellpellets.....	123
5.6.2	Magnetpartikel-basierter Sandwich Enzyme-Linked Aptamer Assay	124
5.7	Strukturanalyse des Cholera-toxin B-Pentamers, des Aptamers CT916 und des Aptamer-Protein-Komplexes.....	127
5.7.1	Cholera-toxin B-Pentamer	128
5.7.2	Aptamer CT916.....	130
5.7.3	Aptamer-Protein-Komplex	132
6	Literatur	136
7	Anhang	151

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1: Prozentuelle Sequenzhomologie zwischen den A- und B-Untereinheiten ausgewählter AB₅-Toxine.
- Abb. 1.2: Struktur des Cholera-Holotoxins und des B-Pentamers in Cartoon Darstellung.
- Abb. 1.3: Struktur des Monosialgangliosids GM1.
- Abb. 1.4: Struktur des Shigatoxin 1 Holotoxins und des B-Pentamers in Cartoon Darstellung und Überlagerung mit der Struktur des Cholera-Toxins.
- Abb. 1.5: Struktur des Globotriaosylceramids Gb3.
- Abb. 1.6: Kristallstruktur des Aptamers TBA komplexiert mit seinem Target Thrombin.
- Abb. 1.7: Typischer Ablauf der SELEX.
- Abb. 1.8: Ablauf der *just in time*-Selection.
- Abb. 1.9: Schematische Darstellung des direkten ELAA.
- Abb. 1.10: Typischer Aufbau eines für den LFA verwendeten Teststreifens.
- Abb. 5.1: (A) SDS-PAGE Gel und (B) Western Blot des aufgereinigten CT-B.
- Abb. 5.2: (A) SDS-PAGE Gel und (B) Western Blot des aufgereinigten ST1-B.
- Abb. 5.3: Größenverteilung des exprimierten CT-B nach Intensität bestimmt mit DLS.
- Abb. 5.4: Größenverteilung des exprimierten ST1-B nach Intensität bestimmt mit DLS.
- Abb. 5.5: Schematische Darstellung der Kopplung des CT-B an carboxylierte Magnetpartikel.
- Abb. 5.6: ELISA am Magnetpartikel zum Nachweis der Kopplung des CT-B.
- Abb. 5.7: Zusammenschnitt einzelner Agarosegele aus der Cholera-Toxin-SELEX.
- Abb. 5.8: Änderung der Schmelztemperatur der Aptamerpools im Verlauf der Cholera-Toxin-SELEX.
- Abb. 5.9: Signifikantes Motiv der Cholera-Toxin-SELEX, Position auf den Strängen (ohne Primer) und p-Werte.
- Abb. 5.10: Thermodynamisch stabilste Sekundärstrukturvorhersage der Aptamere CT916 und CT928.
- Abb. 5.11: Elliptizität des Aptamers CT928 im Wellenlängenbereich von 210-300 nm und Aptamersequenz.
- Abb. 5.12: Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Aptamere CT916 und CT928 mit CT-B mittels fluoreszenzbasierter Affinitätschromatographie.
- Abb. 5.13: Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Aptamers CT916 mit CT-B mittels MST.
- Abb. 5.14: Kreuzreaktivität ausgewählter CT-Aptamere gegenüber ST1-B, Protein A und BSA mittels direktem ELAA.
- Abb. 5.15: Größenverteilung des CT-B-CT916-Komplexes nach Intensität bestimmt mit DLS.
- Abb. 5.16: Chelatkomplex des Co²⁺-Ions am Magnetpartikel mit den Histidin-Seitenketten des His-Tags.
- Abb. 5.17: ELISA am Magnetpartikel zum Nachweis der Kopplung des ST1-B.
- Abb. 5.18: Zusammenschnitt einzelner Agarosegele der Shigatoxin 1-SELEX.
- Abb. 5.19: Änderung der Schmelztemperatur der Aptamerpools im Verlauf der Shigatoxin 1-SELEX.
- Abb. 5.20: Thermodynamisch stabilste Sekundärstrukturvorhersage für die Strukturen der Aptamere ST1065 und ST1076.
- Abb. 5.21: Elliptizität des Aptamers ST1076 im Wellenlängenbereich von 210 – 300 nm und Aptamersequenz.
- Abb. 5.22: Affinitätscreening der Shigatoxin 1-Aptamere mittels Affinitätschromatographie mit qPCR.
- Abb. 5.23: Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Aptamere ST1065 und ST1076 mit ST1-B mittels Affinitätschromatographie mit qPCR.
- Abb. 5.24: Kreuzreaktivität ausgewählter Shigatoxin 1-Aptamere gegenüber CT-B, BSA, Protein A und Streptavidin bestimmt durch Affinitätschromatographie mit qPCR.
- Abb. 5.25: Größenverteilung des (A) ST1065-ST1-B-Komplex und (B) ST1076-ST1-B-Komplex nach Intensität bestimmt mit DLS.
- Abb. 5.26: SDS-PAGE-Analyse des Anti-Cholera-Toxin-Antikörperserums.
- Abb. 5.27: Bestimmung der Dissoziationskonstante des Anti-Cholera-Toxin-Antikörperserums mittels ELISA.
- Abb. 5.28: SDS-PAGE zur Analyse des lyophilisierten Taubeneiweißes.
- Abb. 5.29: Bestimmung der Dissoziationskonstante des biotinylierten Taubeneiweißes mittels ELISA.

Abb. 5.30: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE Gele der Aptamer-basierten Affinitätsanreicherung von CT-B aus Zellpellets durch (A) Ethanolamin-blockierte CT916-Magnetpartikel und (B) BSA-blockierte CT916-Magnetpartikel.

Abb. 5.31: Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel der Aptamer-basierten Affinitätsanreicherung von CT-B aus Zellpellets durch Co^{2+} -Magnetpartikel.

Abb. 5.32: Schematischer Ablauf des Magnetpartikel Sandwich ELAA für Cholera-toxin.

Abb. 5.33: Dot Blot mit Cholera-toxin-Aptameren als Fänger und Anti-Cholera-toxin-Antikörper und HRP-Sekundärantikörper als Reporter.

Abb. 5.34: Magnetpartikel Sandwich ELAA mit (A) Ethanolamin-blockierten CT916-Carboxyl-Magnetpartikeln, (B) BSA-blockierten CT916-Carboxyl-Magnetpartikeln und (C) CT916-Streptavidin-Magnetpartikeln als Fänger und Anti-Cholera-toxin-Antikörper mit HRP-markiertem Anti-Kaninchen-Antikörper als Reporter.

Abb. 5.35: Magnetpartikel Sandwich ELAA in Leitungswasser mit Ethanolamin-blockierten CT916-Carboxyl-Magnetpartikeln als Fänger und Anti-Cholera-toxin-Antikörper mit HRP-markiertem Anti-Kaninchen-Antikörper als Reporter.

Abb. 5.36: Magnetpartikel Sandwich ELAA mit CT916-Carboxyl-Magnetpartikeln als Fänger und biotinyliertem CT916, CT910, CT931 oder CT928 in Kombination mit Streptavidin-HRP als Reporter.

Abb. 5.37: TEM-Aufnahme der Goldnanopartikel.

Abb. 5.38: Schematische Darstellung eines Liposoms.

Abb. 5.39: Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers der GM1-Liposomen mittels DLS nach Intensität.

Abb. 5.40: Schematische Darstellung des kompetitiven Lateral Flow Assays zum Nachweis von Cholera-toxin.

Abb. 5.41: Optimierung von AuNP-Volumen, Membranporengröße und Inkubationszeiten für den kompetitiven LFA.

Abb. 5.42: Ergebnisse des kompetitiven Lateral Flow Assays. (A) Lateral Flow Streifen mit abnehmender CT-B Konzentration, BSA und ST1-B (B) Kalibrierungskurve und LOD mit logistischem Fit.

Abb. 5.43: Ergebnisse des kompetitiven Lateral Flow Assays zum Nachweis von Cholera-toxin in Leitungswasser. (A) Streifen mit abnehmender CT-B Konzentration (B) Mit *ImageJ* bestimmte Graustufenintensitäten der einzelnen Konzentrationspunkte.

Abb. 5.44: Schematische Darstellung des Aptamer-Antikörper Sandwich Lateral Flow Assays zum Nachweis von Cholera-toxin.

Abb. 5.45: Optimierung der Antikörperkonzentration und des Immobilisierungspuffers für das Aptamer-Antikörper-Sandwich.

Abb. 5.46: Optimierung der Inkubationszeit der AuNP@CT916.

Abb. 5.47: Ergebnisse des Antikörper-Aptamer Sandwich Lateral Flow Assays zum Nachweis von Cholera-toxin. (A) Streifen mit zunehmender CT-B Konzentration (B) Mit *ImageJ* bestimmte Graustufenintensitäten der einzelnen Konzentrationspunkte.

Abb. 5.48: Ergebnisse des Antikörper-Aptamer Sandwich Lateral Flow Assays zum Nachweis von Cholera-toxin in Leitungswasser. (A) Streifen mit steigender CT-B Konzentration (B) Mit *ImageJ* bestimmte Graustufenintensitäten der einzelnen Konzentrationspunkte.

Abb. 5.49: Ergebnisse des Antikörper-Aptamer Sandwich Lateral Flow Assays zum Nachweis von Cholera-toxin in Pferdekot.

Abb. 5.50: Schematische Darstellung des Aptamer-Antikörper-Antikörper Sandwich Lateral Flow Assays zum Nachweis von Cholera-toxin.

Abb. 5.51: Optimierung der Antikörper-Inkubationszeiten in einem Aptamer-Antikörper-Antikörper-Sandwich.

Abb. 5.52: Ergebnisse des Antikörper-Antikörper-Aptamer Sandwich Lateral Flow Assays zum Nachweis von Cholera-toxin. (A) Streifen mit zunehmender CT-B Konzentration (B) Mit *ImageJ* bestimmte Graustufenintensitäten der einzelnen Konzentrationspunkte.

Abb. 5.53: Ergebnisse der Versuche zur Silber- und Goldverstärkung.

Abb. 5.54: Versuche zur Entwicklung eines Aptamer-Aptamer-Sandwich.

Abb. 5.55: Schematische Darstellung des GM1-Aptamer Sandwich Lateral Flow Assays.

Abb. 5.56: Optimierung des Liposomenvolumens für das GM1-Aptamer Sandwich.

Abb. 5.57: Ergebnisse des GM1-Aptamer Sandwich Lateral Flow Assays zum Nachweis von Cholera toxin. (A) Streifen mit zunehmender CT-B Konzentration (B) Mit *ImageJ* bestimmte Graustufenintensitäten der einzelnen Konzentrationspunkte und logistischer Fit.

Abb. 5.58: Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel der Aptamer-basierten Affinitätsanreicherung von ST1-B aus Zellpellets durch (A) Ethanolamin-blockierte ST1065- Magnetpartikel und (B) BSA-blockierte ST1065-Magnetpartikel.

Abb. 5.59: Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel der Aptamer-basierten Affinitätsanreicherung von ST1-B aus Zellpellets durch Co^{2+} -Magnetpartikel.

Abb. 5.60: Magnetpartikel-Sandwich ELAA mit Ethanolamin-blockierten ST1076 Carboxyl-Magnetpartikeln als Fänger und biotinyliertem PEW und Streptavidin-HRP als Reporter.

Abb. 5.61: Magnetpartikel-Sandwich ELAA mit Ethanolamin-blockierten ST1076 Carboxyl-Magnetpartikel als Fänger und biotinyliertem PEW und Streptavidin-HRP als Reporter in (A) Milch mit 0,3 % Fett (B) Milch mit 1,5 % Fett (C) Hackfleisch.

Abb. 5.62: (A) Mittlere Streudaten, (B) Guinier-Plot und (C) Abstandverteilungsfunktion der SAXS-Daten für CT-B.

Abb. 5.63: Abstandverteilungsfunktionen und zugehörige Partikelformen.

Abb. 5.64: Mit GASBOR berechnetes *ab initio* Modell von CT-B, überlagert mit dessen publizierter Kristallstruktur.

Abb. 5.65: (A) Mittlere Streudaten, (B) Guinier-Plot und (C) Abstandverteilungsfunktion der SAXS-Daten für CT916.

Abb. 5.66: Mit DAMMIF und DAMAVER berechnetes *bead density* Modell (*damfilt*) von CT916.

Abb. 5.67: *Ab initio* und *in silico* Modell des Aptamers CT916 sowie *overlay* der beiden Modelle.

Abb. 5.68: SEC-SAXS Profil nach Streuintensität und vorhergesagtes Molekulargewicht des CT-B-CT916-Komplexes.

Abb. 5.69: (A) Mittlere Streudaten, (B) Guinier-Plot und (C) Abstandverteilungsfunktion der SAXS-Daten für den Aptamer-Protein-Komplex.

Abb. 5.70: Mit DAMMIF und DAMAVER berechnetes *bead density* Modell (*damfilt*) von des CT916-CT-B-Komplexes, beispielhaft überlagert mit der mittels GASBOR bestimmten Proteinstruktur.

Abb. 5.71: Aus den *Batch*-Daten erstelltes *bead density* Modell überlagert mit dem aus den SEC-SAXS-Daten erstellten *bead density* Modell für den CT-B-CT916-Komplex.

Abb. 7.1: Gefahrenpiktogramme nach GHS.

Abb. 7.2: SDS-PAGE-Gele der CT-B Aufreinigung mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie.

Abb. 7.3: SDS-PAGE-Gele der CT-B Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie.

Abb. 7.4: SDS-PAGE-Gele der ST1-B Aufreinigung mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie.

Abb. 7.5: SDS-PAGE-Gele der ST1-B Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie.

Abb. 7.6: SDS-PAGE-Gele der CT-B Aufreinigung für SAXS.

Abb. 7.7: Agarose-Gele zur Visualisierung der Kolonie-PCR-Produkte mit Aptamer-spezifischen und Plasmid-spezifischen Primern der CT-B-SELEX.

Abb. 7.8: Weitere Agarose-Gele zur Visualisierung der Kolonie-PCR-Produkte mit Aptamer-spezifischen und der CT-B-SELEX.

Abb. 7.9: Agarose-Gele zur Visualisierung der Kolonie-PCR-Produkte der durchgemusterten Kolonien mit Aptamer-spezifischen Primern der ST1-B-SELEX.

Abb. 7.10: Mittels *mfold* vorhergesagte Sekundärstrukturen der Cholera toxin-Aptamere.

Abb. 7.11: Mittels *mfold* vorhergesagte Sekundärstrukturen der Shigatoxin 1-Aptamere.

Abb. 7.12: Elliptizität der Aptamere CT910 und CT939 im Wellenlängenbereich von 210-300 nm.

Abb. 7.13: Elliptizität der Aptamere ST1063, ST1064, ST1065, ST1066, ST1068 und ST1075 im Wellenlängenbereich von 210-300 nm.

Abb. 7.14: Selektivität der Aptamere ST1063, ST1064, ST1066, ST1068 und ST1075 bestimmt mit Affinitätschromatographie und anschließender qPCR.

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1.1: Übersicht über die AB₅-Toxine.
- Tab. 1.2: Ausgewählte Nachweise für Cholera toxin.
- Tab. 1.3: Ausgewählte Nachweise für Shigatoxin 1.
- Tab. 4.1: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.
- Tab. 4.2: Zusammensetzung des einfachen PCR-Ansatzes.
- Tab. 4.3: Temperaturprogramm der PCR.
- Tab. 4.4: Zusammensetzung des BEAMing-Ansatzes.
- Tab. 4.5: Zusammensetzung des qPCR-Ansatzes.
- Tab. 4.6: Temperaturprogramm der qPCR.
- Tab. 4.7: Übersicht über das FISHing der 1. SELEX.
- Tab. 4.8: Übersicht über das FISHing der 2. SELEX.
- Tab. 5.1: Übersicht über die erhaltenen Aptamersequenzen der Cholera toxin-SELEX.
- Tab. 5.2: Mit Affinitätschromatographie ermittelte K_D-Werte der Cholera toxin-Aptamere.
- Tab. 5.3: Übersicht über die ermittelten Aptamersequenzen der Shigatoxin 1-SELEX.
- Tab. 5.4: Mit Affinitätschromatographie ermittelte K_D-Werte der Shigatoxin 1-Aptamere.
- Tab. 5.5: Zur Verfügung stehende NC-Membranen mit relevanten Eigenschaften laut Herstellerangaben.
- Tab. 5.6: Vergleich der LFA-Ansätze zum Nachweis von Cholera toxin.
- Tab. 5.7: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des Magnetpartikel ELAA zum Nachweis von Shigatoxin 1 in Milch und Hackfleisch.
- Tab. 7.1: Gefahrenstoffe.
- Tab. 7.2: Verwendete Puffer und Lösungen.
- Tab. 7.3: Verwendete Medien.
- Tab. 7.4: Verwendete Oligonukleotide.
- Tab. 7.5: Weitere verwendete Materialien und Reagenzien.
- Tab. 7.6: Verwendete Geräte.
- Tab. 7.7: Verwendete Software.
- Tab. 7.8: KingFisher 96-*deep well*-Layout CT-B-SELEX Runde 1-4.
- Tab. 7.9: KingFisher 96-*deep well*-Layout CT-B-SELEX Runde 5-10.
- Tab. 7.10: KingFisher 96-*deep well*-Layout CT-B-SELEX Runde 11.
- Tab. 7.11: KingFisher 96-*deep well*-Layout CT-B-SELEX Runde 12.
- Tab. 7.12: FISHing-Programm Runde 1-4.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AuNP	Goldnanopartikel
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BiP	<i>binding immunoglobulin protein</i>
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderalbumin
BW	Blindwert
C	Cytosin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Circulardichroismus
CE	Kapillarelektrophorese
C _q	<i>quantification cycle value</i>
CT	Choleratoxin
CT-B	Choleratoxin B-Untereinheit
D _{max}	maximaler Partikeldurchmesser
DESY	Deutsches Elektronen-Synchrotron
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPPC	Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DPPG	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol)
E	Erwartungswert
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELAA	Enzyme-linked Aptamer Assay
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EM	Elektronenmikroskopie
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
emPCR	Emulsions-PCR
EpCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül (<i>epithelial cell adhesion molecule</i>)
ER	endoplasmatisches Retikulum
ETEC	enterotoxigene <i>Escherichia coli</i>
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FAM	6-Carboxyfluorescein
FDA	U.S. Behörde für Lebens- und Arzneimittel (<i>Food and Drug Administration</i>)
G	Guanin
GST	Glutathion-S-Transferase
H	haltbar
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His-Tag	Polyhistidin-Tag
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Hsp	Hitzeschockprotein
HSS	HEPES- <i>saline-sucrose</i>
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
ICP-AES	Atomemissionspektrometrie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
K _D	Dissoziationskonstante
KL	Kontrolllinie
LB	<i>lysogeny broth</i>
LFA	Lateral Flow Assay
LOD	Nachweisgrenze
LOQ	Bestimmungsgrenze
LT-I	Heat labile Enterotoxin I
LT-IIa	Heat labile Enterotoxin IIa
LT-IIb	Heat labile Enterotoxin IIb
LT-B	Heat-labile Enterotoxin B-Untereinheit
M	Marker
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MP	Magnetpartikel
MS	Massenspektrometrie
MST	<i>Microscale Thermophoresis</i>
MUC	Mucin
MW	Molekulargewicht
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
NALFA	<i>Nucleic Acid Lateral Flow Assay</i>
nb	nicht bestimmt
NC	Nitrozellulose
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NK	Negativkontrolle
NMR	Kernspinresonanz
NTA	Nitriloessigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	Protein Data Bank
PEGMUA	α -Methoxypoly-(Ethylenglycol)- ω -(11-Mercaptoundecanoat)
PEW	Taubeneiweiß (<i>pigeon egg white</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration
PK	Positivkontrolle
POA	Taubenovalbumin (<i>pigeon ovalbumin</i>)
POCT	patientennahe Labordiagnostik (<i>Point-of-Care-Testing</i>)
POM	Taubenovomuroid (<i>pigeon ovomucoid</i>)
POT	Taubenovotransferrin (<i>pigeon ovotransferrin</i>)
PT	Pertussistoxin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
R _g	Gyrationsradius
R _h	hydrodynamischer Radius

RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RPA	<i>Recombinase Polymerase Amplification</i>
RT	Raumtemperatur
SDA	<i>Strand Displacement Amplification</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC	Größenausschlusschromatographie (<i>size exclusion chromatography</i>)
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
SHT	Shigatoxin
SOC	<i>super optimal broth</i> mit 20 mM Glucose
SOMamer	<i>Slow Off-rate Modified Aptamer</i>
SPR	Oberflächenresonanzspektroskopie (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)
SRB	Sulforhodamine B
ST1 (SLTI)	Shigatoxin 1 (auch: Shiga-like Toxin 1)
ST1-B	Shigatoxin B-Untereinheit
ST2 (SLTII)	Shigatoxin 2 (auch; Shiga-like Toxin 2)
STEC	Shigatoxin-bildenden <i>E. coli</i>
SubAB	Subtilase Cytotoxin
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBA	<i>Thrombin-binding Aptamer</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TL	Testlinie
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolettstrahlung
UV/Vis	UV-Vis-Spektroskopie
v/v	Volumenanteil (<i>volume per volume</i>)
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VET-RPLA	<i>Vibrio cholerae toxin reverse passive latex agglutination</i>
Vis	sichtbar (<i>visible</i>)
w/v	Massenanteil (<i>weight per volume</i>)
Δ FNorm%	normalisierte prozentuelle Bindung
Δ G	freie Faltungsenthalpie
%CV	Variationskoeffizient

Weiterhin wurden die gängigen Abkürzungen für die (SI)-Einheiten und zugehörigen Basisgrößen verwendet.

Zusammenfassung

Das von *Vibrio cholerae* produzierte Cholera-toxin ist der Auslöser der schweren Durchfallerkrankung Cholera, an welcher jährlich mehrere Millionen Menschen erkranken. Das Shiga-like Toxin 1, Shigatoxin 1 oder Verotoxin 1 wird von Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* produziert, welche unter anderem das hämolytisch-urämische Syndrom auslösen können. Beide Toxine sind aus einer monomeren A-Untereinheit und fünf ein Pentamer bildenden B-Untereinheiten aufgebaute AB₅-Toxine.

In der vorliegenden Arbeit wurden Aptamere, kurze einzelsträngige Nukleinsäuren, die durch ihre Faltung spezifisch an Zielmoleküle binden können und daher in der Analytik als Antikörperalternativen eingesetzt werden, mittels *Just in Time*-Selection gegen das B-Pentamer des heterolog exprimierten Cholera-toxins (CT-B) und Shigatoxins 1 (ST1-B) selektiert und charakterisiert.

Das sehr affine und selektive Cholera-toxin-Aptamer CT916 ($K_D = 48,5$ nM bzw. $66,1$ nM) wurde in Kombination mit Antikörpern zur Entwicklung eines Magnetpartikel-basierten Sandwich Enzyme-linked Aptamer Assays eingesetzt, mit welchem Cholera-toxin mit einer Nachweisgrenze von $2,1$ ng/ml bzw. $2,4$ ng/ml in dotiertem Puffer bzw. dotiertem Leitungswasser nachgewiesen werden konnte. Weiterhin wurden vier verschiedene Lateral Flow Assays entwickelt; (i) ein auf Konkurrenz mit immobilisiertem CT-B beruhender kompetitiver Assay mit Detektor-Aptamer und einer Nachweisgrenze von 51 ng/ml, (ii) ein einfaches Sandwich mit einem Fänger-Antikörper und Detektor-Aptamer mit einer Nachweisgrenze von 5 ng/ml, (iii) ein mobiles Sandwich mit zwei Fänger-Antikörpern und einem Detektor-Aptamer und einer Nachweisgrenze von $0,6$ ng/ml, sowie (iv) ein Sandwich mit Fänger-Aptamer und GM1-Rezeptor-modifizierten Liposomen als Detektor mit einer Nachweisgrenze von 2 ng/ml in Puffer.

Das Shigatoxin 1-Aptamer ST1076 ($K_D = 14,7$ nM) wurde zusammen mit den Shigatoxin 1-spezifischen Glykoproteinen des Taubeneiweißes zur Entwicklung eines Magnetpartikel-basierten Sandwich Enzyme-linked Aptamer Assays verwendet, mit dem Shigatoxin 1 in dotiertem Puffer, fettfreier und fettarmer Milch sowie Hackfleisch mit Nachweisgrenzen von $105,4$ ng/ml, $270,8$ ng/ml, $414,2$ ng/ml und $269,6$ ng/ml nachgewiesen werden konnte.

Zusätzlich wurden die Cholera- bzw. Shigatoxin 1-Aptamere CT916 und ST1065 ($K_D = 26,9 \text{ nM}$) in einer weiteren biotechnologischen Anwendung erfolgreich zur Affinitätsanreicherung von CT-B und ST1-B aus Zellpellets eingesetzt.

Zuletzt wurden Kleinwinkelröntgenstreuungsexperimente (*small angle X-ray scattering*) zur Aufklärung der Struktur des Aptamers CT916 und zur Untersuchung seiner Bindungsstelle an CT-B durchgeführt.

Abstract

Cholera toxin produced by *Vibrio cholerae* is the causative agent of the eponymous severe diarrheal disease, which affects several million people every year. Shiga-like toxin 1, Shiga toxin 1 or Verotoxin 1 is secreted by Shiga toxin producing *Escherichia coli*, which can cause haemolytic uremic syndrome amongst others. Both are AB₅ toxins composed of a monomeric A subunit and five pentamer-forming B subunits.

In the present study, aptamers, short single-stranded nucleic acids, which by their folding can specifically bind to target molecules and are therefore used in analytics as antibody alternatives, were selected by *Just in Time*-selection against the B pentamers of the heterologously expressed cholera toxin (CT-B) and Shiga toxin 1 (ST1-B) and thoroughly characterized.

The highly affine and selective cholera toxin aptamer CT916 ($K_D = 48.5$ nM and 66.1 nM, respectively) was used in combination with antibodies to develop a magnetic bead-based sandwich enzyme-linked aptamer assay with a detection limit of 2.1 ng/ml and 2.4 ng/ml for cholera toxin detection in spiked buffer and tap water, respectively. Furthermore, four different lateral flow assays were developed; (i) a competitive assay with immobilized CT-B and a detector aptamer having a detection limit of 51 ng/ml, (ii) a simple sandwich with a capture antibody and detector aptamer having a detection limit of 5 ng/ml, (iii) a mobile sandwich with two capture antibodies and a detector aptamer having a detection limit of 0.6 ng/ml, as well as (iv) a sandwich with capture aptamer and GM1 receptor-modified liposomes as detector having a detection limit of 2 ng/ml in buffer.

The Shiga toxin 1 aptamer ST1076 ($K_D = 14.7$ nM) was used in combination with Shiga toxin 1 specific pigeon egg white glycoproteins for the development of a magnetic bead-based sandwich enzyme-linked aptamer assay, which was capable of Shiga toxin 1 detection in spiked buffer, low and medium fat milk and ground beef at detection limits of 105.4 ng/ml, 270.8 ng/ml, 414.2 ng/ml and 269.6 ng/ml, respectively.

In addition, the cholera and Shiga toxin 1 aptamers CT916 and ST1065 ($K_D = 26.9$ nM) were successfully used in another biotechnological application for the affinity enrichment of CT-B and ST1-B from cell pellets.

Finally, small-angle X-ray scattering experiments were performed to elucidate the structure of aptamer CT916 and study its binding site to CT-B.

1 Einführung

1.1 AB₅-Toxine

1.1.1 Struktureller Aufbau der AB₅-Toxine

AB₅-Toxine sind eine Klasse von Bakterientoxinen, die ihren Namen durch ihre besondere Struktur erhalten haben. Sie bestehen aus einer katalytischen A-Untereinheit und einem B-Pentamer aus fünf verknüpften Monomeren.¹ Der Aufbau aus A- und B-Einheiten und die Funktionalität der Einheiten sind bei allen AB₅-Toxinen gleich, sie unterscheiden sich allerdings in Größe und Aminosäuresequenz. Entsprechend binden verschiedene AB₅-Toxine auch an unterschiedliche Zellrezeptoren. Ebenso haben die durch die Toxine hervorgerufenen Krankheiten unterschiedliche Krankheitsverläufe.

Die A-Untereinheiten der AB₅-Toxine bestehen aus zwei Domänen (A1 und A2), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Während die C-terminale A2-Einheit die A- und B-Untereinheiten durch eine nicht-kovalente Bindung innerhalb der Pore des B-Pentamers verbindet, enthält die A1-Einheit die katalytische Domäne, welche für die Toxizität sorgt.² Das B-Pentamer ist für die Bindung an den jeweiligen Glykanrezeptor auf der Zelloberfläche verantwortlich. Trotz ihrer niedrigen Sequenzhomologie teilen die B-Pentamere einiger AB₅-Toxine (Choleratoxin (CT)-, Shigatoxin (ST)- und Subtilase AB (SubAB)-Familien) eine gemeinsame Proteinfaltung. Diese sogenannte Oligonukleotid/Oligosaccharid-Faltung (OB-Faltung) basiert auf einer kreisförmig angeordneten Tertiärstruktur (β -Faß oder β -barrel) aus fünf β -Faltblättern, die von einer α -Helix flankiert wird.³ Einzig die B-Untereinheiten des Pertussistoxins sind vier unterschiedliche Untereinheiten, von welchen eine doppelt vorkommt. Die Sequenzhomologien der Untereinheiten der Cholera- und Shigatoxinfamilie sowie des Pertussistoxins sind in Abb. 1.1 schematisch dargestellt.

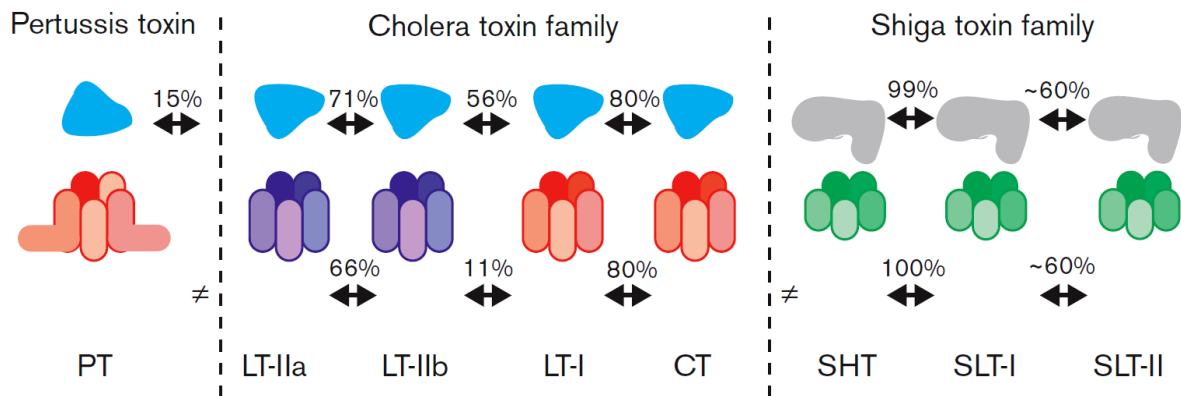


Abb. 1.1: Prozentuelle Sequenzhomologie zwischen den A- und B-Untereinheiten ausgewählter AB₅-Toxine. PT – Pertussistoxin, LT-IIa – Heat-labile Enterotoxin 2a, LT-IIb – Heat-labile Enterotoxin 2b, LT-I – Heat-labile Enterotoxin 1, CT – Cholera toxin, SHT – Shigatoxin, SLTI – Shiga-like Toxin 1, SLTII – Shiga-like Toxin 2; aus Fan *et al.* (2000).¹

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass zwischen den B-Pentameren nur innerhalb der jeweiligen Familie, trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit aber nicht zwischen den Familien Sequenzhomologien existieren. Ähnliches gilt für die A-Untereinheiten, wobei zwischen LT-IIa und PT eine geringe Sequenzhomologie besteht.¹

1.1.2 Bedeutung der AB₅-Toxine

Übertragung und Verbreitung

Die AB₅-Toxine lassen sich gemäß ihrer Sequenzhomologie in vier Klassen unterteilen. Tab. 1.1 gibt eine Übersicht über die Toxine, die produzierenden Pathogene und Zellrezeptoren.

Tab. 1.1: Übersicht über die AB₅-Toxine.^{1,3-5}

Familie	Toxin	Sezernierender Organismus	Rezeptor
Cholera toxin-Familie	Cholera toxin	<i>Vibrio cholerae</i>	GM1
	Heat-labile Enterotoxin Typ 1	<i>Escherichia coli</i>	GM1
	Heat-labile Enterotoxin Typ 2a	<i>Escherichia coli</i>	GD1b
	Heat-labile Enterotoxin Typ 2b	<i>Escherichia coli</i>	GD1a
	Heat-labile Enterotoxin Typ 2c	<i>Escherichia coli</i>	GD1a
Shigatoxin-Familie	Shigatoxin	<i>Shigella dysenteriae</i>	Gb3
	Shiga-like Toxin 1	<i>Escherichia coli</i>	Gb3
	Shiga-like Toxin 2	<i>Escherichia coli</i>	Gb3
Subtilase Cytotoxin-Familie	Subtilase Cytotoxin	<i>Escherichia coli</i>	Neu5Gc
Pertussistoxin-Familie	Pertussistoxin	<i>Bordetella pertussis</i>	Neu5AcGal

Die schwere Durchfallerkrankung Cholera wird durch die orale Aufnahme von *Vibrio cholerae* aus verschmutztem Trinkwasser mit einhergehender Expression des Cholera-toxins ausgelöst. Es ist verantwortlich für weltweit etwa 2,9 Millionen Erkrankungen im Jahr, von denen etwa 95 000 tödlich enden.⁶ Die meisten Erkrankungen treten in Entwicklungsländern auf; so werden beispielsweise in Kenia jährlich Choleraausbrüche, alle fünf bis sieben Jahre sogar Choleraepidemien verzeichnet. Einer der bedeutendsten Choleraausbrüche klingt derzeit im Jemen ab. Hier wurden zwischen April 2017 und Februar 2018 über eine Million vermutete Cholerafälle gemeldet. Bei knapp einem Drittel der Betroffenen handelte es sich um Kinder unter fünf Jahren.⁷

Eine der Cholera verwandte Krankheit ist der „Reisedurchfall“ (*traveler's diarrhea*). Diese durch enterotoxische *Escherichia coli* (ETEC) verursachte Krankheit hat einen ähnlichen, aber deutlich schwächeren Verlauf als die Cholera. Etwa die Hälfte aller ETEC bilden das Heat-labile Enterotoxin (LT). Dieses Toxin kommt in den in Tab. 1.1 aufgelisteten strukturell leicht unterschiedlichen Typen vor, von denen jedoch nur Typ 1 für den Menschen relevant ist.⁸

Zur dritten Familie der AB₅-Toxine gehören das Shigatoxin, Shiga-like Toxin 1 (SLT-1 oder ST1) und Shiga-like Toxin 2 (SLT-2 oder ST2). Das Shigatoxin wird von *Shigella dysenteriae* gebildet und verstärkt bei Übertragung durch mangelnde Hygiene die Symptome der von *S. dysenteriae* ausgelösten Shigellose (Bakterienruhr). Die beiden Shiga-like Toxine werden von Shigatoxin-bildenden *E. coli* (STEC) produziert. Humanpathogene STEC werden auch als enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) bezeichnet. Sie sind weltweit verantwortlich für etwa 2,8 Millionen akute Erkrankungen im Jahr und werden durch ungenügend erhitztes Hackfleisch, rohes Gemüse, Wasser oder unpasteurisierte Milch übertragen.^{9,10} Sie können blutigen Stuhl, hämorrhagische Kolitis, hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) und schließlich mikrovaskuläre Thrombose auslösen.¹¹⁻¹³ Im Frühsommer 2011 häufte sich in Norddeutschland die Inzidenz von HUS (HUS-Epidemie 2011), laut Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) ausgelöst durch den bis dahin untypischen Stamm EHEC O104:H4.¹⁴ In diesem Zusammenhang wurden 83 (EHEC) bzw. 54 (HUS) Todesfälle gemeldet.¹⁵

STEC produzieren auch das zur Peptidase_S8 (Subtilisin) Familie gehörende SubAB. SubAB hydrolysiert das im endoplasmatischen Retikulum (ER) befindliche Chaperon Hsp70 und

führt somit zu Apoptose. Die von SubAB ausgelösten Symptome überschneiden sich mit den HUS Symptomen, allerdings ist deren Relevanz für den Menschen noch zu klären.¹⁶

Das von *Bordetella pertussis* gebildete Pertussistoxin sorgt wesentlich für die mit dem Keuchhusten assoziierten Symptome. Obwohl effektive Impfungen existieren, treten laut Weltgesundheitsorganisation jährlich weltweit etwa 50 Millionen Krankheitsfälle auf. Besonders für Kleinkinder unter sechs Monaten ist die Sterberate mit fast 1 % sehr hoch.¹⁷ Insgesamt sorgen AB₅-Toxine für über eine Million Todesfälle im Jahr.³

Einsatz als Therapeutika und Zellwerkzeuge

Die B-Untereinheiten einiger AB₅-Toxine kommen dank ihrer Ungiftigkeit und äußerst spezifischen Bindung an Zellrezeptoren verstärkt als Werkzeuge zur Aufklärung zellulärer Prozesse, als Therapeutika oder Impfstoff-Adjuvantien zum Einsatz. Dafür werden in der Regel die heterolog exprimierte pentamere B-Untereinheiten oder aus diesen entwickelte Fusionsproteine genutzt.

Die rekombinante pentamere B-Untereinheit des Cholera-Toxins (CT-B) wird zusammen mit inaktivierten Vibriozellen unter dem Markennamen DUKORAL (GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, München) als Cholera-Schluckimpfstoff vertrieben. Durch die Konjugation mit CT-B konnte zudem in Tierversuchen die Wirkung von Autoantigenen verstärkt werden, welche beispielsweise im Rahmen der Typ 1 Diabetes, autoimmuner Enzephalomyelitis, Chondritis und Uveitis eine Rolle spielen. Sowohl CT-B als auch das eng verwandte LT-B werden in Verbindung mit Virusimpfstoffen zur Verstärkung der Immunantwort verwendet.¹⁸ Des Weiteren gewinnt CT-B als Teil von *Targeted Drug Delivery* Systemen im Wirkstofftransport an Popularität.¹⁹ Die pentamere B-Untereinheit des Shigatoxin 1 (ST1-B) wurde von Tarrango-Trani *et al.* (2006) ebenfalls zum Wirkstofftransport verwendet. Dabei wurde der Photosensibilisator Chlorin e6 kovalent an ST1-B gebunden, um so dessen Transport zu Gb3 exprimierenden Verozellen zu verbessern.²⁰ ST1-B ist als Therapeutikum in der Lage, die Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF- α zu induzieren. Wie auch CT-B und LT-B, können ST1-B und auch das Pertussistoxin als Impfstoff-Vektoren den Transport zur Zelle verbessern. Es wird vermutet, dass Pertussistoxin zusätzlich HIV-1 Infektionen inhibieren kann.²¹ SubAB, welches hochspezifisch an BiP, ein Chaperon der Hsp70-Familie im ER, bindet, wurde zur Aufklärung der Bedeutung von BiP und ER-Stress

in HeLa Zellen, T-Zellaktivierung und inflammatorischen Antworten eingesetzt. Der Effekt auf BiP kann potenziell auch in der Krebstherapie Anwendung finden.¹⁶

1.1.3 Cholera toxin

Das Cholera toxin besteht aus einem Homopentamer aus fünf B-Untereinheiten und einer A-Untereinheit, die sich wiederum aus den Domänen A1 und A2 zusammensetzt. Das B-Pentamer besitzt ein Molekulargewicht von etwa 55 kDa (11,6 kDa pro Untereinheit). Jede B-Kette hat eine Länge von 125 Aminosäuren, wovon die ersten 21 N-terminalen Aminosäuren ein Signalpeptid darstellen, welches nach Übergang des Proteins ins bakterielle Periplasma abgespalten wird.⁸ Die über Wasserstoff- und Salzbrücken miteinander verbundenen fünf B-Monomere bilden zusammen einen donutartigen Ring mit einem Durchmesser von etwa 60 Å, der die Pore von 20 Å Durchmesser umschließt.²²

Die A-Untereinheit besteht aus insgesamt 240 Aminosäuren, wovon die Aminosäuren 1-194 auf das A1-Fragment und 195-240 auf das A2-Fragment fallen. Insgesamt hat die A-Untereinheit ein Molekulargewicht von ca. 28 kDa. Während die A2-Domäne für die Verbindung zum B-Pentamer sorgt, ist die A1-Domäne auf Grund ihrer ADP-Ribosyltransferase-Aktivität für die Toxizität des Cholera toxins verantwortlich.⁸ Die Faltstrukturen des Holotoxins und des B-Pentamers sind in Abb. 1.2 dargestellt.

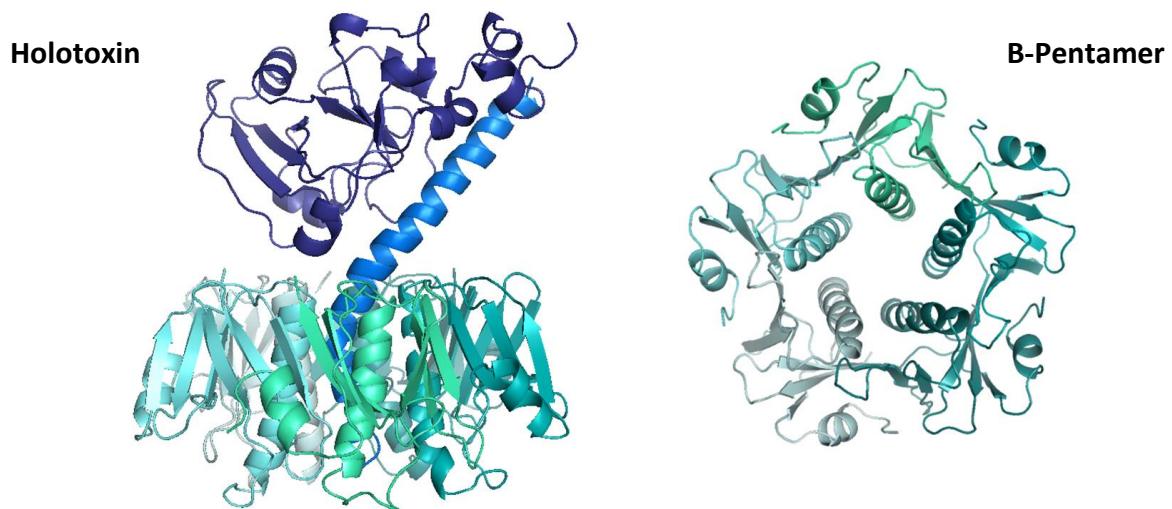


Abb. 1.2: Struktur des Cholera-Holotoxins (links) und des B-Pentamers (rechts) in Cartoon Darstellung, PDB ID: 1XTC.²³

Von den über 140 Serogruppen des *V. cholerae* sind nur zwei in der Lage, das Cholera-toxin zu produzieren: Serogruppe O139 und O1, wovon letztere weiter unterteilt wird in den El Tor Biotypen und den klassischen Biotypen. Das codierende Gen liegt in Form einer Prophage (CTX ϕ) vor. Nur O1 El Tor und O139 können die intakte Bakteriophage CTX ϕ produzieren.²⁴

Nach der oralen Aufnahme von *V. cholerae*, welche in der Regel fäkal-oral erfolgt, kolonisiert das Bakterium den Dünndarm mit Hilfe seiner Toxin-coregulierten Pili. Einmal angesiedelt beginnt es mit der Toxinsekretion. Die B-Untereinheiten binden an die in *Lipid Rafts* (sphingolipid- und cholesterolreiche Teile der Zellmembran)²⁵ auf der Dünndarmschleimhaut vorliegenden GM1-Rezeptoren. Diese sind Monosialganglioside mit der Sequenz [Gal(β 1-3)GalNac(β 1-4)(NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)Glc)] \rightarrow ceramid (Abb. 1.3). Jedes B-Monomer hat jeweils eine GM1-Bindungsstelle. Im Anschluss an die Rezeptorbindung erfolgt die Aufnahme des Toxins durch Endozytose in die Zelle. Erst am ER dissoziiert die A1-Untereinheit vom CT-B und wird ins Cytosol transportiert, wo sie durch ihre ADP-Ribosylase-Aktivität das Enzym Adenylatcyclase aktiviert. Dieses sorgt für eine Erhöhung der cAMP-Konzentration im Cytosol, was wiederum eine Störung des Elektrolytgleichgewichts hervorruft.²⁶ Genauer verringert sich die Aufnahme von Natriumkationen, während verstärkt Anionen (Chlorid und Bicarbonat) aus den Epithelzellen ins Darmlumen gelangen. Durch osmotische Effekte wird Flüssigkeit ausgeschieden und gleichzeitig die Flüssigkeitsaufnahme ins Epithel durch die Darmschleimhaut behindert. Es kommt zum typischen Reiswasserstuhl.²⁷

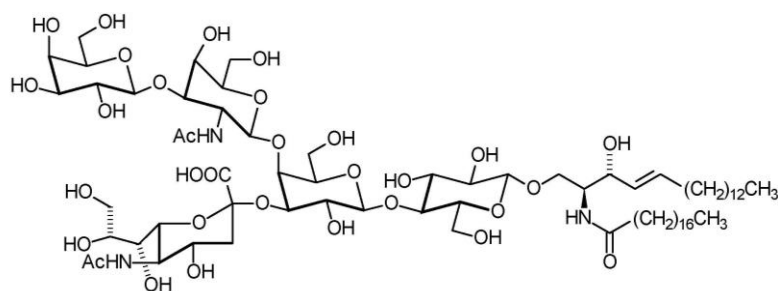


Abb. 1.3: Struktur des Monosialgangliosids GM1, entnommen aus Farwanah *et al.* (2012).²⁸

Oftmals reicht es aus, *V. cholerae* beziehungsweise das *ctx*-Gen nachzuweisen. Allerdings ist es in der Anfangsphase eines Choleraausbruchs oder bei niedriger Inzidenz dennoch ratsam auf das Toxin selbst zu testen. Da nicht alle O1-Isolate toxigen sind und immer wieder neue

Serotypen entdeckt werden, können durch den Toxinnachweis zudem falsch-positive beziehungsweise falsch-negative Ergebnisse vermieden werden.²⁹

Klassischerweise wird ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) oder ein *Vibrio cholerae toxin reverse passive latex agglutination* (VET-RPLA) Assay durchgeführt.³⁰ Im Falle des ELISA wird ein Anti-Choleratoxin-Fänger-Antikörper auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Zugabe der Probe werden ein Detektionsantikörper und normalerweise ein mit HRP (*horse raddish peroxidase*, Meerrettichperoxidase) konjugierter Sekundärantikörper zugegeben. Über eine enzymatische Farbreaktion kann dann das Choleratoxin in der Probe nachgewiesen werden. Beim VET-RPLA ist der Anti-Choleratoxin-Antikörper auf Polystyrenlatexpartikeln immobilisiert. Bei Zugabe einer Choleratoxin enthaltenden Probe agglomerieren die Partikel in der Mikrotiterplatte, da es durch die Bindung zwischen Choleratoxin und Antikörper zu einer Quervernetzung kommt. Das Agglutinat ist anhand seiner blauen Färbung am Boden der Mikrotiterplatte erkennbar.³¹

Neben diesen beiden Standardmethoden existieren noch weitere Nachweise, die in Tab. 1.2 dargestellt sind. Die meisten dieser Nachweise beruhen entweder auf einer Interaktion des Choleratoxins mit einem Antikörper oder dem GM1-Gangliosid. Im Vergleich zum Antikörper weist GM1 eine deutlich stärkere Bindung zu Choleratoxin auf,³² wodurch niedrigere Nachweisgrenzen erzielt werden können.

Tab. 1.2: Ausgewählte Nachweise für Choleratoxin.

Methoden	Nachweisgrenze	Linearer Messbereich	Quelle
Elektrochemischer Sensor	2 ng/ml	10-1000 ng/ml	33
ELISA	1 ng/ml	10-1000 ng/ml	33
VET-RPLA	800 pg/ml	600-1000 pg/ml	30
Liposomen-Polymerasekettenreaktion (PCR)-Assay	> 1 pg/ml	1-1000 pg/ml	30
Oberflächenresonanz-Immunosensor	0,85 ng/ml	85 ng/ml-85 µg/ml	34
Bead ELISA	25 pg/ml	26-100 pg/ml	35
Gangliosid-Liposomen-Immunoassay	10 fg/ml	10 ¹ -10 ⁶ fg/ml	36

1.1.4 Shigatoxin 1

Zu den Shigatoxinen gehören das Shigatoxin, Shiga-like Toxin 1 und Shiga-like Toxin 2; letztere werden auch Verotoxin 1 und 2 genannt. Die B-Untereinheiten des Shigatoxins und

des Shigatoxin 1 sind identisch, die A-Untereinheiten unterscheiden sich nur in einer Aminosäure. Im Vergleich dazu haben Shigatoxin und Shigatoxin 1 eine etwa 60%ige Sequenzhomologie zu Shigatoxin 2. Shigatoxin 2 wird weiter in die Subgruppen 2a-f unterteilt. Auch von Shigatoxin 1 sind Varianten (neben 1a noch 1c und 1d) bekannt, allerdings ist nur Shigatoxin 1a (im Weiteren synonym mit Shigatoxin 1 verwendet) für den Menschen relevant.³⁷

Strukturell entspricht das Shigatoxin 1 dem allgemeinen Aufbau der AB₅-Toxine, allerdings hat es im Vergleich zum Cholera-toxin, mit einem B-Pentamer von 38,5 kDa (7,7 kDa pro Monomer), dessen pentamerer Ring einen Durchmesser von 70 Å hat, und einer A-Untereinheit von 32,2 kDa, insgesamt ein geringeres Molekulargewicht.^{38,39} Die Strukturen des Holotoxins und des B-Pentamers, sowie eine Überlagerung der Struktur mit der des Cholera-toxins sind in Abb. 1.4 dargestellt.

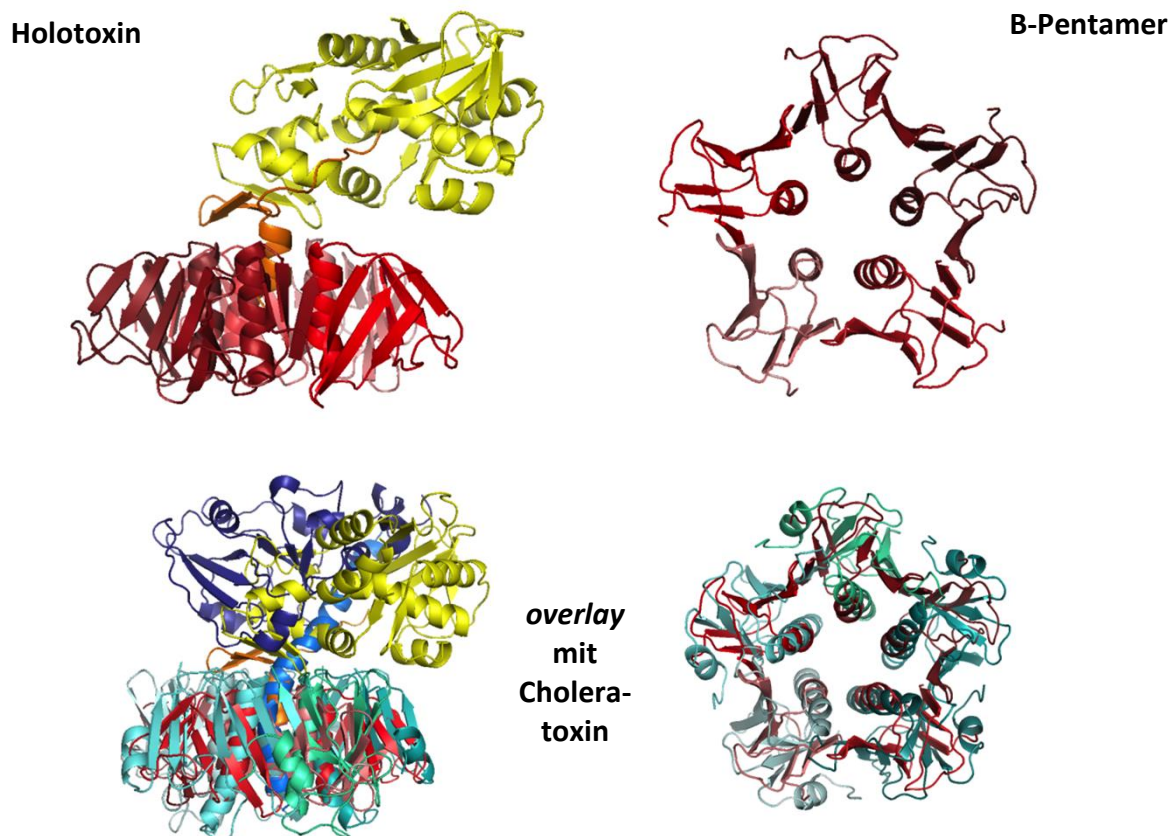


Abb. 1.4: Struktur des Shigatoxin 1 Holotoxins (links) und des B-Pentamers (rechts) in Cartoon Darstellung, PDB ID: 1DM0⁴⁰ und Überlagerung mit der Struktur des Cholera-toxins (unten).

Eine monomere B-Untereinheit des Shigatoxin 1 hat jeweils eine Länge von 89 Aminosäuren, wovon die ersten 20 Aminosäuren ein Signalpeptid darstellen. Die A-Untereinheit besteht, analog zur A-Untereinheit des Choleratoxins, aus einer katalytischen A1- und einer A2-Kette, die für die Verbindung zur pentameren B-Einheit sorgt. Sie ist insgesamt 293 Aminosäuren lang und reicht C-terminal in die Pore des B-Pentamers. Jedes B-Monomer besitzt jeweils drei Bindungsstellen für die Glykankomponente des Gb3-Rezeptors, welcher besonders häufig in den *Lipid Rafts* der Nierenzellen vorkommt. Die Kohlenhydratkette des Gb3-Rezeptors hat die Sequenz: Gal(α 1-4)Gal(β 1-4)Glc und ist wie GM1 mit einem Ceramid gekoppelt (Abb. 1.5).⁴¹

Nach erfolgter Bindung an den Gb3-Rezeptor wird Shigatoxin 1 über einen Clathrin-abhängigen Mechanismus internalisiert. Nach der Endozytose wird es als Endosom zum Golgi-Apparat transportiert, von wo aus es schließlich das ER erreicht. Im ER wird der *loop* zwischen A1 und A2 Einheit durch das Enzym Furin aufgespalten. Die A2 Einheit gelangt anschließend ins Cytosol, wo sie ihre N-Glycosidase-Aktivität ausübt. Genauer wird ein Adenin an Stelle 4324 in der 28S rRNA von Ribosephosphat abspalten. Die 60S Einheit kann entsprechend nicht mehr an die 28S Einheit binden, das Ribosom ist somit inaktiviert und die Proteinbiosynthese gehemmt.^{38,39,42}

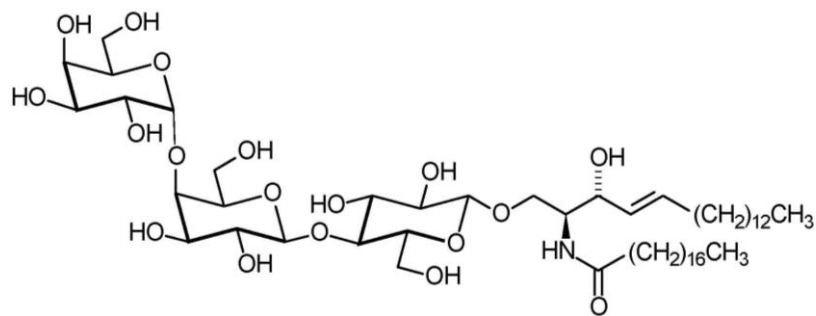


Abb. 1.5: Struktur des Globotriaosylceramids Gb3, entnommen aus Farwanah *et al.* (2012).²⁸

Bei EHEC-Infektionen ist laut Robert Koch-Institut (RKI) der Nachweis des Toxins das wichtigste diagnostische Mittel.⁴³ Hierzu wird entweder das *stx*-Gen über einen PCR-Nachweis oder das Toxin selbst, standardmäßig über einen ELISA, nachgewiesen. Alternativ zum klassischen Antikörper-basierten ELISA wurden auch für Shigatoxin 1 alternative Nachweismethoden entwickelt, von welchen einige beispielhaft in Tab. 1.3 dargestellt sind. Interessanterweise kann anstatt eines Antikörpers oder des Glykanrezeptors Gb3 auch

Taubeneiweiß (*pigeon egg white*, PEW) für den Nachweis von Shigatoxin 1 verwendet werden. PEW setzt sich aus Taubenovotransferrin (*pigeon ovotransferrin*, POT), Taubenoalbumin (*pigeon ovalbumin*, POA) und Taubenovomuroid (*pigeon ovomucoid*, POM) zusammen; Taubenoalbumin macht dabei etwa 60 % des Taubeneiweißes aus. Bei den drei Proteinen handelt es sich um Glykoproteine, die terminale Gal α 1-4Gal-Ketten tragen.⁴⁴ Diese Seitenketten binden analog zur die Glykankette des Gb3-Rezeptors spezifisch an Shigatoxin 1.

Tab. 1.3: Ausgewählte Nachweise für Shigatoxin 1.

Methoden	Nachweisgrenze	Linearer Messbereich	Quelle
ELISA	10-50 pg/ml	0,05-5 ng/ml	45
	8,7 pg/ml	0,01-10 ng/ml	46
Lateral Flow Assay	0,1 ng/ml (getestet mit ST2, gemeinsames Epitop)	2-20 ng/ml	47
PEW-MP/MS	44 pM	nicht bestimmt	48
Quantum Dot Immunoassay	300 ng/ml	nicht bestimmt	49
PEW-Gold/MS	40 pM	nicht bestimmt	50
Bead ELISA	250 pg/ml	10-1000 pg/ml	51

MP - Magnetpartikel, MS - Massenspektrometrie

Kommerziell erhältlich ist der „Shiga Toxin Quik CHEK“ der Firma Alere (Waltham, Massachusetts, USA), der mit einer Nachweisgrenze von 0,04 ng/ml sowohl Shigatoxin 1 als auch Shigatoxin 2 in Stuhlproben nachweisen kann.⁵²

1.2 Aptamere

Aptamere (lat. *aptus* – passend/geeignet; gr. *μέρος* (*méros*) – teil) sind einzelsträngige DNA- oder RNA-Oligonukleotide mit einer Länge von ca. 18 bis 100 Basen. Durch ihre sequenzabhängige Tertiärstruktur sind sie in der Lage, hochspezifisch an Zielmoleküle (auch: Targets) zu binden. Die Interaktion beruht unter anderem auf van der Waals-Kräften, Wasserstoffbrückenbindungen, Salzbrücken und hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen.^{53,54} Der Begriff „Aptamer“ wurde im Jahr 1990 durch Ellington und Szostak geprägt,⁵⁵ kurz vorher hatten Robertson und Joyce ein DNA-Einzelstrang-schneidendes RNA-Enzym selektiert⁵⁶ und Tuerk und Gold den Begriff „*Systematic Evolution*

of *Ligands by Exponential Enrichment*“ (SELEX) bei der Selektion eines RNA-Liganden gegen die DNA-Polymerase der Bakteriophage T4 etabliert.⁵⁷ Seither ist die Zahl der Publikationen über Aptamer-basierte Anwendungen exponentiell angestiegen.^{58,59} Entsprechend wurden inzwischen gegen eine Vielzahl verschiedener Targets Aptamere selektiert. Diese reichen von Ionen⁶⁰ über kleine Moleküle,⁶¹ Peptide und Proteine,⁶² Bakterienzellen⁶³ und Sporen⁶⁴ bis hin zu eukaryotischen Zellen.⁶⁵ Die Sekundärstrukturen von Aptameren können über energetische Vorhersagen abgeschätzt werden. Aufschluss über die Bindungsstellen zwischen Aptamer und Target erhält man beispielsweise durch Kristallisation der Komplexe. Derzeit sind allerdings nur wenige solcher Kristallstrukturen bekannt. Ein Beispiel eines prominenten Aptamer-Protein-Komplexes (TBA mit Thrombin) ist in Abb. 1.6 dargestellt.

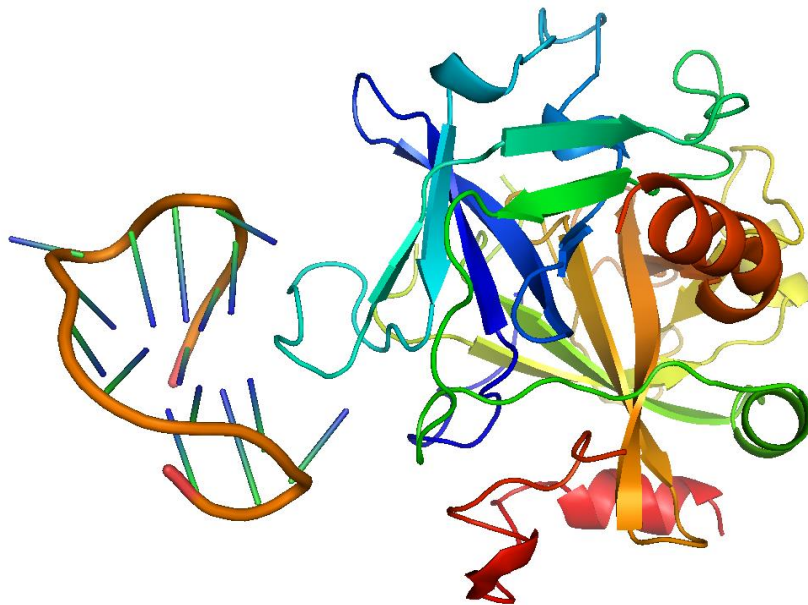


Abb. 1.6: Kristallstruktur des Aptamers TBA (links) komplexiert mit seinem Target Thrombin (rechts), PDB: 4DIH.⁶⁶

Die Affinität eines Aptamers zu seinem Zielmolekül wird in der Regel anhand der Dissoziationskonstante (K_D -Wert) beschrieben. Der K_D -Wert beschreibt, ob ein Komplex bevorzugt in assoziierter oder dissoziierter Form vorliegt. Je niedriger der K_D -Wert ist, desto höher ist die Affinität der Liganden.⁶⁷ Die Dissoziationskonstanten von Aptamer-Target-Komplexen liegen in der Regel im pico- bis micromolaren Bereich, wobei größere Targets auf Grund der größeren Anzahl möglicher Bindungsstellen häufig niedrigere K_D -Werte aufweisen. Entsprechend können sie eine synthetische Alternative zu mit Hilfe von Tieren

gewonnen Antikörpern darstellen, die traditionell in ähnlichen analytischen Fragestellungen zum Einsatz kommen.^{58,68}

Aptamere bieten gegenüber Antikörpern eine Reihe von Vorteilen. Dazu gehört, dass die Selektionsbedingungen, also die Bedingungen, in denen die besten Bindungsvoraussetzungen gegeben sind, entsprechend der angestrebten Aptameranwendung im Vorfeld ausgewählt werden können. Die Pufferbedingungen können, im Gegensatz zu Antikörperanwendungen, auch im stark sauren oder alkalischen Bereich liegen. Einmal selektiert können Aptamere in großer Menge schnell und günstig synthetisiert werden, einschließlich gerichteter Modifikationen wie Biotinylierungen und Thiolierungen, die später eine gerichtete Kopplung an Partikel, Resins, oder Membranen ermöglichen. Antikörper sind hingegen bedeutend teurer und lassen sich nur ungerichtet modifizieren. Im Vergleich zu Antikörpern sind Aptamere zudem deutlich hitze- und, in gefriergetrockneter Form, lagerstabiler und weisen eine vernachlässigbare produktionsbedingte Chargenvariabilität auf, während die von immunisierten Tieren oder Hybridomzellen produzierten Antikörper biologischen Schwankungen unterliegen. Ein weiterer Vorteil der Aptamere ist, dass sie sich im Gegensatz zu Antikörpern bei Bedarf renaturieren lassen und weder immunogen noch toxisch sind.^{58,59,68-70} Der limitierende Faktor bei der Anwendung von Aptameren ist derzeit vor allem das zur Verfügung stehen geeigneter hochaffiner und selektiver Aptamersequenzen.

1.2.1 *In vitro* Selektion

Aptamere werden normalerweise durch *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (SELEX) selektiert (Abb. 1.7). Als Ausgangspunkt dient eine einzelsträngige DNA- oder RNA-Aptamerbibliothek, die eine theoretische Diversität von etwa 10^{15} Basen besitzt. Jede enthaltene Sequenz ist aus zwei konstanten Primerregionen und einem dazwischen liegenden randomisierten Bereich aufgebaut. Die Länge des randomisierten Bereichs, ebenso wie die Primerlänge, kann je nach Anwendung frei gewählt werden, sie liegt aber in der Regel zwischen 20 und 50 Basen.⁷¹ Die klassische SELEX beschreibt einen iterativen Prozess, bei dem zunächst ein immobilisiertes Target mit dem Aptamerpool inkubiert wird. Nicht oder schlecht bindende Sequenzen werden im darauffolgenden Waschschrift entfernt. Die bindenden Sequenzen werden eluiert und mittels PCR vervielfältigt.⁷² Nach der Strangtrennung (bzw. bei RNA-Aptameren nach der reversen Transkription) liegt ein angereicherter Pool vor. Dieser Prozess wird normalerweise 10- bis

15-fach wiederholt (wobei auch verkürzte Protokolle existieren, die im Folgenden erläutert werden). Am Ende der SELEX wird der finale Aptamerpool in *E. coli*-Zellen kloniert, einzelne Kolonien durchgemustert und deren isolierte Vektoren sequenziert.⁷³

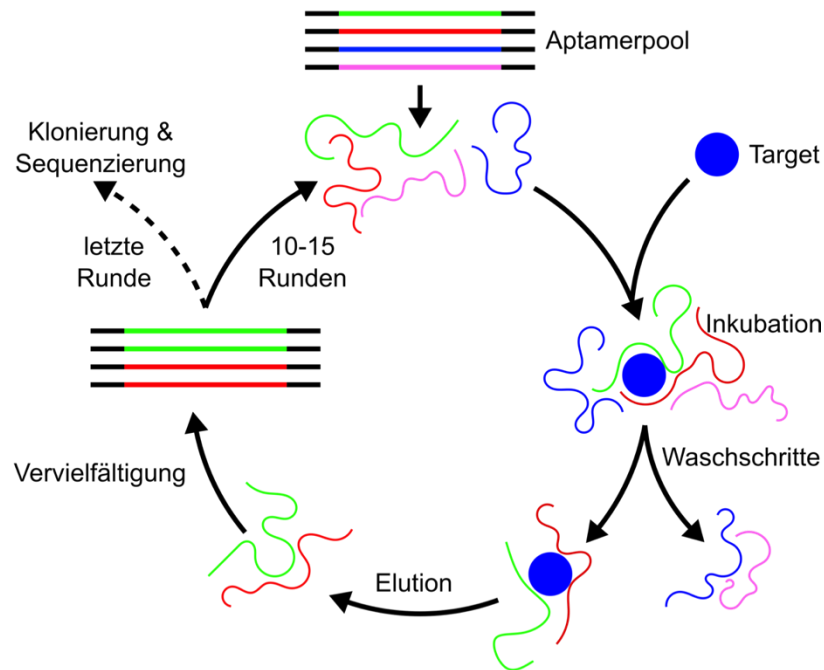


Abb. 1.7: Typischer Ablauf der SELEX (modifiziert nach Schütze *et al.* (2011)).⁷⁴

Um die Spezifität der Aptamere zu erhöhen, kann im Laufe der Selektion auch eine Gegen- oder *Counter*-SELEX eingefügt werden.⁷¹ Hierbei wird der Aptamerpool vor der Target-Inkubation mit einem oder mehreren Gegen- oder Counter-Target(s) inkubiert, an die die Aptamere nicht binden sollen. Das Gegen-Target und die daran gebundenen Aptamere werden verworfen und erst dann wird der übrige Pool mit dem SELEX-Target inkubiert.

Mit dem hier beschriebenen SELEX-Ablauf können innerhalb von zwei Wochen bis mehreren Monaten Aptamere selektiert werden. Im Laufe der Zeit wurden allerdings vielfältige SELEX-Methoden entwickelt, die jeweils das Ziel haben, günstiger, schneller oder effizienter zu sein und/oder in der Lage sind, affinere und spezifischere Aptamere zu selektieren. Dazu gehört zum Beispiel die *cell*-SELEX, bei der statt gegen aufgereinigte Oberflächenproteine direkt gegen Bakterien- oder eukaryotische Zellen selektiert wird. Dabei kann der native Zustand der Oberflächenstrukturen beibehalten werden. Eine Immobilisierung ist nicht notwendig.⁷⁵ Die CE-SELEX beruht auf einer Trennung von Target-gebundenen und freien Aptameren mittels Kapillarelektrophorese.⁷⁶ Der Vorteil der CE-SELEX ist, dass auch hier

das Target nicht immobilisiert werden muss und dank der sehr effektiven Trennleistung nur ein bis drei Selektionsrunden notwendig sind. Bei der FluMAG-SELEX ist der Aptamerpool fluoreszenzmarkiert und das Target an Magnetpartikel gekoppelt.⁷⁷ Wang *et al.* (2017) koppeln beim sogenannten *Particle Display* hingegen einen vorselektierten Aptamerpool an Magnetpartikel. Mit Hilfe von Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*; FACS) werden dabei Aptamerpool-Magnetpartikel-Target-Komplexe von freien Aptamerpool-Magnetpartikeln und freien fluoreszenzmarkierten Target-Molekülen getrennt und so eine Vielzahl von Aptameren in kurzer Zeit durchgemustert.⁷⁸

Alternativ zur Art der Inkubation beziehungsweise dem Abtrennen nicht-bindender Sequenzen kann auch die Ausgangssequenzbibliothek verändert werden. So wird bei der *genomic SELEX* statt einer randomisierten synthetischen Bibliothek eine aus genomischer DNA abgeleitete Bibliothek verwendet, z.B. aus *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* oder dem menschlichen Genom. Durch die *genomic SELEX* können biologisch bedeutsame Nukleinsäure-Protein-Interaktionen aufgeklärt werden.⁷⁹ Tolle *et al.* (2015) nutzen im Rahmen der *click-SELEX* durch Kupfer(I)-katalysierte Alkalin-Azid-Cycloaddition chemisch modifizierte Basen, um den Sequenzraum und damit die Zahl der möglichen Faltungen zu vergrößern und um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, sehr affine Aptamere zu selektieren.⁸⁰ Ähnlich zur *click-SELEX* ist auch bei SOMAmeren der Sequenzraum durch chemische Modifikationen erweitert.⁸¹ Es werden statt chemischer Modifikationen auch L-Ribonukleinsäuren, also Spiegelbildenantiomere natürlicher Ribonukleinsäuren, verwendet. Diese sogenannten Spiegelmere sind nicht von Enzymen spaltbar und entsprechend besonders geeignet für den Einsatz als Arzneistoffe im Blutserum.⁸² Auch die an der Hamburg School of Food Science entwickelte *Just in Time-Selection* ist eine modifizierte Form der SELEX.⁶⁴

Neben der Selektion und der Sequenzbibliothek kann auch die Sequenzierung, d.h. die Methode zum Erhalt potenzieller bindender Sequenzen, modifiziert werden. Besonders zu nennen ist hierbei das *Next Generation Sequencing* (NGS).⁸³ Beim NGS werden statt einiger Klone Millionen in einem Aptamer-Pool vorhandene Sequenzen in einem einzigen Lauf sequenziert. Nach umfangreicher Datenanalyse können so auch die prozentuellen Anteile angereicherter Sequenzen erfasst werden. Es ist so außerdem möglich, einzelne Sequenzen über den Verlauf der SELEX hinweg zu verfolgen und schon in frühen SELEX-Runden

Aussagen zu deren Anreicherung zu treffen.⁷⁴ Zudem gibt es bioinformatische Tools, die SELEX-Verläufe *in silico* vorhersagen sollen.⁸⁴

Just in Time-Selection

Die *Just in Time-Selection* (Abb. 1.8) nach Hünninger *et al.* (2015) ist eine SELEX-Variante, bei der das Target zunächst auf Magnetpartikeln immobilisiert wird.⁶⁴ Die Inkubation von Aptamer-Pool und Magnetpartikel-immobilisiertem Target erfolgt halbautomatisch mit Hilfe eines KingFisher Duo Purification Systems. Dieses System besteht aus einem beweglichen magnetischen Kamm, welcher für die automatische Inkubation der Target-Magnetpartikel mit dem Aptamerpool und anschließende Waschschrte in tiefen 96-*well*-Platten verwendet wird. Ein beheizbarer Elutionsstreifen ermöglicht die Elution gebundener Aptamere bei einer Temperatur von bis zu 75 °C. Dieser erste Teil der SELEX wird FISHing genannt. Im zweiten Teil, dem sogenannten BEAMing (von *beads, emulsion, amplification, magnetics*), werden die „gefischten“ Aptamere amplifiziert.

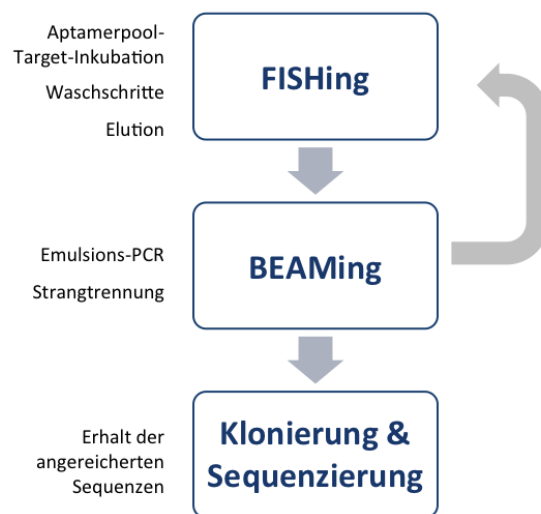


Abb. 1.8: Ablauf der *Just in Time-Selection*.

Dazu werden Magnetpartikel verwendet, auf denen über eine Aminogruppe Rückwärtsprimer immobilisiert sind. Diese Primer-Magnetpartikel werden statt des Rückwärtsprimers zu einem Emulsions-PCR-Ansatz gegeben. Bei der Emulsions-PCR (emPCR) wird durch Überschichten des PCR-Ansatzes mit Ölen bestimmter Dichte und anschließender Vermischung eine Emulsion gebildet. Die gebildete Wasser-in-Öl Emulsion sorgt durch die

Bildung von Mizellen für eine Vielzahl einzelner Reaktionsräume, in denen im optimalen Fall jeweils nur eine einzelne Sequenz amplifiziert wird.⁸⁵ Das kann zum einen die für die konventionelle PCR typische Bildung von Artefakten durch Fehlanlagerung der Primer bei der Amplifikation, und zum anderen den PCR *bias* reduzieren, durch den bestimmte Sequenzen effizienter repliziert werden als andere.⁸⁶ Der PCR *bias* kann in der SELEX dazu führen, dass Aptamersequenzen, die sich leichter vervielfältigen lassen aber keine guten Binder sind, in den Aptamerpools überrepräsentiert werden.

Nach erfolgter PCR wird die Emulsion durch Zugabe von Isobutanol oder Isopropanol gebrochen. Die Primärstränge werden im Anschluss durch etwa zehnmütiges Erhitzen bei 90 °C von den kovalent an die Magnetpartikel gebundenen Sekundärsträngen abgetrennt und können im Magnetrack mit dem Überstand als sogenanntes BEAMing Eluat abgenommen werden. Auf Grund der geringen Konzentration der einzelsträngigen DNA (*single stranded* DNA, ssDNA) erfolgt im Anschluss eine offene PCR, um die Produkte auf einem Agarosegel mit Ethidiumbromid zu visualisieren. Das BEAMing Eluat wird direkt für die nächste Selektionsrunde eingesetzt. Klonierung und Sequenzierung am Ende der Selektion erfolgen wie oben beschrieben.

1.2.2 Charakterisierung der Bindungseigenschaften

Um die Eignung der Aptamere nach der Selektion zu überprüfen, müssen Aussagen über Bindungsstärke und Selektivität getroffen werden. Zur Ermittlung der Bindungsstärke wird der K_D -Wert bestimmt. Je kleiner dieser ist, desto stärker ist die Bindung zwischen den Liganden.⁸⁷ Für Selektivitätsmessungen wird die Affinität des Aptamers zum Target mit der Affinität zu anderen Stoffen bei gleicher Konzentration verglichen. Im Folgenden wird eine Auswahl häufig verwendeter Methoden zur Aptamercharakterisierung beschrieben.

Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie kann für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten genutzt werden, indem ein Ligand auf einer Oberfläche, beispielsweise auf einem Agaroseresin oder auf Magnetpartikeln immobilisiert wird.⁸⁸ Dieser Ligand (in der Regel das Target) wird dann mit verschiedenen Konzentrationen des anderen Liganden (in der Regel das Aptamer) inkubiert. Im Anschluss wird, z.B. über eine Fluoreszenzmarkierung oder eine real-time PCR (*quantitative* PCR, qPCR), die relative Menge des gebundenen Aptamers bestimmt. Durch

Auftragen der eingesetzten Konzentrationen relativ zum erhaltenen Signal und Fitting der Daten können K_D -Werte bestimmt werden. Die Affinitätschromatographie kann auch zur Selektivitätsmessung eingesetzt werden.⁸⁹

Direkter Enzyme-linked Aptamer Assay

Der Enzyme-linked Aptamer Assay (ELAA) ist eine adaptierte Form des direkten ELISA und kann verwendet werden, wenn es sich beim Zielmolekül um ein Protein oder einen proteingebundenen Stoff handelt. Eine festgelegte Menge Protein wird auf einer beschichteten Mikrotiterplatte immobilisiert und mit biotinyliertem Aptamer und Streptavidin-HRP inkubiert. Durch Zugabe des Substrates 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) tritt unter Anwesenheit von H_2O_2 eine konzentrationsabhängige Blaufärbung auf (Abb. 1.9). Nach Zugabe von H_2SO_4 wird die Reaktion gestoppt und die Extinktion kann bei 450 nm gemessen werden.⁹⁰ Der ELAA eignet sich sowohl zur K_D -Wert-Bestimmung als auch zur Selektivitätsmessung.

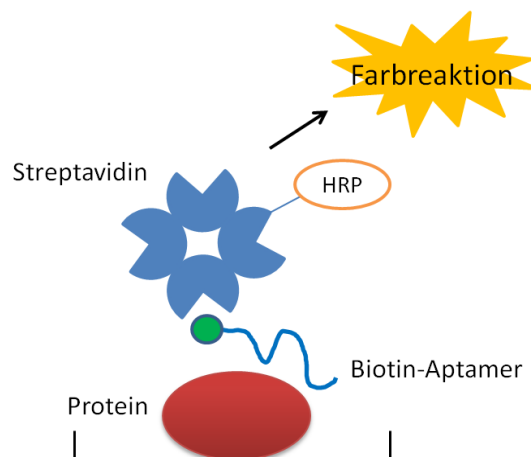


Abb. 1.9: Schematische Darstellung des direkten ELAA.

Microscale Thermophoresis

Microscale Thermophoresis (MST) ist eine auf Thermophorese beruhende Methode zur Quantifizierung biomolekularer Interaktionen.⁹¹ Der thermophoretische Effekt basiert auf der Bewegung von Teilchen in einem mikroskopischen Temperaturgradienten. Die Thermophorese eines ungebundenen Liganden unterscheidet sich von der eines Liganden-

Komplexes, sodass durch Bindung ausgelöste kleinste Veränderungen von Konformation, Ladung, Größe und Hydrathülle erfasst werden.⁹²

Für eine MST-Messung wird zunächst eine Verdünnungsreihe eines der Liganden hergestellt, zu der danach im äquimolaren Verhältnis ein fluoreszenzmarkierter zweiter Ligand gegeben wird. Die Lösungen werden durch Kapillarkräfte in Glaskapillaren bewegt, anschließend wird ein Infrarotlaser mit einer Emissionswellenlänge von 1480 nm durch ein Objektiv auf die Glaskapillaren gestrahlt. Dadurch wird ein Temperaturgradient in der Größenordnung von 2 bis 6 °C erzeugt. Gleichzeitig wird der fluoreszierende Ligand angeregt und dessen Fluoreszenz detektiert.⁹² So wird eine konzentrationsabhängige Zu- oder Abnahme der Fluoreszenz im Gradienten registriert, woraus sich schließlich die Dissoziationskonstante ableiten lässt.

Weitere Methoden

Neben den bereits beschriebenen gibt es viele weitere Methoden, um Aptamere bezüglich ihrer Affinität und Selektivität zu charakterisieren.

Dazu gehört unter anderem die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR-Spektroskopie), bei der auf einem Goldfilm über einem Prisma ein Ligand immobilisiert wird. Durch Auftreffen von Licht in einem bestimmten Winkel entsteht eine Plasmonenwelle. Beim Überleiten des zweiten Liganden ändert sich durch die Bindung der Liganden die Plasmonenwelle und entsprechend der Brechungsindex: die Änderung kann anschließend detektiert werden.⁹³ FACS wurde ursprünglich für das Sortieren von Zellen entwickelt, kann aber auch für Bindungsstudien zwischen Aptameren und eukaryotischen oder Bakterienzellen verwendet werden. Die Aptamere müssen dafür mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden.⁹⁴ Beim Filterbindungsassay wird ein Proteinligand auf einer Filtermembran immobilisiert und radioaktiv markiertes Aptamer darüber geleitet. Bei der Dialyse und Ultrafiltration werden Größenunterschiede zwischen Komplexen und ungebundenen Liganden zur Ermittlung der Bindungsstärke genutzt.⁹⁵ Weiterhin zu nennen sind molekularbiologische Methoden wie der DNase Assay und der SYBR Green I Assay,⁸⁸ außerdem die Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC).

1.2.3 Anwendungen von Aptameren

Wirkstofftransport

Aptamere können mit Hilfe der *cell-SELEX* so generiert werden, dass sie gesunde von erkrankten Zellen unterscheiden und somit pharmakologische Wirkstoffe gerichtet zu Krebszellen transportieren können.⁶⁸ Die Wirkstoffe, z.B. Doxorubicin, werden an Aptamere gekoppelt oder zwischen mehreren Aptameren interkaliert. Beim Erreichen der Zielzellen werden die Wirkstoffe mit den Aptameren in die Zellen aufgenommen.⁹⁶ Durch diese Technik können kranke Zellen gezielter angegriffen werden. Beispiele für Wirkstoff-transportierende Aptamere sind anti-MUC1,⁹⁷ anti-HER2⁹⁸ oder anti-EpCAM.⁹⁹ Aptamere werden auch verwendet, um Goldnanopartikel, Eisenoxidnanopartikel oder Liposomen zu Zielzellen zu transportieren.⁹⁶

Bioimaging

Durch Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen oder Quantenpunkten (*quantum dots*) können Aptamere im *Bioimaging* verwendet werden. Normalerweise wird ein Mechanismus verwendet, bei dem die Fluoreszenz ohne Vorhandensein des Targets gequencht und erst bei Target-Bindung erfassbar wird. Der umgekehrte Mechanismus ist seltener, wird aber auch genutzt. *Bioimaging* wird beispielsweise dafür eingesetzt, die Verteilung bestimmter Stoffe innerhalb von Zellen sichtbar zu machen, zelluläre Prozessabläufe zu verfolgen oder Krebszellen zu erkennen.¹⁰⁰

Therapeutika

Auch wenn derzeit erst ein Aptamer als Therapeutikum zugelassen ist, gibt es eine Vielzahl von Publikationen über Aptamer-basierte therapeutische Anwendungen. Dazu zählen in erster Linie die Detektion, Diagnostik und Therapie von Krebs sowie Anreicherung von Krebszellen mittels FACS.⁶⁸ So wurden beispielsweise bereits Aptamere gegen Leberkrebszellen¹⁰¹ und Darmkrebszellen,¹⁰² Eierstockkrebszellen,¹⁰³ Prostatakrebszellen¹⁰⁴ oder Brustkrebszellen¹⁰⁵ selektiert.

Macugen (Pegaptanib), ist ein RNA-Aptamer-basiertes Therapeutikum gegen altersbedingte Makuladegeneration, das in den USA im Jahr 2004 durch die *Food and Drug Administration*

(FDA) zugelassen wurde und heute durch Bausch+Lomb (Rochester, New York, USA) vertrieben wird. Es ist das erste als Therapeutikum zugelassene Aptamer weltweit. Das Aptamer bindet an Wachstumsfaktor *vascular endothelial growth factor* 165 (VEGF₁₆₅), wodurch es diesen blockiert und abnormales Wachstum verhindert.¹⁰⁶ Derzeit sind keine weiteren Aptamere als Therapeutika zugelassen, wobei sich aber einige in klinischen Studien befinden.¹⁰⁷

Neben Anti-VEGF existieren auch Blutgerinnsel-lösende Aptamere, Anti-Adipositas Aptamere, Anti-Autoimmunantikörper-Aptamere und antivirale Aptamere.¹⁰⁸ Häufig werden statt R-DNA - oder R-RNA -Aptameren auch nukleasestabile Spiegelmere eingesetzt. Spiegelmere sind gegen eine Reihe von Biomarkern verfügbar, unter anderem gegen Vasopressin,¹⁰⁹ *Staphylococcus* Enterotoxin B,¹¹⁰ GnRH⁸² und Ghrelin.¹¹¹

Diagnostik und Analytik

Neben den therapeutischen Anwendungen sind Diagnostik und Analytik sicherlich die bedeutendsten Einsatzgebiete der Aptamere. Dafür werden in aller Regel Aptasensoren verwendet, d.h. Biosensoren, die Aptamere als Sensorelemente verwenden. Aptasensoren wurden für eine Vielzahl analytisch und diagnostisch interessanter Stoffe beschrieben, unter anderem Mykotoxine, Bakterientoxine, Schwermetalle und Allergene. Die meisten Aptasensoren basieren auf einer elektrochemischen, fluoreszenzbasierten oder kolorimetrischen Detektion.¹¹²

Zu den kolorimetrischen Biosensoren gehört der Lateral Flow Assay (LFA). Der LFA zeichnet sich durch seine sehr schnelle und einfache Durchführbarkeit, niedrige Kosten und Lagerstabilität aus,^{113,114} weshalb er im *Point-of-Care-Testing* (patientennahe Labordiagnostik, POCT) eingesetzt wird.¹¹⁵

Der Aufbau eines typischen Lateral Flow Streifens ist in Abb. 1.10 dargestellt. Die Streifen bestehen normalerweise aus einem Sample-Pad aus Zellulosefaser zum Auftragen der Proben und einem Conjugate-Pad aus Glasfaser, auf dem die zumeist Goldnanopartikel (AuNP)-markierten Detektor-Aptamere (oder -Antikörper) mit der Probe in Kontakt gebracht werden. Neben AuNPs können auch Latexpartikel, farbstoffgefüllte Liposomen oder Fluoreszenzfarbstoffe als Signalgeber verwendet werden. Die mit dem Analyten komplexierten Signalgeber fließen über eine Nitrozellulose (NC)-Membran zu Test- und

Kontrolllinie, wo sie gegebenenfalls festgehalten werden. Ungebundene AuNPs werden schließlich vom Absorbent-Pad aufgenommen.¹¹⁶

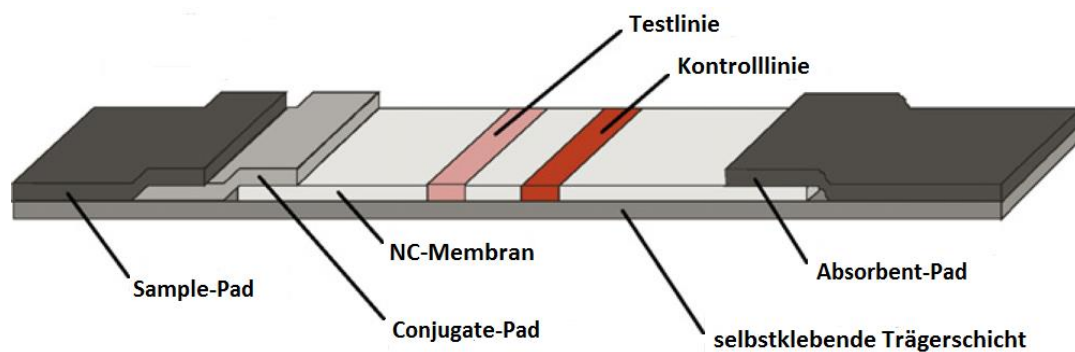


Abb. 1.10: Typischer Aufbau eines für den LFA verwendeten Teststreifens, modifiziert nach Assadollahi *et al.* (2009).¹¹⁷

Ein LFA basiert entweder auf einem kompetitiven oder einem Sandwich-Format. In einem typischen kompetitiven Assay wird der Analyt oder ein zum Aptamer (teilweise) komplementärer Strang auf der Testlinie immobilisiert. Befindet sich Analyt in Lösung, sättigt dieser nach und nach die (in der Regel AuNP-gekoppelten) Reporter-Aptamere ab, sodass diese nicht mehr an den immobilisierten Analyten oder den Komplementärstrang an der Testlinie binden können. Ist die Testbande nicht oder schwach sichtbar ist der Test positiv. Beispielsweise entwickelten Jauset-Rubio *et al.* (2016) einen kompetitiven Assay zum Nachweis des Lebensmittelallergens β -Conglutin, bei dem β -Conglutin auf der Testlinie und ein zum Reporter-Aptamer komplementärer Strang auf der Kontrolllinie immobilisiert wurden. Dadurch ließ sich β -Conglutin bis zu einer Konzentration von 55 pM in Puffer nachweisen.¹¹⁶

Für das Sandwichformat wird neben dem Reporter ein auf der Testlinie immobilisierter Fänger benötigt. Prinzipiell können zwei Aptamere oder eine Kombination aus einem Aptamer und beispielsweise einem Antikörper verwendet werden. Der markierte Reporter kann nur an die Testlinie binden, wenn der Analyt in ausreichender Menge vorhanden ist. Es bildet sich ein Komplex mit dem Analyten zwischen Fänger und Reporter, der als sichtbare Testlinie ein positives Testergebnis anzeigt.¹¹⁴ Sofern möglich werden für Sandwich Assays Aptamerpaare verwendet, die an unterschiedliche Aptatope binden. Das prominenteste Beispiel hierfür ist ein Sandwich-LFA zum Nachweis von Thrombin, der die Aptamere TBA1 und TBA2 als AuNP-markierten Reporter beziehungsweise als Biotin-Streptavidin immobilisierten Fänger einsetzt.¹¹⁸ Mit diesem Assay konnte eine Nachweisgrenze von

2,5 nM in Puffer und 5 nM in Blutplasma erreicht werden. Ist kein geeignetes Aptamerpaar vorhanden werden auch Kombinationen von Aptameren und Antikörpern verwendet. Hierfür beispielhaft zu nennen ist ein LFA zum Nachweis von α -Amylase, bei dem ein Anti- α -Amylase-Antikörper als Fänger und ein AuNP-markiertes Aptamer als Reporter eingesetzt wurde.¹¹⁹

Eine weitere Variante des LFA ist der *Nucleic Acid Lateral Flow Assay* (NALFA). Beim NALFA geht dem eigentlichen LFA eine PCR voraus, bei der unterschiedlich markierte Target-spezifische Vorwärts- und Rückwärtsprimer (z.B. mit Biotin und einem Fluoreszenzfarbstoff) verwendet werden. Das PCR-Produkt wird dann auf den Teststreifen aufgetragen und über eines der Label (im Falle eines Biotin-Labels zum Beispiel durch Streptavidin) an der Testlinie festgehalten. Das andere Label ermöglicht die Detektion, zum Beispiel über ein Fluoreszenzsignal.¹²⁰ Anstatt einer PCR kann auch eine isothermale Amplifikation (z.B. durch *Strand Displacement Amplification*, SDA oder *Recombinase Polymerase Amplification*, RPA) durchgeführt werden. Ursprünglich wurden beim NALFA Genfragmente bestimmter Organismen (z.B. STEC)¹²¹ amplifiziert und damit die jeweiligen Organismen nachgewiesen, allerdings wird die Vervielfältigung inzwischen auch zur Signalverstärkung in Aptamer-basierten LFAs eingesetzt.¹¹⁶

Neben dem LFA gehört unter anderem auch der ELAA zu den kolorimetrischen Aptasensoren. Anders als zur Aptamercharakterisierung wird in der Analytik allerdings häufig ein Sandwich Assay durchgeführt, bei dem der Fänger (Aptamer oder Antikörper) auf der Mikrotiterplatte immobilisiert wird und die kolorimetrische Detektion durch einen markierten Reporter erfolgt. Der Reporter ist häufig ein Biotin-markiertes Aptamer. Durch anschließende Inkubation mit Streptavidin-HRP wird durch die bereits erwähnte Farbreaktion die Konzentration der Zielsubstanz angezeigt (1.2.2).¹²² Das Sandwichformat wird auf Grund seiner besseren Sensitivität und Selektivität dem kompetitiven Assay vorgezogen.

Bei elektrochemischen Aptasensoren muss meistens, auch wenn ebenso labelfreie elektrochemische Sensoren existieren, zunächst das Aptamer über eine funktionelle Gruppe auf einer leitenden Oberfläche immobilisiert werden. Diese besteht aus Kohlenstoffnanoröhren, Nanopartikeln, Graphen-, Polymer- oder anderen Nanostrukturen. Die Entstehung des Signals beruht im Falle eines Enzym-konjugierten elektrochemischen Aptasensors auf der enzymatischen Reaktion des an ein sekundäres Aptamer gekoppelten

Enzyms in Anwesenheit seines Substrats. Das sekundäre Aptamer bindet nur bei Anwesenheit des Zielmoleküls an die Oberfläche, sodass die Enzymreaktion nur in dessen Anwesenheit ablaufen kann.^{112,123} Amperometrische elektrochemische Sensoren basieren auf der Änderung des Redoxpotentials, z.B. durch Strukturänderung eines Aptamers bei Target-Bindung und dadurch veränderten Elektronenfluss. Impedanz-basierte Sensoren benötigen kein Label und basieren stattdessen auf dem Messen eines Widerstandes in Anwesenheit des Redox-Vermittlers $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$. In Abwesenheit des Zielmoleküls findet eine Abstoßung zwischen Vermittler und Aptamer statt, welche durch Bindung an das Zielmolekül aufgehoben wird. Die entstandene Widerstandsänderung wird als Signal erfasst.¹²³ Neben den oben beschriebenen kommen weiterhin potentiometrische und andere Ansätze für elektrochemische Aptasensoren zum Einsatz.

Fluoreszenzbasierte Aptasensoren nutzen Fluoreszenzintensitäten, um An- oder Abwesenheit von Zielmolekülen anzuzeigen. Ni *et al.* (2017) verwenden das 17β -Estradiol E2 Aptamer, um AuNPs in Lösung zu halten, wodurch sie die Fluoreszenz von Rhodamine B quenchen.¹²⁴ In Anwesenheit von 17β -Estradiol bindet das Aptamer an sein Target wodurch die AuNPs aggregieren und nicht mehr in der Lage sind Rhodamine B zu quenchen.¹²⁴ Mukherjee *et al.* (2017) entwickelten einen kompetitiven Ansatz, bei dem BSA-konjugiertes Aflatoxin B1 in der Mikrotiterplatte mit freiem Aflatoxin B1 um die Bindung eines FAM-markierten Aptamers konkurriert.¹²⁵

Prinzipiell können alle standardmäßig auf Antikörpern basierenden Biosensoren, wie z. B. auch SPR-Biosensoren, als Aptasensoren adaptiert werden, indem mindestens ein Antikörper durch ein Aptamer ersetzt wird.^{126,127}

Proteinreinigung

Neben den oben beschriebenen Anwendungen können Aptamere auch zur Reinigung von exprimierten Proteinen aus Zellysat genutzt werden. Der Vorteil einer solchen Methodik ist, dass kein Affinitätstag für die Reinigung benötigt wird. Die Reinigung kann mit Hilfe von Aptamer-modifizierten Magnetpartikeln oder Aptamer-modifizierter Sepharose als Säulenmaterial erfolgen.¹²⁸

1.3 Strukturaufklärung von Aptamer-Protein-Komplexen

Die Strukturaufklärung von biologischen Makromolekülen wie Proteinen und DNA erfolgt hauptsächlich durch hochauflösende Methoden wie Kernspinresonanzspektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, NMR-Spektroskopie), Röntgenstrukturanalyse (auch: Kristallstrukturanalyse) oder Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM). Bei der NMR-Spektroskopie werden Resonanzsignale von Atomkernen, im Fall von Proteinen und DNA von ^1H , ^{13}C und ^{15}N , ausgewertet. Mit steigender Größe der Biomoleküle nimmt die Komplexität der Daten durch Überlappung und Peakverbreiterung jedoch stark zu, weshalb mittels NMR vor allem Aptamere im Bereich von 30 bis 50 Basen oder Aptamer-Target-Komplexe von kleinen Molekülen bis maximal 40 kDa untersucht werden. Die Strukturen großer Aptamer-Protein-Komplexe werden üblicherweise mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt.¹²⁹ Dafür werden sehr reine Einkristalle hinreichender Größe mit einer hohen inneren Ordnung benötigt. Um gut beugende Kristalle zu erhalten ist normalerweise eine Vielzahl von Kristallisierungsversuchen notwendig, die bisweilen auch erfolglos bleiben, z.B. bei Proteinen mit flexiblen Bereichen wie Polyhistidin-Tags (His-Tags). Normalerweise müssen zusätzlich zum Entfernen der Protein-Tags auch für das Aptamer Minimalmotivversuche durchgeführt werden, um überflüssige (und möglicherweise flexible) Sequenzbereiche zu entfernen, die die Qualität der Kristalle negativ beeinflussen können.¹³⁰ Da die Strukturaufklärung durch Röntgenstrukturanalyse zeitaufwendig, komplex und für einige Fragestellungen nicht zielführend ist, findet die Kryo-EM zunehmend Anwendung. Bei der Kryo-EM werden Bilder mehrerer Tausend verschiedener Einzelpartikel auf einer dünnen Schicht nicht-kristallinem Eis bei etwa einer Temperatur von flüssigem Stickstoff aufgenommen. Zusammengefügt entstehen dadurch dreidimensionale Modelle.¹³¹ Heutzutage können mit dieser sich schnell entwickelnden Methode schon Auflösungen knapp über 2 \AA ¹³² erhalten werden. Im Vergleich dazu werden mittels Röntgenstrukturanalyse vereinzelt Auflösungen bis zu $0,5 \text{ \AA}$ erreicht,¹³³ wobei 2 \AA der Durchschnitt ist.

Wenn Strukturaufklärung im hochauflösenden Bereich auf Grund der Komplexität der Methoden nicht zielführend oder lohnenswert ist, kann mittels Kleinwinkelröntgenstreuung (*small angle X-ray scattering*, SAXS) eine Struktur mit niedriger Auflösung (bis zu etwa 8 \AA)¹³⁴ bestimmt werden. Vereinfacht treffen beim SAXS Röntgenstrahlen auf die Elektronen der Biomoleküle in einer Probe, woraus eine Streuung resultiert. Die Streuwinkel der

Strahlen werden mit einem Detektor aufgezeichnet. Aus den aufgezeichneten Intensitäten und zugehörigen Winkeln wird die Streukurve extrahiert, die anschließend zur Modellierung *ab initio* genutzt wird.¹³⁵

Eine wichtige Voraussetzung für hochwertige Daten ist die Monodispersität der Proben. SAXS-Experimente werden in Lösung durchgeführt und können unter anderem mit Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) kombiniert werden, um beispielsweise bei der Messung von Komplexen überschüssige Liganden abzutrennen.^{136,137} Als Röntgenquelle können Laborquellen dienen, bevorzugt wird allerdings die sehr viel stärkere Synchrotronstrahlung, wie sie zum Beispiel an der Speicherring-Röntgenstrahlungsquelle PETRA III des Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) verfügbar ist, da diese eine höhere Auflösung, kürzere Messzeiten und ein kleineres Probenvolumen ermöglicht.¹³⁵

SAXS wurde in Kombination mit sequenzieller Massenspektrometrie bereits erfolgreich für die Aufklärung der Bindung des G-Quadruplex formenden Aptamers AIR-3 an den Interleukin-6 Rezeptor hIL-6R eingesetzt.¹³⁸

2 Ziel der Arbeit

Die beiden AB₅-Toxine Cholera toxin und Shigatoxin 1 lösen schwere Durchfallerkrankungen aus. Die Nachweise der beiden Toxine beruhen heutzutage entweder auf Antikörper-basierten Methoden oder auf Ansätzen, die eine komplexe Infrastruktur und wissenschaftlich geschultes Personal erfordern. Gerade die Choleraerkrankung spielt allerdings eine Rolle in Gegenden, in denen die Voraussetzungen dazu häufig nicht gegeben sind. Generell ist die Suche nach Antikörperalternativen, zum einen aus Tierschutzgründen, zum anderen auf Grund ihrer intrinsischen Nachteile wie schlechter Lagerbarkeit, Chargenvariabilität und Kosten, erstrebenswert. Eine solche Alternative stellen Aptamere dar.

In der vorliegenden Arbeit sollen Aptamere gegen heterolog exprimiertes und aufgereinigtes Cholera toxin und Shigatoxin 1 mittels *Just in Time*-Selection selektiert werden. Die erhaltenen Aptamersequenzen sollen anschließend hinsichtlich ihrer Target-Affinität und Kreuzreaktivität charakterisiert werden. Dazu sollen unter anderem Affinitätschromatographie mit Quantifizierung mittels Fluoreszenz und qPCR, MST und ELAA verwendet werden. Weiterhin sollen bioinformatische Vorhersage-Tools und Circular dichroismus-Spektroskopie Informationen über die Strukturen und Sequenzmotive der Aptamere liefern.

Die jeweils besten Aptamere jeder Selektion sollen für die Entwicklung Magnetpartikel-basierter Sandwich Assays verwendet werden, welche auch auf ihre Eignung für realitätsnahe Anwendungen geprüft werden sollen. Weiterhin sollen mit Hilfe der Aptamere verschiedene LFA-Ansätze für einen schnellen und kostengünstigen Nachweis des Cholera toxins entwickelt werden.

Zuletzt sollen Aussagen über die Struktur der selektierten Aptamere – im besten Fall mit dem Target-Protein – getroffen werden.

3 Materialien

3.1 Chemikalien

Alle verwendeten Standardchemikalien sind im Detail im Anhang 7.1 (Tab. 7.1) aufgeführt.

3.2 Puffer und Lösungen

Eine Auflistung aller verwendeten Puffer und Lösungen ist dem Anhang 7.2 (Tab. 7.2) zu entnehmen.

3.3 Medien

Alle Nährmedien sind im Anhang 7.3 in Tab. 7.3 aufgeführt.

3.4 Bakterienstämme und Vektoren

Für die Proteinexpression wurde ein chemisch kompetenter *E. coli* BL21 (DE3) Stamm eingesetzt. Für die Aptamer-Klonierung wurden hauseigene chemisch kompetente *E. coli* XL1 Zellen verwendet. Für die rekombinante Expression von CT-B und ST1-B wurden pET22b(+)Vektoren mit den Schnittstellen Nde I und Hind III eingesetzt. Es wurden folgende Proteinsequenzen codon-optimiert verwendet:

CT-B

>VC-CTXB

MHHHHHHSVDDDDKGGTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMAITFKNGATFQVEVP
GSQHIDSQKKAIERMKDTRLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMAN

ST1-B

>VC-STXB1

MTPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKELFTNRWNLQSLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVI
FRVDDDDKSGHHHHHH

Aus Sicherheitsgründen wurden anstatt der Holotoxine die B-Pentamere verwendet.

3.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang 7.4 in Tab. 7.4 aufgelistet.

3.6 Proteine und Ganglioside

Anti-CT-Antikörper (Kaninchen; Serum ca. 60 mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Anti-Kaninchen-Antikörper (Ziege; 2 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Anti-ST1-Antikörper (Kaninchen; 1 mg/ml)	List Biological Laboratories, Campbell, California, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Fluka, St. Gallen, Schweiz
Casein	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
CT-B	eigene Herstellung
Dream Taq-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
GM1	Enzo Life Sciences, Lörrach
HRP-Anti-Kaninchen-Antikörper (Ziege; 0,25 mg/ml)	Fluka, St. Gallen, Schweiz
NeutrAvidin <i>biotin binding protein</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Protein A	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
ST1-B	eigene Herstellung
Streptavidin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Streptavidin-HRP (1,25 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Taubeneiweiß	Hamburger Stadttauben e.V., eigene Aufreinigung

3.7 Kits

E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit	Omega Biotek/VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
peqGold Gel Extraction Kit	PEQLAB/VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
EZ-Link Sulfo-NHS-LC Biotinylation Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Monolith NT His-Tag Labeling Kit RED-tris-NTA	Nanotemper, München

3.8 Molekulargewichtsmarker

Low Molecular Weight DNA Ladder	BioRad, Hercules, California, USA
Pierce Unstained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
SMOBIO-PM-2600	SMOBIO, Hsinchu City, Taiwan

3.9 Geräte und Software

Die verwendeten Geräte und Software sind dem Anhang 7.5 (Tab. 7.6 und Tab. 7.7) zu entnehmen. Die notwendige Software zur Verwendung der Geräte ist zur besseren Übersichtlichkeit nicht separat aufgeführt.

4 Methoden

4.1 Proteinbiochemische Methoden

4.1.1 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Für die Herstellung rekombinanter Proteine (hier: CT-B und ST1-B) muss zunächst ein Expressionsvektor, der für das Protein codierende DNA enthält, in ein geeignetes Zellsystem, in der Regel *E. coli*, transformiert werden.

Dafür wurden jeweils 50 µl chemisch kompetente *E. coli* BL21 Zellen auf Eis aufgetaut und zusammen mit 0,08 µg in sterilem Wasser gelöster Plasmid-DNA (Choleratoxin: Vektor VC-CTBX; Shigatoxin 1: Vektor STXB1) in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Für den Hitzeschock wurden die Zellen 30 min auf Eis inkubiert, anschließend 20 s bei 42 °C erwärmt und 1 min auf Eis gekühlt. Es wurde jeweils 1 ml LB-Medium hinzugegeben und 30 min bei 37 °C unter sanftem Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden auf Agarplatten (LB-Medium mit 100 mg/l Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

4.1.2 Expression der B-Untereinheiten von Choleratoxin und Shigatoxin 1

Für die Expression der rekombinanten Proteine wurden jeweils 100 ml LB-Medium mit 100 mg/l Ampicillin mit einer einzelnen Kolonie beimpft und bei 37 °C und 150 rpm über Nacht im Schüttelinkubator geschüttelt. Mit dieser Vorkultur wurden 8 l LB-Amp-Medium (100 mg/ml Ampicillin) angeimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,4-0,6 unter Schütteln inkubiert. Nach 30 min bei 16 °C wurden 2 mM IPTG hinzugegeben und bei 130 rpm für 40 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 30-40 min durch Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C pelletiert, einmal mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen, erneut zentrifugiert und bei -80 °C gelagert.

4.1.3 Proteinreinigung

Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie

Die Reinigung der Proteine aus den Zellpellets erfolgte unter Ausnutzung der Affinität der an die Proteine fusionierten His-Tags gegenüber immobilisierten Metallkationen wie Ni^{2+} .

Die Zellpellets wurden dafür in 3-5 ml Puffer A je Gramm Zellen resuspendiert und Zellklumpen wurden mit einem Ultraschall-Homogenisator (2 x 25 s) aufgelöst. Der Zellaufschluss erfolgte mit einer French Press. Die Zellsuspension wurde anschließend für 1 h bei 15 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Protein-enthaltende Überstand wurde mit einem ÄKTAPrime plus System über eine Nickel-Chelat-Chromatographiesäule affinitätschromatographisch aufgereinigt. Dafür wurde die Säule mit Puffer A gespült, die Proteinlösung mit einer Flussrate von 2 ml/min auf die Säule aufgetragen, die Säule erneut gespült und das exprimierte Protein bei einem stufenlosen Gradienten von Puffer A zu Puffer B (15-800 mM Imidazol) in 6 ml-Aliquoten eluiert. Die Reinheit der Proteinfractionen wurde mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; 4.1.4) und Coomassie-Färbung (4.1.5) analysiert.

Größenausschlusschromatographie

Die Proteinfractionen, die die größten Mengen an CT-B bzw. ST1-B enthielten, wurden mittels SEC erneut aufgereinigt. Bei diesem Verfahren werden Proteine abhängig von ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Während kleine Moleküle in die Poren der Gelmatrix eindringen, durchlaufen große Moleküle die Säule schneller und eluieren daher früher.

Eine Superdex 200 *prep grade* wurde dafür zuerst mit 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0,02 % NaN₃ bei einer Flussrate von 3 ml/min für 2 h äquilibriert. Anschließend wurden jeweils 10 ml Proteinlösung aufgetragen und in 10 ml-Fractionen im gleichen Puffer eluiert. Die anhand ihrer UV-Absorption identifizierten proteinhaltigen Elutionsfractionen wurden erneut mittels SDS-PAGE (4.1.4) und Coomassie-Färbung (4.1.5) analysiert. Die Fractionen mit hohem Proteingehalt und ohne offensichtliche Verunreinigungen wurden mit Amicon Ultra-15 Zentrifugeneinheiten mit einem *Molecular Weight Cut Off* (MWCO) von 5 kDa (CT-B) bzw. 3 kDa (ST1-B) aufkonzentriert.

4.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen im elektrischen Feld. Durch die Bindung an das anionische Detergens SDS wird die Eigenladung der Proteine maskiert, sodass die Trennung nur anhand ihres Molekulargewichts erfolgt. Für

die Analyse der Fraktionen der ersten bzw. zweiten Proteinreinigung wurden 15%ige Polyacrylamidgelen verwendet (Tab. 4.1). Das Sammelgel war immer 4%ig.

Tab. 4.1: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele (zwei Gele).

	15%iges Trenngel	12%iges Trenngel	4%iges Sammelgel
Reinstwasser	3,75 ml	4,5 ml	2,0 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamid	3,5 ml	3,0 ml	0,5 ml
APS (10 %)	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 (v/v) mit Probenpuffer verdünnt und für 5 min bei 95 °C erhitzt, je nach Konzentration wurden jeweils 3-15 µl Probe wurden auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde der Pierce Unstained Protein Molecular Weight Marker beziehungsweise bei anschließender Western Blot-Analyse der Spectra Multicolor Broad Range Marker verwendet. Die eingestellten Parameter für die Auftrennung lagen bei max. 14 W, 220 V und 35 mA pro Gel.

Bei der SDS-PAGE des Anti-Choleratoxin-Antikörpers und des Taubeneiweißes sowie der Ergebnisse der Affinitätsanreicherung wurde analog vorgegangen. Dafür wurden anstatt 15%igen Polyacrylamidgelen 12%ige Polyacrylamidgele hergestellt (Tab. 4.1). Als Marker diente der SMOBIO-PM-2600. Es wurden jeweils 10 µl bei einer Konzentration von 200 µg/ml (Antikörper) und 150 µg/ml (PEW) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte analog zu oben.

4.1.5 Coomassie-Färbung

Die Proteinbanden wurden mit Coomassie Brilliant Blue R-250 angefärbt. Dafür wurden die Polyacrylamidgele über Nacht unter Schütteln in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend für 30 min mit Entfärbelösung entfärbt und eingescannt.

4.1.6 Western Blot

Für den immunologischen Nachweis wurden die aufgetrennten Proteine mittels Nassblotverfahren auf eine Hybond-Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran übertragen. Dafür wurden zuerst in Anodenpuffer I und II getränkte Stofftücher luftblasenfrei auf der Anode einer Western Blot-Apparatur platziert und darauf die PVDF-Membran gelegt. Auf

dieser wurde wiederum ein Polyacrylamidgel nach elektrophoretischer Auftrennung positioniert, mit mehreren Lagen in Kathodenpuffer getränkten Stofftüchern bedeckt und mit der Kathode geschlossen. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine für 2 h bei 120 mA auf die Membran übertragen.¹³⁹ Die Membran wurde für 15-30 min getrocknet und für 2 x 15 min mit Tris-Puffer blockiert. Die Membran wurde über Nacht bei Raumtemperatur (RT) mit 20 ml Anti-Cholera-toxin-Antikörper (Kaninchen, 1:2000 (v/v) in Tris-Puffer) inkubiert und nach drei fünfminütigen Waschschritten mit 20 ml Tris-Puffer 1 h mit 20 ml Anti-Kaninchen-Antikörper-HRP-Konjugat inkubiert (1:20000 (v/v) in Tris-Puffer). Nach drei weiteren fünfminütigen Waschschritten mit 20 ml Tris-Puffer wurden 20 ml Färbelösung II hinzugegeben. Als die erwarteten Banden ausreichend sichtbar waren, wurde die Färbung durch Waschen mit vollentsalztem Wasser gestoppt.

4.1.7 Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch nach BRADFORD bestimmt.¹⁴⁰ Hierzu wurde eine BSA-Kalibrierreihe von 0,1 bis 0,5 mg/ml in PBS-Puffer hergestellt. Zu jeweils 10 µl Probenlösung beziehungsweise zu 10 µl jedes Konzentrationsstandards im Triplikate wurden 250 µl BRADFORD-Lösung gegeben und die Absorption bei 595 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

4.1.8 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Absorption

Alternativ wurde die Proteinkonzentration mittels NanoDrop ND-1000 bei einer Wellenlänge von 280 nm unter Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichts bestimmt, welche zuvor anhand ihrer Aminosäuresequenz mit Hilfe des Programms ProtParam (*ExpASy Server*) ermittelt wurden.¹⁴¹

4.1.9 Lyophilisation und Biotinylierung

Zur Isolierung des Taubeneiweißes wurde dieses zunächst manuell vom Eigelb getrennt. Anschließend wurde es bei -20 °C eingefroren und über Nacht (15-18 h, nachfolgend „über Nacht“ genannt) bei -50 °C und 1 mbar lyophilisiert. Das Taubeneiweiß wurde mittels EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit nach Herstellerangaben biotinyliert und die Biotinylierung nach Herstellerangaben mit den HABA-Assay überprüft.

Für die Biotinylierung wurden zunächst 800 µl Taubeneiweiß-Lösung (10 mg/ml in Reinstwasser) mit 384 µl Sulfo-NHS-LC-Biotin (10 mM in Reinstwasser) für 1 h unter Schütteln inkubiert. Anschließend folgte ein Pufferaustausch mit PBS-Puffer mittels einer *Zeba Spin Desalting Column*. Für das HABA-Assay wurden zu 200 µl NeutrAvidin-Lösung (5 mg/ml in Reinstwasser) zu 60 µl HABA-Lösung (10 mM in 0,01 N NaOH) und 1,9 ml PBS gegeben. Zu 180 µl der Lösung wurden und jeweils 20 µl des biotinylierten Taubeneiweißes gegeben und die Extinktion bei 500 nm photometrisch bestimmt. Durch die Verdrängung des HABA durch das zu NeutrAvidin affinere Biotin sinkt die Extinktion der Lösung proportional zum Biotingehalt.

4.1.10 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Um die Avidität des Anti-Choleratoxin-Antikörpers und des Taubeneiweißes zu Choleratoxin beziehungsweise Shigatoxin 1 zu überprüfen wurde ein direkter ELISA durchgeführt.

Anti-Choleratoxin-Antikörper

CT-B wurde in Tris-Puffer (pH 8) auf Konzentrationen von 0,01 ng/ml bis 10 µg/ml verdünnt. Jeweils 100 µl jeder Verdünnung sowie die Pufferkontrolle wurden im Triplikat über Nacht bei 4 °C auf einer ELISA-Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit 200 µl Tris-Puffer wurde die Mikrotiterplatte mit 200 µl Tris-Puffer mit 5 % BSA (w/v) blockiert. Nach erneutem Waschen mit Tris-Puffer wurden je 100 µl Anti-Choleratoxin-Antikörper (Kaninchen, 1:2000 (v/v) in PBS) in die Kavitäten gegeben und bei RT unter sanftem Schütteln inkubiert. Nach zwei erneuten Waschschritten mit Tris-Puffer wurden je 100 µl HRP-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:20000 (v/v) in PBS) zugegeben und erneut für 1 h bei RT inkubiert. Nach drei erneuten Waschschritten erfolgte die Färbung durch Zugabe von 100 µl Färbelösung. Nach 5 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 2 M H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion bei 450 nm photometrisch bestimmt. Die Daten wurden mittels *OriginPro 8G* Software ausgewertet.

Taubeneiweiß

Bei der Affinitätsbestimmung des Taubeneiweißes zu Shigatoxin 1 wurde ähnlich vorgegangen. Es wurden Verdünnungen von ST1-B in PBS-Puffer hergestellt (0,01 nM bis 100 nM) und jeweils 100 µl jeder Verdünnungsstufe und der Pufferkontrolle wurden im

Triplikat über Nacht bei 4°C auf einer ELISA-Mikrotiterplatte zur Immobilisierung bei RT inkubiert. Die Platte wurde zweimal mit 250 µl PBS-Tween (PBS-T, 0,05 %, v/v) gewaschen und für 1 h mit 200 µl PBS mit 5 % BSA (w/v) blockiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit PBS-Puffer wurden 100 µl biotinyliertes Taubeneiweiß (1,4 µg/ml in PBS) zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten mit PBS wurden 100 µl Streptavidin-HRP (1:10000, v/v) zugegeben und 1 h inkubiert. Nach wiederum drei weiteren Waschschrritten wurde wie oben gefärbt und ausgewertet.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde im Rahmen der Aptamerselktion zu Vervielfältigung von ssDNA, zur Kontrolle des Erfolgs der Selektionsrunden sowie zur Herstellung der Klonierungsinserts genutzt. Dafür wurden der in Tab. 4.2 dargestellte Reaktionsansatz und das in Tab. 4.3 dargestellte Temperaturprogramm verwendet. Es wurde stets eine Negativkontrolle (Reinstwasser) und eine Positivkontrolle (Aptamer, 100 nM oder Aptamerbibliothek, 100 nM in Reinstwasser) mitgeführt.

Tab. 4.2: Zusammensetzung des einfachen PCR-Ansatzes.

Komponente	Volumen [µl]
10x Dream Taq Polymerase PCR-Puffer	2,5
Dream Taq Polymerase (0,5 U)	0,5
dNTPs (10 µM)	2,0
Vorwärtsprimer (100 µM)	0,15
Rückwärtsprimer (100 µM)	0,15
Reinstwasser	18,7
Templat	1
	25

Tab. 4.3: Temperaturprogramm der PCR.

Schritt	Dauer [s]	Temperatur [°C]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	300	95	
Denaturierung	30	95	
Annealing	30	56	15-25
Elongation	30	72	
Finale Elongation	300	72	
Kühlung	∞	4	

4.2.2 BEAMing

Beim BEAMing handelt es sich um eine abgewandelte emPCR, bei der der Rückwärtsprimer an Magnetpartikel gekoppelt vorliegt (4.3.1). Das BEAMing wurde zur Vervielfältigung der Aptamerpools nach Inkubation mit dem Zielmolekül und Waschschritten (FISHing) verwendet. Der Vorteil des BEAMings im Vergleich zur klassischen PCR liegt in der Schaffung von einzelnen Reaktionsräumen, die den PCR *bias* senken, und in der Möglichkeit, im Anschluss an das Brechen der Emulsion direkt eine Strangtrennung durchzuführen.¹⁴² Es wurde das in Tab. 4.4 dargestellte Pipettierschema verwendet. Die wässrige Lösung wurde anschließend mit 46 µl ABIL WE, 132 µl Mineralöl und 438 µl Tegosoft DEC überschichtet und durch fünfminütiges Schütteln bei höchster Stufe homogenisiert.

Tab. 4.4: Zusammensetzung des BEAMing-Ansatzes.

Komponente	Volumen [µl]
10x Dream Taq Polymerase PCR-Puffer	15
Dream Taq Polymerase (0,5 U)	9
dNTPs (10 µM)	6
Vorwärtsprimer (100 µM)	4
Rückwärtsprimer (2,5 µM)	1
Rückwärtsprimer-Magnetpartikel	6
Reinstwasser	69
Templat	40
	150

Die Emulsion wurde in 80 µl-Aliquote aufgeteilt und einer PCR von 20-30 Zyklen nach dem in Tab. 4.3 dargestellten Temperaturprogramm unterzogen. Nach der PCR wurden die Ansätze vereint und die Emulsion durch Zugabe von -21 °C-kaltem Isopropanol gebrochen. Nach einer dreiminütigen Zentrifugation bei 12000 rpm wurde der Überstand abgenommen, die Magnetpartikel in 80 µl Reinstwasser resuspendiert und die ssDNA bei 95°C für 10 min eluiert. Der Überstand wurde im Magnetrack abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

4.2.3 Real-time PCR (qPCR)

Die qPCR wurde zum einen zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten und Selektivität der Aptamere der zweiten SELEX (4.6.3) und zum anderen zur Kontrolle der Diversitätsabnahme beider Selektionen eingesetzt. Bei diesem sogenannten Diversitätsassay wird die Korrelation von Rückschmelztemperatur nach vorangegangener PCR und Diversität eines Aptamerpools

ausgenutzt. Der in der qPCR eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, der mit doppelsträngiger DNA (*double stranded* DNA, dsDNA) interkaliert, wird beim Aufschmelzen frei und lässt so anhand eines Schmelzkurvenpeaks Rückschlüsse auf die Rückschmelztemperatur zu.¹⁴³ Es ist davon auszugehen, dass bei höherer Diversität weniger intermolekulare Wechselwirkungen vorliegen, weshalb die Schmelztemperatur niedriger ist. Allerdings ist zu beachten, dass neben der Diversität auch der Guanin-Cytosin(GC)-Gehalt einen Einfluss auf die Schmelztemperatur hat.

Der Diversitätsassay wurde für ausgewählte Selektionsrunden nach dem in Tab. 4.5 und Tab. 4.6 beschriebenen Pipettierschema und Temperaturprogramm durchgeführt.

Tab. 4.5: Zusammensetzung des qPCR-Ansatzes.

Komponente	Volumen [µl]
10x Dream Taq Polymerase PCR-Puffer	2,5
Dream Taq Polymerase (0,5U)	0,5
dNTPs (10 µM)	2
Vorwärtsprimer (100 µM)	0,15
Rückwärtsprimer (100 µM)	0,15
SYBR Green I (1:1250)	1
Reinstwasser	12,7
Templat	1
	20

Tab. 4.6: Temperaturprogramm der qPCR.

Schritt	Dauer [min]	Temperatur [°C]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	5	95	
Denaturierung	0,5	95	
Annealing	0,5	56	15-25
Elongation	0,5	72	
Finale Elongation	5	72	
Denaturierung	2	95	
Rehybridisierung	180	76	
Schmelzkurve	0,5°C/0,07 min	55-90	
Kühlung	∞	4	

4.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

In einem Gelschlitten wurde ein 3%iges Agarosegel (w/v) gegossen. Dafür wurden 1,5 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Die PCR-Produkte wurden mit 2 µl DNA-Probenpuffer versetzt und 10 µl pro Tasche aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 170 V mit TAE als Laufpuffer durchgeführt.

4.2.5 Ethidiumbromidfärbung

Die DNA-enhaltenden Agarosegele wurden für 0,5-5 min in TAE-Puffer mit 0,001 % (v/v) Ethidiumbromid gefärbt und anschließend für einige Minuten entfärbt. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe einer Fotodokumentationseinheit bei einer Wellenlänge von 306 nm.

4.2.6 Präparative Aufreinigung von DNA

Es wurde eine Gelelektrophorese wie oben (4.2.4) beschrieben durchgeführt, allerdings wurden statt 10 µl Probe 150 µl Probe in eine große Tasche aufgetragen. Die entsprechende DNA-Bande wurde nach Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit einem Gelextraktions- und Aufreinigungskit (peqGold Gel Extraction Kit) nach Herstellerangaben extrahiert und in 30 µl Reinstwasser eluiert.

4.2.7 Bestimmung der Konzentration von ssDNA mittels UV-Absorption

Zur Konzentrationsbestimmung von ssDNA wurde zum einen der NanoDrop ND-1000 genutzt. Hierzu wurde 1 µl Probe auf den Sensor pipettiert und die Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

4.2.8 Bestimmung der Konzentration von ssDNA mittels Quantus Fluorometer

Alternativ wurde ein Quantus Fluorometer in Verbindung mit dem Fluoreszenzfarbstoff OliGreen verwendet. Dabei wurde das OliGreen 1:200 (v/v) mit TE Puffer verdünnt und es wurden 100 µl Farbstoff-Lösung, 99 µl TE Puffer und 1 µl Probe in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß vereint, 5 min unter Lichtausschluss inkubiert und bei 480 nm (Extinktion) bis 550 nm (Emission) gemessen. Da der Farbstoff OliGreen spezifisch an ssDNA bindet wird, im Gegensatz zur photometrischen Bestimmung mit dem NanoDrop, mit dem Quantus Fluorometer nur ssDNA detektiert. Diese kann auch gekoppelt vorliegen.

4.2.9 Klonierung, Kolonie-PCR, Plasmidisolierung

Nach zwölf (erste SELEX) beziehungsweise elf (zweite SELEX) Selektionsrunden wurden die Aptamerpools für die Sequenzierung durch Klonierung vereinzelt. Dazu wurden die PCR-amplifizierten Pools zunächst über eine präparative Agarose-Gelelektrophorese (4.2.6) aufgereinigt und anschließend mittels eines TOPO TA Cloning Kits nach Herstellerangaben

kloniert. Es wurden zu 5 µl PCR-Produkt 1 µl sterile Salzlösung und 1 µl des TOPO 4-Vektors gegeben, 30 min bei 4 °C und 5 min bei RT inkubiert und anschließend zu 50 µl chemisch kompetenten *E. coli* XL1 Zellen gegeben. Nach zwanzigminütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock (42 °C, 30 s) mit anschließender Eiskühlung. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die transformierten Zellen 2 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Es wurden 10, 50 und 90 µl des angereicherten SOC-Mediums auf LB-Agar-Platten mit 170 mg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Vereinzelte Kolonien wurden ausgewählt und mittels Kolonie-PCR durchgemustert. Dazu wurde in einen PCR-Ansatz nach Tab. 4.2 mit einem sterilen Zahnstocher etwas Zellmaterial übertragen und eine PCR (22 Zyklen, Temperaturprogramm entsprechend Tab. 4.3) mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese wie in 4.2.4 und 4.2.5 beschrieben durchgeführt. Ein PCR-Produkt auf Höhe von 76 Basenpaaren wurde als positiv bewertet. Die Kolonie wurde in ein 50 ml Reaktionsröhrchen mit etwa 35 ml LB-Medium mit 100 mg/ml Ampicillin übertragen und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (20 min, 1500g, 4 °C), mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert (3 min, 7000g, 4 °C). Die Aptamer-enthaltenden Plasmide wurden mit einem E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit nach Herstellerangaben isoliert.

4.2.10 Sequenzierung

Zur Sequenzierung nach Sanger erfolgte durch die Firma GATC (Konstanz, Deutschland; jetzt Eurofins Genomics, Brüssel, Belgien) unter Verwendung des plasmidspezifischen M13-Forwardprimers. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Software *GENtle* ausgewertet.

4.2.11 Modifizierung von DNA

Die Modifizierung der ssDNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 und Biotin erfolgte durch das in 4.2.2 beschriebene BEAMing, wobei als Templat 5 µl einer 100 µM Aptamer-Lösung dienten und anstatt eines unmodifizierten Vorwärtsprimers jeweils ein Alexa488- oder Biotin-modifizierter Vorwärtsprimers verwendet wurde.

4.3 *In vitro* Selektionen

Es wurden zwei, sich in der Durchführung unterscheidende, *in vitro* Selektionen durchgeführt.

4.3.1 Kopplung der Zielproteine an Magnetpartikel

Zunächst wurden 10 mg SiMAG Carboxyl-Magnetpartikel zweimal mit 1 ml MES-Puffer gewaschen und durch Zugabe von 250 µl EDC-MES-Puffer aktiviert. Die Kopplung erfolgte unter Zugabe von 75 µg aufgereinigtem Protein und Inkubation für 2 h unter leichtem Schütteln bei RT. Nach drei erneuten Waschschritten mit 1 ml PBS wurden die Magnetpartikel in 1 ml Blockierungspuffer I aufgenommen, sodass die finale Konzentration 10 mg/ml betrug. Alternativ wurden 10 mg Dynabeads His-Tag Isolation and Pulldown-Magnetpartikel (Kobalt-/Co²⁺-Magnetpartikel) zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Diesen wurden 350 µg aufgereinigtes Protein zugegeben und 2 h unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Nach drei Waschschritten mit je 1 ml PBS wurden die Magnetpartikel in 1 ml Blockierungspuffer I aufgenommen, sodass die finale Konzentration ebenfalls 10 mg/ml betrug. Magnetpartikel für die Gegen-SELEX wurden jeweils in gleicher Weise, allerdings ohne Zugabe von Protein, hergestellt.

4.3.2 Überprüfung der Kopplung

Um die Kopplung zu überprüfen, wurde ein modifizierter ELISA durchgeführt. Dafür wurden 10 µl der Magnetpartikel für 2 h mit 1 ml Anti-Cholera-toxin-Antikörper (Kaninchen, 1:2000 (v/v) in PBS) oder Anti-Shigatoxin 1-Antikörper (Kaninchen, 1:2000, v/v) unter Schütteln inkubiert. Nach drei Waschschritten mit je 1 ml PBS wurde für 1 h mit 1 ml HRP-gekoppeltem Sekundär-Antikörper (1:20000 (v/v) in PBS) unter Schütteln inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS erfolgte eine Immunfärbung durch Zugabe von 1 ml Färbelösung. Die Farbreaktion wurde nach 5-10 min durch Zugabe von 0,5 ml 2 M Schwefelsäure gestoppt, 100 µl in eine 96-well-Platte überführt und die Extinktion bei 450 nm in Dreifachbestimmung am Mikroplatten-Reader gemessen.

4.3.3 Kopplung der Rückwärtsprimer an Magnetpartikel

Für die ssDNA-Amplifikation mittels BEAMing wurden Amin-C12-modifizierte Rückwärtsprimer an SiMAG Carboxyl-Magnetpartikel gekoppelt. Dafür wurde analog zu 4.3.1

vorgegangen. Allerdings wurde anstatt des Zielproteins 25 µg Primer auf 10 mg Magnetpartikel gegeben. Die Magnetpartikel wurden mit Blockierungspuffer II blockiert.

4.3.4 Erste *in vitro* Selektion

Die erste *in vitro* Selektion wurde mit CT-B als Zielmolekül als unmodifizierte *Just in Time*-Selection nach Hünninger *et al.* (2014) in zwölf Runden durchgeführt.¹⁴² Als Selektionspuffer wurde PBS (pH 7,4) gewählt. CT-B wurde für die Selektion auf SiMAG Carboxyl-Magnetpartikeln (4.3.1) immobilisiert.

Zu Beginn der Selektion (Runde 1) wurden 20 µl einer Aptamerbibliothek mit der folgenden Sequenz 5'-CATCCGTCACACCTGCTC-(N)₄₀-GGTGTTGGCTCCCGTATC-3' im Thermocycler für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Diese wurde laut dem Pipettierschema aus Tab. 7.8 (Anhang 7.7) mit PBS verdünnt. Inkubations- und Waschschrte erfolgten während des FISHings automatisch mit Hilfe des KingFisher Duo. Die Amplifikation erfolgte im Anschluss wie oben beschrieben (BEAMing, 4.2.2). Der Erfolg jeder Selektionsrunde wurde mittels klassischer PCR überprüft.

Für jede weitere Selektionsrunde wurden jeweils 50 µl des Eluats der vorangegangenen Runde wie oben beschrieben im Thermocycler erhitzt, abgekühlt und für die nächste Runde eingesetzt. Die zugehörigen Pipettierschemata und das FISHing-Programm sind dem Anhang 7.7 und 7.8 zu entnehmen. Eine Übersicht über die FISHing-Parameter ist in der folgenden Tab. 4.7 dargestellt.

Tab. 4.7: Übersicht über das FISHing der 1. SELEX.

SELEX-Runde	Input ssDNA [pmol]	Target-/Gegen-Magnetpartikel-Volumina [µl]	Inkubationszeit [min]	Anzahl Waschschrte	Wasch-Volumen [µl]	Gegen-SELEX?
1	2000	16/16	40	1	200	ja
2	840	16/16	40	1	200	ja
3	1027	16/16	40	1	200	ja
4	657	16/16	40	1	200	ja
5	562	16/-	40	2	200	nein
6	524	16/-	40	2	200	nein
7	493	16/-	35	2	200	nein
8	1259	16/-	30	2	200	nein
9	1209	16/-	25	3	200	nein
10	953	16/-	20	3	200	nein
11	658	16/-	15	3	400	nein
12	1787	16/-	15	3	600	nein

4.3.5 Zweite *in vitro* Selektion

Bei der zweiten Selektion (gegen Shigatoxin 1) wurde ein modifiziertes *Just in Time-Selection*-Protokoll verwendet. Die Selektion wurde in elf Runden durchgeführt, wobei für Runde 9-11 eine kompetitive Elution statt der Hitzeelution eingesetzt wurde, was der Selektivitätssteigerung dienen sollte. Anstatt automatisch mit dem magnetischen Separator (KingFisher Duo) wurden Inkubation und Waschschrte manuell durchgeführt. Wie oben erfolgte ein Erhitzen auf 95 °C und schnelles Abkühlen auf 4 °C vor jeder Runde. Es wurden ST1-B-modifizierte Co²⁺-Magnetpartikel für die Immobilisierung des Targets verwendet. Das manuelle FISHing erfolgte in DNA *low binding* 1,5 ml-Reaktionsgefäßen und nach dem in Tab. 4.8 aufgeführten Schema. Die verwendete Aptamerbibliothek hatte die folgende Sequenz: 5'-ATCCAGAGTGACGCAGCA-(N)₄₀-TGGACACGGTGGCTTAGT-3'.

Tab. 4.8: Übersicht über das FISHing der 2. SELEX.

SELEX-Runde	Input ssDNA [pmol]	Target-/Gegen-Magnetpartikel-Volumina [μ l]	Inkubationszeit [min]	Anzahl Waschschrte	Wasch-Volumen [μ l]	Gegen-SELEX?	Elution
1	2000	16/16	40	1	200	ja	Hitze
2	264	16/16	40	1	200	ja	Hitze
3	519	16/16	30	2	200	ja	Hitze
4	483	12	30	3	200	nein	Hitze
5	634	10	30	3	400	ja	Hitze
6	509	10	30	4	500	nein	Hitze
7	682	8	30	4	600	ja	Hitze
8	542	6	30	4	700	nein	Hitze
9	584	6	30	4	800	nein	kompetitiv
10	976	6	30	4	1000	nein	kompetitiv
11	256	6	30	4	1000	nein	kompetitiv

Die Amplifikation erfolgte mittels BEAMing wie oben beschrieben (4.2.2). Der Erfolg jeder Selektionsrunde wurde mittels klassischer PCR oder qPCR überprüft. Auch hier wurden für jede weitere Selektionsrunde jeweils 50 μ l des Eluats der vorangegangenen Runde eingesetzt. Selektionsrunden, die nicht nach 25 PCR Zyklen auf dem Agarosegel visuell sichtbar waren, wurden wiederholt.

4.4 Strukturvorhersage und Motivanalyse

Anhand der Basenabfolgen der Aptamere wurden *in silico* Vorhersagen der Strukturen vorgenommen sowie das Auftreten von Sequenzmotiven überprüft.

4.4.1 *Mfold*

Die Vorhersage der Sekundärstrukturen der selektierten Aptamere erfolgte mit Hilfe des DNA *folding form* des *mfold* Webservers.¹⁴⁴ Hierbei werden wahrscheinliche Sekundärstrukturen unter Berücksichtigung der Pufferbedingungen, hier eine Na⁺-Konzentration von 137 mM, und der Faltungstemperatur, hier 20 °C, simuliert. Diese Vorhersage ergibt sich aus der höchsten errechneten thermodynamischen Stabilität der Strukturen.

4.4.2 *MEME Suite*

MEME Suite ist ein Analyse-Programm zur Untersuchung von Basenabfolgemotiven, welches eine Beurteilung des Verwandtschaftsgrades einzelner Aptamere zulässt.¹⁴⁵ Es wurden folgende Einstellungen gewählt: Motivlänge 4-50 Basen, max. Motivanzahl 5.

4.4.3 *QGRS Mapper*

Guanin-reiche einzelsträngige Nukleinsäuren können sogenannte G-Quadruplex-Strukturen ausbilden. Dabei handelt es sich besonders stabile parallele oder anti-parallele quadratische Anordnungen.¹⁴⁶ Um anhand der Basensequenz G-Quadruplexe und deren Stabilität vorherzusagen wurde das Online-Tool *QGRS Mapper* verwendet.¹⁴⁷

4.5 Allgemeine biophysikalische Methoden

4.5.1 Dynamische Lichtstreuung

Dynamische Lichtstreuung (DLS) wurde zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius (R_h) von CT-B und ST1-B verwendet, um die Größe und Reinheit der Proteine abzuschätzen. Für die Messung wurden 15 µl Probe mit einer Konzentration von 1 mg/ml in Tris-Puffer mit

einem 120 mW Rotlichtlaser bei einer Wellenlänge von 660 nm im 90°-Winkel bestrahlt. Es wurden jeweils 30 Messungen von 20 s Dauer durchgeführt.

Für die Bestimmung der hydrodynamischen Radien der Aptamer-Protein-Komplexe wurden Protein und Aptamer im äquimolaren Verhältnis gemischt und 15 µl Probe mit einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS-Puffer analog gemessen. Die Durchführung der DLS-Messungen im Rahmen der Liposomencharakterisierung ist im Kapitel 4.9.5 beschrieben.

4.5.2 Circular dichroismus-Spektroskopie

Um die mittels des *QGRS Mapper Tools* vorhergesagten G-Quadruplex-Strukturen experimentell zu bestätigen, wurde CD-Spektroskopie durchgeführt. Dafür wurden die Aptamere in PBS auf eine Konzentration von 5 µM verdünnt und mit einem CD-Spektrometer in Zehnfachbestimmung Elliptizitätsspektren zwischen einer Wellenlänge von 210 und 300 nm aufgenommen. Nach Abzug des Puffers (PBS) wurden die Daten mittels *OriginPro 8G* Software geplottet.

4.6 Charakterisierung von Aptamer-Protein-Interaktionen

Die Bestimmung der Affinität der Aptamere gegenüber ihren Zielproteinen erfolgte mittels Affinitätschromatographie und Microscale Thermophoresis (MST). Für die Aptamere aus der ersten SELEX wurden für die Affinitätschromatographie Alexa488-markierte Aptamere verwendet, für die Aptamere der zweiten SELEX wurde die relative Quantifizierung über eine qPCR durchgeführt. Durch Auftragen der Aptamerkonzentration gegen die Fluoreszenzintensität oder den C_q -Wert können die Dissoziationskonstanten bestimmt werden.

4.6.1 Fluoreszenzbasierte Affinitätschromatographie

Für die fluoreszenzbasierte Affinitätschromatographie wurden die Aptamere zunächst wie in Kapitel 4.2.11 beschrieben am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 markiert. Die markierten Aptamere wurden in PBS auf finale Konzentrationen von 20, 40, 80, 120 und 200 nM verdünnt. CT-B-modifizierte Magnetpartikel wurden mit PBS-Puffer gewaschen und jeweils 10 µl Magnetpartikel wurden für 30 min unter mildem Schütteln unter Lichtausschluss

in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen mit 90 µl jeder Verdünnung inkubiert. Die Magnetpartikel wurden anschließend mit PBS-Puffer gewaschen und in 100 µl Reinstwasser aufgenommen. Es wurden jeweils 90 µl in eine schwarze Mikrotiterplatte überführt und die Fluoreszenz gemessen (Extinktion 485 nm, Emission 525 nm). Jedes Experiment wurde im Triplikат durchgeführt. Die Daten wurden mit *OriginPro* 8G Software ausgewertet.

4.6.2 Microscale Thermophoresis

Zur Überprüfung des K_D -Wertes des Aptamers CT916 wurde dieser zusätzlich mittels MST bestimmt. Im ersten Versuch wurde CT-B nach Herstellerangaben mit dem Monolith NT His-Tag Labeling Kit RED-tris-NTA fluoreszenzmarkiert. Für den Bindungsassay wurden in die Reaktionsgefäße 2-15 10 µl PBS-Puffer gegeben. In Reaktionsgefäß 1 wurden 20 µl Aptamer CT916 (50 µM in PBS) vorgelegt. Es wurden 10 µl der Lösung aus Reaktionsgefäß 1 in Reaktionsgefäß 2 übertragen, mit der Pipette gemischt, in das nächste Reaktionsgefäß übertragen, gemischt, bis in jedem Reaktionsgefäß 10 µl seriell verdünntes Aptamer vorlagen. Zehn Mikroliter fluoreszenzmarkiertes CT-B (50 nM) wurden in jedes Reaktionsgefäß gegeben, mit der Pipette gemischt, in Premium-Kapillaren aufgenommen und bei einer MST Power von 40 % und LED Power von 40 % gemessen.

Im zweiten Versuch wurde das Aptamer am 5'-Ende mit FAM markiert. Für den Bindungsassay wurden 10 µl PBS in die Reaktionsgefäße 2-15 wie oben vorgelegt. In Reaktionsgefäß 1 wurden 20 µl CT-B (3,8 µM in PBS) gegeben. Es wurde wie oben eine serielle Verdünnung hergestellt. Anschließend wurden 10 µl 5'-FAM markiertes Aptamer (10 nM) in jedes Reaktionsgefäß gegeben, gemischt, in Standard-Kapillaren gesogen und bei einer MST Power von 40 % und LED Power von 80 % gemessen.

4.6.3 Affinitätschromatographie mit qPCR

Screening

Im Rahmen der Charakterisierung der Shigatoxin 1-Aptamere wurde zunächst mittels einer abgewandelten Affinitätschromatographie ein Screening durchgeführt. Dafür wurden die Aptamere auf finale Konzentrationen von 20 nM und 1 µM in PBS-Puffer verdünnt. Zehn Mikroliter ST1-B-Magnetpartikel wurden für 30 min unter Schütteln mit 90 µl Aptamerverdünnung inkubiert. Die Magnetpartikel wurden mit 1 ml PBS-T (0,05 %, v/v)

gewaschen und in 20 μl 200 mM Imidazol aufgenommen. Die ssDNA-Aptamere wurden bei 90 °C für 5 min eluiert und jeweils 5 μl wurden für eine qPCR nach Kapitel 4.2.3 als Templat eingesetzt und die C_q -Werte bestimmt.

Dissoziationskonstanten

Zur Bestimmung der K_D -Werte der Shigatoxin 1-Aptamere wurden die Aptamere mit PBS-Puffer auf finale Konzentrationen von 20, 60, 80, 120, 400 und 1000 nM verdünnt. Wie oben wurden 90 μl jeder Verdünnung mit 10 μl ST1-B-Magnetpartikel für 30 min unter Schütteln inkubiert. Die Magnetpartikel wurden mit 1 ml PBS-T (0,05 %, v/v) gewaschen und in 20 μl 200 nM Imidazol aufgenommen. Nach der Elution der Aptamere bei 90 °C für 5 min wurden jeweils 5 μl für die qPCR eingesetzt. Um die K_D -Werte zu bestimmen, wurde ΔC_q berechnet, indem der ermittelte C_q -Wert vom Referenz- C_q -Wert bei einer Aptamerkonzentration von 0,01 nM subtrahiert wurde. Die Daten wurden mit *OriginPro* 8G Software ausgewertet.

Selektivität

SiMAG Carboxyl-Magnetpartikel wurden nach Kapitel 4.3.1 mit ST1-B, CT-B, Protein A, BSA und Streptavidin modifiziert. Für die Selektivitätsmessungen wurden je 10 μl modifizierte Magnetpartikel mit jeweils 90 μl Aptamer-Lösung (50 nM in PBS) 30 min unter Schütteln bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml PBS-T (0,05 %, v/v) wurden die Magnetpartikel in 20 μl Reinstwasser aufgenommen und die Aptamere wurden für 10 min bei 95 °C im Wasserbad eluiert. Die Quantifizierung der eluierten Aptamere erfolgte wie oben. Als Referenz diente das jeweilige Aptamer bei einer Konzentration von 0,01 nM.

4.6.4 Direkter Enzyme-linked Aptamer Assay

Um die Spezifität der Aptamere aus der ersten SELEX zu überprüfen wurde ein direkter ELAA durchgeführt. Dazu wurden 10 μg CT-B, ST1-B, Protein A und BSA in 100 μl Carbonat-Puffer über Nacht auf einer ELISA-Mikrotiterplatte immobilisiert. Die Mikrotiterplatte wurde zweimal für 5 min mit je 250 μl PBS-T (0,05 %, v/v) gewaschen und durch einstündige Inkubation mit 200 μl 2 % Ethanolamin (w/v) in PBS unter sanftem Schütteln bei RT blockiert. Nach zwei erneuten fünfminütigen Waschschrritten mit PBS-T wurden 100 μl biotinyliertes Aptamer (5 μM) zugegeben und 1 h unter sanftem Schütteln bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten mit PBS-T wurden 100 μl Streptavidin-HRP

(1:10000 (v/v) in PBS) zugegeben und für eine Stunde unter sanftem Schütteln bei RT inkubiert. Nach drei erneuten Waschschritten mit PBS-T erfolgte die Färbung und Messung der Extinktion analog zum ELISA (4.1.10).

4.7 Affinitätsanreicherung

Die bei der Expression von Cholera- und Shigatoxin 1 B nach dem Abzentrifugieren übrigen Zellbestandteile (Zellpellets) enthalten häufig noch zum Teil unvollständig gefaltetes Protein. Dieses kann mittels Affinitätsanreicherung gewonnen werden.

4.7.1 Kopplung der Aptamere an Magnetpartikel

Amin-modifizierte Aptamere wurden analog zu den Zielproteinen (siehe 4.3.1) an SiMAG Carboxyl-Magnetpartikel gekoppelt. Statt des Zielproteins wurde 25 µg Amin-Aptamer auf 10 mg Magnetpartikel zugegeben.

Für die Blockierung wurden Blockierungspuffer I (0,1 % Ethanolamin (w/v)) oder II (0,1 % BSA (w/v)) verwendet. Die Kopplung wurde über die Bestimmung der ssDNA-Konzentration nach Kapitel 4.2.8 überprüft. Biotin-modifizierte Aptamere wurden an MyOne C1 Streptavidin-beschichtete Magnetpartikel gekoppelt indem 25 µg Biotin-modifiziertes Aptamer für 30 min mit 10 mg gewaschenen Co^{2+} -Magnetpartikeln in TE-Puffer mit 300 mM NaCl bei RT inkubiert wurde. Die modifizierten Magnetpartikel wurden dreimal mit je 1 ml PBS-T (0,01 % v/v) mit 0,5 % BSA (w/v) gewaschen und in 100 µl desselben Puffers aufgenommen.

4.7.2 Affinitätsanreicherung aus Zellpellets

Für die Affinitätsanreicherung wurden jeweils ca. 2 ml Zellpellets in 5 ml PBS-Puffer resuspendiert und mit einem Ultraschall-Homogenisator aufgeschlossen. Zu 150 µl Suspension wurden 150 µl PBS und 30 µl gewaschene Aptamer-Magnetpartikel oder Co^{2+} -Magnetpartikel in *protein low binding*-Reaktionsgefäße gegeben und 30 min unter Schütteln bei RT inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Magnetpartikel wurden viermal mit 1 ml PBS-T (0,5 %, v/v) gewaschen. Nach einem weiteren Waschschriff mit 1 ml PBS

wurden die Magnetpartikel in 50 µl Reinstwasser aufgenommen und 10 min bei 95 °C im Wasserbad erhitzt. Der heiße Überstand wurde im Magnetrack abgenommen und mit 25 µl Probenpuffer versetzt. Jeweils 20 µl der 1:1 (v/v) mit PBS verdünnten Zellpellets und aller Überstände nach Inkubation und Waschschrinen wurden mit jeweils 10 µl Probenpuffer versetzt. Alle Proben wurden für 3 min im Wasserbad bei 95 °C erhitzt.

Polyacrylamidgele wurden wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben hergestellt. Es wurden 7 µl Pierce Unstained Protein MW Marker, 2 µl 1:1 (v/v) mit PBS verdünnte Zellpellets, 10 µl Eluat mit angereichertem Protein, 2 µl des Inkubationsüberstands sowie jeweils 10 µl der Waschfraktionen in die Taschen des Gels gegeben. Die Auftrennung erfolgte bei max. 14 W, 220 V und 35 mA pro Gel. Das Gel wurde über Nacht mit Coomassie-Färbelösung wie in Kapitel 4.1.5 beschrieben gefärbt.

4.8 Enzyme-linked Aptamer Assay

4.8.1 Magnetpartikel Sandwich Enzyme-linked Aptamer Assay zum Nachweis von Cholera toxin

Der Magnetpartikel ELAA ist ein auf dem ELISA basierender Assay, bei dem ein Fängeraptamer auf Magnetpartikeln immobilisiert ist. Zur Optimierung wurden verschiedene Magnetpartikel (SiMAG Carboxyl und Dynabeads MyOne C1) und Blockierungspuffer (I (Ethanolamin) und II (BSA)) verglichen. Als Detektor diente Anti-Cholera toxin-Antikörper.

Dot Blot

Um zu überprüfen, ob Cholera toxin-Aptamere und Cholera toxin-Antikörper in der Lage sind, zeitgleich an Cholera toxin zu binden, wurde ein Dot Blot durchgeführt. Dafür wurden 5 µl biotinyliertes Aptamer CT910, CT916, CT928 und CT931 mit 5 µl NeutrAvidin (5 mg/ml) für 20 min inkubiert. Es wurde jeweils im Triplikat 2 µl Aptamer-NeutrAvidin-Lösung mit einer Mikroliterpipette auf eine PVDF-Membran gespottet und die Membran bei RT bis zu 1 h getrocknet. Im Anschluss wurde die Membran mit 20 ml PBS mit 3 % BSA (w/v) blockiert. Nach drei Waschschrinen mit PBS für jeweils 5 min wurde die Membran für 1 h mit 20 ml

CT-B-Lösung (1 µg/ml in PBS) inkubiert. Nach drei weiteren fünfminütigen Waschschritten mit PBS wurde die Membran mit Anti-Choleratoxin-Antikörper inkubiert (1:2000 (v/v) in PBS). Nach wiederum drei weiteren Waschschritten wurde für 1 h mit HRP-Sekundärantikörper inkubiert (1:20000 (v/v) in PBS). Die Membran wurde anschließend erneut drei Mal mit PBS gewaschen und analog zu 4.1.6 gefärbt.

Magnetpartikel ELAA

Optimierungsparameter

Im Rahmen der Optimierung wurden

- (1) Anzahl der Waschschriffe (1, 2 oder 3)
- (2) Verdünnung des Primärantikörpers (1:2000 oder 1:3000, v/v)
- (3) Verdünnung des Sekundärantikörpers (1:20000 oder 1:30000, v/v)
- (4) Reaktionsgefäßtyp (Standard- oder *protein low binding*)

variiert. Alle anderen Parameter entsprachen den im folgenden Abschnitt beschriebenen.

Optimierter Magnetpartikel ELAA

Für jedes Experiment wurde CT-B in PBS-Puffer oder Leitungswasser auf eine Endkonzentration von 0,1 ng/ml bis 1000 ng/ml in *protein low binding* Reaktionsgefäßen verdünnt. Leitungswasser wurde mit 10-fach konzentriertem PBS im Verhältnis 10:1 (v/v) gemischt. Aptamer-modifizierte Magnetpartikel wurden gewaschen und jeweils 10 µl wurden mit jeder Verdünnung für 30 min unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Die Magnetpartikel wurden zweimal mit 1 ml PBS-T (0,05 %, v/v) gewaschen. Ein Milliliter Anti-Choleratoxin-Antikörper (1:3000 (v/v) in PBS) wurde in jedes Reaktionsgefäß gegeben und erneut 1 h unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten mit PBS-T (0,05 %, v/v) wurde 1 ml sekundärer HRP-konjugierter Antikörper (1:30000 (v/v) in PBS) zugegeben und 1 h unter Schütteln bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS-T wurde die Farbe durch Zugabe von 1 ml Färbelösung (analog zu 4.1.10) entwickelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml 2 M H₂SO₄ nach 5 min gestoppt. Achtzig Mikroliter jeder Reaktion wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die

Extinktion bei 450 nm gemessen. Jedes Experiment wurde im Triplikат durchgeführt und jedes Replikат wurde dreimal gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels *OriginPro* 8G. Die Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) wurde laut DIN 32645 als Hintergrundsignal plus drei Standardabweichungen (3σ) definiert.¹⁴⁸ Die Bestimmungsgrenze (*limit of quantification*, LOQ) wurde laut DIN 32645 als Hintergrundsignal plus zehn Standardabweichungen (10σ) definiert.¹⁴⁸

Dualer Aptamer Enzyme-linked Aptamer Assay

Weiterhin wurde versucht, den Reporter-Antikörper durch ein Aptamer zu ersetzen. Dafür wurden 10 µl CT916-modifizierte Magnetpartikel mit 1 ml CT-B in PBS (0, 100 und 1000 ng/ml) im Triplikат für 30 min inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS-T (0,01 %, v/v) gewaschen, 100 µl einer 5 µM Lösung biotinyliertes CT916, CT910, CT928 oder CT931 zugegeben und weitere 30 min bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrіten mit PBS-T wurden 100 µl Streptavidin-HRP (1:5000 (v/v) in PBS) zugegeben und nach einer einstündigen Inkubation bei RT erneut dreimal mit PBS-T gewaschen. Die Färbung erfolgte wie oben beschrieben. Anschließend wurde die Extinktion bei 450 nm gemessen.

4.8.2 Magnetpartikel Sandwich Enzyme-linked Aptamer Assay zum Nachweis von Shigatoxin 1

Für den Nachweis von Shigatoxin 1 durch einen Magnetpartikel ELAA wurden ST1076-modifizierte Magnetpartikel (SiMAG Carboxyl) als Fänger und Taubeneiweiß als Reporter verwendet.

Magnetpartikel ELAA

Optimierungsparameter

Im Rahmen der Optimierung wurden

- (1) Anzahl der Waschschrіten nach Inkubation mit PEW (3 oder 4)
- (2) Konzentrationen des biotinylierten PEW (140 ng/ml - 14 µg/ml),
- (3) Konzentrationen des Tween 20 (0,05 % oder 0,1 %, v/v)

(4) und Konzentrationen des Streptavidin-HRP (1:10000 oder 1:100000, v/v)

variiert. Alle anderen Parameter entsprachen den im folgenden Abschnitt beschriebenen.

Optimierter Magnetpartikel ELAA

Es wurden Verdünnungen von ST1-B von 1 µg/ml bis 75 µg/ml in PBS-Puffer hergestellt. Zu jeweils 1 ml ST1-B-Lösung wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 10 µl ST1076-Magnetpartikel gegeben und für 30 min unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Die Magnetpartikel wurden mit 1 ml PBS-T (0,1 %, v/v) gewaschen. Anschließend wurde 1 ml biotinyliertes PEW (1,4 µg/ml) in PBS-T (0,1 %, v/v) zugegeben und 1 h unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Die Magnetpartikel wurden dreimal mit PBS-T (0,1 %, v/v) gewaschen und es wurde 1 ml Streptavidin-HRP (1:10000 (v/v) in PBS) zugegeben. Nach einstündiger Inkubation unter sanftem Schütteln wurde erneut dreimal mit PBS-T (0,1 %, v/v) gewaschen. Um falsch-positive Ergebnisse durch an die Reaktionsgefäßwand adheriertes Taubeneiweiß oder Streptavidin-HRP auszuschließen, wurden die Magnetpartikel anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Färbelösung (analog zu 4.1.10) gestartet und nach 5 min durch Zugabe von 0,5 ml 2 M H₂SO₄ gestoppt. Jeweils 80 µl wurden im Triplikat in eine Mikrotiterplatte überführt und die Extinktion wurde bei 450 nm gemessen. Jedes Experiment erfolgte im Triplikat. Die Daten wurden mittels *OriginPro* 8G ausgewertet. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden als Hintergrundsignal plus drei beziehungsweise zehn Standardabweichungen definiert.

Magnetpartikel ELAA im Lebensmittel

Um eine realitätsnahe Anwendung zu testen, wurde der optimierte Assay zum Nachweis von ST1-B in damit dotierter 0,3%iger H-Milch, 1,5%iger H-Milch und dotiertem Hackfleisch durchgeführt. Je 1 ml Milch wurde mit ST1-B auf Konzentrationen von 0,1 µg/ml - 75 µg/ml versetzt. Um eine möglichst gute Aptamerbindung zu ermöglichen, wurden 0,5 ml 2-fach konzentriertes PBS (v/v) zugegeben und der Test nach Zugabe von 15 µl ST1076-Magnetpartikeln wie oben beschrieben durchgeführt. Für den Nachweis in Hackfleisch wurden ca. 33 g Rinderhackfleisch in 65 ml PBS manuell in einem Zipperbeutel homogenisiert. Um große Fettstücke zu entfernen wurde die Suspension 2 min bei 3100g

zentrifugiert. Der Überstand wurde analog zum Milchversuch mit ST1-B versetzt und der Versuch durchgeführt.

4.9 Lateral Flow Assay

4.9.1 AuNP Synthese

Als farbgebende Partikel wurden zunächst Aptamer-gekoppelte AuNPs verwendet. Die AuNPs wurden nach der von Schulz *et al.* (2013) beschriebenen Methode nach Turkevich synthetisiert.^{149,150} Dafür wurden 800 ml einer wässrigen Lösung aus Natriumcitrat (2,35 mM), Zitronensäure (684 μ M) und EDTA (32,5 μ M) und 200 ml einer wässrigen Tetrachlorgoldsäurelösung (937,5 μ M) hergestellt und bis zum Sieden erhitzt. Die Lösungen wurden unter intensivem Rühren gemischt, wodurch eine verdünnte, rubinrote AuNP-Lösung entstand. Die AuNP-Lösung wurde abgekühlt und bis zum Gebrauch bei RT unter Lichtausschluss gelagert.

4.9.2 Charakterisierung der AuNPs

Die fertigen AuNPs wurden mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und UV-Vis-Spektroskopie (UV/Vis) charakterisiert. Für die Größenabschätzung mittels TEM wurden die unmodifizierten AuNPs mit α -Methoxypoly-(Ethylenglycol)- ω -(11-Mercaptoundecanoat) (PEGMUA) funktionalisiert.¹⁴⁹ Dafür wurden 50 μ l wässrige PEGMUA-Lösung zu 500 μ l AuNP-Lösung gegeben, gemischt und bei 20000g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch die gleiche Menge Reinstwasser ersetzt. Ein Volumen von 10 μ l AuNPs wurde auf ein Kohlenstoff-ummanteltes Kupfergitter getropft, welches auf einem Objektträger platziert und für 24 h bei RT getrocknet wurde. Das Gitter wurde mittels TEM bei 100 kV fotografiert. Zur Bestimmung der Partikeldurchmesser wurde die Software *ImageJ* genutzt. Dafür wurden die automatisch ermittelten Durchmesser von mindestens 1000 Partikeln gemittelt und die Standardabweichung berechnet. Die Partikelgröße wurde genutzt, um mittels UV/Vis die AuNP-Konzentration zu bestimmen. Dafür wurde die Extinktion bei 450 nm in einer 1 ml gemessen und in die folgende Gleichung nach Haiss *et al.* (2007) eingesetzt.¹⁵¹

$$N = \frac{A_{450} \cdot 10^{14}}{d^2 \left(-0,295 + 1,36e^{-\left(\frac{d-96,8}{78,2}\right)^2} \right)} \quad (1)$$

Dabei steht A_{450} für die Extinktion bei 450 nm, d für den Partikeldurchmesser in nm und N für die Partikeldichte.

4.9.3 Kopplung der Aptamere an AuNPs

Für die Kopplung der Aptamere an citratstabilisierte AuNPs wird üblicherweise die starke Affinität reduzierter Thiolgruppen zur AuNP-Oberfläche genutzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Kopplungsmethoden etabliert.

Für Methode 1 wurden 50 μ l Thiol-C6-CT916 (100 μ M) mit 25 μ l frisch angesetzter 10 mM TCEP-Lösung und 25 μ l 500 mM Acetatpuffer (pH 5,2) unter mildem Schütteln für 1 h bei RT reduziert. Fünfzig Milliliter AuNPs (~2 nM) wurden hinzugegeben und über Nacht auf dem Rollschüttler inkubiert. Anschließend wurden 25 μ l Tris-Acetat-Puffer (pH 8,2) hinzugegeben. Da die Oberflächenbeladung nach der ersten Inkubation über Nacht noch nicht ausreichend war, erfolgte im Anschluss das *salt aging*. Beim *salt aging* wird schrittweise die NaCl-Konzentration erhöht, um sterische Hinderungen zwischen den negativ geladenen Aptameren zu mindern und somit die Belegungsichte zu erhöhen.¹⁵² Hierfür wurden alle 20 min 500 μ l 5 M NaCl zu den AuNPs gegeben und die Lösung ca. 10 s ins Ultraschallbad gehalten, bis eine finale NaCl-Konzentration von 0,6 M erreicht war. Nach einer erneuten Inkubation über Nacht bei RT wurden die modifizierten AuNPs in DNA *low binding*-Reaktionsgefäße aliquotiert und 20 min bei 21000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, 1 ml Reinstwasser hinzugefügt und erneut 20 min bei 21000g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt und der Überstand erneut abgenommen. Die konzentrierten AuNPs wurden vereint und bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert.

Für Methode 2 wurden 100 μ l Thiol-C6-CT916 (100 μ M) mit 40 μ l 10 mM TCEP-Lösung für 1 h reduziert und mit 50 ml AuNPs (~2nM) über Nacht bei RT inkubiert. Das *salt aging* erfolgte bis zu einer Gesamt-NaCl-Konzentration von 0,6 M durch Zugabe von 1 ml 2,5 M NaCl in Tris-Acetat (pH 8,2) in 14 Schritten. Es wurde erneut über Nacht bei RT inkubiert, die modifizierten AuNPs aliquotiert und 20 min bei 21000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, 1 ml 5 mM Tris-Acetat (pH 8,2) hinzugefügt und erneut 20 min bei

21000g zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die konzentrierten AuNPs wurden vereint und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Die Endvolumina jedes Ansatzes betragen jeweils ca. 1,5 ml (bei einer Konzentration von ~35 nM). Die Kopplung wurde durch Bestimmung der ssDNA-Konzentration nach Kapitel 4.2.8 mittels Quantus Fluorometer überprüft. Bei einer Konzentration über 1 ng/µl wurde die Kopplung als erfolgreich gewertet.

4.9.4 Herstellung der GM1-Liposomen

Als alternative farbgebende Partikel wurden Liposomen mit GM1 auf der Oberfläche synthetisiert. Für die Liposomensynthese wurde zunächst eine 150 mM Lösung des Fluoreszenzfarbstoffs Sulforhodamine B (SRB) in 0,02 M HEPES-Puffer angesetzt. Parallel wurden 15 mg 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DPPC), 7,5 mg 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (DPPG), 10 mg Cholesterol in 3 ml Chloroform und 0,5 ml Methanol in einem Rundkolben gelöst. Anschließend wurden 216,4 µl GM1-Lösung (1 mg/ml in 2:1 Chloroform:Methanol, v/v) hinzugegeben. Das molare Verhältnis betrug 40,3:4,2:40,9:1,3. Die Lösungen wurden im Wasserbad auf 45 °C erwärmt und 1 min sonifiziert. Zwei Milliliter SRB-Lösung wurden zu den Lipiden in den Rundkolben gegeben und 4 min sonifiziert, um eine Mikroemulsion zu erhalten. Anschließend wurde die Mikroemulsion mit einem Rotationsverdampfer bei 45 °C nach dem folgenden Programm eingeeengt, um eine Umordnung der Lipide zu Liposomen zu ermöglichen:

(1) 750 mbar - 5 min

(2) 600 mbar - 5 min

(3) 500 mbar - 5 min

(4) 400 mbar - 5 min

(5) 380 mbar - 20 min

Anschließend wurde die Lösung 1 min mittels Vortex-Schüttler geschüttelt, 2 ml SRB-Lösung zugegeben und erneut ca. 1 min geschüttelt. Danach wurde nach folgendem Programm weiter eingeeengt:

(6) 320 mbar - 20 min

(7) 280 mbar - 20 min

Um eine einheitliche Größenverteilung zu erhalten, erfolgte im Anschluss eine Extrusion mit einem Miniextruder. Dafür wurde die Liposomenlösung 21-fach mit einem 1 µm Membranfilter, anschließend 21-fach mit einem 0,4 µm Membranfilter filtriert. Der Extruder wurde dafür auf einer Heizplatte bei knapp über 50 °C gehalten.

Um die extrudierten Liposomen von überschüssigem Farbstoff zu trennen, wurde eine Größenausschlusschromatographie mit einer kleinen Sephadex-Säule und HSS-Puffer als Elutionspuffer durchgeführt. Die Fraktionen wurden in die hochkonzentrierte und die mittelkonzentrierte Liposomenfraktion aufgeteilt. Beide Fraktionen wurden anschließend dialysiert bis nach Pufferwechsel keine Pinkfärbung mehr zu sehen war (etwa 1,5 Tage). Nur die hochkonzentrierte Fraktion wurde weiter verwendet.

4.9.5 Charakterisierung der GM1-Liposomen

Die Liposomen wurden bezüglich ihrer Größenverteilung und ihres Zeta-Potentials untersucht. Für die DLS-Messung zur Bestimmung der Größenverteilung wurden in einer Küvette 10 µl Liposomen zu 990 µl HSS-Puffer gegeben und die Elliptizität im *backscattering mode* mit einem Winkel von 173 °C in 30 konsekutiven Messungen bestimmt. Dieselbe Lösung wurde in eine Zetasizer Küvette pipettiert und damit das Zeta-Potential bestimmt. Die Phospholipidkonzentration der Liposomenlösung wurde indirekt über Atomemissionsspektrometrie (ICP-AES) nach der von Fenzl *et al.* (2016) beschriebenen Methode bestimmt.¹⁵³ Dafür wurden Phosphatstandards mit Konzentrationen von 1, 5, 10, 25, 50 und 100 µM in 0,5 M HNO₃ zum Kalibrieren angesetzt und bei einer Wellenlänge von 178 nm gemessen. Zwanzig Mikroliter Liposomen wurden zu 2,98 ml 0,5 M HNO₃ gegeben und ebenfalls spektrometrisch analysiert. Daraus konnte die Phospholipidkonzentration der Liposomen rechnerisch ermittelt werden.¹⁵³

4.9.6 Kompetitiver Assay

Beim kompetitiven Assay ist CT-B auf der Testlinie immobilisiert und konkurriert mit dem CT-B in Lösung um die Bindung an die AuNPs@CT916.

Optimierungsparameter

Im Rahmen der Optimierung wurden

- (1) NC-Membran-Typ (HF075 oder HF180),
- (2) AuNP-Volumen (2, 5 oder 10 μl) und
- (3) Inkubationszeiten (0, 5, 10 oder 30 min)

variiert. Alle anderen Parameter entsprachen den im folgenden Abschnitt beschriebenen.

Vorbereitung der Teststreifen

Für die Kontrolllinie wurde NeutrAvidin (5 mg/ml) im Verhältnis 1:1 (v/v) mit biotinyliertem zugehörigem Rückwärtsprimer (100 μM) gemischt, mindestens 20 min inkubiert und 36-fach mit PBS-Puffer (v/v) verdünnt. Davon wurden 20 μl mit einem ATS4 (Automatic TLC Sampler) auf eine Breite von 14 mm auf eine NC-Membran (HF075) gesprüht. Der Abstand zum Rand betrug 12 mm. Für die Testlinie wurden 20 μl CT-B (0,12 mg/ml in PBS) auf 14 mm NC-Membran mit 22 mm Abstand zum unteren Rand aufgesprüht. Die Membran wurde für mindestens 30 min bei RT getrocknet und 20 min unter leichtem Schütteln mit 3 % Ethanolamin (w/v) in PBS-T (0,1 %, v/v) blockiert. Die blockierte Membran wurde erneut mindestens 30 min lang bei RT getrocknet und in Streifen von ca. 3 mm Breite und 35 mm Länge geschnitten. Absorbent Pads von 10 \times 10 mm Größe wurden an der Oberseite jedes Teststreifens mit Klebefilm befestigt und die fertigen Streifen wurden bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

Optimierter Lateral Flow Assay

Es wurden Verdünnungen von CT-B von 0,1 ng/ml bis 100 $\mu\text{g/ml}$ in PBS-Puffer angesetzt. Fünf Mikroliter AuNPs@CT916 wurden zu 95 μl CT-B-Verdünnung gegeben und für 10 min in einer Mikrotiterplatte bei RT inkubiert. Die Proben wurden auf die Teststreifen gegeben, die Streifen wurden entwickelt, bei RT getrocknet und gescannt. Die Graustufenintensität eines Bereichs fester Größe wurde mit *ImageJ* Software bestimmt und mit *OriginPro 8G* Software ausgewertet. Jeder Test wurde im Triplikate durchgeführt. Die Nachweisgrenze wurde als Blindwert zuzüglich drei Standardabweichungen (3σ) definiert sowie visuell als die Konzentration bestimmt, bei der ein Intensitätsrückgang der Testbande gerade zu sehen war.

Die Bestimmungsgrenze wurde als Blindwert zuzüglich zehn Standardabweichungen (10σ) festgelegt. Zur Bestimmung der Selektivität wurden Tests mit 95 μ l ST1-B und BSA (10 μ g/ml) durchgeführt.

Realprobenversuche

Als Matrix wurde Leitungswasser (Wasserwerk Nordheide) gewählt. CT-B dotiertes Leitungswasser wurde im Verhältnis 1:1 (v/v) mit zweifach konzentriertem PBS-Puffer verdünnt und der Test wie oben beschrieben im Triplikate durchgeführt.

4.9.7 Aptamer-Antikörper Sandwich

Optimierung

Zur Optimierung wurden

- (1) Immobilisierungspuffer des Fänger-Antikörpers (Carbonatpuffer, pH 9; Tris-HCl, pH 8 oder PBS, pH 7,4),
- (2) Konzentration des Fänger-Antikörpers (0,4; 1 oder 6 mg/ml) und
- (3) Inkubationszeiten (0, 5, 10 oder 30 min)

variiert. Alle weiteren Parameter entsprachen den unten beschriebenen.

Vorbereitung der Teststreifen

Für den Sandwich-LFA wurde eine UniSart CN 140 NC-Membran verwendet. Die Kontrolllinie wurde analog zu oben aufgesprüht. Für die Testlinie wurde Anti-Choleratoxin-Antikörper mit einer Konzentration von 0,4 mg/ml in Carbonat-Puffer (pH 9) verwendet. Sprühen, blockieren und zuschneiden der Streifen erfolgte analog zu Kapitel 4.9.6.

Optimierter Lateral Flow Assay

CT-B-Verdünnungen wurden in PBS hergestellt (1 ng/ml bis 1000 ng/ml). Fünf Mikroliter AuNPs@CT916 wurden zu jeder Verdünnung gegeben. Die Teststreifen wurden in die Lösungen gegeben, entwickelt, bei RT getrocknet und gescannt. Jeder Test wurde im Triplikate durchgeführt. Zur Bestimmung der Selektivität wurde der Assay mit 95 μ l ST1-B und BSA

(10 µg/ml) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte analog zu Kapitel 4.9.6. Als visuelle Nachweisgrenze wurde die Konzentration definiert, bei der eine Testbande gerade zu sehen war.

Realprobenversuche

Realprobenversuche wurden mit Leitungswasser (Wasserwerk Nordheide) und Pferdekot durchgeführt. Leitungswasser wurde mit CT-B auf Konzentrationen von 10 ng/ml, 50 ng/ml, 250 ng/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml dotiert. Pferdekot wurde 1:100 mit PBS-Puffer verdünnt (w/v) und die Feststoffe durch Zentrifugation bei 3134g für 45 min abgetrennt. Der Überstand wurde auf finale Konzentrationen von 10, 250, 1000 und 2000 ng/ml mit CT-B dotiert. Die Tests wurden analog zu oben im Triplikate durchgeführt.

4.9.8 Aptamer-Antikörper-Antikörper Sandwich

Beim Aptamer-Antikörper-Antikörper Sandwich wird das AuNP@CT916-CT-B-Antikörper Sandwich bereits in Lösung gebildet und dann durch einen Sekundärintikörper an der Testlinie festgehalten.

Optimierung

Im Rahmen der Optimierung des Aptamer-Antikörper-Antikörper Sandwich wurde die Inkubationszeit des Anti-Choleratoxin-Antikörpers (2 mg/ml) mit dem AuNP@CT916-CT-B-Komplex in der Probe untersucht (0, 5, 10 und 30 min). Die Inkubationsdauer der AuNPs@CT916 mit der Probe wurde konstant gehalten. Alle weiteren Parameter entsprachen den unten beschriebenen.

Vorbereitung der Teststreifen

Als Fänger wurde ein Sekundärintikörper (0,12 mg/ml in PBS) auf eine HF180 NC-Membran aufgesprüht. Kontrolllinie, Sprühmethodik und Blockierung erfolgten analog zu Kapitel 4.9.6 und 4.9.7.

Optimierter Lateral Flow Assay

CT-B wurde auf 1 ng/ml bis 500 ng/ml in PBS verdünnt. Zu 90 µl CT-B-Lösung wurden 5 µl AuNPs@CT916 gegeben und in der Mikrotiterplatte für 10 min bei RT inkubiert.

Anschließend wurden 5 µl Anti-Choleratoxin-Antikörper (2 mg/ml in PBS) hinzugegeben und weitere 10 min inkubiert. Testentwicklung, Analyse und Auswertung erfolgten analog zu Kapitel 4.9.7. Jeder Test wurde im Triplikat durchgeführt. Zur Bestimmung der Selektivität wurde der Assay mit 90 µl ST1-B und BSA (10 µg/ml) durchgeführt.

Signalverstärkung

Um die Empfindlichkeit des Assays weiter zu steigern, kann mittels Silber- oder Goldfixierung eine Signalverstärkung erreicht werden.

Silberfixierung

Für die Silberfixierung wurden eine Silbernitratlösung (0,3 % (w/v) in Reinstwasser) und eine Entwicklungslösung (3 % (w/v) Hydrochinon in Reinstwasser) frisch angesetzt und im Verhältnis 1:1 (v/v) zusammen gegeben.¹⁵⁴ Die Lösung wurde im Verhältnis 1:2 (v/v) mit Reinstwasser verdünnt und der Teststreifen zum Entwickeln in einer Mikrotiterplatte hinzugefügt. Analysiert wurden eine Konzentration von 1 ng/ml und ein Puffer-Blindwert.

Goldfixierung

Die Goldfixierlösung wurde aus 100 µl HAuCl₄ (25 nM), 350 µl MES-Puffer (10 mM, pH 6) und 50 µl H₂O₂ (30 %, v/v) frisch hergestellt.¹⁵⁵ Die Lösung wurde 1:2 (v/v) mit Reinstwasser verdünnt und der Teststreifen entwickelt. Analysiert wurden ebenfalls eine Konzentration von 1 ng/ml und ein Puffer-Blindwert.

4.9.9 Duales Aptamer Sandwich

Jeweils 2,5 µl NeutrAvidin (5 mg/ml) mit 2,5 µl biotinyliertem Aptamer CT910, CT916 oder CT928 (100 µM) wurden für mindestens 20 min bei RT inkubiert und mit PBS-Puffer auf 200 µl ergänzt. Davon wurden 20 µl pro 14 mm Streifen auf eine HF075-NC-Membran aufgebracht. Die Membran wurde analog zu oben beschrieben blockiert und getrocknet. Für die Testdurchführung wurden 500 ng/ml CT-B in PBS verdünnt und der Teststreifen entwickelt. Außerdem wurde eine Puffer-Negativkontrolle mitgeführt.

4.9.10 GM1-Aptamer Sandwich

Optimierung

Zunächst wurde das eingesetzte Liposomenvolumen optimiert, indem 0,5 µl, 2 µl und 10 µl Liposomen auf 100 µl PBS ergänzt wurden und der Test mit einer CT-B Konzentration von 250 ng/ml wie unten beschrieben durchgeführt wurde.

Vorbereitung der Membran

Für den GM1-Aptamer Assay wurden für die Testlinie jeweils 20 µl CT-B (0,1 mg/ml in PBS) pro 14 mm NC-Membran aufgesprüht. Für die Testlinie wurden 2,5 µl NeutrAvidin (5 mg/ml) mit 2,5 µl biotinyliertem CT916 (100 µM) für mindestens 20 min inkubiert und auf 100 µl mit PBS aufgefüllt. Mit dem TLC Applicator wurden davon 20 µl pro 14 mm Streifen analog zu oben auf eine HF075-NC-Membran gesprüht. Die Membran wurde mind. 30 min bei RT getrocknet und für 40 min mit 30 ml 0,1 % Casein Na-Salz (w/v) und 0,25 % Saccharose (w/v) in Reinstwasser blockiert (nach: Edwards *et al.* (2017)¹⁵⁶) und erneut bei RT getrocknet. Die Membran wurde in 40x3 mm große Streifen geschnitten und jeweils ein Absorbent Pad (10x10 mm) mit Klebefilm angebracht. Die fertigen Streifen wurden bei 4°C gelagert.

Optimierter Lateral Flow Assay

CT-B wurde in PBS auf finale Konzentrationen von 0,1 ng/ml bis 10 µg/ml verdünnt. Jeweils 100 µl jeder Konzentration wurden in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit den Teststreifen inkubiert. Pro Streifen wurden 2 µl GM1-Liposomen mit 98 µl PBS verdünnt und zu den Streifen gegeben. Zur Verbesserung des Signal-Hintergrund-Verhältnisses (d.h. um eine schwächere Färbung des Hintergrundes zu erzielen) wurde mit 100 µl PBS gespült. Die Streifen wurden bei RT getrocknet und eingescannt. Alle Assays wurden im Triplikat durchgeführt. Für die Auswertung wurden die Streifen in Graustufen gescannt, da ansonsten auf Grund der pinken Farbe keine Auswertung mit *ImageJ* möglich war. Anschließend wurden Bereiche der Testbanden einer festgelegten Größe mit *ImageJ* in Graustufenintensitäten übersetzt und mit *Origin Pro 8G* ausgewertet. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden analog zu 4.9.7 ermittelt. ST1-B und BSA (10 µg/ml) wurden zur Selektivitätsbestimmung verwendet.

4.10 Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXS)

SAXS ermöglicht die Abschätzung von Formen und Strukturen von Proteinen, Nukleinsäuren und anderen Makromolekülen mit niedriger Auflösung. Dafür wird die Beugung von Röntgenstrahlen am zu untersuchenden Molekül in Lösung im kleinwinkligen Bereich (typischerweise bis maximal 10°) betrachtet.¹⁵⁷

4.10.1 Probenvorbereitung

Für die SAXS-Messungen wurde CT-B nach 4.1.2 exprimiert, nach 4.1.3 mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie aufgereinigt und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (4.1.4 und 4.1.5) auf Reinheit überprüft. Die Proteinlösungen wurden mittels Amicon Ultra-15 Zentrifugeneinheiten (MWCO 10 kDa) aufkonzentriert und die Proteinkonzentration nach 4.1.8 mittels UV-Absorption bestimmt. HPLC-gereinigtes Aptamer wurde in demselben Puffer gelöst, in dem sich auch das Protein befand (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 8).

4.10.2 SAXS Experimente

Alle Experimente wurden an der Beamline P12 des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) am PETRA III-Speicherring des DESY bei einer Wellenlänge von $1,24 \text{ \AA}$ durchgeführt. Der Detektorabstand betrug 3 m. Für die *Batch*-Messungen wurde jeweils ein Probenvolumen von $30 \mu\text{l}$ verwendet. Es wurde zunächst CT-B bei Konzentrationen von $3,5 \text{ mg/ml}$ ($50 \mu\text{M}$), $2,8 \text{ mg/ml}$ ($40 \mu\text{M}$), $1,75 \text{ mg/ml}$ ($25 \mu\text{M}$), $0,88 \text{ mg/ml}$ ($12,5 \mu\text{M}$) und $0,44 \text{ mg/ml}$ ($6,75 \mu\text{M}$) und anschließend CT916 bei Konzentrationen von $2,4 \text{ mg/ml}$ ($100 \mu\text{M}$), $2 \times 1,2 \text{ mg/ml}$ ($50 \mu\text{M}$), $0,6 \text{ mg/ml}$ ($25 \mu\text{M}$), $0,3 \text{ mg/ml}$ ($12,5 \mu\text{M}$) und $0,15 \text{ mg/ml}$ ($6,75 \mu\text{M}$) einzeln gemessen.

Im Anschluss erfolgte die Messung des Komplexes mittels SEC-SAXS. Dafür wurden CT-B (finale Konzentration $3,5 \text{ mg/ml}$, $50 \mu\text{M}$) und CT916 (finale Konzentration $1,2 \text{ mg/ml}$, $50 \mu\text{M}$) in theoretisch äquimolarem Verhältnis gemischt und ein Probenvolumen von $80 \mu\text{l}$ auf eine zuvor äquilibrierte Superdex 200 10/300 GL geladen. Bei einem Fluss von $0,5 \text{ ml/min}$ erfolgten 3000 Einzelmessungen (d.h. eine Messung pro Sekunde).

Anschließend wurden im *Batch Mode* Protein und Aptamer im theoretischen molaren Verhältnis 1:2 und 1:3 gemessen. Die Proteinkonzentration betrug 1,75 mg/ml oder 25 μ M. Zu jeder Messung erfolgte auch eine Puffermessung, deren Streusignal automatisch abgezogen wurde.

4.10.3 Datenanalyse

Die Datenverarbeitung erfolgte mit Hilfe des vom EMBL entwickelten Software-Pakets *ATSAS Suite*,¹⁵⁸ insbesondere mittels der Programme PRIMUS,¹⁵⁹ GNOM,¹⁶⁰ GASBOR,¹⁶¹ DAMMIF¹⁶² und DAMAVER.¹⁶³ Mittels PRIMUS wurden zunächst der Guinier- und Kratky-Plot und mittels GNOM die Abstandsverteilungsfunktion $p(r)$ berechnet. Die Guinierverteilung diente der Abschätzung des Gyrationradius R_g und der Bewertung der Datenqualität, aus der Abstandsverteilungsfunktion wurde der maximale Durchmesser D_{max} abgeschätzt. Mit dem Programm GASBOR wurde unter Angabe der pentameren Symmetrie und Anzahl der Aminosäuren (*dummy residues*) ein *ab initio* Modell für CT-B erstellt. Die *ab initio* Modelle des Aptamers CT916 sowie des Aptamer-Protein-Komplexes wurden mittels DAMMIF modelliert und mittels DAMAVER gemittelt. Die Aptamerstruktur wurde zum Vergleich mit dem Webserver *SimRNAweb*¹⁶⁴ *in silico* unter Austausch von Thymin durch Uracil als RNA modelliert. Für SEC-SAXS wurden zunächst mit dem Programm CHROMIX¹⁶⁵ manuell die Probe und der Puffer ausgewählt. Anschließend erfolgte die weitere Verarbeitung der Daten analog zu oben. Weiterhin wurden mit den Programmen MONSA,¹⁶⁶ CORAL¹⁶⁷ und SASREF¹⁶⁸ Versuche zum *docking* und *rigid body modelling* unternommen.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Expression, Reinigung und Charakterisierung der B-Untereinheiten von Cholera toxin und Shigatoxin 1

Aus Sicherheitsgründen wurden anstatt der Holotoxine die B-Pentamere des Cholera toxins und des Shigatoxin 1 als Selektionstargets gewählt.

CT-B und ST1-B wurden zunächst mit transformierten *E. coli* BL21 Zellen exprimiert. Um die Reinigung über eine Nickel-Chelat-Chromatographiesäule zu ermöglichen, wurden den Proteinsequenzen nach Begutachtung der Termini mit PyMOL N- beziehungsweise C-terminal eine Endopeptidase-Schnittstelle und ein His-Tag hinzugefügt (CT-B: Aminosäuren 22-124 Acc. No. AND74811.1, N-terminaler His-Tag und ST1-B: Aminosäuren 21-89 Acc. No. Q8X4M7, C-terminaler His-Tag). Durch die Endopeptidase-Schnittstelle kann der His-Tag gegebenenfalls enzymatisch vom aufgereinigten Protein entfernt werden.

Da die Elutionsfraktionen der Metallchelate-Affinitätschromatographie deutliche Verunreinigungen zeigten, wurde im Anschluss eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt (für die zugehörigen SDS-PAGE-Gelbilder siehe Anhang 7.6). Die aufgereinigten Fraktionen wurden zusammengelegt, mit einem Amiconkonzentrator aufkonzentriert und erneut mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 5.1A und Abb. 5.2A). Anschließend wurde mit einem Western Blot die Identität der Proteine bestätigt und mit DLS die Monodispersität der Proteinlösung untersucht. Für den Western Blot wurde zunächst für jedes Protein eine SDS-PAGE durchgeführt und die Proteine anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Nach Inkubation mit spezifischen Antikörpern wurde durch eine Immunfärbung das Protein nachgewiesen (Abb. 5.1B und Abb. 5.2B).

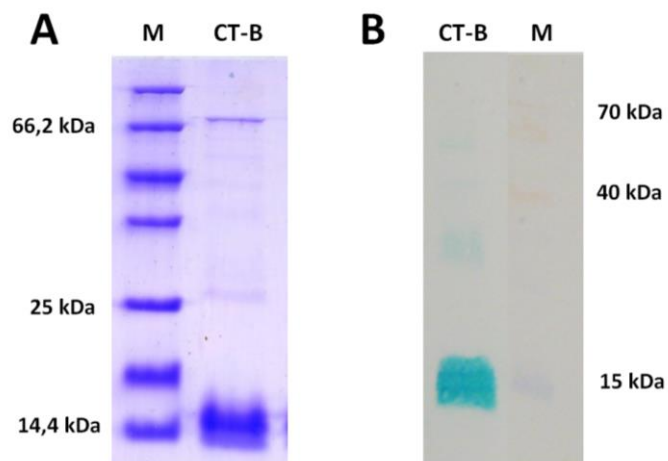


Abb. 5.1: (A) SDS-PAGE Gel und (B) Western Blot des aufgereinigten CT-B. Der Marker wurde für die Immunfärbung abgetrennt und für die Darstellung nachträglich wieder hinzugefügt.

Durch die Immunfärbung des Western Blots kann man erkennen, dass in der denaturierenden PAGE CT-B wie erwartet vorwiegend als Monomer (Molekulargewicht $\sim 13,5$ kDa), zusätzlich aber auch zu einem geringeren Anteil als Dimer ($\sim 26,9$ kDa), Trimer ($\sim 40,3$ kDa) und Pentamer ($\sim 67,2$ kDa) vorliegt.¹⁶⁹ Nennenswerte Verunreinigungen waren mittels SDS-PAGE nicht festzustellen.

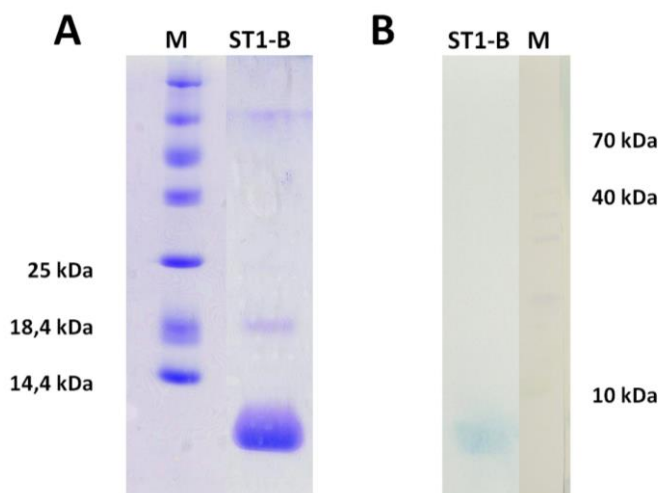


Abb. 5.2: (A) SDS-PAGE Gel und (B) Western Blot des aufgereinigten ST1-B. Der Marker wurde für die Immunfärbung abgetrennt und nachträglich wieder angefügt.

Auch beim aufgereinigten ST1-B ließen sich keine nennenswerten Verunreinigungen feststellen. Auf dem Gel sind Proteinbanden bei etwa 9 kDa, 18 kDa und 25 kDa erkennbar, welche mit den Molekulargewichten des Mono-, Di- und Trimers (9,3 kDa, 18,6 kDa,

27,9 kDa) korrelieren. Im Western Blot ist nur das Monomer deutlich erkennbar, was aber wahrscheinlich an der schwachen Färbung des Blots liegt.

Um zusätzlich die Monodispersität der Proteine zu überprüfen, wurde DLS durchgeführt. Mit DLS kann der hydrodynamische Radius R_h von Proteinen und anderen Biopolymeren bestimmt werden. Der R_h beschreibt den Radius einer hypothetischen Kugel, die mit der gleichen Geschwindigkeit wie die Teilchen in Lösung diffundiert. Die Methode eignet sich besonders um das Vorkommen von Proteinaggregaten aufzuzeigen, da große Partikel in der Intensitätsverteilung überschätzt werden.¹⁷⁰ Mit DLS wurde ein R_h von $3,3 \pm 0,1$ nm für das exprimierte CT-B bestimmt (Abb. 5.3).

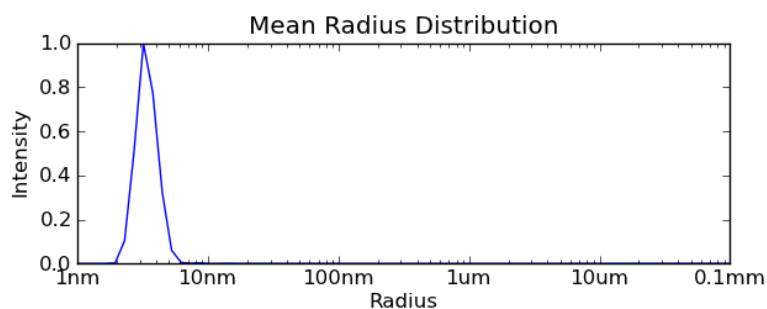


Abb. 5.3: Größenverteilung des exprimierten CT-B nach Intensität bestimmt mit DLS.

Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem Literaturwert von 3,2-3,4 nm für das CT-B-Pentamer überein.^{171,172} Es ist ein einzelner, schmaler Peak zu erkennen, was darauf hindeutet, dass das Protein monodispers, also (nahezu) nur als Pentamer vorliegt.

Auch für die Messung des ST1-B ist ein einzelner Peak bei einem R_h von $3,2 \pm 0,04$ nm erkennbar, was ebenso für ein monodispers vorliegendes pentamer Protein spricht (Abb. 5.4). Die abgeschätzte Proteingröße deckt sich mit den Angaben in der Literatur.^{173,174}

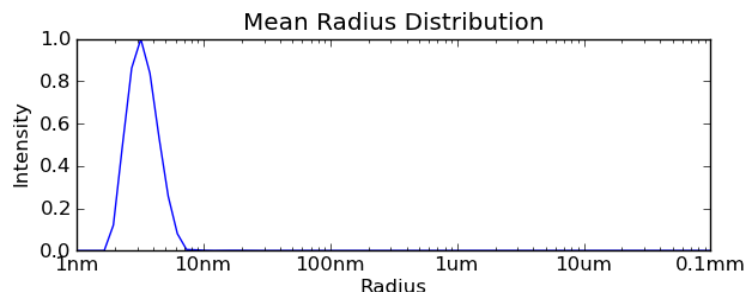


Abb. 5.4: Größenverteilung des exprimierten ST1-B nach Intensität bestimmt mit DLS.

5.2 Selektion von Aptameren gegen Choleratoxin

Die Aptamere gegen aufgereinigtes CT-B wurden in zwölf Runden mittels des *Just in Time-Selection* Protokolls selektiert.¹⁴² Als Vorbereitung für die *Just in Time-Selection* wurde zunächst das Target auf Magnetpartikeln immobilisiert und die Kopplung überprüft. In der ersten Selektionsrunde wurde die Aptamerbibliothek mit den Target-Magnetpartikeln inkubiert, für alle weiteren Runden wurde jeweils das vervielfältigte, einzelsträngige Produkt der vorangegangenen Selektionsrunde verwendet. In den ersten vier SELEX-Runden erfolgte eine Gegenselektion gegen mit Ethanolamin blockierte Magnetpartikel. Diese Gegenselektion ist notwendig, um die Selektion von Matrixbindern zu vermeiden, also von Aptameren, die an die Magnetpartikel-Oberfläche und nicht spezifisch an das Selektionstarget CT-B binden. In der *Just in Time-Selection* wird jede SELEX-Runde in zwei Schritte unterteilt, das automatisierte FISHing (Target-Inkubation und Waschschrte) und das BEAMing (Vervielfältigung und Strangtrennung). Am Ende jeder Runde liegt einzelsträngiges ssDNA-Produkt vor, welches direkt für die nächste Selektionsrunde eingesetzt werden kann. Durch eine Erhöhung der Stringenz im Laufe der SELEX durch häufigeres Waschen und steigende Waschvolumina und eine kürzere Inkubationszeit steigt der Selektionsdruck, was dann im erhofften Fall zur Verringerung der Sequenzdiversität und Anreicherung bindender Sequenzen führt. Alternativ kann auch die Waschdauer verlängert und die Target-Menge verringert werden.

5.2.1 Immobilisierung von CT-B auf Magnetpartikeln

Für die Selektion gegen CT-B wurde dieses über eine Aktivierung mit EDC kovalent an carboxylierte Magnetpartikel gekoppelt (schematisch gezeigt in Abb. 5.5). Nach Aktivierung der Magnetpartikel reagieren die Carboxylgruppen mit EDC zu einem Zwischenprodukt, welches im nächsten Schritt mit einer primären Aminogruppe (an einem Asparagin, Glutamin, Lysin oder Arginin) des CT-B weiter reagiert. Freie Bindungsstellen werden anschließend mit Ethanolamin abgesättigt.

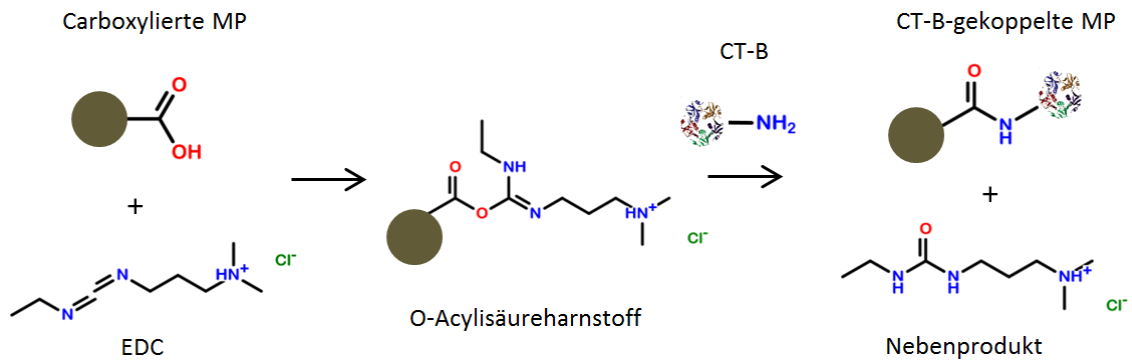


Abb. 5.5: Schematische Darstellung der Kopplung des CT-B an carboxylierte Magnetpartikel (MP).

Die Kopplung des Proteins wurde zum einen durch Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD im Überstand nach der Kopplung, zum anderen durch einen ELISA im Reaktionsgefäß nachgewiesen. Mit Hilfe einer Kalibrierreihe konnte eine Proteinkonzentration im Überstand $< 0,01$ mg/ml bestimmt werden, woraus geschlossen werden konnte, dass die Kopplung erfolgreich verlaufen war. Beim ELISA wird analog zum Western Blot durch eine Immunreaktion eine Farbreaktion ausgelöst. Wie in Abb. 5.6 gezeigt, fand diese statt, wodurch die Kopplung des CT-B nochmals bestätigt wurde.

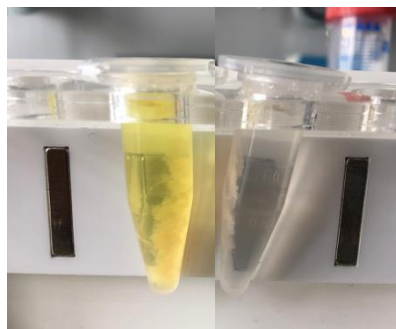


Abb. 5.6: ELISA am Magnetpartikel zum Nachweis der Kopplung des CT-B. Links zeigt eine Gelbfärbung eine erfolgreiche Kopplung an, rechts ist die Negativkontrolle (Ethanolamin-Magnetpartikel) ungefärbt.

5.2.2 Verlauf der Selektion

Die Cholera-Toxin-SELEX wurde in zwölf Runden nach den in Tab. 4.7 für das FISHing dargestellten Parametern durchgeführt.

Die Eluate des FISHings wurden in 30 BEAMing-Zyklen amplifiziert. Anschließend wurde zur Visualisierung auf dem Agarosegel eine sogenannte Kontroll-PCR (20 Zyklen) durchgeführt. Ein Zusammenschnitt der mit Ethidiumbromid visualisierten Kontroll-PCR-Produkte ist in Abb. 5.7 gezeigt. Es wurde jeweils eine Positivkontrolle (Aptamer aus

vorangegangener SELEX, 100 nM) und eine Negativkontrolle (Reinstwasser) mitgeführt. Diese sind hier zugunsten der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

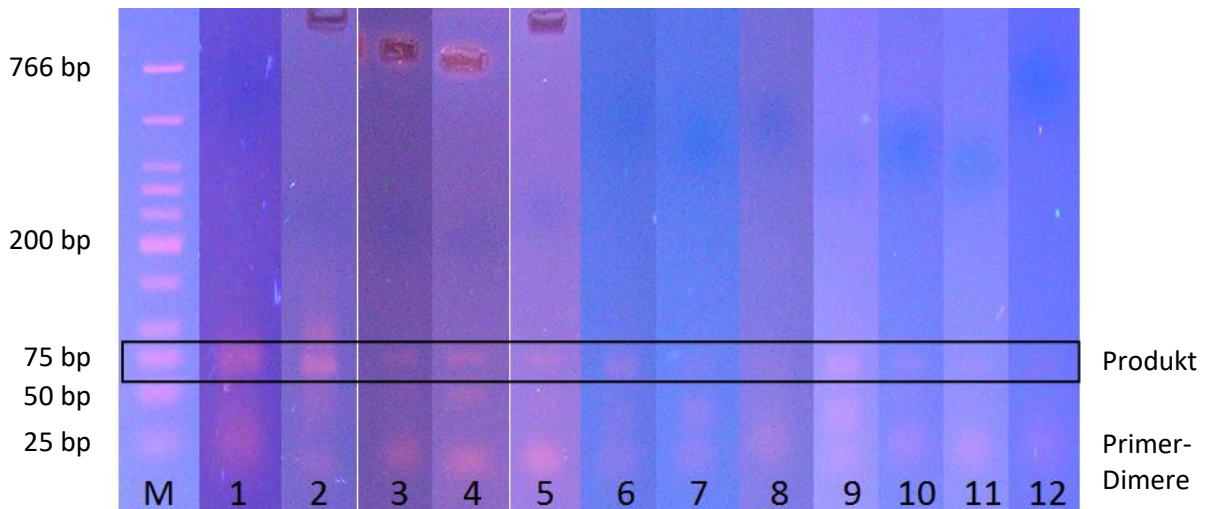


Abb. 5.7: Zusammenschnitt einzelner Agarosegele aus der Cholera-toxin-SELEX. Bei einer Höhe von ca. 76 Basenpaaren (bp) ist jeweils der amplifizierte Aptamerpool zu erkennen, der für die nächste Runde eingesetzt wurde. M – Marker, Nummerierungen – jeweilige SELEX-Runde.

Sofern eine Produktbande bei der zu erwartenden Größe von 76 Basenpaaren (bp) deutlich zu erkennen war, wurde direkt die nächste Selektionsrunde angeschlossen. Da nach Runde 2, 5 und 6 zunächst nur sehr schwache Banden zu erkennen waren, wurde vor der nächsten Selektionsrunde ein erneutes BEAMing zur Vervielfältigung durchgeführt. War kein PCR-Produkt bei der erwarteten Größe sichtbar, wurde die SELEX-Runde wiederholt, indem aus der Rückstellprobe der vorangegangenen Runde ein BEAMing durchgeführt wurde, welches dann für die Wiederholung des FISHings der jeweiligen Runde eingesetzt wurde.

Auf den Agarosegelen außerdem deutlich zu erkennen sind Banden bei knapp unter 18 bp. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Primer-Dimere, da bei der Kontroll-PCR Primer im Überschuss zugegeben wurden. In den Runden 4, 7 und 9 sind außerdem Nebenprodukte im Bereich von 50 bp erkennbar. Die Bildung von Nebenprodukten kann sich nachteilig auf die Selektion auswirken und sogar die Vervielfältigung bestimmter Sequenzen inhibieren.¹⁷⁵ Obwohl sich die emPCR durch ein vermindertes Auftreten von Fragmenten durch die Ausbildung räumlich getrennter Reaktionsräume auszeichnet,^{85,176} kann deren Bildung nicht vollständig ausgeschlossen werden. Da die Nebenprodukte allerdings in der folgenden Runde nicht mehr oder nur sehr schwach vorhanden waren, konnten diese vernachlässigt werden. Eine Auswirkung auf den SELEX-Erfolg ist somit unwahrscheinlich.

Diversitätsassay

Die theoretische Diversität eines Aptamerpools mit 40 randomisierten Positionen beträgt unter Verwendung der vier natürlich vorkommenden DNA-Basen 4^{40} mögliche Sequenzen, wovon allerdings nur etwa 10^{15} experimentell erreicht werden.¹⁷⁷ Im Laufe der SELEX nimmt die Diversität des Aptamerpools ab. Dieser Diversitätsverlust kann über einen Vergleich der Rückschmelztemperaturen der Aptamerpools verfolgt werden.¹⁷⁸ Dabei wird nach erfolgter qPCR eine Schmelzkurvenbestimmung angeschlossen. Da davon auszugehen ist, dass die Rehybridisierung bei Pools geringerer Diversität vollständiger abläuft, kann im Umkehrschluss angenommen werden, dass bei höherer Diversität verstärkt Heteroduplexe, also Sequenzpaarungen, die eigentlich nicht oder nur teilweise komplementär sind, entstehen. Entsprechend werden für Pools höherer Diversität niedrigere Schmelztemperaturen ermittelt als für Pools niedrigerer Diversität.¹⁷⁸ Sind also Informationen über die Veränderung der Diversität im Verlauf der SELEX vorhanden, können Rückschlüsse darauf getroffen werden, ob eine Anreicherung stattgefunden hat, was wiederum für eine erfolgreiche SELEX spricht. Über Bindungsstärke und Selektivität können mittels Diversitätsassay allerdings keine Aussagen getroffen werden.

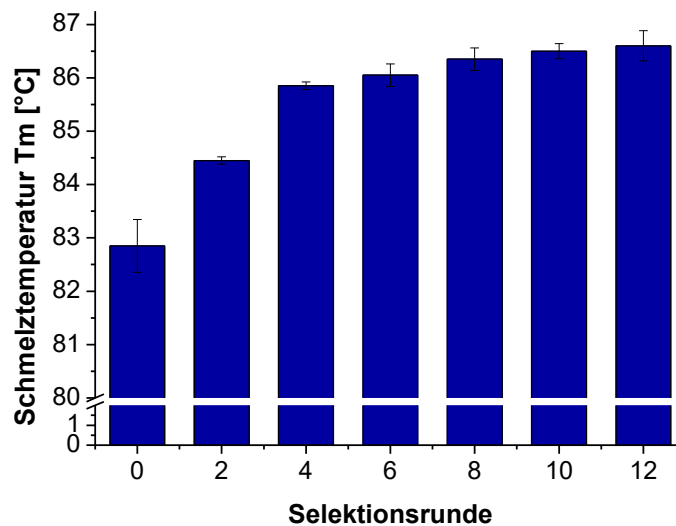


Abb. 5.8: Änderung der Schmelztemperatur der Aptamerpools im Verlauf der Cholera-toxin-SELEX.

In Abb. 5.8 ist zu erkennen, dass die Schmelztemperatur in den ersten vier Selektionsrunden stark anstieg, die Diversität also besonders stark abnahm. Anschließend ist von Runde zu

Runde nur noch eine leichte Diversitätsabnahme erkennbar, weshalb die SELEX nach 12 Runden beendet wurde, da keine weitere Anreicherung mehr zu erwarten war.

5.2.3 Sequenzierung

Der Aptamerpool aus Runde 12 wurde mit einer konventionellen PCR amplifiziert, um doppelsträngiges PCR-Produkt zu erhalten. Dieses wurde dann mit Hilfe eines Klonierungskits (TOPO TA Cloning Kit) in einen offenen Vektor mit Thyminüberhängen ligiert und in chemisch kompetente *E. coli* XL1 Zellen transformiert. Die Zellen wurden auf ampicillinhaltigem LB-Agar ausplattiert und scheinbar positive Klone (die mit dem Vektor u.a. auch ein Ampicillinresistenzgen aufgenommen hatten) nochmals mit einer Kolonie-PCR mit Aptamer-spezifischen (und M13) Primern durchgemustert (siehe Anhang Abb. 7.7. und Abb. 7.8). Vierzig positive Klone wurden ausgewählt und angezüchtet. Die so vervielfältigten Plasmide wurden isoliert und sequenziert.

Durch die Sequenzierung wurden die in Tab. 5.1 mit Basenlänge und Häufigkeit dargestellten acht Aptamersequenzen erhalten. Die Auflistung wurde um offensichtliche Kontaminanten (Sequenzen aus einer vorangegangenen SELEX) bereinigt.

Tab. 5.1: Übersicht über die erhaltenen Aptamersequenzen der Cholera-toxin-SELEX. Die Primerregionen sind jeweils CATCCGTCACACCTGCTCGG am 5'-Ende und GGTGTTCGGTCCCGTATC am 3'-Ende.

Aptamer	Aptamersequenz ohne Primerregionen (5'-3')	Länge [Basen]	Häufigkeit
CT910	GTACACAGGAGCCAAACCCAACCAGACCAACCTGAAGCC	76	10
CT916	GGCAAAAAGGATTGCCAGGTCTGCTGTCTAGCCGGATTC	76	1
CT928	CACCCGTCACACTTATCCGTCAACTGGGCTCCCACTGGG	75	1
CT931	CCAGCGTGCGTTCGAGGGGGACCCCTGTCAGCCCCCTCGCG	76	1
CT938	CACCCGTCCACTCATCCGTCACACCTGTTCTCCCCATG	74	1
CT939	CACCCGTCACACTTATCCGTCACACTGGGCCCCACTGGG	75	1
CT943	CACCCGTCCACTCATCCGACACACCTGCTCTCCCCACTG	75	1
CT946	CCCACAACCGGTCCGGTGTTCGGTCCCGTATCACGCCCC	76	1

Die Hälfte der Aptamere zeigt die erwartete Länge von 76 Basen. Die anderen Aptamere sind um ein oder zwei Basen verkürzt. Das kann beispielsweise an Lesefehlern der im BEAMing zur Vervielfältigung eingesetzten Taq-Polymerase liegen, da diese keine *proofreading*-Aktivität besitzt. Außerdem möglich ist das Vorliegen kürzerer Aptamere in der Ausgangsbibliothek oder eine fehlerhafte Sequenzierung des finalen Aptamerpools.

Auffallend ist außerdem, dass Aptamer CT910 zehnmal, die anderen Aptamere aber jeweils nur einmal identifiziert wurden. Das kann zum einen daran liegen, dass CT910 ein besonders guter Binder für CT-B ist und sich deshalb stärker angereichert hat, zum anderen kann es sich bei CT910 um ein Aptamer handeln, das auf Grund seiner Sequenz von der Taq-Polymerase bevorzugt vervielfältigt wird (*PCR bias*).¹⁷⁹

Durch die Sanger-Sequenzierung wurden acht Aptamersequenzen, von denen sieben nur einmal vorkamen, ermittelt. Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass die zufällig gewählten Klone alle relevanten Sequenzen repräsentieren. Um eine nahezu vollständige Abdeckung des finalen Aptamerpools zu erreichen, kann stattdessen *Next Generation Sequencing* eingesetzt werden, welches die parallele Sequenzierung einer sehr großen Menge an DNA-Strängen erlaubt, allerdings technisch aufwendig und noch sehr teuer ist.¹⁸⁰

5.2.4 Strukturanalyse

Motivanalyse

Mit dem Analyseprogramm *MEME Suite* lassen sich Sequenzmotive vorhersagen. Dabei sind Motive, für die ein Erwartungs-Wert (E) $\geq 0,05$ ermittelt wird, wahrscheinlich zufällig und daher nicht signifikant.¹⁴⁵ Für die untersuchten acht Aptamere wurde mit den gewählten Parametern nur ein signifikantes Motiv gefunden ($E = 1,5 \cdot 10^{-7}$). Dieses ist in den Aptameren CT938, CT943, CT946, CT939 und CT928 enthalten und 23 Nukleotide lang (Abb. 5.9).

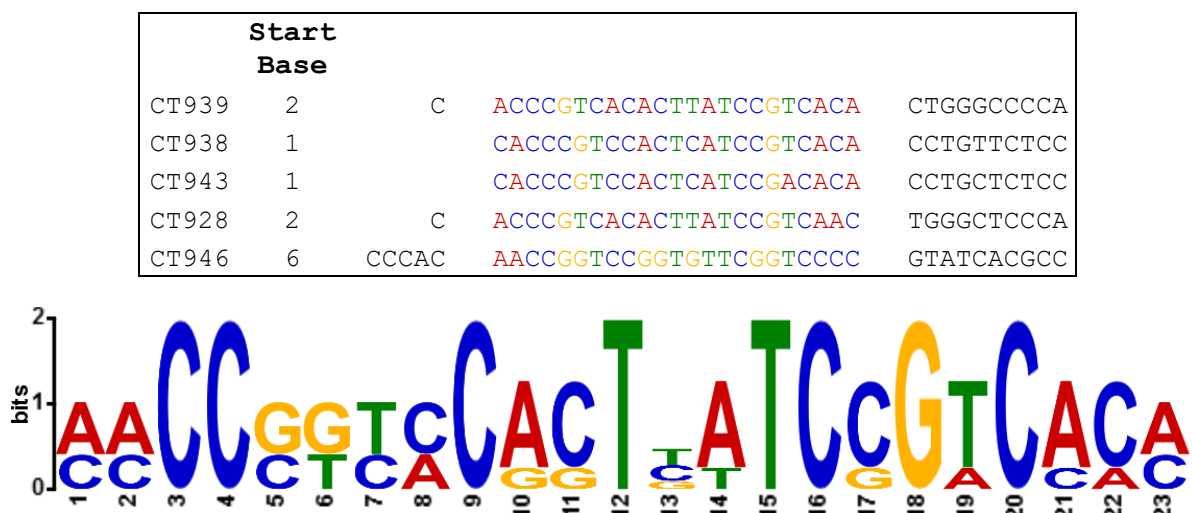


Abb. 5.9: Signifikantes Motiv der Cholera-toxin-SELEX, Position auf den Strängen (ohne Primer).

Das Vorhandensein des Motivs in fünf von acht Aptameren deutet darauf hin, dass es sich dabei um ein Bindungsmotiv handelt. Alternativ könnte das Motiv aber durch den PCR *bias* der Taq-Polymerase entstanden sein.

Sekundärstrukturvorhersage

Mit dem Online-Programm *mfold* kann die Sekundärstruktur von Aptameren vorhergesagt werden. Dafür werden, unter Berücksichtigung der Ionenkonzentration des Puffers und der Temperatur, thermodynamische Stabilitäten bestimmt. Die Strukturen enthalten jeweils stabilisierende (*stems*, *hairpin loops*) sowie destabilisierende Elemente (große *stem loops* und *multi-branched loops*). Die konstanten Primerregionen beeinflussen die Sekundärstrukturen aller CT-B-Aptamere maßgeblich (Abb. 5.10, siehe auch Abb. 7.10 im Anhang) und können daher möglicherweise auch an der Bindung beteiligt sein. Entsprechend kann gefolgert werden, dass bereits durch die Wahl der Primersequenzen die potentiellen Sekundärstrukturen der Aptamere einer SELEX beeinflusst werden.

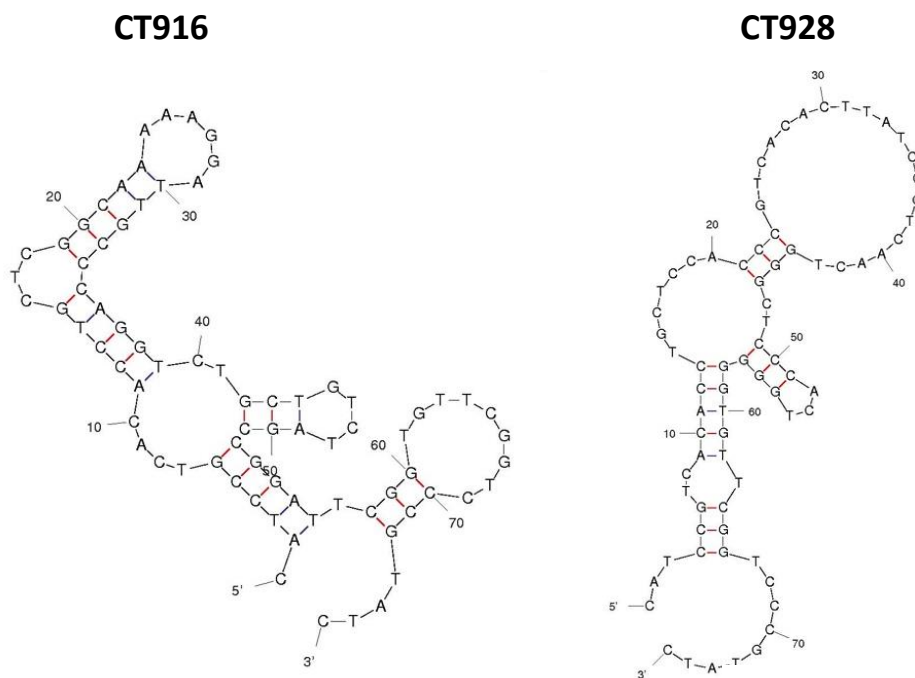


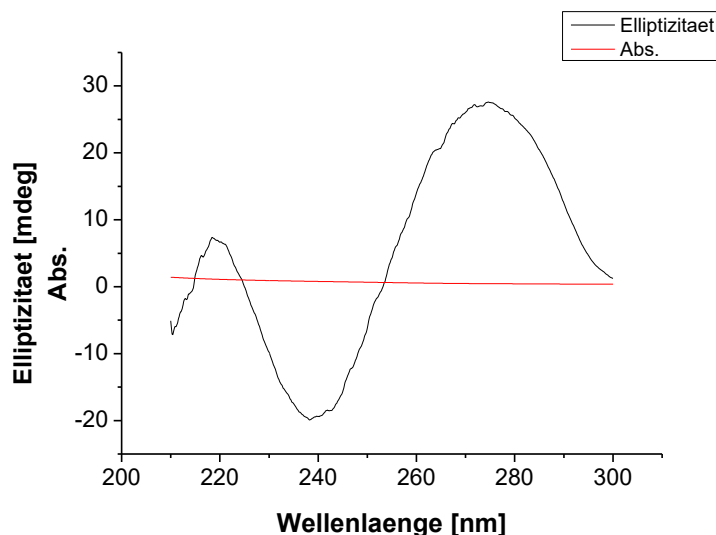
Abb. 5.10: Thermodynamisch stabilste Sekundärstrukturvorhersage der Aptamere CT916 und CT928.

Die minimalen freien Faltungsenergien (ΔG) für die dargestellten Strukturen betragen -12,01 kcal/mol (CT916) und -6,56 kcal/mol (CT928). Im selben Bereich liegen auch die Faltungsenergien der anderen Cholera-toxin-Aptamere. Je negativer ΔG , desto

stabiler ist die Sekundärstruktur bei gegebener Temperatur (hier: 22°C).¹⁴⁴ Die Sekundärstruktur des Aptamers CT916 ist somit stabiler als die des Aptamers CT928.

G-Quadruplexe

Mit Hilfe des *QGRS Mapper* Online-Tools können G-Quadruplex-Strukturen vorhergesagt werden, wonach die Aptamere CT910, CT928 und CT939 jeweils einen G-Quadruplex enthalten. Um die Existenz der G-Quadruplexe zu bestätigen, wurde CD-Spektroskopie durchgeführt. Anhand von charakteristischen CD-Spektren lassen sich parallele und antiparallele G-Quadruplex-Strukturen identifizieren. Parallele G-Quadruplex-Strukturen zeigen in der CD-Spektroskopie typischerweise einen charakteristischen Negativpeak der Elliptizität bei 240 nm und einen Peak bei 270 nm.^{146,181} Diese Peaks sind auf der Elliptizitätskurve des Aptamers CT928 eindeutig erkennbar (Abb. 5.11, für die anderen Aptamere siehe Abb. 7.12 im Anhang).



CATCCGTCAC ACCTGCTCCA CCCGTCACAC TTATCCGTCA

ACTGGGCTCC CACTGGGGGT GTTCGGTCCC GTATC

Abb. 5.11: Elliptizität des Aptamers CT928 im Wellenlängenbereich von 210-300 nm und Aptamersequenz. Guanine, die möglicherweise an einem G-Quadruplex beteiligt sind, sind unterstrichen.

Zusätzlich kann *in silico* der sogenannte *G-Score* als Maß für die Stabilität eines G-Quadruplexes berechnet werden.¹⁴⁷ Je höher dieser ist, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass der gebildete Komplex stabil ist, wobei der *G-Score* maximal 105

betragen kann. Für CT928 wurde ein *G-Score* von 14 berechnet. Zum Vergleich beträgt der *G-Score* des bekannten G-Quadruplex-bildenden Anti-Thrombin Aptamers TBA 20.

5.2.5 Bindungsstudien

Fluoreszenzbasierte Affinitätschromatographie

Um die Bindungsstärke der selektierten Aptamere gegenüber Cholera toxin zu bestimmen, wurde zunächst fluoreszenzbasierte Affinitätschromatographie durchgeführt. Dafür wurden die Aptamere mittels BEAMing mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 markiert, indem statt eines unmarkierten Vorwärtsprimers ein 5'-Alexa488-markierter Vorwärtsprimer eingesetzt wurde. Eine Verdünnungsreihe wurde hergestellt und mit einer konstanten Menge CT-B inkubiert, welches auf Magnetpartikeln immobilisiert war. Nach einem Waschschrift wurde die Fluoreszenzintensität gemessen und gegen die eingesetzte Aptamerkonzentration aufgetragen. Abb. 5.12 zeigt die Auswertung mit *Hill-Fit* für die Aptamere CT916 und CT928.

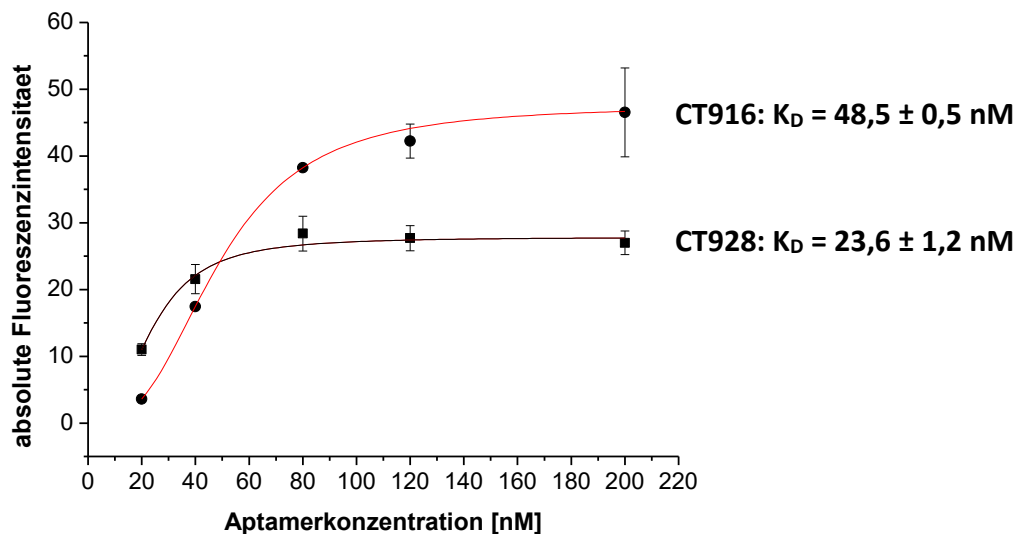


Abb. 5.12: Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Aptamere CT916 und CT928 mit CT-B mittels fluoreszenzbasierter Affinitätschromatographie.

Tab. 5.2 zeigt eine Übersicht aller K_D -Werte der Cholera toxin-Aptamere. Die Affinitäten liegen alle im zweistelligen nanomolaren Bereich und sind damit vergleichbar mit anderen Aptameren, die gegen Bakterientoxine selektiert worden sind.¹⁸²⁻¹⁹⁰ Aptamere gegen

Choleratoxin wurden zwar bereits von Bruno *et al.* (2002) selektiert, es wurden aber weder Dissoziationskonstanten bestimmt noch wurden die Sequenzen veröffentlicht.¹⁹¹

Tab. 5.2: Mit Affinitätschromatographie ermittelte K_D -Werte der Choleratoxin-Aptamere.

Aptamer	K_D [nM]
CT910	$54,6 \pm 6,7$
CT916	$48,5 \pm 0,5$
CT928	$23,6 \pm 1,2$
CT931	$50,2 \pm 13,2$
CT938	$23,2 \pm 0,4$
CT939	$41,6 \pm 4,0$
CT943	$26,8 \pm 0,5$
CT946	$30,4 \pm 1,5$

Microscale Thermophoresis

Die mittels Affinitätschromatographie bestimmten Bindungseigenschaften des Aptamers CT916 wurden mittels MST bestätigt. MST beruht auf der Änderung der Molekülbewegung in einem mikroskopischen Temperaturgradienten, abhängig davon, ob das Molekül und der zugehörige Ligand als Komplex vorliegen oder nicht. Dafür muss einer der beiden Bindungspartner fluoreszenzmarkiert werden, während vom anderen eine serielle Verdünnung pipettiert wird.⁹¹ Anschließend wird die Konzentration des unmarkierten Liganden gegen die normierte prozentuale Bindung ($\Delta F_{\text{Norm}}\%$) aufgetragen und der K_D bestimmt.

Um die Bindung zwischen CT-B und CT916 zu bestimmen, wurde zunächst ein Ansatz gewählt, in dem CT-B mit einem His-Tag-spezifischen Farbstoff markiert wurde und das Aptamer seriell verdünnt wurde. Da sich dadurch keine auswertbaren Daten generieren ließen, wurde stattdessen das Aptamer 5'-FAM-markiert und die Verdünnungsreihe aus dem CT-B hergestellt. Die MST-Messungen mit markiertem Aptamer wurden nur mit Aptamer CT916 durchgeführt, da dieses auch für die weiteren Anwendungen eingesetzt wurde. Mit MST wurde ein K_D von $66,1 \pm 12,1$ nM ermittelt (Abb. 5.13), welcher verhältnismäßig gut mit dem mittels Affinitätschromatographie bestimmten K_D von $48,5 \pm 0,5$ nM übereinstimmt.⁸⁸

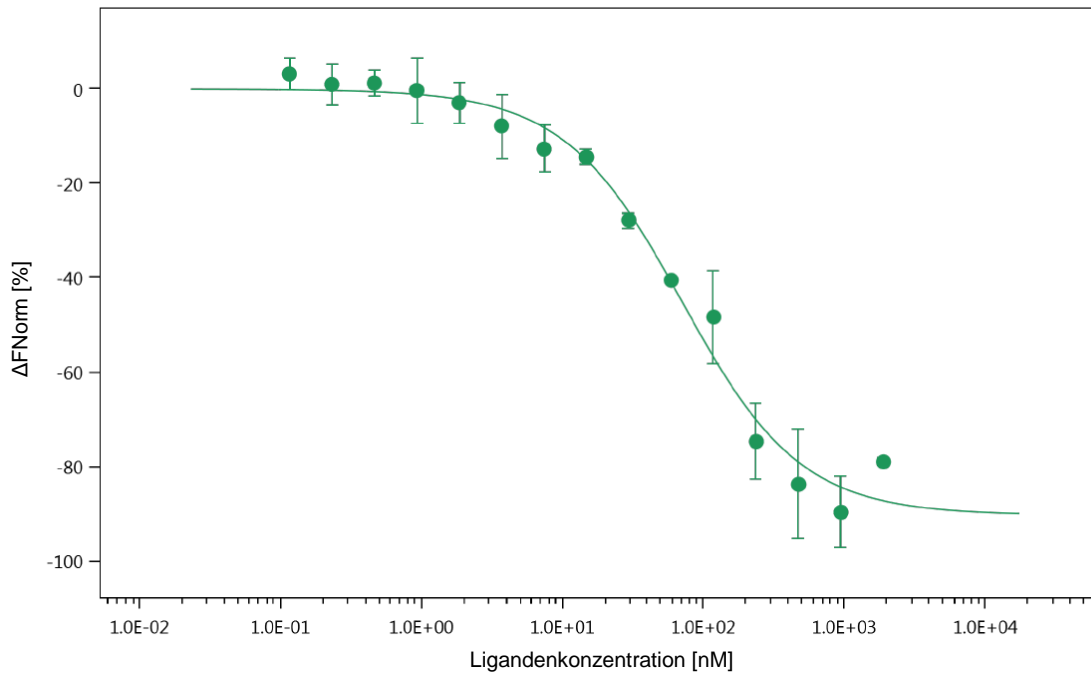


Abb. 5.13: Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Aptamers CT916 mit CT-B mittels MST.

5.2.6 Selektivitätsmessungen

Neben der Bindungsstärke der Aptamere zu ihren jeweiligen Zielmolekülen ist die Selektivität, also die Fähigkeit, das Zielmolekül spezifisch zu binden, eine essenzielle Eigenschaft von Aptameren. Die Selektivität gegenüber CT-B wurde für die Aptamere CT910, CT916, CT928 (repräsentativ für die Aptamere mit dem Sequenzmotiv) und CT931 durch einen modifizierten direkten ELAA bestimmt. Dafür wurde eine konstante Konzentration biotinylierten Aptamers mit gleichen Mengen an CT-B, ST1-B, Protein A und BSA inkubiert. ST1-B wurde gewählt, da es als AB₅-Toxin dem CT-B strukturell ähnlich ist und in der gleichen Umgebung auftreten kann. Protein A ist ein Oberflächenprotein von *Staphylococcus aureus* und kann ebenfalls in einer ähnlichen Umgebung vorkommen. BSA wird oft als Blockierungsmittel in biochemischen Assays verwendet. Alle Aptamere zeigten eine gute Selektivität für CT-B mit geringer bis minimaler Kreuzreaktivität (Abb. 5.14). Insbesondere CT916 hatte eine sehr gute Selektivität und zusätzlich das niedrigste Hintergrundsignal.

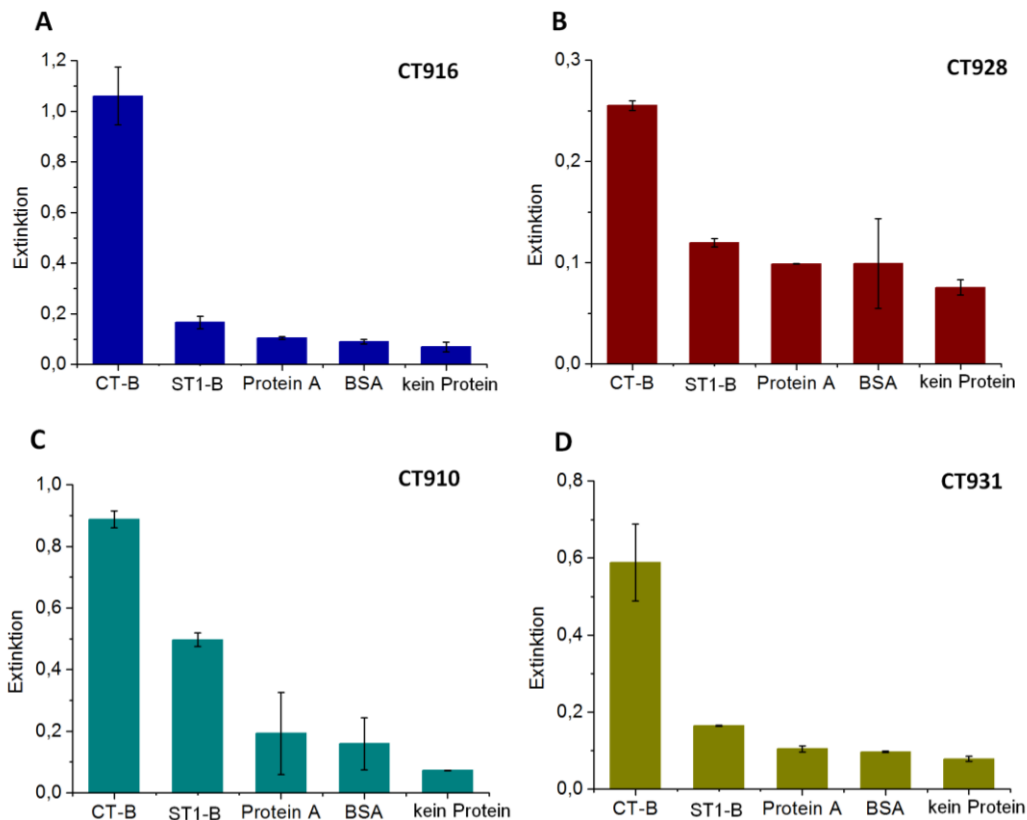


Abb. 5.14 Kreuzreaktivität ausgewählter Cholera-toxin-Aptamere gegenüber ST1-B, Protein A und BSA mittels direktem ELAA.

5.2.7 DLS des Aptamer-Cholera-toxin B-Komplexes

Als weitere Bestätigung der Bindung des Aptamers CT916 an CT-B wurde DLS mit dem Protein-Aptamer-Komplex durchgeführt. Es wurde eine Vergrößerung des R_h im Vergleich zum für CT-B ermittelten R_h erwartet, da der Komplex größer als das Protein alleine sein muss. Da es sich bei dem Komplex nicht um eine perfekte Kugel handelt, liefert der R_h aber nur eine grobe Abschätzung. Im hier beobachteten Fall wurde ein R_h von $4,4 \pm 0,3$ nm ermittelt (Abb. 5.15), was einer Vergrößerung des R_h um 1,1 nm im Vergleich zu CT-B ohne Aptamer entspricht. Wie erwartet ist der Komplex also größer.

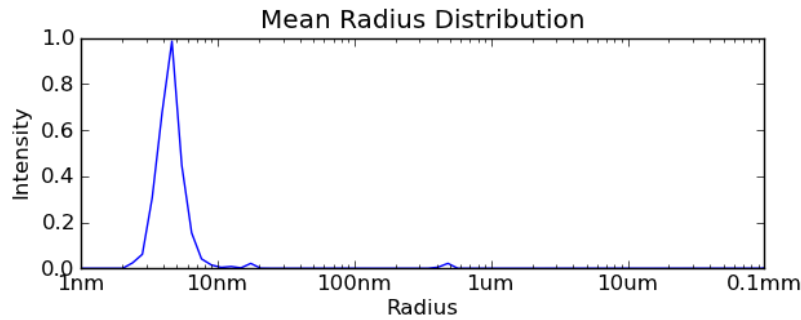


Abb. 5.15: Größenverteilung des CT-B-CT916-Komplexes nach Intensität bestimmt mit DLS.

Die in der Abbildung zu erkennenden kleinen Peaks resultieren aus einer leichten Aggregatbildung der Proteine. Diese ist aber vernachlässigbar, da die Intensität großer Partikel in der DLS überschätzt wird (d.h. Peaks sehen bei höheren Radien größer aus, als sie eigentlich sind).

5.3 Selektion von Aptameren gegen Shigatoxin 1

Nach vollendeter Cholera-toxin-SELEX wurde entschieden, in einer zweiten SELEX Aptamere gegen ein weiteres AB₅-Toxin, das Shigatoxin 1, zu selektieren. Um jegliche Kontamination aus vorangegangenen Selektionen zu vermeiden, wurde eine neue Bibliothek mit der folgenden Sequenz ausgewählt: 5'-ATCCAGAGTGACGCAGCA-N₄₀-TGGACACGGTGGCTTAGT-3'. Die Längen des randomisierten Bereichs und der Primer entsprachen mit zusammen 76 Basen denen der ersten SELEX. Zunächst wurde angestrebt, eine *Just in Time*-Selection nach dem Protokoll der ersten SELEX durchzuführen. Da allerdings mehrere Versuche erfolglos blieben, wurde angenommen, dass die Bewegung durch den magnetischen Separator unter den verwendeten Bedingungen zu stringent sei. Daher wurde das FISHing in dieser SELEX manuell durchgeführt. Das BEAMing erfolgte analog zur Cholera-toxin-SELEX.

Bei dieser Selektion wurde in Runde 1, 2, 3, 5 und 7 eine Gegenselektion mit Co²⁺-Magnetpartikeln durchgeführt. Um weiterhin die Selektivität der Aptamere zu verbessern wurde in Runde 9, 10 und 11 eine kompetitive Elution eingeführt. Der Selektionsdruck wurde im Laufe der SELEX durch die Änderung der Inkubationszeit, Anzahl der Waschschr

Waschvolumen, und Target-Menge erhöht. Nach 11 Selektionsrunden wurde die SELEX beendet.

5.3.1 Immobilisierung von ST1-B auf Magnetpartikeln

Wie auch in der Cholera-toxin-SELEX wurde das B-Pentamer als Target verwendet. Das ST1-B trägt je Monomer (7,7 kDa) einen His-Tag und eine Endopeptidase-Schnittstelle (~1,7 kDa). Um sicherzustellen, dass bei dem verhältnismäßig kleinen ST1-B keine His-Tag-Binder selektiert wurden, wurde dieses über eine koordinative Bindung auf Co^{2+} -Magnetpartikeln immobilisiert (Abb. 5.16).

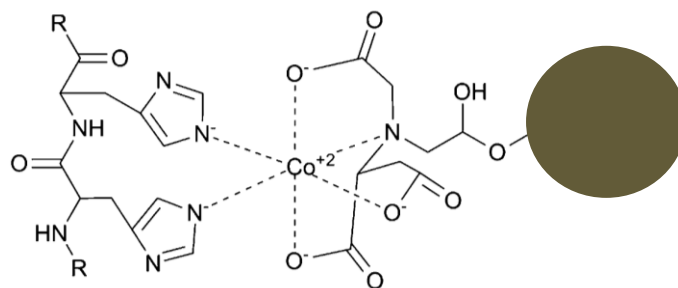


Abb. 5.16: Chelatkomplex des Co^{2+} -Ions am Magnetpartikel mit den Histidin-Seitenketten des His-Tags, modifiziert nach Credou *et al.* (2014).¹⁹²

Vor dem Beginn der SELEX wurde wie in der Cholera-toxin-SELEX ein ELISA und eine Bestimmung der Proteinkonzentration im Kopplungsüberstand zur Kontrolle der Target-Magnetpartikel-Kopplung durchgeführt (Abb. 5.17). Als Negativkontrolle dienten unmodifizierte Co^{2+} -Magnetpartikel. Die Magnetpartikel-freien Überstände wurden zur besseren Darstellung in eine Mikrotiterplatte überführt.

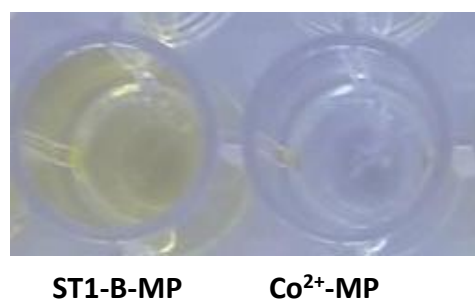


Abb. 5.17: ELISA am Magnetpartikel zum Nachweis der Kopplung des ST1-B. Links zeigt eine Gelbfärbung eine erfolgreiche Kopplung an, rechts ist die Negativkontrolle ungefärbt.

An der Gelbfärbung ist zu erkennen, dass die Kopplung des ST1-B nachgewiesen werden konnte. Die Proteinkonzentration im Überstand war mit $< 0,01$ mg/ml ebenso vernachlässigbar, wodurch die Kopplung nochmals bestätigt wurde.

5.3.2 Verlauf der Selektion

Insgesamt wurde die Shigatoxin 1-SELEX in elf Runden durchgeführt. Die Inkubation der Target- und Gegen-Magnetpartikel (unbelegte, mit Ethanolamin blockierte Magnetpartikel) mit dem Aptamerpool, die Waschschrte und die Elution wurden manuell, also ohne Verwendung des magnetischen Separators KingFisher Duo, durchgeführt. Die Amplifikation der FISHing-Eluate erfolgte mittels BEAMing in 20 Zyklen. Es wurde nach jeder Selektionsrunde eine Kontroll-PCR (20 Zyklen) und Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die mit Ethidiumbromid visualisierten doppelsträngigen Produkte der Kontroll-PCR sind in Abb. 5.18 dargestellt. Die Aptamerbibliothek wurde jeweils als Positivkontrolle und Reinstwasser als Negativkontrolle mitgeführt. Die Negativkontrolle ist nicht gezeigt.

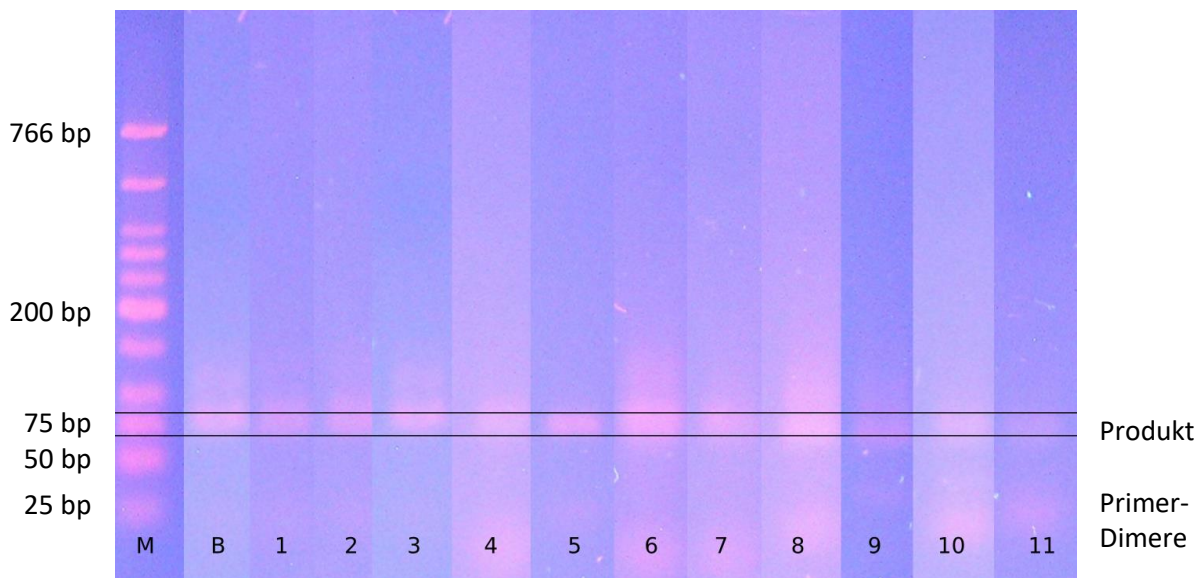


Abb. 5.18: Zusammenschnitt einzelner Agarosegele der Shigatoxin 1-SELEX. Bei einer Höhe von ca. 76 bp ist jeweils der amplifizierte Aptamerpool zu erkennen, der für die nächste Runde eingesetzt wurde. M – Marker, B – Aptamerbibliothek, Nummerierung – SELEX-Runde.

Wie auch in der Cholera-toxin-SELEX zeigt eine Bande bei 76 bp eine erfolgreich verlaufene Selektionsrunde an. War keine Bande zu erkennen, wurde ein Teil der Rückstellprobe der vorangegangenen Runde mittels BEAMing vervielfältigt und die Runde wiederholt. Da in den

Runden 1, 2, 3, 5, 7 und 8 nach der ersten Kontroll-PCR auf dem Gel nur schwache Banden zu erkennen waren, wurde nach Runde 1, 2 und 8 vor der nächsten SELEX-Runde ein weiteres BEAMing, nach Runde 3, 5 und 7 zunächst eine PCR (analog zur Kontroll-PCR) und dann ein weiteres BEAMing durchgeführt. Die FISHing-Eluatate der Runden 9 und 11 wurden zunächst mit einer PCR amplifiziert, dann wurde durch ein BEAMing nochmals amplifiziert und der Komplementärstrang abgetrennt. Dadurch konnte die ssDNA-Menge soweit erhöht werden, dass auch die nächste Selektionsrunde erfolgreich war.

Um die Selektivität der Aptamere weiter zu steigern, wurde in den letzten drei Runden statt der Hitzeelution eine kompetitive Elution durchgeführt. Dabei wurden die mit Aptamerpool inkubierten und gewaschenen Target-Magnetpartikel mit einem Überschuss an freiem ST1-B in Lösung (1 mg/ml im Selektionspuffer PBS) inkubiert. Da in diesem Fall die ST1-B-Konzentration in der Umgebung höher als an den Magnetpartikeln ist, diffundieren die spezifisch ST1-B-bindenden Aptamere vom Magnetpartikel in die Lösung.^{185,186,193} Dabei sollten Aptamere, die nicht an das ST1-B sondern an die Magnetpartikel-Oberfläche binden, am Magnetpartikel verbleiben. Eine Gesamtübersicht der Durchführung des manuellen FISHings über die Selektionsrunden ist in Tab. 4.8 dargestellt.

Diversitätsassay

Beim Diversitätsassay werden die Rückschmelztemperaturen mittels qPCR vervielfältigter Aptamerpools einzelner SELEX-Runden verglichen, um einen Einblick in die Reduktion der Sequenzdiversität im Verlauf der SELEX zu erlangen. Der Diversitätsassay der Shigatoxin 1-SELEX zeigte einen steilen Anstieg der Schmelztemperatur und damit einen schnellen Rückgang der Diversität von der Ausgangsbibliothek zu Runde 2 (Abb. 5.19). Weiterhin war ein starker Anstieg der Schmelztemperatur von Runde 4 zu Runde 6 zu beobachten. Von Runde 6 zu Runde 11 nahm die Schmelztemperatur wieder leicht ab.

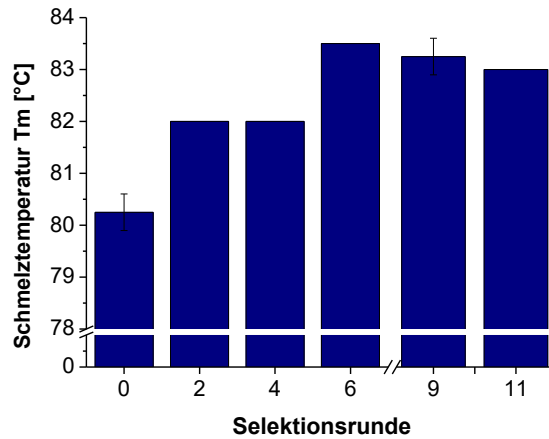


Abb. 5.19: Änderung der Schmelztemperatur der Aptamerpools im Verlauf der Shigatoxin 1-SELEX.

Eine Zunahme der Diversität nach Runde 6 ist unwahrscheinlich, obwohl dies zu einem geringen Maße auch durch zufällige Mutation während der PCR vorkommen kann. Wahrscheinlicher ist, dass in Runde 6 das Auftreten von Nebenprodukten beziehungsweise Überamplifikaten (nach Aufbrauchen der Primer durch gegenseitiges Annealing der Strände entstandene Nebenprodukte) in der Schmelzkurvenanalyse vorangegangenen qPCR die Schmelztemperatur leicht erhöht hat. Neben dem Anteil der Heteroduplexe ist außerdem der GC-Gehalt der Sequenzen für die Schmelztemperatur ausschlaggebend. Hohe GC-Gehalte begünstigen durch sogenannte *stacking*-Effekte Duplexstrukturen, während Adenin-Thymin(AT)-Bindungen destabilisierend wirken.¹⁹⁴

Insgesamt ist über den Gesamtverlauf der SELEX ein Anstieg der Schmelztemperatur und somit eine Abnahme der Diversität erkennbar, weshalb geschlossen werden kann, dass eine Anreicherung einzelner Sequenzen aus dem Ausgangspool stattgefunden hat.

5.3.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung des Aptamerpools erfolgte in der Shigatoxin 1-SELEX nach elf Runden. Wie in der vorangegangenen SELEX wurde dafür das TOPO TA Cloning Kit verwendet. Es wurden zunächst 15 Klone sequenziert. Da dadurch bereits sieben Sequenzen, davon vier mehrfach, identifiziert wurden, wurde auf die Sequenzierung weiterer Klone verzichtet. Die Aptamersequenzen sind in Tab. 5.3 mit Basenlänge und Sequenzierhäufigkeit dargestellt.

Tab. 5.3: Übersicht über die ermittelten Aptamersequenzen der Shigatoxin 1-SELEX. Die Primerregionen sind jeweils ATCCAGAGTGACGCAGCA am 5'-Ende und TGGACACGGTGGCTTAGT am 3'-Ende.

Aptamer	Aptamersequenz ohne Primerregionen (5'-3')	Länge [Basen]	Häufig- keit
ST1063	ACAATTAACATTGTGGTTAGTCTGAATGATTCGGTGCAG	76	1
ST1064	TTGGAGAGCATTGTGGTCACTGCCTGGTGGGTGTCTCGCA	76	3
ST1065	GCATGACCAGCTACGTGTTCTTGTATCGTTCGCAGTGGAGTGG	76	5
ST1066	GCACAAACGTCTGTCAATGCCCTAAGTGTACGGAACGGGTGG	76	2
ST1068	GCACCAACGTCTTGAGGTTTCAGCATTAAAGCATCATCAGCCTG	76	2
ST1075	GCACGCGAGATTGCCTTGGTTTAAACAACGACCGCTCGTGAGG	76	1
ST1076	GCATCATTAGTCTCCGTTATGATAAACTATAACCATGTTGTCGG	76	1

Alle Aptamere weisen die erwartete Länge von 76 Basen auf. Das mehrfache Auftreten einiger Sequenzen unterstützt die aus den Ergebnissen des Diversitätsassays gezogene Annahme, dass eine Anreicherung im Verlauf der Selektion erfolgt ist.

5.3.4 Strukturanalyse

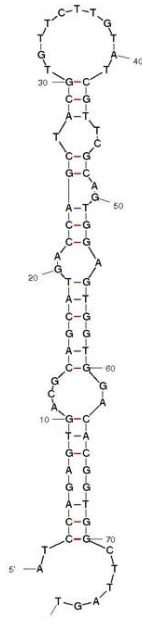
Motivanalyse

Mit dem Motivanalyseprogramm *MEME Suite* wurden im Gegensatz zur Choleratoxin-SELEX keine signifikanten Sequenzmotive vorhergesagt. Es existieren folglich keine Sequenzfamilien oder bedeutende Ähnlichkeiten zwischen den Sequenzen.

Sekundärstrukturvorhersage

Weiterhin wurden die Sekundärstrukturen der Shigatoxin 1-Aptamere mit dem Programm *mfold* vorhergesagt. Die energetisch stabilsten Sekundärstrukturvorhersagen der Aptamere ST1065 und ST1076 sind in Abb. 5.20 dargestellt.

ST1065



ST1076

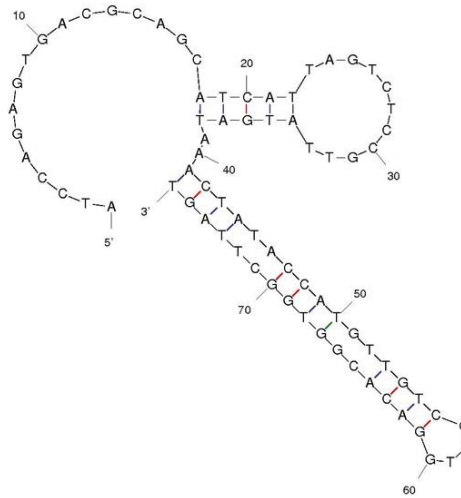


Abb. 5.20: Thermodynamisch stabilste Sekundärstrukturvorhersage für die Strukturen der Aptamere ST1065 und ST1076.

Beide Strukturen sind mit freien Faltungsenergien von ca. -7 bzw. -8 kcal/mol weniger stabil als das Cholera-toxin-Aptamer CT916. Die Faltungsenergien der anderen Aptamere der zweiten SELEX liegen im Bereich von -6 bis -12 kcal/mol (siehe Abb. 7.11 im Anhang). Die Sekundärstruktur des ST1065 besteht aus einem langen *stem* mit mehreren *stem loops* und einem offenen *stem loop* in der Primerregion. Sowohl die Vorwärts- als auch die Rückwärtsprimerregion nehmen an der Ausbildung der Sekundärstruktur teil. Die vorhergesagte Sekundärstruktur des Aptamers ST1076 ist im Gegensatz zu ST1065 verzweigt, sie beinhaltet aber ebenso eine lange *stem*-Struktur. Insgesamt sind die Strukturen weniger verzweigt als die der CT-B Aptamere (vgl. Abb. 7.10 und Abb. 7.11 im Anhang).

G-Quadruplexe

Auch für die Shigatoxin 1-Aptamere wurden unter Berücksichtigung der in der Sequenz vorkommenden Guanine mit dem *QGRS Mapper*-Tool G-Quadruplex-Strukturen vorhergesagt. Danach besitzt jedes ST1-B-Aptamer einen G-Quadruplex im nicht-randomisierten Bereich der Aptamersequenz. Die G-Quadruplexe wurden mittels CD-Spektroskopie überprüft, wobei sich bei allen Aptameren das typische Elliptizitätsprofil mit Negativpeak bei etwa 240 nm und Peak bei etwa 280 nm zeigte, welches auf das Vorhandensein von G-Quadruplexen hindeutet.^{146,195} Abb. 5.21 zeigt die Elliptizitätskurve für

ST1076 (weitere Elliptizitätskurven finden sich im Anhang in Abb. 7.13). Der *in silico* berechnete *G-Score* beträgt 18.

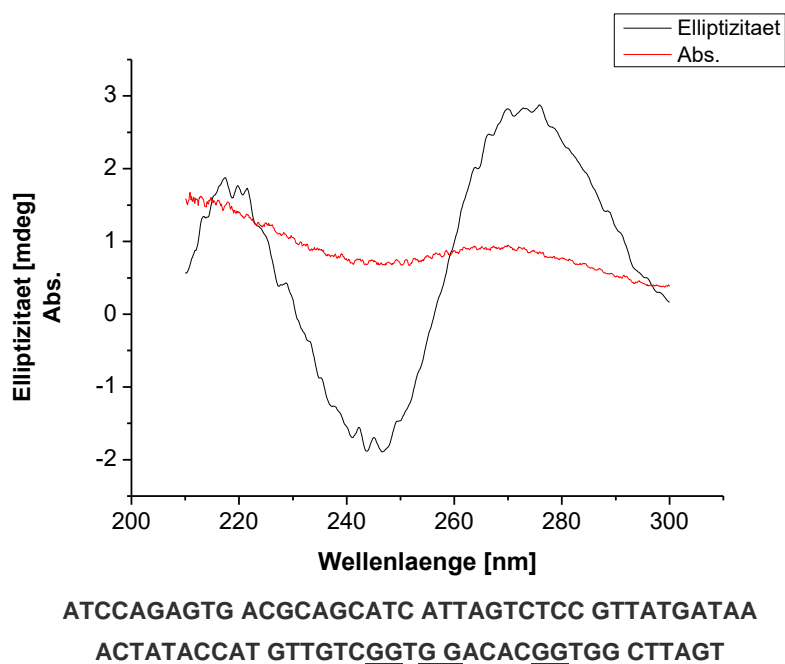


Abb. 5.21: Elliptizität des Aptamers ST1076 im Wellenlängenbereich von 210-300 nm und Aptamersequenz. Guanine, die möglicherweise an einem G-Quadruplex beteiligt sind, sind unterstrichen.

5.3.5 Bindungsstudien

Affinitätschromatographie mit qPCR-Screening

Anstatt die Bindungseigenschaften aller Aptamersequenzen einzeln zu analysieren, kann zunächst ein Screening durchgeführt werden, um gegebenenfalls schlechter bindende Aptamere von der weiteren Charakterisierung auszuschließen.¹⁹⁶ Dafür wurde für jedes Aptamer eine Affinitätschromatographie mit anschließender qPCR mit zwei Konzentrationspunkten durchgeführt. Die Affinitätschromatographie mit qPCR funktioniert im Prinzip analog zur fluoreszenzbasierten Affinitätschromatographie. Die Quantifizierung der bindenden Aptamere erfolgt allerdings über eine relative Quantifizierung mittels qPCR anstatt mittels einer Fluoreszenzmessung. Dadurch kann auf das BEAMing und den verhältnismäßig teuren Alexa488-Vorwärtsprimer verzichtet werden; stattdessen erfolgt eine relative Quantifizierung des unmarkierten Aptamers. Jedes Aptamer wurde auf 20 nM und 1 μ M in Selektionspuffer verdünnt und mit einer konstanten Menge auf Co^{2+} -Magnetpartikeln

immobilisiertem ST1-B inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die gebundenen Aptamere eluiert und mittels qPCR relativ quantifiziert. Ein kleinerer C_q -Wert bedeutet eine höhere Aptamerkonzentration im Eluat und damit somit eine höhere Aptameraffinität gegenüber dem Target (Abb. 5.22).

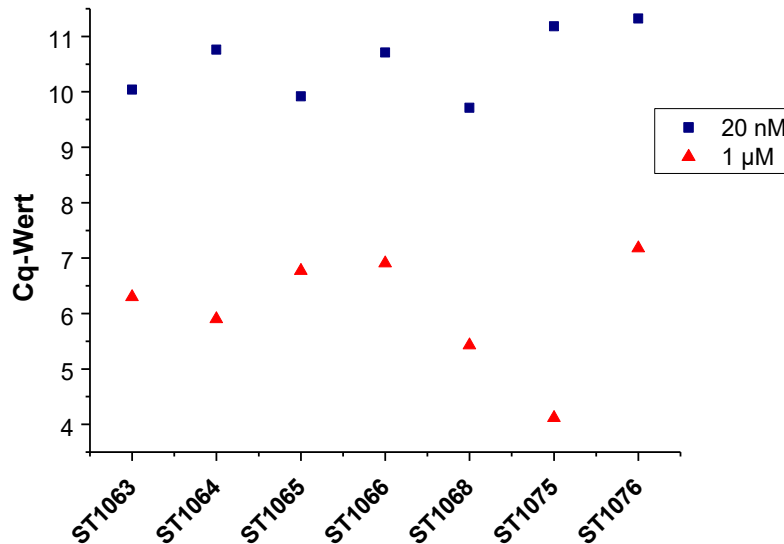


Abb. 5.22: Affinitäts-Screening der Shigatoxin 1-Aptamere mittels Affinitätschromatographie mit qPCR.

Durch das Screening konnten keine bedeutenden Unterschiede zwischen den Affinitäten der einzelnen Aptamere festgestellt werden. Lediglich das Aptamer ST1075 zeigte im Screening eine bedeutend höhere Affinität, allerdings nur bei einer Konzentration von 1 μ M. Daher wurde entschieden, die K_D -Werte aller Aptamere zu bestimmen und alle Aptamere hinsichtlich ihrer Selektivität zu untersuchen.

Affinitätschromatographie mit qPCR – Bestimmung der Dissoziationskonstante

Um mit der Affinitätschromatographie mit qPCR analog zur fluoreszenzbasierten Affinitätschromatographie K_D -Werte zu bestimmen wurde wie zuvor im Screening, allerdings mit mehr Konzentrationsstufen vorgegangen. Durch Subtraktion des C_q -Wertes von einem zuvor festgelegten Referenzwert (hier: C_q -Wert bei einer Aptamerkonzentration von 0,01 nM) ergibt sich der ΔC_q -Wert, welcher gegen die eingesetzte Aptamerkonzentration aufgetragen wird.

Im Folgenden sind die daraus erhaltenen Bestimmungskurven zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten der Aptamere ST1065 und ST1076 dargestellt (Abb. 5.23).

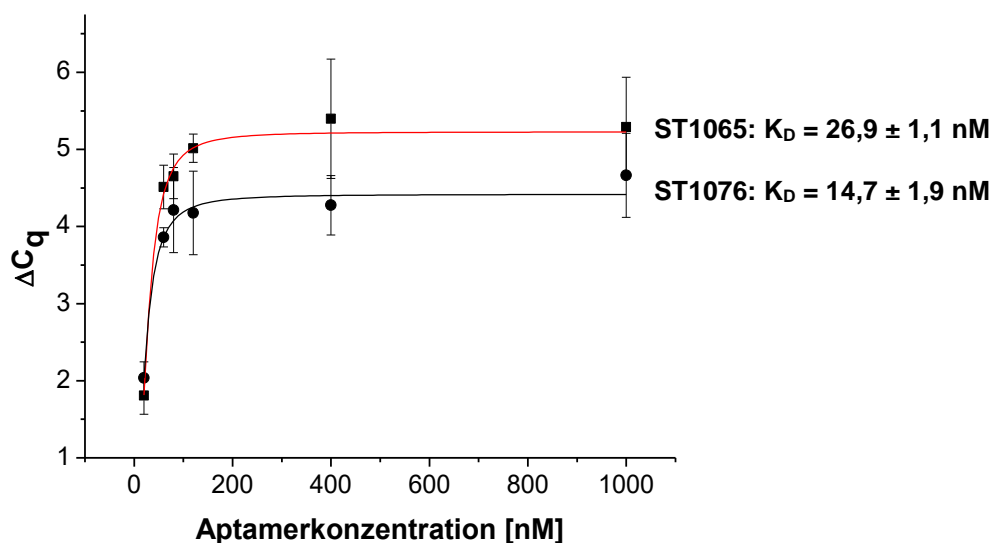


Abb. 5.23: Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Aptamere ST1065 und ST1076 mit ST1-B mittels Affinitätschromatographie mit qPCR. Die Affinitätschromatographie erfolgte im Triplikate, die Konzentration der Replikate wurde im Duplikat bestimmt.

Eine Übersicht aller auf diese Weise für die Shigatoxin 1-Aptamere berechneten Dissoziationskonstanten gibt Tab. 5.4.

Tab. 5.4: Mit Affinitätschromatographie ermittelte K_D -Werte der Shigatoxin 1-Aptamere.

Aptamer	K_D [nM]
ST1063	$56,8 \pm 1,0$
ST1064	$19,3 \pm 4,0$
ST1065	$26,9 \pm 1,1$
ST1066	$56,7 \pm 1,0$
ST1068	$14,5 \pm 1,9$
ST1075	$14,7 \pm 1,9$
ST1076	$21,7 \pm 1,0$

Die ermittelten Dissoziationskonstanten der Shigatoxin 1-Aptamere liegen in einem ähnlichen Bereich wie die der Cholera-toxin-Aptamere. Damit sind ihre Affinitäten vergleichbar mit denen anderer Aptameren gegen Bakterientoxine.¹⁸²⁻¹⁹⁰

Challa *et al.* (2014) selektierten RNA-Aptamere gegen Shigatoxin 1 und 2, konnten aber nur für Shigatoxin 2 eine Anreicherung erreichen. Dissoziationskonstanten sind nicht bekannt.¹⁹⁷

Bruno *et al.* (2016) publizierten ein Aptamer-basiertes Magnetpartikel Sandwich Assay zum

Nachweis von Shigatoxin 1, wobei über die für OTC Biotech (San Antonio, Texas, USA) patentierten Aptamere aber keine näheren Informationen verfügbar sind.¹⁹⁸

Selektivitätsmessungen

Da bei den Shigatoxin 1-Aptameren keine Vorauswahl durch wiederkehrende Motive oder besonders gute beziehungsweise schlechte Affinitäten getroffen werden konnte, wurden alle Aptamere bezüglich ihrer Selektivität untersucht. Dafür wurde analog zur K_D -Wert-Bestimmung vorgegangen. Es wurde jeweils eine festgelegte Konzentration des jeweiligen Aptamers (50 nM) mit einer festen Menge Protein (5 μ l gleich beladene Magnetpartikel) inkubiert und ΔC_q durch Abzug der C_q -Werte von einer Referenz (C_q -Wert des Referenz-Aptamers bei 0,01 nM) ermittelt. Die so bestimmten ΔC_q -Werte zeigen die Kreuzreaktivität an. Je höher ΔC_q , desto höher ist die Affinität zum jeweiligen Protein. Abb. 5.24 zeigt die Ergebnisse beispielhaft für die Aptamere ST1065 und ST1076.

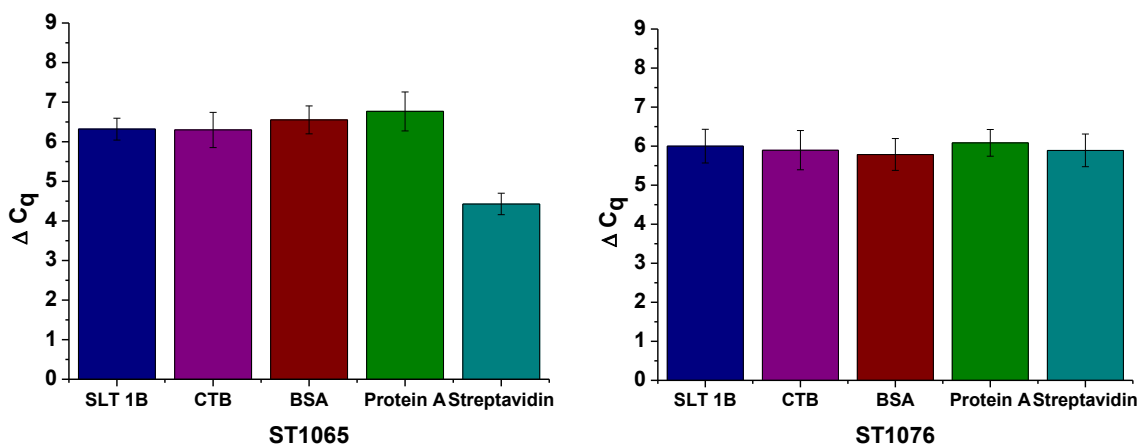


Abb. 5.24: Kreuzreaktivität ausgewählter Shigatoxin 1-Aptamere gegenüber CT-B, BSA, Protein A und Streptavidin bestimmt durch Affinitätschromatographie mit qPCR.

Die Shigatoxin 1-Aptamere binden ähnlich stark an die Vergleichsproteine und zeigen somit keine Selektivität gegenüber ihrem Target. Solche unspezifischen Bindungen sollten eigentlich durch die kompetitive Elution ausgeschlossen werden, treten aber häufig (trotzdem) auf.^{89,199,200} Ein Einsatz der Shigatoxin 1-Aptamere in Testsystemen ist folglich nur in einem Sandwich in Kombination mit einem spezifischen Binder möglich.

5.3.6 DLS des Aptamer-Shigatoxin 1-Komplexes

Weiterhin wurden die Komplexe der Aptamere ST1065 und ST1076 mit ST1-B mittels DLS gemessen, um den R_h der Aptamer-Protein-Komplexe mit dem des reinen Proteins zu vergleichen. Es wurden hydrodynamische Radien von $4,6 \pm 0,5$ nm (ST1065-ST1-B) und $4,7 \pm 0,4$ nm (ST1076-ST1-B) ermittelt (Abb. 5.25).

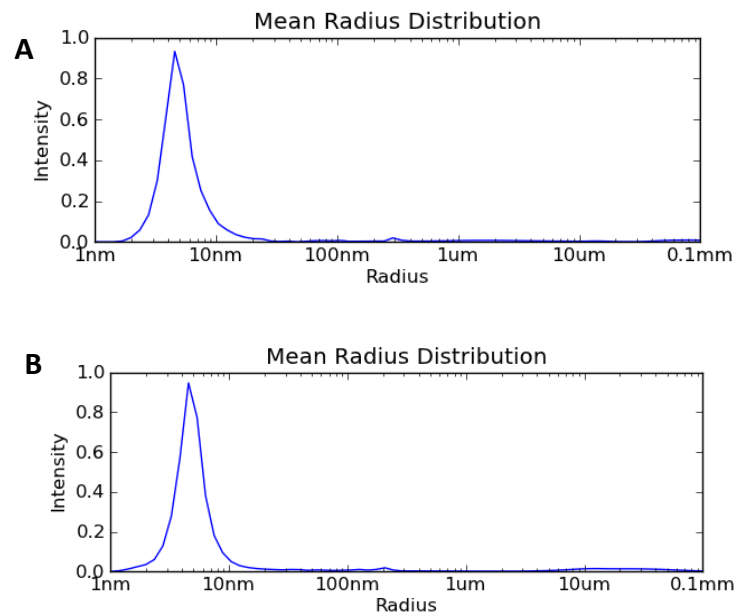


Abb. 5.25: Größenverteilung des (A) ST1065-ST1-B-Komplex und (B) ST1076-ST1-B-Komplex nach Intensität bestimmt mit DLS.

Im Vergleich zu dem für ST1-B ermittelten R_h von $3,2 \pm 0,04$ nm sind die R_h der Komplexe um 1,4 nm bzw. 1,5 nm größer.

5.4 Charakterisierung des Anti-Choleratoxin-Antikörpers und des Taubeneiweißes

Für die Entwicklung von Sandwich Assays zum Nachweis von Choleratoxin und Shigatoxin 1 wurden neben den Aptameren ein polyklonaler Antikörper und Taubeneiweiß gewählt. Diese wurden zunächst bezüglich ihrer Zusammensetzung und Bindungseigenschaften charakterisiert.

5.4.1 Anti-Choleratoxin-Antikörper

Zur Abschätzung der Reinheit wurde der polyklonale Anti-Choleratoxin-Antikörper (Kaninchen) zunächst mittels denaturierender SDS-PAGE analysiert (Abb. 5.26).

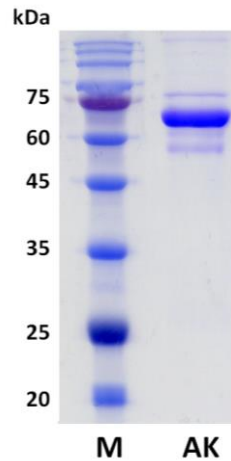


Abb. 5.26: SDS-PAGE-Analyse des Anti-Choleratoxin-Antikörperserums.
M - Marker (SMOBIO-PM-2600), AK - Anti-Choleratoxin-Antikörper

Auf dem Gel ist eine starke Bande bei etwa 70 kDa und schwächere Banden darüber und darunter zu erkennen. Die starke Bande ist wahrscheinlich auf den polyklonalen Antikörper zurück zu führen, um dies allerdings zu bestätigen müsste beispielsweise ein Western Blot durchgeführt werden. Typischerweise besteht IgG aus zwei leichten (25 kDa) und zwei schweren Ketten (50 kDa), die in der denaturierenden PAGE als zwei Banden sichtbar sind. Diese sind hier überraschenderweise nicht erkennbar.

Um eine bessere Vorstellung über die Bindungseigenschaften des Antikörpers zu bekommen, wurde die Proteinkonzentration mit BRADFORD bestimmt (60 mg/ml) und ein ELISA zur Bestimmung des K_D -Wertes durchgeführt (Abb. 5.27). Hierfür wurde CT-B in steigenden Konzentrationen auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit einer konstanten Menge des Antikörpers inkubiert. Eine CT-B-konzentrationsabhängige Farbreaktion wurde wie beim ELISA üblich über einen HRP-markierten Sekundärantikörper ausgelöst.

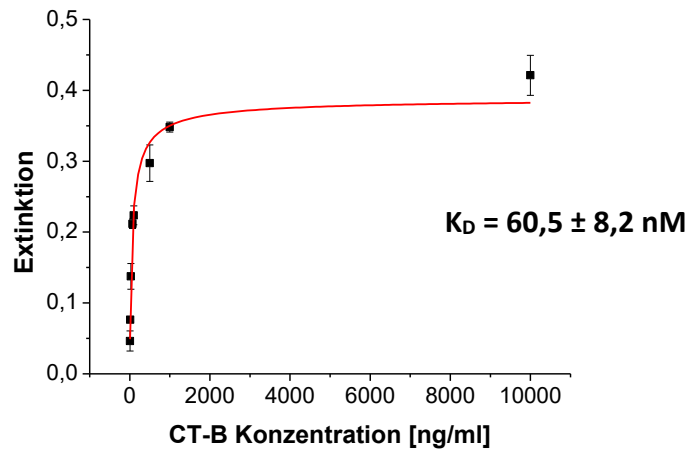


Abb. 5.27: Bestimmung der Dissoziationskonstante des Anti-Choleratoxin-Antikörperserums mittels ELISA.

Der berechnete K_D -Wert liegt bei 60,5 nM und damit im normalen Bereich für Antikörper, wobei hochaffine Antikörper deutlich niedrigere K_D -Werte haben können.^{201,202}

5.4.2 Taubeneiweiß

Taubeneiweiß besteht aus den Glykoproteinen Ovotransferrin, Ovalbumin und Ovomuroid.²⁰³ Diese drei Proteine enthalten $\alpha(1-4)\text{-Gal-}\beta(1-4)\text{-GlcNAc}$ -Termini, durch welche sie selektiv an die B-Untereinheit des Shigatoxin 1 binden.²⁰⁴ Entsprechend stellt PEW einen praktisch kostenlosen und leicht verfügbaren Ersatz für Anti-Shigatoxin 1-Antikörper dar. Li *et al.* (2017) nutzen diesen Umstand zur Entwicklung eines AuNP/MS-basierten Nachweises für Shigatoxin 1 mit einer Nachweisgrenze von etwa 10 ng/ml aus *E. coli* O157:H7 Zelllysate.⁵⁰

Die im Folgenden eingesetzten Taubeneier waren eine Schenkung des Hamburger Stadtauben e.V. Zur Gewinnung des Eiweißes wurde dieses zunächst manuell von Taubeneigelb getrennt und gefriergetrocknet. Anschließend erfolgte die Visualisierung mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (Abb. 5.28). Durch die SDS-PAGE wurden wie erwartet drei Banden detektiert, die wahrscheinlich mit den Proteinen Taubenovotransferrin, Taubenoalbumin und Taubenovomuroid korrespondieren.

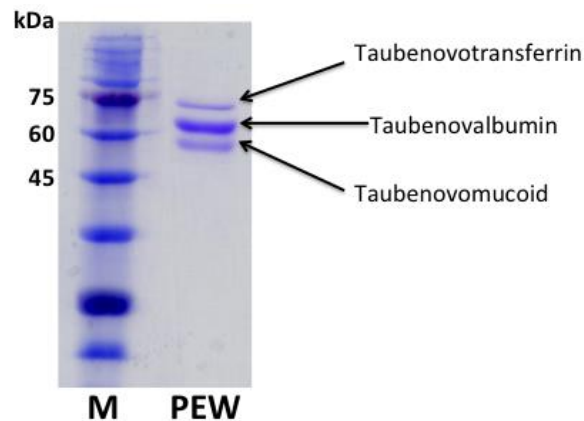


Abb. 5.28: SDS-PAGE zur Analyse des lyophilisierten Taubeneiweißes.
M – Marker (SMOBIO-PM-2600)

Für den Einsatz als Reporter im Sandwich ELAA wurde das PEW biotinyliert. Der Nachweis der Biotinylierung erfolgte durch den HABA-Assay, bei dem sich durch Zugabe des biotinylierten PEW eine Avidin-HABA-Lösung entfärbt. Es findet eine Austauschreaktion statt, da die Bindung zwischen Avidin zu Biotin stärker ist als die zu dem Farbstoff HABA.

Um die Affinität des biotinylierten PEW zu ST1-B zu überprüfen, wurde ein ELISA durchgeführt. Hierbei wurde, analog zur Affinitätsbestimmung des Anti-Choleratoxin-Antikörpers, ST1-B in steigenden Konzentrationen auf der Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Inkubation mit biotinyliertem PEW folgte eine Inkubation Streptavidin-HRP. Anschließend wurde durch Zugabe einer Färbelösung eine konzentrationsabhängige Farbreaktion ausgelöst. Durch Auftragen der gemessenen Extinktion in Abhängigkeit von der ST1-B-Konzentration und *Hill-Fit* wurde ein K_D -Wert von 37,5 nM bestimmt (Abb. 5.29).

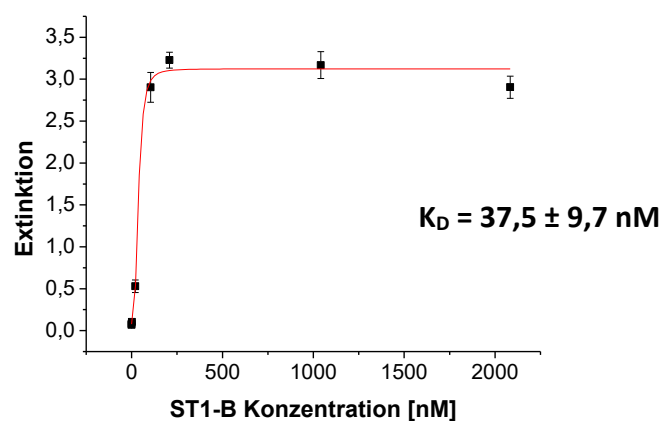


Abb. 5.29: Bestimmung der Dissoziationskonstante des biotinylierten Taubeneiweißes mittels ELISA.

5.5 Anwendungen des Aptamers CT916

Nach intensiver Charakterisierung des Aptamers CT916 wurde dieses zum einen für den Einsatz zur Aufreinigung aus Zellresten und zum anderen zur Entwicklung von Testsystemen zum Nachweis von Cholera toxin eingesetzt.

5.5.1 Affinitätsanreicherung aus Zellpellets

Bei der Herstellung rekombinanten Proteins wird standardmäßig ein *E. coli* Stamm mit einem Vektor transformiert, der einen für das zu exprimierende Protein codierenden Genabschnitt trägt. Dieser Genabschnitt enthält in der Regel zusätzlich eine Markierung, die für einen His-Tag oder Glutathion-S-Transferase(GST)-Tag (mit Affinität zu Glutathion) zur späteren Aufreinigung des Proteins codiert. Nach Induktion und ausreichender Expression wird das lösliche Protein von den unlöslichen Zellbestandteilen getrennt, um später über ein Nickel-NTA- beziehungsweise Glutathion-Resin aufgereinigt zu werden. In den Zellbestandteilen (*inclusion bodies*) kann allerdings teilweise ungefaltetes Protein zurückbleiben.

Die Aptamer-basierte Affinitätsanreicherung kann prinzipiell sowohl direkt aus Zelllysat sowie aus dem Zellpellet erfolgen, sofern dieses noch Protein enthält. Die Anreicherung aus Zelllysat wurde bereits für mehrere Proteine publiziert.²⁰⁵⁻²⁰⁸ Im hier dargestellten Ansatz wurden dafür die Zellpellets verwendet (Abb. 5.30). Der Ansatz kann aber problemlos auf

Zelllysate übertragen werden. Weiterhin ist denkbar, die Anreicherung mit einem ELAA oder LFA wie nachfolgend beschrieben (5.5.2 und 5.5.3) zu koppeln, um so von *V. cholerae* gebildetes Cholera-toxin in einer Anreicherungskultur (d.h. in der Nährbuillon) nachzuweisen.

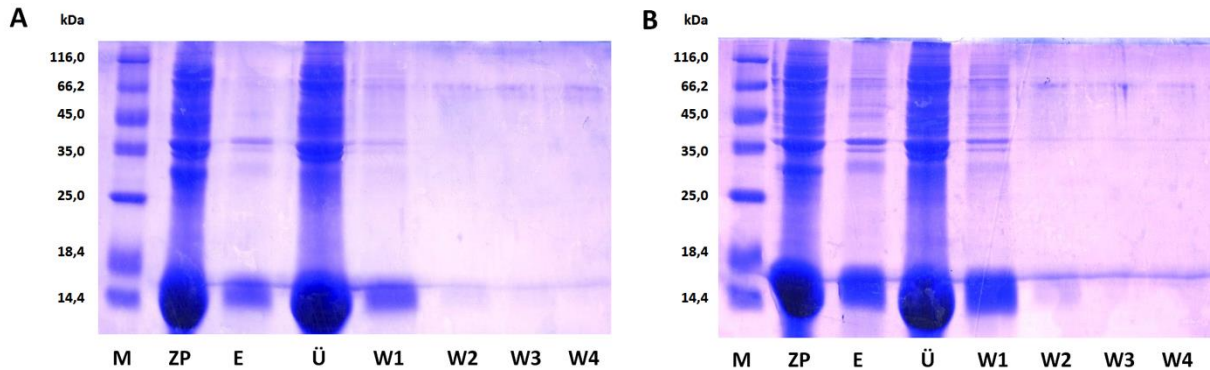


Abb. 5.30: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE Gele der Aptamer-basierten Affinitätsanreicherung von CT-B aus Zellpellets durch (A) Ethanolamin-blockierte CT916-Magnetpartikel und (B) BSA-blockierte CT916-Magnetpartikel. M – Marker, ZP – Zellpellet, E – Eluat nach Anreicherung, Ü – Überstand nach Inkubation, W1-4 – Waschüberstände 1-4.

Als Referenz wurde dasselbe Protokoll mit Dynabeads His-Tag Isolation und Pulldown (Co^{2+} -Magnetpartikeln) durchgeführt (Abb. 5.31). Diese binden spezifisch an den His-Tag und wurden auch in der ST1-B-SELEX zur Target-Immobilisierung eingesetzt.

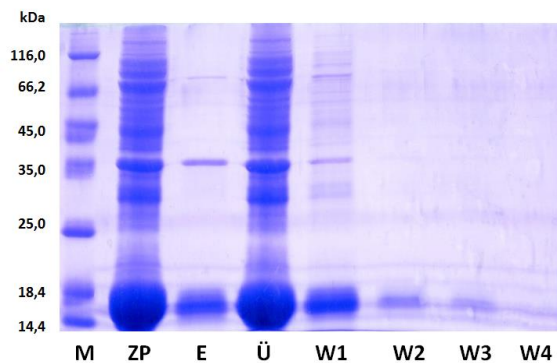


Abb. 5.31: Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel der Aptamer-basierten Affinitätsanreicherung von CT-B aus Zellpellets durch Co^{2+} -Magnetpartikel. M – Marker, ZP – Zellpellet, E – Eluat nach Anreicherung, Ü – Überstand nach Inkubation, W1-4 – Waschüberstände 1-4.

Auf allen drei Gelen ist eine sehr starke Bande bei etwa 14 kDa zu erkennen, was dem unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE erwarteten Monomer des CT-B entspricht. Zusätzlich lassen sich auf dem Referenzgel Banden zwischen 35 und 45 kDa und knapp über

66 kDa erkennen, was entsprechend für das in kleinen Mengen vorliegende Tri- und Pentamer spricht (vgl. Western Blot Abb. 5.1). Zumindest die etwas stärkere Bande zwischen 35 und 45 kDa ist auch auf den Gelen der Aptamer-basierten Affinitätsanreicherung zu erkennen. Im Vergleich der Magnetpartikel-Blockierungen ist das Eluat der mit Ethanolamin blockierten Magnetpartikel deutlich reiner. Das kann damit begründet werden, dass die Zellbestandteile vermutlich stärker mit dem Protein BSA interagieren als mit der niedermolekularen Substanz Ethanolamin. Die Aptamere scheinen also in der Lage zu sein, CT-B im Zellpellet spezifisch zu binden. Das CT-B kann anschließend eluiert und direkt verwendet werden.

Generell hat eine Aptamer-basierte Aufreinigung den Vorteil, dass kein His- oder GST-Tag am Protein zur Aufreinigung notwendig ist. Das ist besonders hilfreich, wenn zum Beispiel für Kristallisationsversuche oder andere biotechnologische Anwendungen ein Tag-freies Protein benötigt wird. Der Tag kann zwar enzymatisch entfernt werden, allerdings besteht dabei auch die Gefahr eines teilweisen Verdaus des Proteins. Wird die Aptamer-basierte Affinitätsaufreinigung verwendet können theoretisch auch mehrere Proteine ohne Tag co-exprimiert und einzeln spezifisch aufgereinigt werden.²⁰⁹ Die Anreicherung aus Zellpellets hat zudem den Vorteil, dass so auch unzugängliches Protein, das ansonsten ggf. mit den Zellpellets verworfen wird, noch nutzbar gemacht werden kann. Dies ist besonders bei sehr teuren Proteinen interessant, beispielsweise kostet kommerzielles CT-B über 500 € pro Milligramm.

5.5.2 Magnetpartikel-basiertes Sandwich Enzyme-linked Aptamer Assay

Der Magnetpartikel-basierte Sandwich Enzyme-linked Aptamer Assay (ELAA) ist eine Aptamer-basierte Abwandlung des Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA). Anstatt eines Fänger-Antikörpers, der auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert wird, wird beim Magnetpartikel-Sandwich ELAA ein Fänger-Aptamer auf Magnetpartikeln immobilisiert. Aptamer-funktionalisierte Magnetpartikel eignen sich als Fänger von Zielmolekülen aus verschiedenen Matrices und können je nach Linker-Chemie auch wiederverwendet werden.²¹⁰ Die Detektion erfolgte hier wie beim klassischen ELISA mittels eines Primär- und eines markierten Sekundärantikörpers (Abb. 5.32). Sie kann prinzipiell, sofern verfügbar, auch durch ein markiertes Reporter-Aptamer erfolgen.

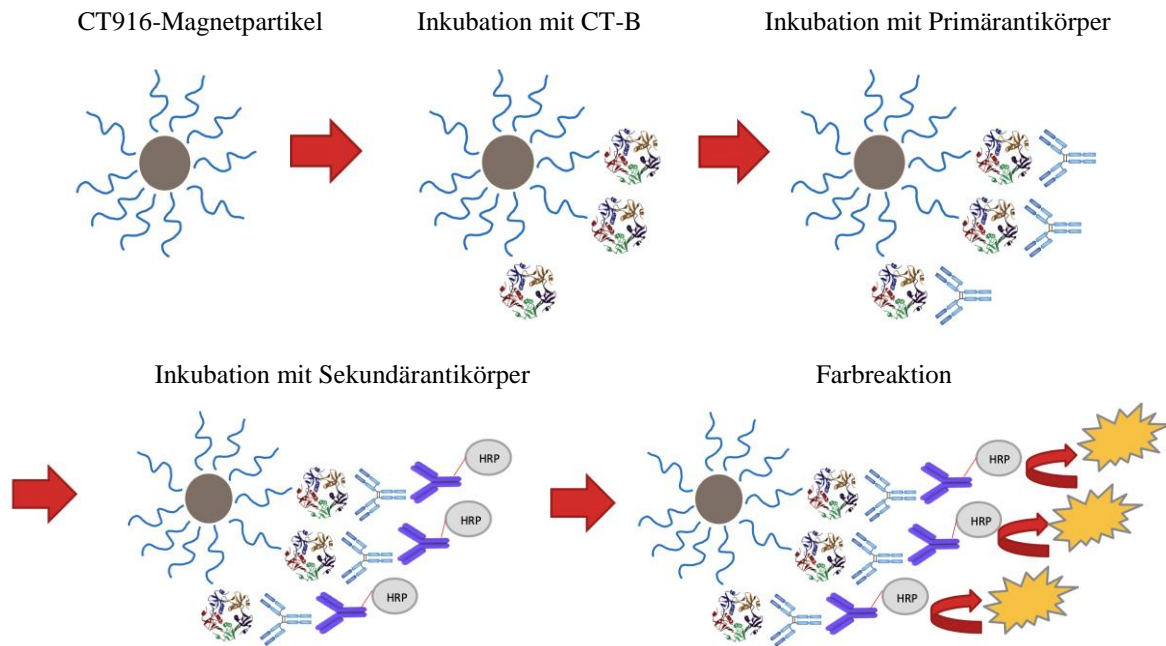


Abb. 5.32: Schematischer Ablauf des Magnetpartikel Sandwich ELAA für Cholera toxin. Die Aptamer-funktionalisierten Fänger-Magnetpartikel werden nacheinander mit der Probe, dem Primär- und dem Sekundärantikörper sowie der Färbelösung inkubiert.

Dot Blot

Um zu überprüfen, ob eine gleichzeitige Bindung des Aptamers und des Anti-Cholera toxin-Antikörpers möglich ist, wurde zunächst ein Dot Blot durchgeführt (Abb. 5.33). Dafür wurden die biotinylierten Aptamere mit NeutrAvidin inkubiert und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Nach einer Inkubation mit CT-B und anschließend mit Primär- und Sekundärantikörper wurde eine Farbreaktion ausgelöst. Als Positivkontrolle wurde CT-B, als Negativkontrolle ST1-B auf der Membran immobilisiert.

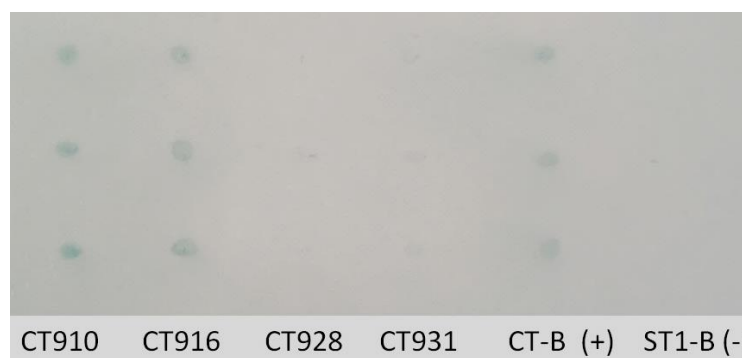


Abb. 5.33: Dot Blot mit Cholera toxin-Aptameren als Fänger und Anti-Cholera toxin-Antikörper und HRP-Sekundärantikörper als Reporter.

Der Dot Blot war für die Aptamere CT910, CT916 und CT931 positiv. Da polyklonale Antikörper verwendet wurden, war es auf Grund der Bindung an unterschiedliche Epitope sehr wahrscheinlich, dass Aptamere und Antikörper gleichzeitig binden können.

Magnetpartikel Sandwich ELAA

Da Aptamer CT916 eine gute Bindungsaffinität mit sehr guter Selektivität gegenüber CT-B aufweist und zusätzlich die Bindung des Anti-Choleratoxin-Antikörpers nicht stört, wurde dieses Aptamer als Fänger für den Magnetpartikel-Sandwich ELAA ausgewählt.

Zur Optimierung wurden als nächstes verschiedene Magnetpartikel (SiMAG Carboxyl, Carboxyl-beschichtet und Dynabeads MyOne C1, Streptavidin-beschichtet) sowie Ethanolamin und BSA als Blockierungsmittel der Carboxyl-Magnetpartikel nach Aptamer-Kopplung verglichen.

Dafür wurde Amin-C6-modifiziertes CT916 in Gegenwart von EDC kovalent an die aktivierten Carboxylgruppen der Carboxyl-Magnetpartikel gekoppelt. Freie Carboxylgruppen wurden anschließend entweder mit BSA oder Ethanolamin abgesättigt. Biotinyliertes CT916 wurde durch Inkubation mit Streptavidin-Magnetpartikeln an die Magnetpartikeloberfläche gekoppelt. Eine Blockierung ist nicht notwendig, da die sehr starke nicht-kovalente Bindung zwischen Biotin und Streptavidin sehr spezifisch ist.

Anschließend wurden Verdünnungsreihen von CT-B in PBS-Puffer hergestellt und der ELAA mit allen drei Magnetpartikeltypen durchgeführt und verglichen (Abb. 5.34).

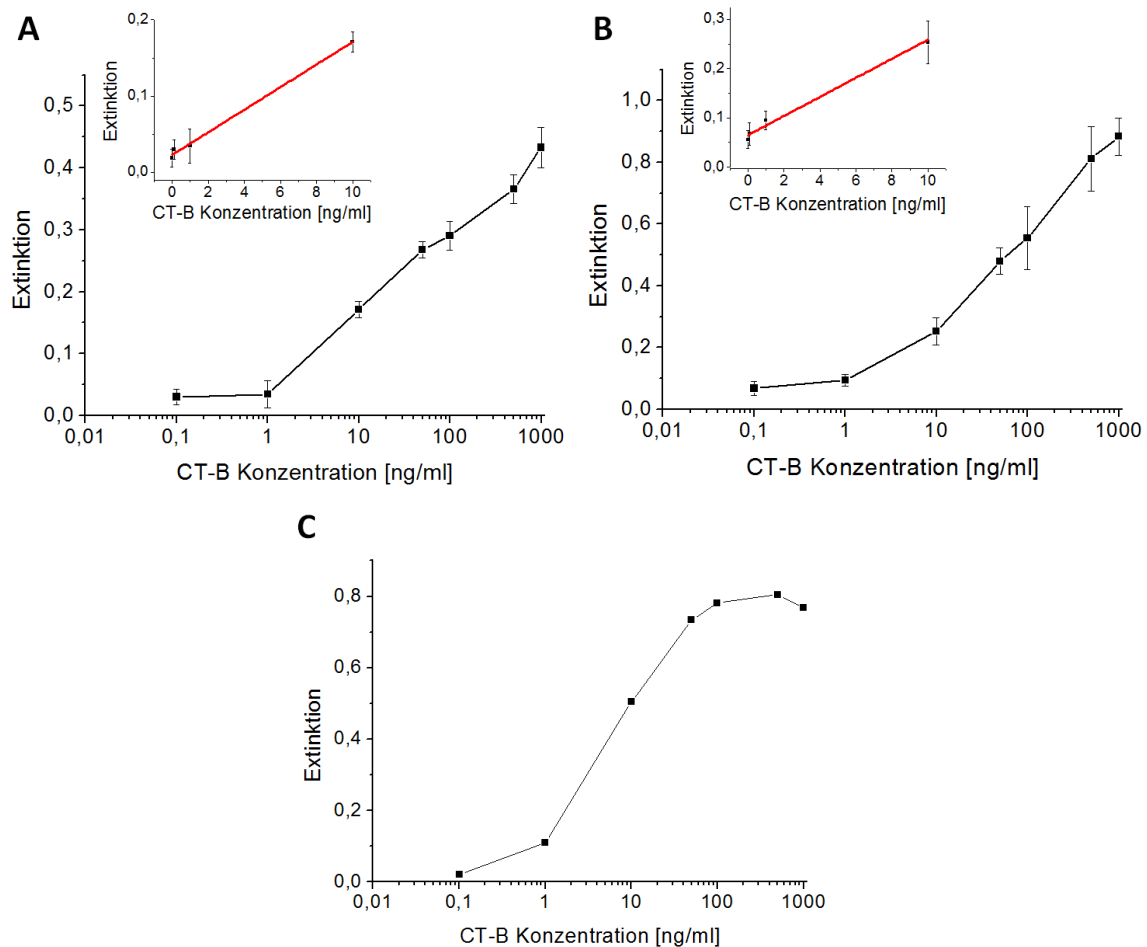


Abb. 5.34: Magnetpartikel Sandwich ELAA mit (A) Ethanolamin-blockierten CT916-Carboxyl-Magnetpartikeln, (B) BSA-blockierten CT916-Carboxyl-Magnetpartikeln und (C) CT916-Streptavidin-Magnetpartikeln als Fänger und Anti-Choleratoxin-Antikörper mit HRP-markiertem Anti-Kaninchen-Antikörper als Reporter. Im Einschub ist jeweils der nicht-logarithmische lineare Bereich dargestellt.

Den oben dargestellten Ergebnissen ist zu entnehmen, dass sich der Enzyme-linked Aptamer Assay generell und alle drei Magnetpartikeltypen im Speziellen für den Nachweis von Choleratoxin in PBS-Puffer eignen. Mit jedem der drei Ansätze war es möglich, CT-B in sehr niedrigen Konzentrationen und in einem großen logarithmisch-linearen dynamischen Bereich nachzuweisen.

Das niedrigste Hintergrundsignal und damit die größte Spezifität wurde analog zur Affinitätsanreicherung mit Ethanolamin-blockierten Carboxyl-Magnetpartikeln erreicht; wahrscheinlich auf Grund der Tatsache, dass die Nachweis-Antikörper wenig bis keine unspezifische Wechselwirkung mit Ethanolamin zeigen. Mit mit BSA blockierten Magnetpartikeln wurde ein etwas höheres Hintergrundsignal mit einem ähnlichen

logarithmisch-linearen dynamischen Bereich (1 ng/ml bis 1000 ng/ml) erhalten. Mit Streptavidin-Magnetpartikeln war das Hintergrundsignal vergleichbar, jedoch war der logarithmisch-lineare dynamische Bereich kürzer (1 ng/ml bis 100 ng/ml). Auf Grund ihrer beträchtlich höheren Kosten und der Tatsache, dass Streptavidin bei höheren Temperaturen denaturiert und somit die Magnetpartikel nicht wiederverwendet werden können, wurden die Streptavidin-Magnetpartikel nach Vorversuchen (Einfachbestimmung) nicht weiter miteinbezogen.

Als nächstes wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowohl für den ELAA mit Ethanolamin-blockierten als auch mit BSA-blockierten Magnetpartikeln berechnet. Dafür wurde der nicht-logarithmische lineare Bereich von 0 bis 10 ng/ml verwendet. Die Werte wurden mit *Origin Pro 8G* linear angepasst. Dabei wurden folgende Geradengleichungen erhalten:

$$\text{Ethanolamin: } y = 0,023 + 0,015x \quad R^2 = 0,99 \quad (2)$$

$$\text{BSA: } y = 0,065 + 0,019x \quad R^2 = 0,95 \quad (3)$$

Als Nachweisgrenzen wurden 2,1 ng/ml für Ethanolamin-blockierte Magnetpartikel und 2,3 ng/ml für BSA-blockierte Magnetpartikel berechnet. Die Bestimmungsgrenzen betragen 6,9 ng/ml und 7,8 ng/ml. Insgesamt eignen sich also mit Ethanolamin blockierte Magnetpartikel am besten für die Immobilisierung der Fänger-Aptamere.

Sowohl die Nachweisgrenze als auch der dynamische Bereich sind vergleichbar mit dem standardmäßig durchgeführten VET-RPLA und ELISA zum Cholera-toxin-Nachweis.³¹ Auch ein kürzlich beschriebener elektrochemischer Sensor für den Cholera-toxin-Nachweis hat eine vergleichbare Nachweisgrenze (Tab. 1.2).³³

Magnetpartikel ELAA in Leitungswasser

Nach erfolgreicher Optimierung des Magnetpartikel-Sandwich ELAA in Puffer wurde dieser zum Nachweis von CT-B in Leitungswasser (Nordheide Wasserwerke) eingesetzt.

Da das Cholera-toxin erst im Darmlumen von *V. cholerae* in großer Menge sekretiert wird, ist ein Vorkommen des Cholera-toxins in Leitungswasser eher unwahrscheinlich. Es könnte aber beispielweise im Kontext von Bioterrorismus in Leitungswasser eine Rolle spielen.^{34,211}

Für den Nachweis wurde Leitungswasser mit CT-B auf finale Konzentrationen von 0,1 ng/ml bis 1000 ng/ml dotiert und der Assay wie oben durchgeführt (Abb. 5.35).

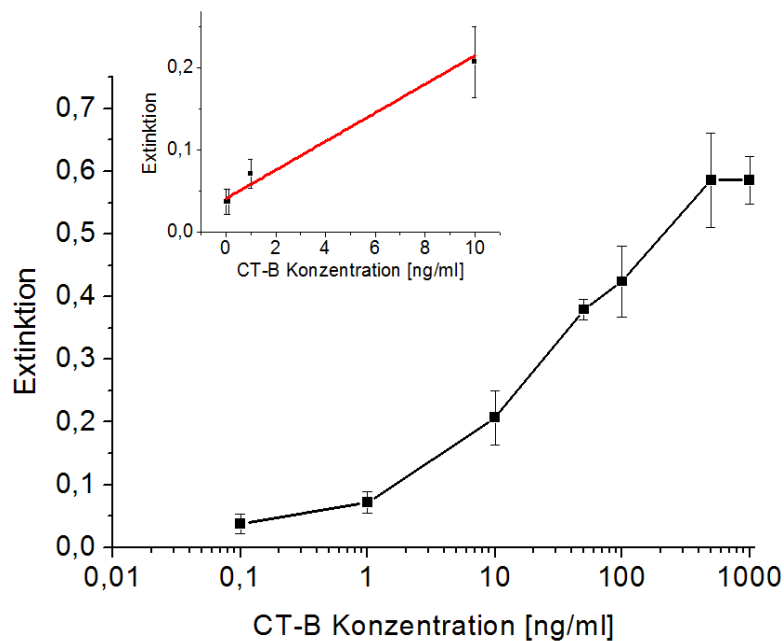


Abb. 5.35: Magnetpartikel Sandwich ELAA in Leitungswasser mit Ethanolamin-blockierten CT916-Carboxyl-Magnetpartikeln als Fänger und Anti-Choleratoxin-Antikörper mit HRP-markiertem Anti-Kaninchen-Antikörper als Reporter. Im Einschub ist jeweils der nicht-logarithmische lineare Bereich dargestellt.

Die Daten wurden analog zu oben ausgewertet, wodurch eine Nachweisgrenze von 2,4 ng/ml und eine Bestimmungsgrenze von 7,7 ng/ml ermittelt wurden. Für die Berechnung wurde die folgende Geradengleichung eingesetzt:

$$y = 0,041 + 0,017x \quad R^2 = 0,93 \quad (4)$$

Die Matrix Leitungswasser scheint demnach die Leistungsfähigkeit des Assays nicht zu beeinträchtigen. Insgesamt benötigt der Assay wie hier beschrieben 3,5 h.

Magnetpartikel Sandwich ELAA mit dualen Aptameren

Da es erstrebenswert ist, die Antikörper nicht nur als Fänger sondern auch als Reporter zu ersetzen, wurde getestet, ob sich eines der Aptamere CT916, CT910, CT931 und CT928 als Reporter eignet. Dafür wurden die Primärantikörper durch biotinyliertes Aptamer und der

Sekundärantikörper durch Streptavidin-HRP ersetzt. Die gemessenen Extinktionen sind in Abb. 5.36 dargestellt.

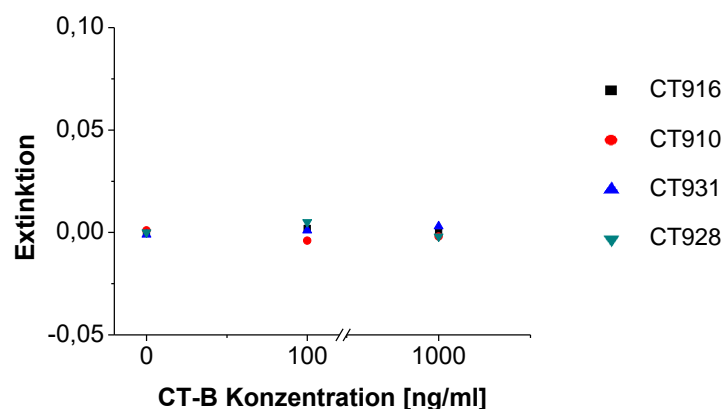


Abb. 5.36: Magnetpartikel Sandwich ELAA mit CT916-Carboxyl-Magnetpartikeln als Fänger und biotinyliertem CT916, CT910, CT931 oder CT928 in Kombination mit Streptavidin-HRP als Reporter.

Es konnte keine konzentrationsabhängige Steigerung des Signals erzielt werden. Eine Begründung dafür könnte sein, dass die Aptamere an dieselbe oder eine überlappende Bindungsstelle binden. Ein rein Aptamer-basierter Magnetpartikel ELAA ist daher nicht realisierbar.

5.5.3 Lateral Flow Assays

Lateral Flow Assays zeichnen sich besonders dadurch aus, dass sie kostengünstig in Entwicklung und Produktion sind, eine hohe Lagerstabilität besitzen und sich sehr schnell auch von ungeschultem Personal durchführen und interpretieren lassen. Entsprechend gewinnen sie in der patientennahen Diagnostik an Bedeutung.¹¹⁵ Sie sind vor allem für den Einsatz in Ländern geeignet, die Zugriff auf teure analytische Ausstattung und ausgebildetes Personal entbehren. Dazu gehören auch die Länder, in denen die Cholera heute noch ein ernst zu nehmendes Problem darstellt. Wie die meisten Schnelltests basieren auch LFAs traditionell auf Antikörpern, wobei Aptamere als Alternative genutzt werden können.¹⁹⁵

Antikörper-basierte Lateral Flow Assays sind bereits für eine Reihe von Bakterientoxinen verfügbar,^{47,212,213} die Anzahl publizierter Aptamer LFAs ist allerdings noch sehr limitiert.¹¹⁶ Im Folgenden ist die Entwicklung von vier verschiedenen Aptamer-basierten LFAs beschrieben.

Aptamer-modifizierte AuNPs

Zunächst wurden AuNPs nach dem von Schulz *et al.* (2016) beschriebenen Protokoll synthetisiert.²¹⁴ AuNPs werden in der Regel als Signalgeber in LFAs favorisiert, da sie relativ günstig und einfach zu synthetisieren sind und sich leicht durch Chemisorption modifizieren lassen.¹¹³ Größe und Form wurden mittels TEM überprüft (Abb. 5.37). Durch automatische Analyse mit dem Programm *ImageJ* wurde ein durchschnittlicher Durchmesser von $14,1 \pm 2,7$ nm erhalten. Mittels UV/Vis Spektroskopie wurde eine Konzentration von 2 nM abgeschätzt.

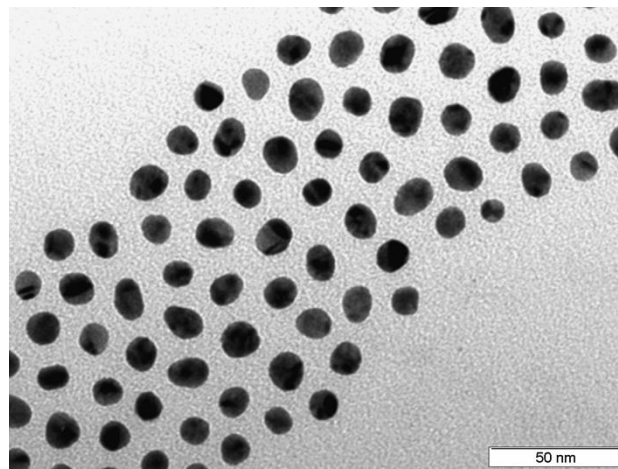


Abb. 5.37: TEM-Aufnahme einiger Goldnanopartikel.

Anschließend wurden zwei Methoden für die Kopplung der Aptamere an die AuNP-Oberfläche etabliert, die beide gleichwertige Ergebnisse lieferten und sich lediglich geringfügig bezüglich der eingesetzten Volumina und Puffer in der Durchführung unterschieden. Dafür wurde jeweils 5'-Thiol-C6-modifiziertes CT916 mit den AuNPs inkubiert und die Belegungsichte über ein sogenanntes *salt aging* angepasst. Das *salt aging* dient dazu, die sterischen Hinderungen zwischen den negativ geladenen DNA-Strängen zu minimieren und dadurch die Belegungsichte zu erhöhen.¹⁵² Dieser Schritt ist unerlässlich, da die AuNPs bei einer zu geringen Belegungsichte beim Aufkonzentrieren zum Aggregieren neigen (was an einer Blauverschiebung des Absorptionsmaximums erkennbar ist). Für erfolgreich Aptamer-gekoppelte AuNPs lag die mittels Quantus Fluorometer bestimmte ssDNA-Konzentration knapp über 1 ng/ml bei einer AuNP-Konzentration von ca. 35 nM.

GM1-Liposomen

Liposomen sind von einer Lipiddoppelschicht umgebene Vesikel, die viele tausend Farbstoffmoleküle einschließen können (Abb. 5.38). Dadurch kann im Vergleich zu Nanopartikeln eine beträchtliche Signalverstärkung erzielt werden.¹⁵⁶ Sie wurden als alternative Signalgeber für die LFA-Entwicklung eingesetzt.

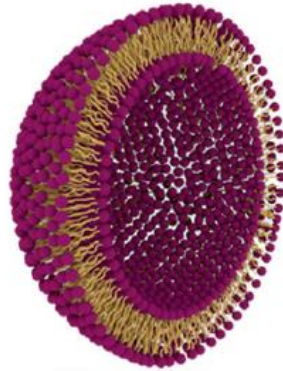


Abb. 5.38: Schematische Darstellung eines Liposoms, modifiziert nach Fenzl *et al.* (2016).¹⁵³

Das Gangliosid GM1, welches den natürlichen Zellrezeptor für Cholera toxin im Darmlumen darstellt, besteht aus einem lipophilen Ceramidschwanz und einem Polysaccharidrest, über welchen wiederum die Bindung des Cholera toxins stattfindet. Der Ceramidschwanz kann während der Liposomensynthese in die Lipiddoppelschicht eingefügt werden. Der Polysaccharidrest wird dann sowohl im Liposomenlumen als auch auf der Liposomenoberfläche präsentiert. Da es sich bei GM1 um den natürlichen Zellrezeptor für Cholera toxin handelt, ist eine sehr hohe Affinität zu dem Toxin zu erwarten.³²

Der hydrodynamische Durchmesser der Liposomen wurde mittels DLS als 182 ± 83 nm bestimmt (Abb. 5.39). Der Polydispersitätsindex lag bei 0,21. Damit sind die Liposomen erwartungsgemäß und ein Vielfaches größer als die AuNPs.

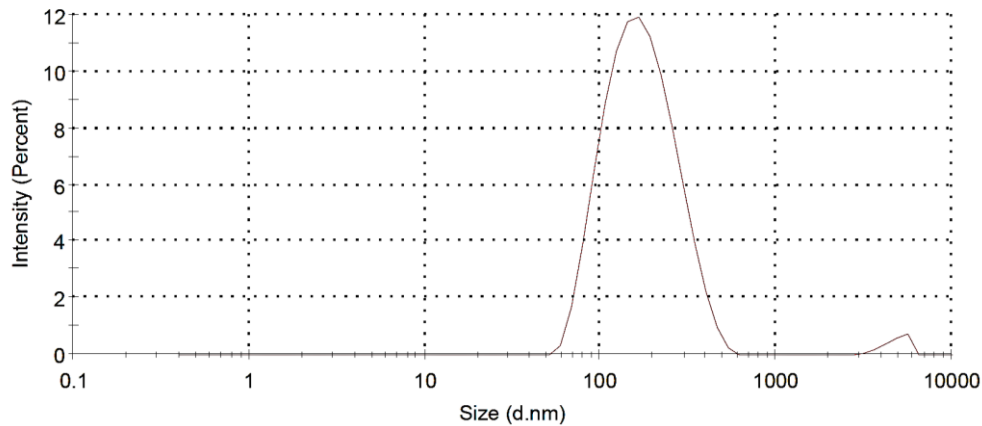


Abb. 5.39: Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers der GM1-Liposomen mittels DLS nach Intensität.

Das Zeta-Potential, welches das elektrokinetische Potential eines kolloidalen Partikels in Lösung beschreibt, gibt Aufschluss über die Stabilität der Liposomen. Es ist ein Maß für die Stärke der elektrostatischen Abstoßung zwischen einzelnen Partikeln. Je kleiner der Zahlenwert des Potentials, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass Partikel aggregieren.²¹⁵ Für die GM1-Liposomen wurde ein Zeta-Potential von -27 ± 0 mV bestimmt. Damit sind die Liposomen als moderat stabil (± 20 -30 mV) zu klassifizieren und negativ geladen.²¹⁶

Kompetitiver Assay

Zunächst wurde ein kompetitiver Lateral Flow Assay zum Nachweis des Cholera-toxins mit Aptamer-gekoppelten AuNPs als Signalgeber entwickelt. Der kompetitive Ansatz wird in der Regel vor allem zum Nachweis von kleinen Targets verwendet, die nicht über multiple Bindungsstellen verfügen. Der nachfolgend beschriebene kompetitive Assay beruht auf der Konkurrenz von CT-B in Lösung mit auf der NC-Membran immobilisiertem CT-B um Bindung an die an AuNPs gekoppelten Aptamere (Abb. 5.40). Die AuNPs@CT916 werden mit steigender CT-B-Konzentration zunehmend gesättigt und können daher weniger an das CT-B auf der Testlinie (TL) binden. Eine schwächer werdende Testbande bedeutet also im kompetitiven LFA eine steigende Analytenkonzentration. Alternativ könnte auch die Konkurrenz mit einem Komplementärstrang oder Fragment dessen genutzt werden, sofern die Affinität des Aptamers zum Target höher ist.

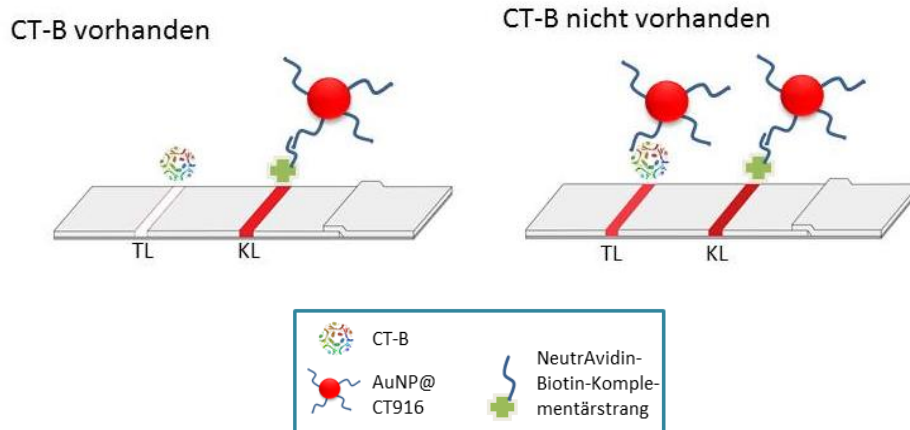


Abb. 5.40: Schematische Darstellung des kompetitiven Lateral Flow Assays zum Nachweis von Cholera-Toxin. Ist CT-B in der Probe vorhanden werden die AuNPs@CT916 zunehmend besetzt und binden daher nicht mehr an die Testlinie (TL). An der Kontrolllinie (KL) werden entweder freie AuNPs@CT916 gebunden oder gebundenes CT-B wird ersetzt.

Für die Kontrolllinie (KL) wurde ausgenutzt, dass das Aptamer CT916 eine stärkere Affinität zu seinem Komplementärstrang als zum Target aufweist. Entsprechend wurde mit NeutrAvidin vorinkubierter 5'-biotinylierter Rückwärtsprimer (18 Basen) über die sehr starke nicht-kovalente Bindung zwischen NeutrAvidin und Biotin auf der Membran immobilisiert. Das Signal an der Kontrolllinie wird entweder durch unbesetzte AuNPs@CT916 ausgelöst, oder das an die AuNPs gebundene CT-B wird beim Erreichen der Kontrolllinie durch den Komplementärstrang ersetzt.

Optimierung

Zur der Optimierung wurden zunächst AuNP-Volumen (Abb. 5.41 1abc), Inkubationszeit (Abb. 5.41 2ab) und Porengröße der NC-Membran (Abb. 5.41 3abcd) variiert. Alle anderen Parameter wurden jeweils konstant gehalten.

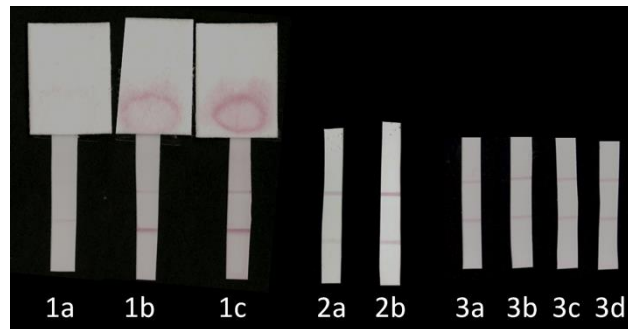


Abb. 5.41: Optimierung von AuNP-Volumen, Membranporengröße und Inkubationszeiten für den kompetitiven LFA. 1a: 2 µl AuNPs@CT916, 1b: 5 µl AuNPs@CT916, 1c: 10 µl AuNPs@CT916; 2a: HF075, 2b: HF180; 3a: Inkubationszeit 0 min; 3b: Inkubationszeit 5 min; 3c: Inkubationszeit 10 min; 3d: Inkubationszeit 30 min. Die CT-B-Konzentration betrug 0 ng/ml für 1abc, 1 µg/ml für 2ab und 3abcd.

Hinsichtlich des AuNP-Volumens wurden 2, 5 und 10 µl eingesetzte AuNPs@CT916 (Konzentration ~35 nM) miteinander verglichen. Wie deutlich zu erkennen ist, war die Testbande bei Verwendung von 2 µl AuNPs deutlich schwächer. Zwischen 5 µl und 10 µl war keine signifikante Intensitätssteigerung erkennbar, wobei bei 10 µl das Hintergrundsignal leicht erhöht war. Entsprechend wurde ein AuNP@CT916-Volumen von 5 µl bei einem Probenvolumen von 95 µl gewählt.

Die Porengröße einer NC-Membran bestimmt die Kapillarflussgeschwindigkeit und damit indirekt die Sensitivität des LFA. Je großporiger die Membran ist, desto höher ist die Fließgeschwindigkeit. Eine Übersicht über die zur Verfügung stehenden Membranen ist Tab. 5.5 zu entnehmen.

Tab. 5.5: Zur Verfügung stehende NC-Membranen mit relevanten Eigenschaften laut Herstellerangaben.^{217,218}

Membran	Kapillarflußrate (s/4 cm)	Fließgeschwindigkeit	Sensitivität
HF180	180 ± 45	am langsamsten	am sensitivsten
Uni Sart CN140	95 - 155	↓	↑
HF075	75 ± 19	am schnellsten	am wenigsten sensitiv

Für den kompetitiven Assay wurden HF075 und HF180 miteinander verglichen. Wie man in Abb. 5.41 erkennen kann, ist die Testbande bei HF180 bei gleicher CT-B-Konzentration (1 µg/ml) stärker. Da im Fall des kompetitiven Assays bei einer möglichst niedrigen CT-B-Konzentration eine Abschwächung des Signals zu erkennen sein soll, wurde folglich eine

kurze Kontaktzeit und damit die Membran mit der schnellsten Fließgeschwindigkeit (HF075) gewählt.

Bezüglich der Inkubationszeit der AuNPs@CT916 mit der Probe wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen 0, 5, 10 und 20 min festgestellt. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Bindung zwischen Aptamer und Target sehr schnell zustande kommt und über längere Zeit stabil ist.

Als Blockierungspuffer diente 3 % Ethanolamin (w/v) in PBS-T (0,1 %, v/v). Da mit diesem sehr simplen Blockierungspuffer bereits sehr gute Ergebnisse erzielt werden konnten, wurden diesbezüglich keine weiteren Optimierungsbemühungen vorgenommen.

Durchführung des optimierten Assays in Puffer

Der optimierte kompetitive Assay wurde zum Nachweis von CT-B aus PBS-Puffer eingesetzt. Dafür wurden Verdünnungen von 0,1 ng/ml bis 100 µg/ml hergestellt and der Test durchgeführt. Mit zunehmender CT-B-Konzentration in der Probe werden die Aptamere auf der AuNP-Oberfläche zunehmend gesättigt, sodass weniger Aptamer zur Bindung des immobilisierten CT-B an der Testlinie zu Verfügung steht. Somit kann eine Abnahme der Testlinienintensität beobachtet werden (Abb. 5.42).

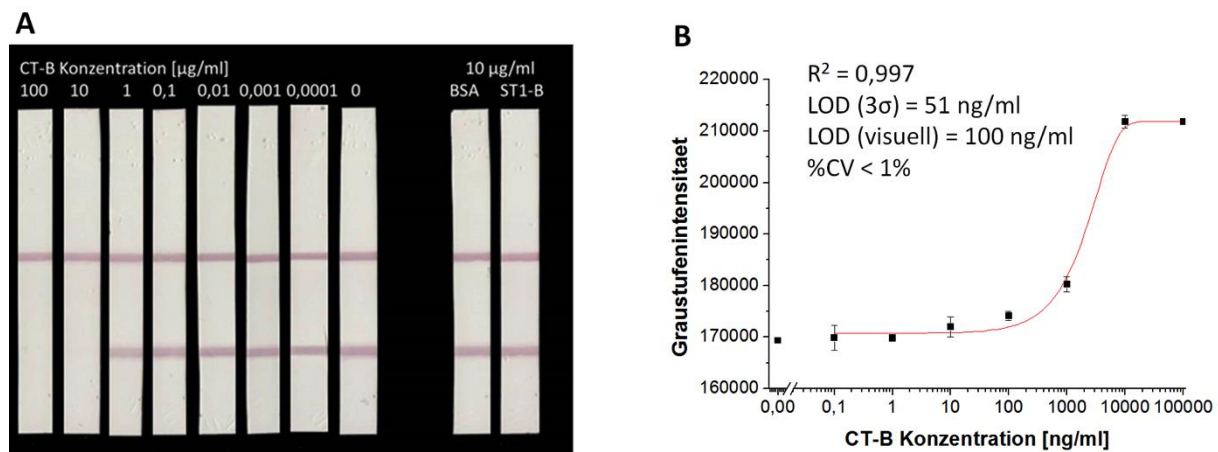


Abb. 5.42: Ergebnisse des kompetitiven Lateral Flow Assays. (A) Lateral Flow Streifen mit abnehmender CT-B Konzentration, BSA und ST1-B (B) Kalibrierungskurve und LOD mit logistischem Fit und Variationskoeffizient (%CV).

Die Funktion des logistischen Fits lässt sich über folgende Gleichung darstellen:

$$y = \frac{211901,91}{1 + e^{-0,000398(x+3510,19)}} \quad (5)$$

Mit der 3σ -Regel wurde durch Einsetzen des Blindwertes plus drei Standardabweichungen eine Nachweisgrenze von 51 ng/ml bestimmt. Das entspricht einer Konzentration von 750 pM oder einer Stoffmenge von 71 fmol in einer 95 μ l-Probe. Mit der 10σ -Regel wurde eine Bestimmungsgrenze von 237 ng/ml berechnet. Visuell ist eine geringfügige Abnahme der Testbandenintensität ab einer Konzentration von 100 ng/ml erkennbar. Vollständig verschwindet die Testbande allerdings erst ab einer Konzentration von 10 μ g/ml, was die Interpretation des LFAs bei niedrigen Konzentrationen erschwert. Der Variationskoeffizient (%CV) ist mit < 1 % sehr niedrig, was auf eine sehr gute Reproduzierbarkeit schließen lässt.

Um die Spezifität des Tests zu bewerten, wurden BSA und ST1-B mit AuNPs@CT916 bei einer Konzentration von 10 μ g/ml inkubiert. BSA ist ein Standardprotein in biochemischen Assays, Shigatoxin 1 hat als AB₅-Toxin eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zum Cholera-toxin. Da die Intensitäten der Testlinien dem Blindwert entsprechen, kann geschlossen werden, dass der Test keine signifikante Kreuzreaktivität mit den getesteten Proteinen aufweist. Diese Ergebnisse bestätigen die zuvor beobachtete hohe Selektivität des Aptamers CT916.

Durchführung des optimierten Assays in Leitungswasser

Um den kompetitiven Assay in einer realitätsnahen Anwendung zu testen, wurde der optimierte Assay mit Leitungswasser als Matrix durchgeführt (Abb. 5.43). Dafür wurde mit CT-B dotiertes Leitungswasser im Verhältnis 1:1 (v/v) mit 2-fach konzentriertem PBS verdünnt. Ansonsten wurde der Test wie oben beschrieben durchgeführt.

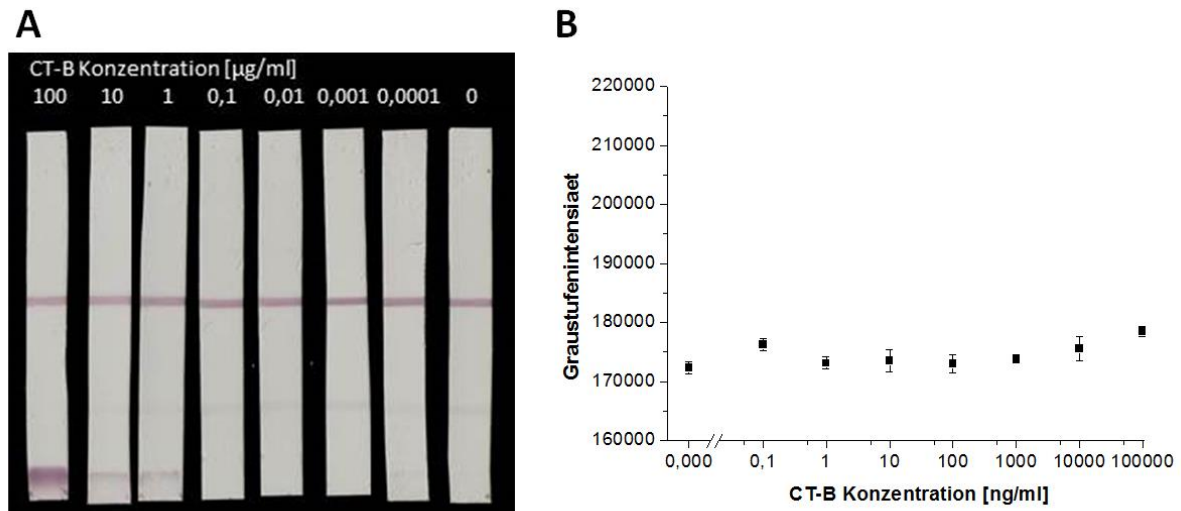


Abb. 5.43: Ergebnisse des kompetitiven Lateral Flow Assays zum Nachweis von Cholera toxin in Leitungswasser. (A) Streifen mit abnehmender CT-B Konzentration (B) Mit *ImageJ* bestimmte Graustufenintensitäten der einzelnen Konzentrationspunkte.

Abb. 5.43 ist zu entnehmen, dass die Durchführung des kompetitiven LFA in Leitungswasser nicht erfolgreich war. Die Kontrollbande war zwar deutlich zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass die AuNPs@CT916 in der Lage sind, durch den Teststreifen zu diffundieren und an ihren Komplementärstrang zu binden, das Signal auf der Testbande war jedoch sehr schwach. Vor allem beim Blindwert wäre sehr viel stärkeres Signal zu erwarten. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Bindung zwischen AuNPs@CT916 und CT-B durch die veränderten Ladungsverhältnisse gestört wird und bei der kurzen Kontaktzeit auf dem Teststreifen nur in sehr geringem Ausmaß zustande kommt. Beachtenswert ist auch, dass die AuNPs@CT916 bei sehr hohen CT-B-Konzentrationen zur Aggregation (und damit zum Wachstum) neigen. Dadurch sind sie nicht mehr in der Lage durch den Teststreifen zu fließen und sammeln sich im unteren Bereich.

Aptamer-Antikörper Sandwich

Sandwich Assays zeichnen sich in der Regel durch eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber kompetitiven Assays aus.¹¹⁶ Da für den Cholera toxin nachweis keine zwei gleichzeitig bindenden Aptamere verfügbar waren (vgl. 5.5.2), wurde zunächst basierend auf dem zuvor beschriebenen Sandwich ELAA ein Aptamer-Antikörper Sandwich LFA entwickelt. Der Antikörper wurde hier als Fänger eingesetzt, während das Aptamer als Reporter fungierte (Abb. 5.44).

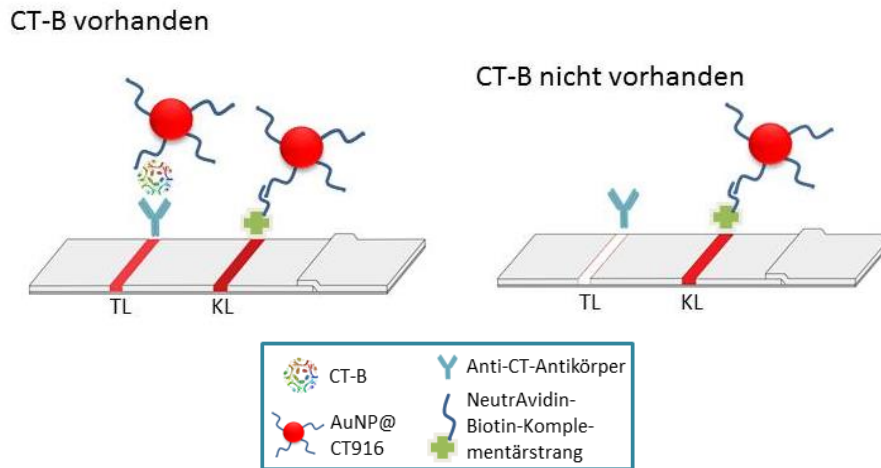


Abb. 5.44: Schematische Darstellung des Aptamer-Antikörper Sandwich Lateral Flow Assays zum Nachweis von Cholera toxin. CT-B in der Probe bildet einen Komplex mit den AuNPs@CT916, welcher auf der TL abgefangen wird.

Wie zuvor wurden die Proben zunächst mit den AuNPs@CT916 inkubiert, dann wurde der Teststreifen senkrecht in die Lösung gegeben. Wenn CT-B vorhanden ist, bildet es einen Komplex mit den AuNPs@CT916. Dieser Komplex wird von dem auf der Testlinie immobilisierten Anti-Cholera toxin-Antikörper abgefangen. Beim Durchgang durch die Kontrolllinie werden entweder nicht gebundene AuNPs abgefangen oder CT-B wird durch den immobilisierten Komplementärstrang ersetzt.

Optimierung

Im ersten Versuch wurden Immobilisierungspuffer und Konzentration des Fänger-Antikörpers optimiert (Abb. 5.45). Verglichen wurden Carbonatpuffer (pH 9), Tris-HCl (pH 8) und PBS (pH 7,4) jeweils bei Konzentrationen von 6 mg/ml, 1 mg/ml und 0,4 mg/ml. Als NC-Membran wurde eine UniSart CN 140 wegen ihrer kleineren Porengröße und damit höheren Empfindlichkeit gewählt.

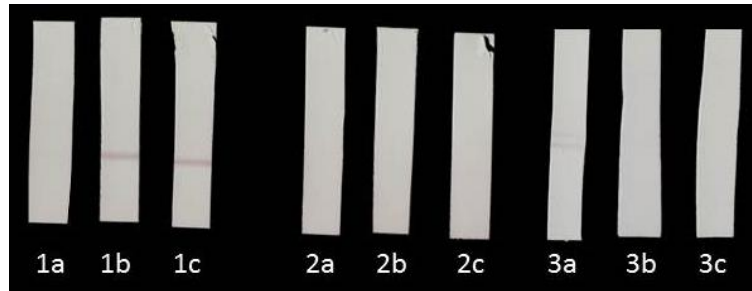


Abb. 5.45: Optimierung der Antikörperkonzentration und des Immobilisierungspuffers für das Aptamer-Antikörper-Sandwich. 1a: Carbonatpuffer pH 9, Antikörperkonz. 6 mg/ml; 1b: Carbonatpuffer pH 9, Antikörperkonz. 1 mg/ml; 1c: Carbonatpuffer pH 9, Antikörperkonz. 0,4 mg/ml; 2a: Tris-HCl pH 8, Antikörperkonz. 6 mg/ml; 2b: Tris-HCl pH 8, Antikörperkonz. 1 mg/ml; 2c: Tris-HCl pH 8, Antikörperkonz. 0,4 mg/ml; 3a: PBS pH 7,4, Antikörperkonz. 6 mg/ml; 3b: PBS pH 7,4, Antikörperkonz. 1 mg/ml; 3c: PBS pH 7,4, Antikörperkonz. 0,4 mg/ml. Die CT-B-Konz. betrug 250 ng/ml.

Aus Abb. 5.45 wird deutlich, dass sich nur Carbonatpuffer (pH 9, Abb. 5.45 1abc) für die Immobilisierung eignet, da ansonsten keine Signale erzielt werden konnten. Bei den Versuchen mit PBS-Puffer ist bei einer sehr hohen Antikörperkonzentration eine Art „Kasten“ um die Testbande zu erkennen (Abb. 5.45 3a). Beides spricht dafür, dass der pH beziehungsweise die Ladungsverhältnisse in PBS und Tris-HCl nicht die angestrebte Interaktion zwischen NC-Membran und Antikörper ermöglichen. Carbonatpuffer (pH 9) und eine Antikörperkonzentration von 0,4 mg/ml wurden gewählt, da durch Erhöhung der Antikörperkonzentration keine Verbesserung des Signals zu erkennen war. Bei einer sehr hohen Konzentration (6 mg/ml) verschwand das Signal sogar vollständig.

Anschließend wurde der Einfluss der Inkubationszeit der AuNPs@CT916 mit der Probe vor dem Hinzufügen des Teststreifens überprüft (Abb. 5.46). Dabei wurde wie zuvor zwischen 0 und 30 min kein signifikanter Unterschied festgestellt. Für alle weiteren Tests wurde eine Inkubationszeit von etwa 10 min gewählt.

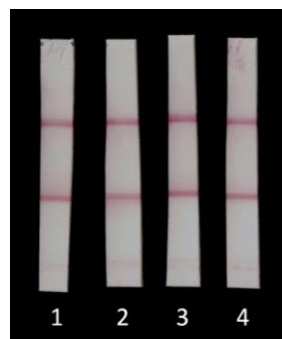


Abb. 5.46: Optimierung der Inkubationszeit der AuNP@CT916. 1: 0 min; 2: 5 min; 3: 10 min; 4: 30 min. Die CT-B Konzentration betrug 250 ng/ml.

Durchführung des optimierten Assays in Puffer

Nach ausgiebiger Optimierung wurde der Sandwich Assay mit CT-B-dotiertem PBS-Puffer in Konzentrationen von 1 ng/ml bis 1000 ng/ml durchgeführt (Abb. 5.47).

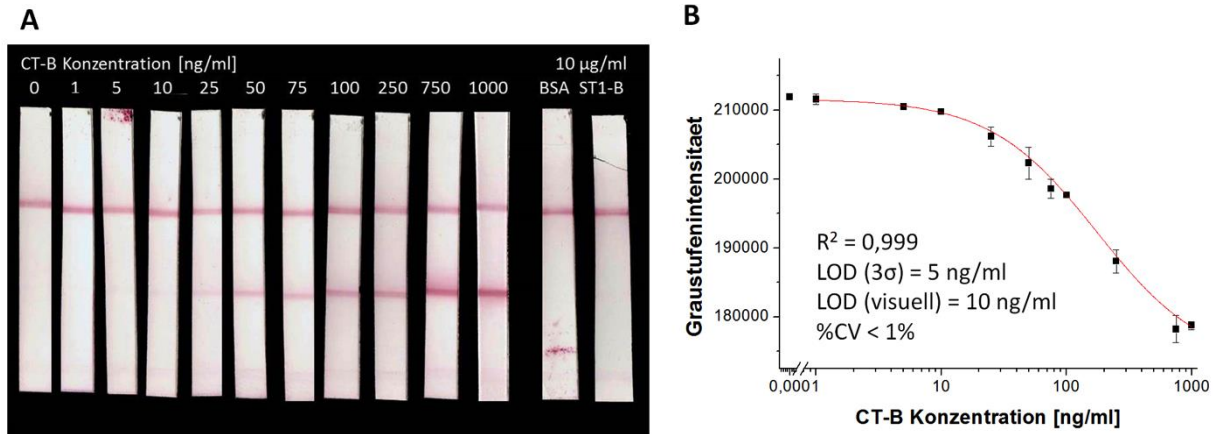


Abb. 5.47: Ergebnisse des Antikörper-Aptamer Sandwich Lateral Flow Assays zum Nachweis von Cholera toxin. (A) Streifen mit zunehmender CT-B Konzentration (B) Kalibrierungskurve und LOD mit logistischem Fit und Variationskoeffizient.

Unter Verwendung eines *Hill-Fit* kann das Verhältnis zwischen Graustufenintensität und CT-B Konzentration mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$y = 211634,31 + \frac{38691,38 \cdot x^{1,0157}}{189,75 + x^{1,0157}} \quad (6)$$

Es wurde eine Nachweisgrenze von 5 ng/ml (75 pM oder 7 fmol in einer 95 µl-Probe) bestimmt. Die Bestimmungsgrenze wurde als 20 ng/ml berechnet. Mit „bloßem Auge“ ist der Test ab 10 ng/ml eindeutig als positiv zu erkennen. Wie erwartet zeigte der Sandwich Assay damit eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit im Vergleich zum kompetitiven Assay mit gleichbleibender Reproduzierbarkeit (%CV < 1 %). Auch hier wurde wie erwartet keine Kreuzreaktivität gegen ST1-B und BSA beobachtet.

Durchführung des optimierten Assays in Leitungswasser

Auch der Sandwich Assay wurde in Leitungswasser durchgeführt (Abb. 5.48). Dafür wurde Leitungswasser mit CT-B dotiert. Dafür wurde zum einen für eine bessere Handhabung die Anzahl der Konzentrationspunkte verringert, zum anderen wurde ein Konzentrationspunkt bei

10 µg/ml hinzugefügt, um die Sättigung besser darstellen zu können. Durch die Änderung der Datenpunkte musste auch der Fit angepasst werden.

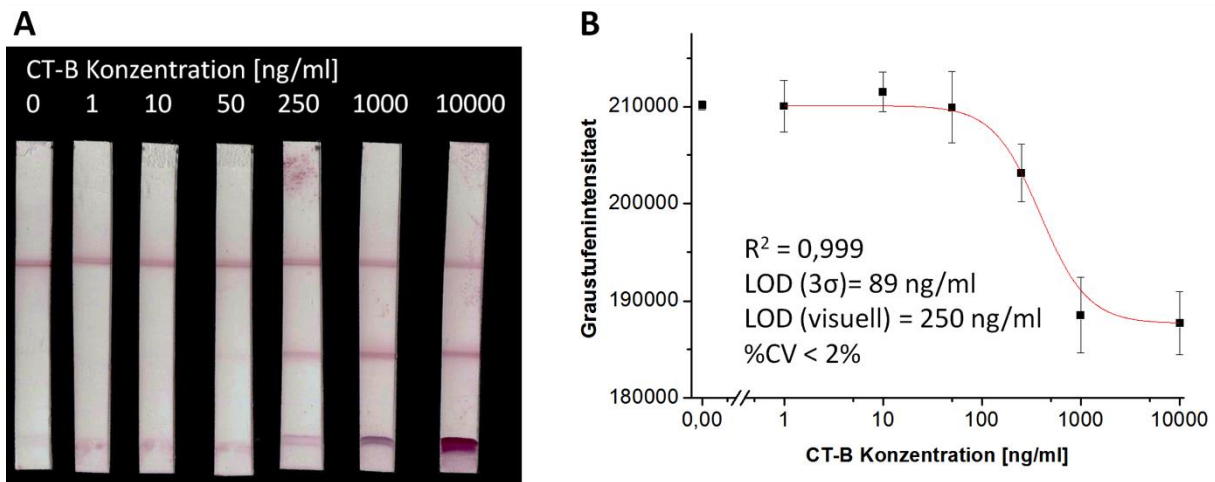


Abb. 5.48: Ergebnisse des Antikörper-Aptamer Sandwich Lateral Flow Assays zum Nachweis von Cholera toxin in Leitungswasser. (A) Streifen mit steigender CT-B Konzentration (B) Kalibrierungskurve und LOD mit logistischem Fit und Variationskoeffizient.

Der logistische Fit aus Abb. 5.48B wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$y = 187669,43 + \frac{22442,37}{1 + \left(\frac{x}{390,19}\right)^{1,92}} \quad (7)$$

Die Nachweisgrenze wurde als 89 ng/ml berechnet und lag visuell bei 250 ng/ml. Die errechnete Bestimmungsgrenze lag bei 177 ng/ml. Damit liegt die Nachweisgrenze im Vergleich zum Test in Puffer deutlich höher, im Gegensatz zum kompetitiven Assay in Leitungswasser ist der Test aber auswertbar.

Durchführung des optimierten Assays in Pferdekot

Um eine möglichst realitätsnahe Probe zu simulieren, wurde der LFA in Pferdekot als Matrix durchgeführt. Dafür wurde dieser in PBS-Puffer aufgenommen, mit CT-B dotiert und abzentrifugiert, um Feststoffe zu entfernen. Anschließend wurden AuNPs@CT916 zum Überstand gegeben und die Teststreifen hinzugefügt (Abb. 5.49).

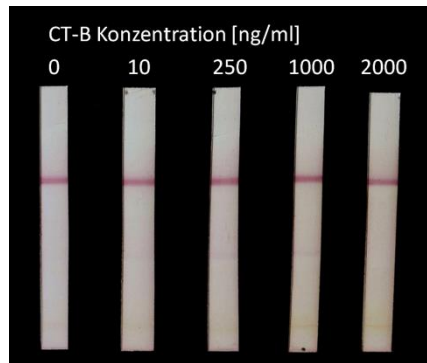


Abb. 5.49: Ergebnisse des Antikörper-Aptamer Sandwich Lateral Flow Assays zum Nachweis von Cholera toxin in Pferdekot.

Zwar ist bei 10, 250 und 1000 ng/ml ein schwaches Signal an der Testlinie erkennbar, dieses ist aber deutlich schwächer als im Puffer oder Leitungswasser. Somit ist davon auszugehen, dass die Aptamer-Target-Interaktion durch die Matrix gestört wird. Möglicherweise können diese Matrixeffekte durch eine Anreicherung mit Aptamer-Magnetpartikeln (ähnlich zu 5.5.2) umgangen werden. Dazu sind allerdings umfangreiche weitere Versuche notwendig, weshalb in diesem Rahmen auf weitere Realprobenversuche verzichtet wurde.

Aptamer-Antikörper-Antikörper Sandwich

Um die Empfindlichkeit des Sandwich Assays weiter zu verbessern, wurde im nächsten Ansatz ein „mobiler“ Sandwich Assay entwickelt. Dazu wurde ein Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen) als Fänger auf der NC-Membran immobilisiert. Durch sukzessive Inkubation der Probe mit AuNPs@CT916 und Anti-Cholera toxin-Antikörper bildet sich ein Sandwichkomplex, der über den Teststreifen fließt und vom Sekundärantikörper auf der Testlinie abgefangen wird (Abb. 5.50). Dadurch wird die Möglichkeit zum Multiplexen geschaffen; außerdem lässt sich der LFA sehr leicht auf andere Analyten adaptieren, sofern ein spezifisches an AuNPs gekoppeltes Aptamer und ein polyklonaler Antikörper verfügbar sind. Bei Durchgang durch die Kontrolllinie werden wieder entweder nicht gebundene AuNPs abgefangen oder CT-B wird durch den immobilisierten Komplementärstrang ersetzt.

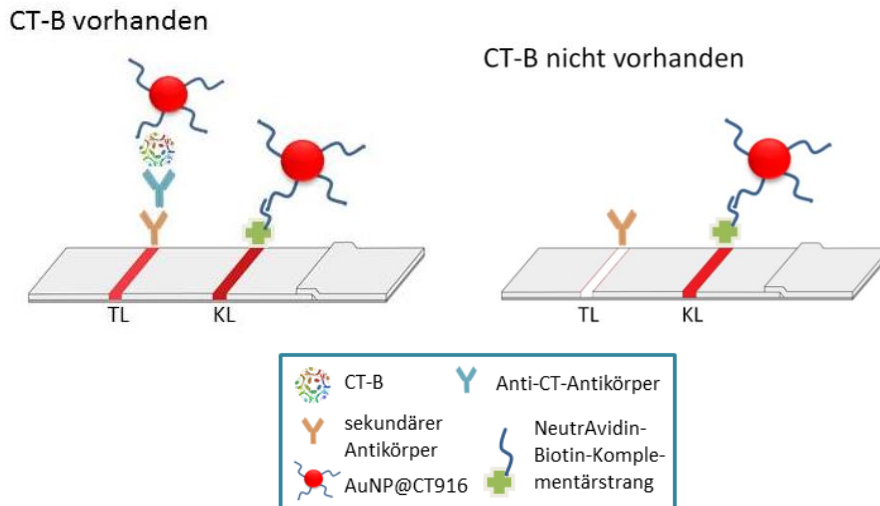


Abb. 5.50: Schematische Darstellung des Aptamer-Antikörper-Antikörper Sandwich Lateral Flow Assays zum Nachweis von Cholera-toxin. CT-B in der Probe bildet einen mobilen Komplex mit den AuNPs@CT916 und dem Anti-Cholera-toxin-Antikörper, welcher vom Sekundärantikörper auf der TL gefangen wird.

Optimierung

Zunächst wurde die Inkubationszeit mit dem primären Antikörper optimiert. Das stärkste Signal konnte bei einer Inkubationszeit von Anti-Cholera-toxin-Antikörper mit dem AuNP@CT916-CT-B-Komplex für 10 min generiert werden (Abb. 5.51).

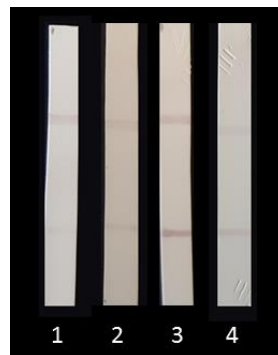


Abb. 5.51: Optimierung der Antikörper-Inkubationszeiten in einem Aptamer-Antikörper-Antikörper-Sandwich. 1: Inkubationszeit 0 min; 2: Inkubationszeit 5 min; 3: Inkubationszeit 10 min; 4: Inkubationszeit 30 min. Die CT-B Konzentration betrug 500 ng/ml, die Inkubationszeit von AuNP@CT916 mit der Probe betrug 10 min.

HF180 wurde als Membran gewählt, da diese eine sehr kleine Porengröße und daher eine hohe Empfindlichkeit aufweist.

Durchführung des optimierten Assays in Puffer

Das optimierte Protokoll wurde mit CT-B dotiertem Puffer (1-500 ng/ml) durchgeführt (Abb. 5.52).

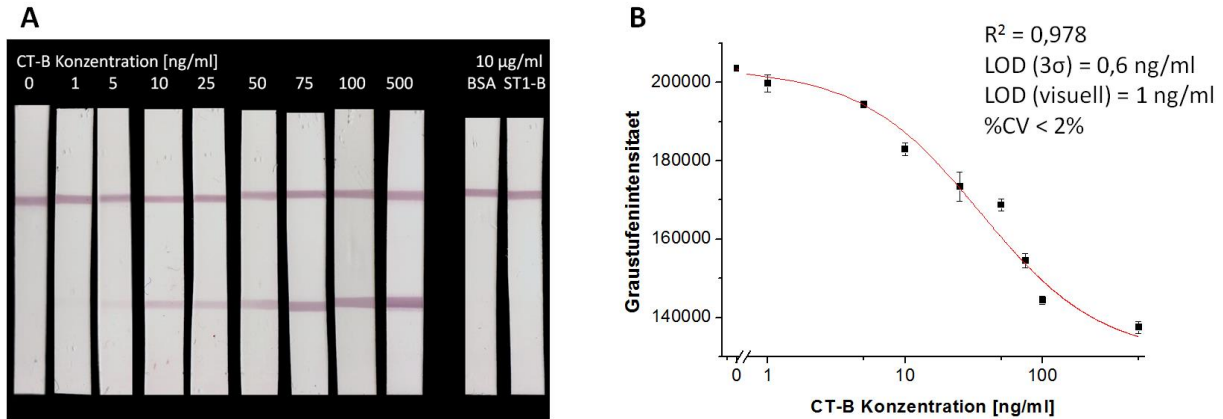


Abb. 5.52: Ergebnisse des Antikörper-Antikörper-Aptamer Sandwich Lateral Flow Assays zum Nachweis von Cholera toxin. (A) Streifen mit zunehmender CT-B Konzentration (B) Kalibrierungskurve und LOD mit logistischem Fit und Variationskoeffizient.

Die Abhängigkeit von Graustufenintensität und Konzentration lässt sich mit folgender Gleichung beschreiben:

$$y = 130200,93 + \frac{73251,31}{1 + \left(\frac{x}{35,11}\right)^{0,994}} \quad (8)$$

Mit der 3σ -Regel konnte durch Einsetzen in die Gleichung eine sehr niedrige Nachweisgrenze von 0,6 ng/ml (9 pM oder 806 amol in 90 µl Probe) erreicht werden. Visuell war eine Konzentration von 1 ng/ml bereits deutlich vom Blindwert zu unterscheiden. Im Vergleich zum einfachen Sandwich wurde die Nachweisgrenze also um Faktor 8,5 bzw. Faktor 10 erniedrigt. Die Bestimmungsgrenze lag bei 2 ng/ml. Die Ergebnisse sind sehr gut reproduzierbar ($\%CV < 2\%$). Weiterhin ist auch in diesem Assay keine Kreuzreaktivität mit den getesteten Proteinen zu erkennen.

Signalverstärkung

Mit den oben beschriebenen Protokollen wurde eine maximale Sensitivität von etwa 0,6 ng/ml erreicht. Durch gezielte Signalverstärkung, wie zum Beispiel mittels Silber- oder Gold-

verstärkung, kann die Nachweisgrenze von LFAs allerdings oft noch deutlich reduziert werden.^{154,219} Entsprechend wurden diesbezüglich einige Versuche durchgeführt.

Bei der Silberverstärkung lagern sich positiv geladene Ag^+ -Ionen an die negativ geladene Oberfläche der AuNPs an, wo sie zu elementarem Silber reduziert werden.^{154,219} Die Goldverstärkung beruht auf der Ablagerung von Gold auf bereits vorhandenen AuNPs in Anwesenheit von MES und H_2O_2 , bei der die Au^{3+} -Ionen zu elementarem Gold reduziert werden. Durch das so ausgelöste Wachstum der AuNPs kommt es zu einer Signalverstärkung.¹⁵⁵ In Abb. 5.53 sind die Ergebnisse der Silber- und Goldverstärkungsversuche dargestellt.

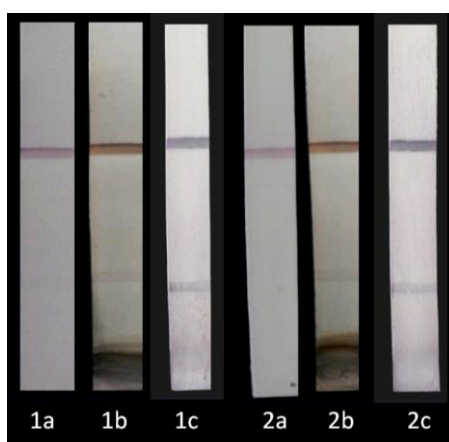


Abb. 5.53: Ergebnisse der Versuche zur Silber- und Goldverstärkung. Es wurde jeweils ein Antikörper-Antikörper-Aptamer-Sandwich durchgeführt. 1a – 1 ng/ml ohne Verstärkung; 1b – 1 ng/ml mit Silberverstärkung; 1c – 1 ng/ml mit Goldverstärkung; 2a – Negativkontrolle (NK) ohne Verstärkung; 2b – NK mit Silberverstärkung; 2c – NK mit Goldverstärkung.

Wie deutlich zu erkennen ist, ist eine Signalverstärkung sowohl durch Gold- als auch durch Silberfärbung prinzipiell möglich (Abb. 5.53 1bc). Allerdings traten in beiden Ansätzen bei der Negativkontrolle falsch-positive Ergebnisse auf, weshalb die Signalverstärkung verworfen wurde (Abb. 5.53 2bc). Die falsch-positiven Ergebnisse lassen sich damit begründen, dass die positiv geladenen Ag^+ - und Au^{3+} -Ionen nicht nur an die Oberfläche der AuNPs, sondern auch unspezifisch an den auf der Testlinie immobilisierten negativ geladenen Antikörper binden können. Zudem ist denkbar, dass eine leichte unspezifische Interaktion zwischen AuNPs@CT916 und dem Antikörper auch ohne Verstärkung stattfindet, welche aber erst durch diese sichtbar wird.

Duales Aptamer Sandwich

In Kapitel 5.5.2 wurde bereits gezeigt, dass die Antikörper im Sandwich Enzyme-linked Aptamer Assay nicht durch Aptamere ersetzt werden können. Trotzdem wurde ein ähnlicher Versuch im LFA-Format durchgeführt, der hier nur kurz erwähnt werden soll. Dafür wurden die Aptamere CT910, CT916 und CT928 auf der NC-Membran als Fänger immobilisiert. Als Reporter dienten AuNPs@CT916 (Abb. 5.54).

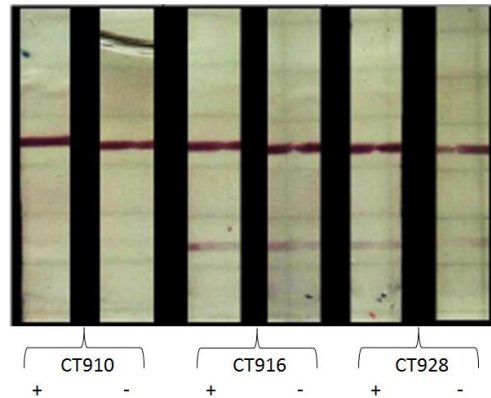


Abb. 5.54: Versuche zur Entwicklung eines Aptamer-Aptamer-Sandwich.

Wie in Abb. 5.54 zu erkennen ist, waren die Tests entweder falsch-negativ (CT910) oder falsch-positiv (CT916 und CT928). Die falsch-positiven Ergebnisse lassen sich auf unspezifische Interaktionen der Aptamere zurückführen. Im Gegensatz zum ELAA werden diese nicht durch Waschen entfernt. Im falsch-negativen Fall (CT910) kann davon ausgegangen werden, dass die beiden Aptamere überlappende Bindungsstellen besetzen. Wie erwartet ist ein dualer Aptamer Sandwich LFA daher nicht realisierbar.

GM1-Aptamer Sandwich

Um dennoch einen sehr sensitiven Assay ohne den Einsatz von Antikörpern zu entwickeln, wurde die extrem hohe Affinität des Cholera-toxins zu seinem Zellrezeptor, dem Gangliosid GM1 ausgenutzt.³² Als Signalgeber dienten hierfür mit dem Fluoreszenzfarbstoff SRB gefüllte Liposomen. Die Liposomen wurden so synthetisiert, dass sie den Oligosaccharidteil des Gangliosids auf ihrer Oberfläche präsentieren.

Da die Liposomen im Vergleich zu den AuNPs deutlich größer sind, wurde in diesem Ansatz eine großporige Membran (HF075) verwendet, um den bestmöglichen Liposomenfluss zu

gewährleisten. Auf der Testlinie wurde biotinyliertes Aptamer CT916 über die Bindung mit NeutrAvidin immobilisiert, welches CT-B beim Passieren der Testlinie in Lösung abfängt (Abb. 5.55). Durch das gebundene CT-B werden wiederum im nächsten Schritt die GM1-Liposomen gebunden. Für die Kontrolllinie wurde auf der NC-Membran immobilisiertes CT-B verwendet, durch welches ungebundene Liposomen abgefangen werden.

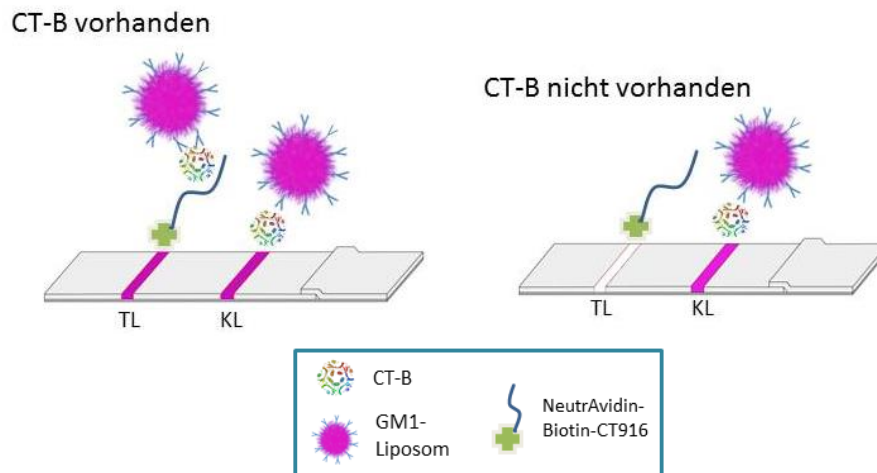


Abb. 5.55: Schematische Darstellung des GM1-Aptamer Sandwich Lateral Flow Assays. CT-B in Lösung bildet einen Komplex mit den GM1-Liposomen, welcher vom Aptamer CT916 an der TL gefangen wird.

Optimierung

Beim GM1-Aptamer LFA wurde das Liposomenvolumen optimiert. Zur Blockierung der Membran wurde das von Edwards *et al.* (2017) beschriebene Protokoll verwendet.¹⁵⁶ Ein Liposomenvolumen von 2 μl wurde für die weiteren Versuche ausgewählt, da es das beste Signal-Hintergrund-Verhältnis aufwies (Abb. 5.56).

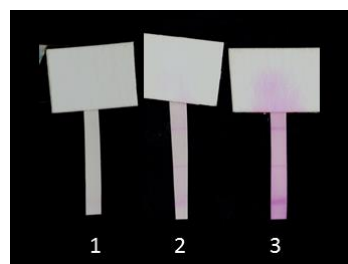


Abb. 5.56: Optimierung des Liposomenvolumens für das GM1-Aptamer Sandwich. 1: 0,5 μl ; 2: 2 μl ; 3: 10 μl ; die CT-B Konzentration betrug 250 ng/ml.

Durchführung des optimierten Assays in Puffer

CT-B wurde in PBS-Puffer auf 0,1 ng/ml bis 10 µg/ml verdünnt und für jede Konzentration wurde ein Teststreifen im Triplikat entwickelt. Anschließend wurden 2 µl Liposomen auf 100 µl PBS hinzugegeben. Nachdem diese über die Membran gelaufen waren, wurde zur Verbesserung des Signal-Hintergrund-Verhältnisses noch einmal mit PBS gespült. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.57 dargestellt.

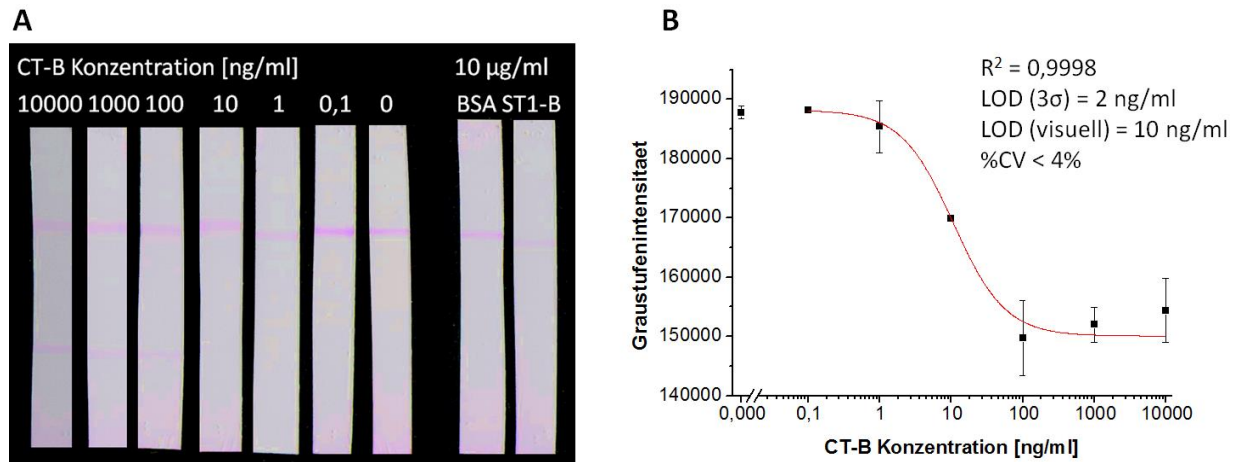


Abb. 5.57: Ergebnisse des GM1-Aptamer Sandwich Lateral Flow Assays zum Nachweis von Cholera toxin. (A) Streifen mit zunehmender CT-B Konzentration (B) Kalibrierungskurve und LOD mit logistischem Fit und Variationskoeffizient.

Obwohl erwartet werden könnte, dass auf Grund einer Konkurrenzreaktion die Intensität der Kontrolllinie mit steigender CT-B Konzentration in Lösung abnimmt, wurde dies im getesteten Bereich bis 10 µg/ml nicht beobachtet. Mittels logistischem Fit lässt sich die Abhängigkeit von Graustufenintensität und CT-B Konzentration wie folgt beschreiben:

$$y = 150065,81 + \frac{38130,71}{1 + \left(\frac{x}{10,67}\right)^{1,20}} \quad (9)$$

Der optimierte Test ermöglicht den Nachweis von Cholera toxin in sehr geringen Konzentrationen mit einer berechneten Nachweisgrenze von 2 ng/ml, was einer Konzentration von 15 pM oder einer Stoffmenge von 2 fmol in 100 µl Probe entspricht. Die Bestimmungsgrenze liegt bei 5 ng/ml. Visuell ist eine Konzentration von 10 ng/ml gerade erkennbar. Wie in allen vorangegangenen Ansätzen ist die Selektivität des GM1-LFA ausgezeichnet. Die Reproduzierbarkeit ist etwas schlechter als bei den zuvor beschriebenen

LFAs (%CV <4 %). Da SRB ein Fluoreszenzfarbstoff ist, ist es zudem denkbar, die Nachweisgrenze durch die Anwendung von Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 586 nm weiterhin zu erhöhen. Dafür kann zum Beispiel ein tragbares Fluoreszenzgerät (Handfluorometer) eingesetzt werden. Alternativ zum pinken SRB können auch Liposomen hergestellt werden die beispielsweise einen blauen oder grünen Farbstoff einschließen.

Ein ähnlicher Ansatz wurde bereits im Jahr 2003 von Ahn-Yoon *et al.* entwickelt.³⁶ Dabei wurden ebenfalls GM1-Liposomen hergestellt; als Fänger auf der Testmembran diente ein Anti-Choleratoxin-Antikörper. Dieser Assay war mit einer Nachweisgrenze von 10 fg/ml bedeutend sensitiver als sein Aptamer-basiertes Pendant.

Vergleich der Lateral Flow Assays

Generell haben alle vier entwickelten LFAs ihre eigenen Vor- und Nachteile. Die Hauptmerkmale sind in Tab. 5.6 zusammengefasst.

Tab. 5.6: Vergleich der LFA-Ansätze zum Nachweis von Choleratoxin.

	Kompetitiver Assay	Aptamer-Antikörper Sandwich	Aptamer-Antikörper - Antikörper Sandwich	GM1-Aptamer Sandwich
LOD rechnerisch [ng/ml]	51	5	0,6	2
LOD visuell [ng/ml]	1000	10	1	10
Dauer	5-15 min	5-15 min	15-25 min	~15 min
%CV	< 1 %	< 1 %	< 2 %	< 4 %
Antikörper notwendig?	nein	ja	ja	nein

Während der kompetitive Assay sehr schnell und einfach durchführbar ist und zur Signalgenerierung keinen Antikörper, sondern nur ein Aptamer und heterlog exprimiertes CT-B benötigt, weist er allerdings auch die geringste Sensitivität auf. Ebenfalls ist der kompetitive Ansatz für den Anwender nicht intuitiv, da hier, im Gegensatz zum Sandwich, zwei Testbanden ein negatives und eine Bande (oder eine zweite schwache Bande) ein positives Ergebnis bedeuten. Beide Antikörper-Sandwich Assays zeichnen sich durch sehr niedrige Nachweisgrenzen (sowohl visuell als auch berechnet) aus. Die Antikörper-Aptamer LFAs sind daher bezüglich ihrer Empfindlichkeit vergleichbar mit beziehungsweise besser als

die routinemäßig verwendete VET-RPLA- oder ELISA-Methode.³¹ Der Aptamer-Antikörper-Antikörper-Sandwich LFA ist der empfindlichste Assay, da die Kontaktzeit zwischen Anti-Choleratoxin-Antikörper und CT-B im Vergleich zum einfachen Sandwich deutlich erhöht ist; es ist jedoch auch der zeitaufwendigste. Außerdem sind für beide LFAs Antikörper notwendig, was auf lange Sicht auf Grund ihrer Nachteile, wie der begrenzten Langzeitstabilität, vermieden werden sollte. Für den GM1-Aptamer Sandwich Assay werden weder mehrere Inkubationsschritte noch Antikörper gebraucht, im Vergleich zum kompetitiven Assay hat er aber eine 50-fach verbesserte Sensitivität. Obwohl das GM1-Aptamer-Sandwich-LFA weniger empfindlich ist als andere Methoden zum Choleratoxin-Nachweis,^{30,36,220} ist die Technik vielversprechend und sollte, gegebenenfalls nach weiterer Optimierung, in Zukunft für Realanwendungen getestet werden.

Alle Tests sind visuell semi-quantitativ und bei Auswertung mit *ImageJ* quantitativ. Die Auswertung kann auch mit einem Smartphone und der *ImageJ* App erfolgen.²²¹ Allgemein heben sich Aptamer LFAs im Vergleich zu Antikörper-basierten Lateral Flow Immunoassays durch reduzierte Kosten und verlängerte Lagerstabilität hervor. In diesem Sinne sollte zukünftig angestrebt werden, die Antikörper beziehungsweise auch das Gangliosid durch ein zweites Aptamer zu ersetzen, um möglichst gänzlich ohne Antikörper und aufgereinigte Proteine auszukommen.

5.6 Anwendungen der Aptamere ST1065 und ST1076

Obwohl die für die Shigatoxin 1-Aptamere ermittelten K_D -Werte im zweistelligen nanomolaren Bereich lagen, deuteten unter anderem die Selektivitätsmessungen darauf hin, dass sich die Shigatoxin 1-Aptamere weniger gut für die Entwicklung von Testsystemen eignen als die Choleratoxin-Aptamere. Trotzdem wurden einige der für das Choleratoxin entwickelten Anwendungen adaptiert oder weiterentwickelt.

Es wurden das Aptamer ST1065, welches die größte Sequenzierhäufigkeit hatte (d.h. dessen Sequenz in den meisten der analysierten Klonen vorlag), und das Aptamer ST1076, welches einen sehr niedrigen K_D -Wert hatte, für die weiteren Versuche ausgewählt.

5.6.1 Affinitätsanreicherung aus Zellpellets

Analog zur rekombinanten Expression von CT-B kann auch bei der Expression von ST1-B Protein im Zellpellet zurückbleiben. Entsprechend wurde auch für die Affinitätsanreicherung von ST1-B ein Aptamer (ST1065) kovalent an Magnetpartikel gekoppelt und zur Aufreinigung genutzt (Abb. 5.58).

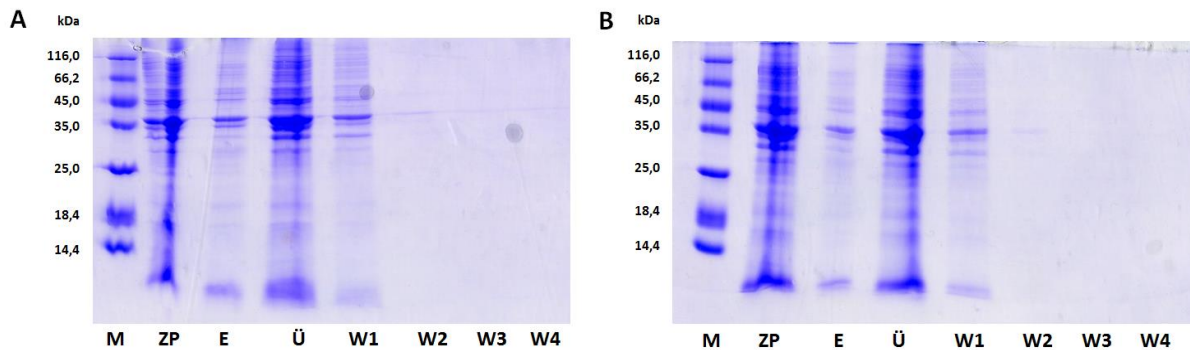


Abb. 5.58: Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel der Aptamer-basierten Affinitätsanreicherung ST1-B aus Zellpellets durch (A) Ethanolamin-blockierte ST1065- Magnetpartikel und (B) BSA-blockierte ST1065- Magnetpartikel. M – Marker, ZP – Zellpellet, E – Eluat nach Anreicherung, Ü – Überstand nach Inkubation, W1-4 – Waschüberstände 1-4.

Analog zur Affinitätsanreicherung von CT-B wurde zum Vergleich dasselbe Protokoll mit His-Tag-spezifischen Co^{2+} -Magnetpartikeln durchgeführt (Abb. 5.59).

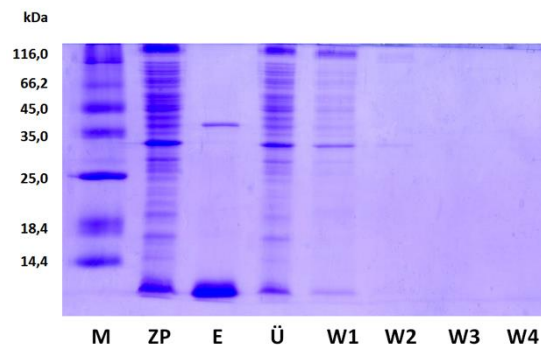


Abb. 5.59: Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel der Aptamer-basierten Affinitätsanreicherung von ST1-B aus Zellpellets durch Co^{2+} -Magnetpartikel. M – Marker, ZP – Zellpellet, E – Eluat nach Anreicherung, Ü – Überstand nach Inkubation, W1-4 – Waschüberstände 1-4.

Auf allen Gelen ist eine untere Bande erkennbar, die in etwa mit dem Molekulargewicht von ca. 8 kDa des ST1-B-Monomers korreliert. Wie auch das CT-B liegt ST1-B unter den herrschenden denaturierenden Bedingungen hauptsächlich als Monomer vor. Die Bande

zwischen 35 und 45 kDa korrespondiert bezüglich ihres Molekulargewichts mit dem ST1-B-Pentamer.

Sowohl Monomer als auch Pentamer sind sowohl auf den Gelen der Aptamer-basierten Affinitätsanreicherung sowie der Co^{2+} -Referenz zu erkennen, allerdings enthalten die Eluate der Aptamer-basierten Anreicherung im Vergleich zur Referenz unabhängig vom Blockierungsmittel neben ST1-B weitere Zellproteine. Da die Shigatoxin 1-Aptamere starke Kreuzreaktivitäten aufweisen, war ein solches Ergebnis zu erwarten.

5.6.2 Magnetpartikel-basierter Sandwich Enzyme-linked Aptamer Assay

Magnetpartikel Sandwich ELAA

Anschließend sollte der zum Nachweis des Choleratoxins etablierte Magnetpartikel ELAA für den Nachweis von Shigatoxin 1 adaptiert werden. Dafür wurde das Aptamer ST1076 verwendet. Es wurde darauf verzichtet zunächst einen Dot Blot durchzuführen, da als Reporter biotinyliertes Taubeneiweiß in Kombination mit Streptavidin-HRP eingesetzt werden sollte. Da das Fänger-Aptamer ebenfalls biotinyliert ist, wären falsch-positive Ergebnisse zu erwarten.

Das Taubeneiweiß ist eine Mischung der Proteine Taubenoalbumin, Taubenovomuroid und Taubenovotransferrin, welche aufgrund ihrer Glykosylierung spezifisch an die B-Untereinheiten des Shigatoxin 1 binden. Es lässt sich durch das Trennen von Taubeneiern und Lyophilisieren des Eiweißes gewinnen. Die Bindungsstärke ist mit der eines Antikörpers vergleichbar (siehe 5.4.2).

Da vorangegangene Ergebnisse (siehe 5.5.2) darauf hindeuteten, dass sich Ethanolamin besser zur Blockierung von Aptamer-modifizierten Magnetpartikeln für den Magnetpartikel ELAA eignet als BSA, wurde auf einen erneuten Vergleich der Magnetpartikelblockierungen verzichtet. Es wurde eine Konzentrationsreihe von ST1-B (1 bis 75 $\mu\text{g/ml}$) in PBS-Puffer hergestellt und der ELAA durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.60 gezeigt.

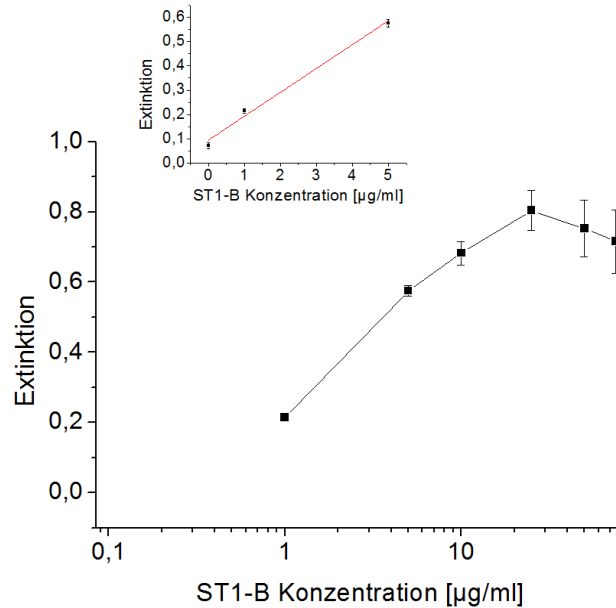


Abb. 5.60: Magnetpartikel-Sandwich ELAA mit Ethanolamin-blockierten ST1076 Carboxyl-Magnetpartikeln als Fänger und biotinyliertem PEW und Streptavidin-HRP als Reporter. Im Einschub ist der nicht-logarithmische lineare Bereich dargestellt, der zur Ermittlung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze verwendet wurde.

Der logarithmisch-lineare Bereich für den Magnetpartikel ELAA zum Nachweis von Shigatoxin 1 lag zwischen 1 µg/ml und 25 µg/ml. Für die Berechnung der Nachweisgrenze wurde analog zum ELAA für Cholera-toxin der nicht-logarithmische lineare Bereich verwendet. Mit der folgenden Gleichung wurden eine Nachweisgrenze von 105,4 ng/ml und eine Bestimmungsgrenze von 790,9 ng/ml berechnet:

$$y = 0,095 + 0,098x \quad R^2 = 0,97 \quad (10)$$

Sowohl Nachweis- als auch Bestimmungsgrenze sind verhältnismäßig hoch. Im Vergleich dazu erreichen moderne rein PEW- oder Antikörper-basierte Nachweismethoden Nachweisgrenzen zwischen 10 pg/ml und 1,5 ng/ml.^{45-48,50,51} Trotzdem wurde der ELAA zum Nachweis von ST1-B in Realproben als *Proof-of-Concept* eingesetzt.

Magnetpartikel ELAA in Lebensmitteln

Dafür wurden 0,3%ige haltbare (H-) Milch, 1,5%ige H-Milch und Rinderhackfleisch mit ST1-B dotiert und der Nachweis analog zu oben durchgeführt (Abb. 5.61).

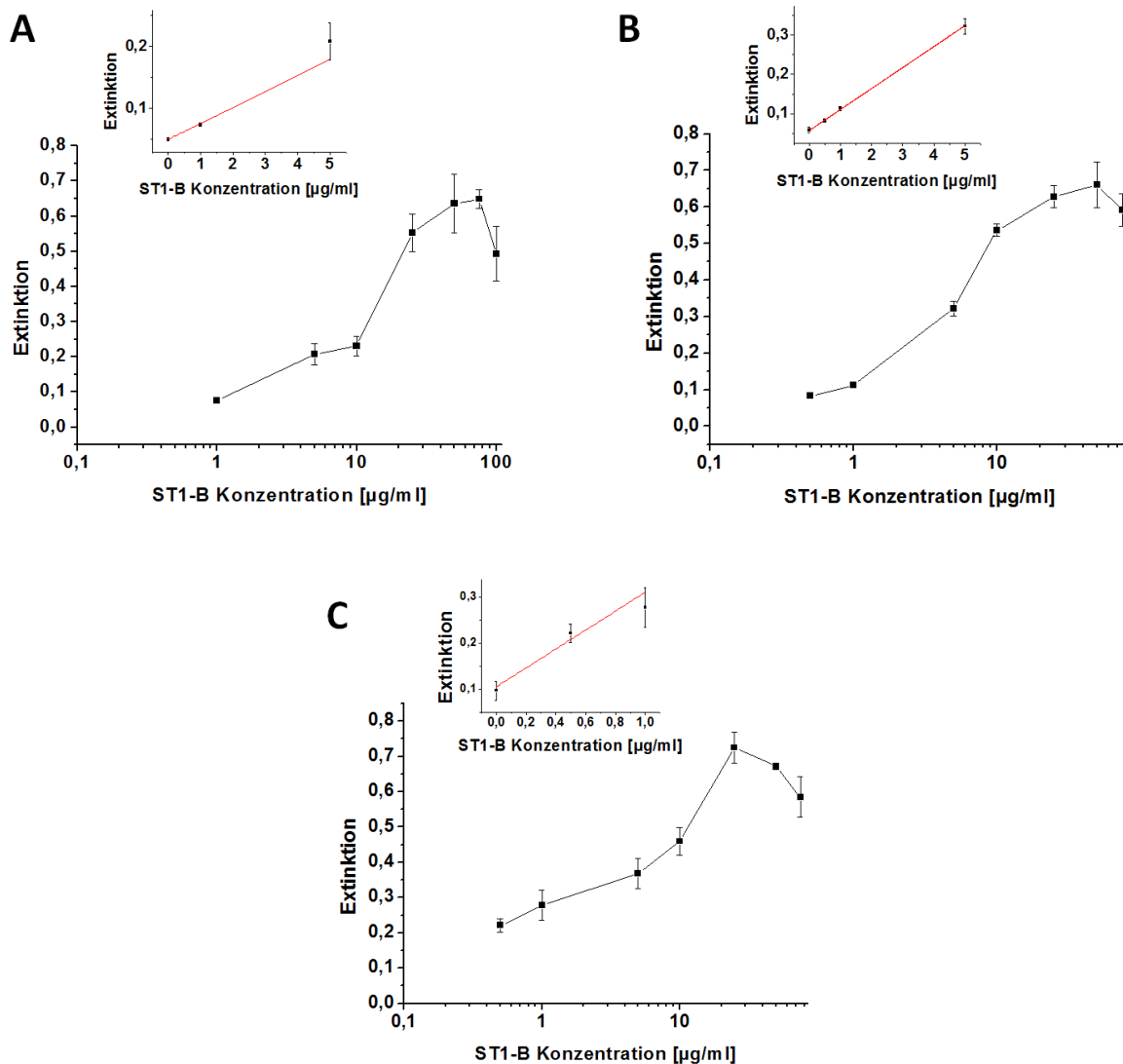


Abb. 5.61: Magnetpartikel-Sandwich ELAA mit Ethanolamin-blockierten ST1076 Carboxyl-Magnetpartikel als Fänger und biotinyliertem PEW und Streptavidin-HRP als Reporter in (A) H-Milch mit 0,3 % Fett (B) H-Milch mit 1,5 % Fett (C) Hackfleisch. Im Einschub ist jeweils der nicht-logarithmische lineare Bereich dargestellt, der zur Ermittlung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze verwendet wurde.

Mit dem Magnetpartikel ELAA konnte ST1-B erfolgreich in dotierter H-Milch mit 0,3 % (A) und 1,5 % (B) Fettgehalt und dotiertem Rinderhackfleisch (C) nachgewiesen werden. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind Tab. 5.7 zu entnehmen.

Tab. 5.7: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des Magnetpartikel ELAA zum Nachweis von Shigatoxin 1 in Milch und Hackfleisch.

	H-Milch 0,3 %	H-Milch 1,5 %	Rinderhackfleisch
LOD [ng/ml]	270,8	414,2	269,6
LOQ [ng/ml]	772,8	1207,1	888,0
Geradengleichungen (11-13)	$y = 0,050 + 0,026x$	$y = 0,057 + 0,053x$	$y = 0,105 + 0,205x$
Bestimmtheitsmaß	$R^2=0,97$	$R^2=0,998$	$R^2=0,90$

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind im Lebensmittel etwas höher als in Puffer und im Vergleich mit anderen etablierten Testsystemen sehr hoch (Tab. 1.3). Allerdings ist eine Adaption des Systems als Kombination von Taubeneiweiß und spezifischeren und affineren Aptameren denkbar. Wang *et al.* (2016) entwickelten einen Antikörper-basierten Sandwich LFA, mit dem sich Shigatoxin 1 und Shigatoxin 2 nach 3 h aus mit *E. coli* O157:H7 beimpften und mit Ciprofloxacin behandeltem Hackfleisch nachweisen lassen.²²² Denkbar wäre, in der Zukunft einen Aptamer-basierten LFA für Shigatoxin 1 zu entwickeln, der auf einem ähnlichen Gebiet zur Anwendung kommen könnte.

5.7 Strukturanalyse des Cholera-toxin B-Pentamers, des Aptamers CT916 und des Aptamer-Protein-Komplexes durch SAXS

Um das Potential des Aptamers CT916 in Biosensoren in Zukunft optimal ausnutzen zu können, ist es notwendig, die Wechselwirkungen zwischen Aptamer und Zielprotein besser zu verstehen. SAXS-Analysen können dabei helfen eine grobe Vorstellung der Komplexstruktur zu erhalten. Unter Kenntnis der Strukturen der Einzelkomponenten können dadurch gegebenenfalls Rückschlüsse auf die Bindungsstelle gezogen werden.

Bei der Vorbereitung der Proben ist es wichtig, dass sowohl Aptamer als auch Protein monodispers vorliegen. Daher wurden das Aptamer CT916 und das B-Pentamer des Cholera-toxins frisch synthetisiert beziehungsweise aus bei -80 °C gelagerten Zellpellets aufgereinigt. Bei Proteinen werden in der Regel Konzentrationen von 1-10 mg/ml für SAXS-Messungen eingesetzt. Dabei bedeutet eine höhere Konzentration ein kleineres Signal-Rausch-Verhältnis, wobei die Konzentration nach oben durch Bildung von Aggregaten und Strahlungsschäden am Protein begrenzt ist.²²³ Bei ssDNA werden tendenziell geringere Konzentrationen benötigt. Es werden nach Möglichkeit immer mehrere Konzentrationspunkte jeder Probe gemessen, um eine Konzentrationsabhängigkeit der Struktur (beispielsweise durch Bildung von Multimeren) auszuschließen.²²⁴

5.7.1 Cholera toxin B-Pentamer

Zunächst wurde CT-B im *Batch Mode* gemessen. Die Messungen bei 3,5 mg/ml, 2,8 mg/ml und 1,75 mg/ml wiesen ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis sowie keine Aggregationsmerkmale auf, aus ihnen wurde für die weiteren Analysen mit dem Programm PRIMUS ein Durchschnitt gebildet (Abb. 5.62A). Daraus wurden der zugehörige Guinier-Plot (Abb. 5.62B) sowie mit GNOM die Abstandsverteilungsfunktion (Abb. 5.62C) ermittelt.

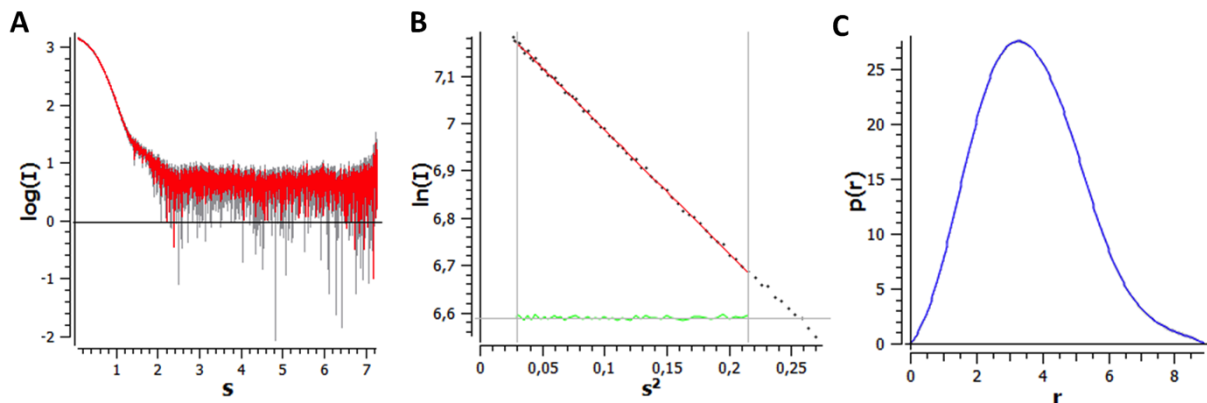


Abb. 5.62: (A) Mittlere Streudaten, (B) Guinier-Plot und (C) Abstandsverteilungsfunktion der SAXS-Daten für CT-B.

Der Guinier-Plot zeigt einen sehr gut angenäherten linearen Verlauf, was auf eine sehr gute Datenqualität schließen lässt. Aus ihm wird der Gyrationradius R_g berechnet, welcher definiert ist als der nach der Streulängendichte gewichtete Durchschnitt der quadratischen Massenschwerpunkte im Molekül. Er dient der modellunabhängigen Abschätzung der Größe eines Moleküls.²²⁵ Für CT-B wurde er als $R_g = 2,80 \pm 0,01$ nm berechnet. Mit Hilfe der Abstandsverteilungsfunktion wurde ein maximaler Durchmesser D_{max} von 8,91 nm ermittelt (Abb. 5.62C). Die Abstandsverteilungsfunktion ermöglicht außerdem eine Abschätzung der Partikelform (Abb. 5.63).²²⁶ Die für CT-B ermittelte Abstandsverteilungsfunktion deutet auf eine stark abgeflachte Kugelform hin, wie sie für die B-Pentamere der AB₅-Toxine typisch ist.

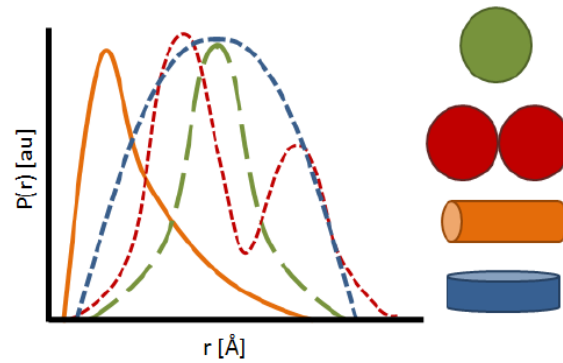


Abb. 5.63: Abstandsverteilungsfunktionen und zugehörige Partikelformen, aus Nyman *et al.* (2015).²²⁶

Mit PRIMUS lässt sich auch das Molekulargewicht des Moleküls modellieren. Mittels Bayes-Interferenz wurde so ein Molekulargewicht von 65,5 kDa abgeschätzt, welches sehr nahe am auf der Aminosäureabfolge basierenden theoretischen Molekulargewicht von 67 kDa liegt.

Im Anschluss wurde mit dem für Proteine optimierten Programm GASBOR, unter Angabe der pentameren Symmetrie und Anzahl der Aminosäuren (*dummy residues*) ein *ab initio* Modell erstellt. Diese ist in Abb. 5.64 als Überlagerung mit der Kristallstruktur dargestellt.

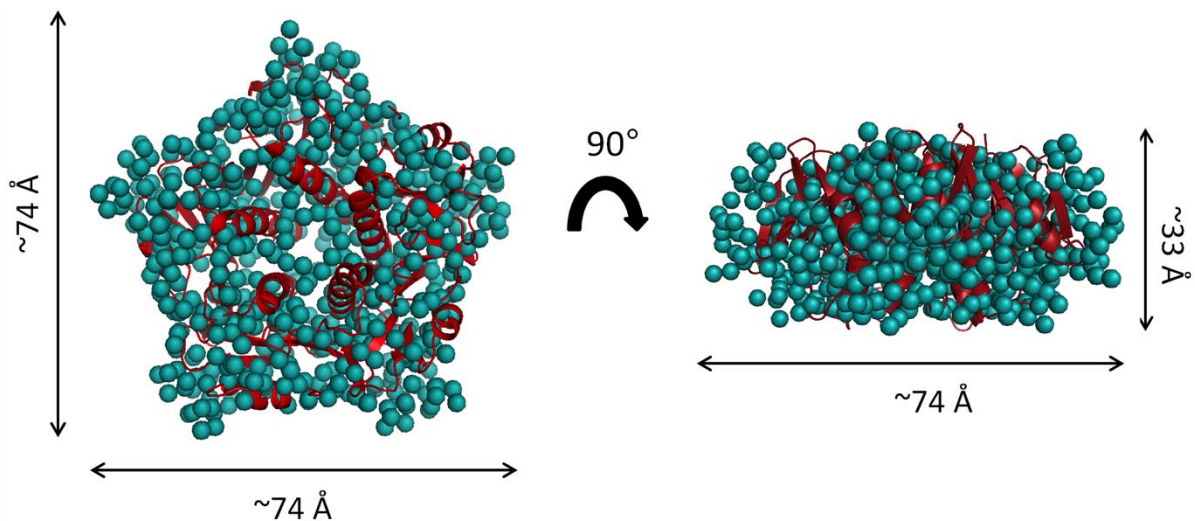


Abb. 5.64: Mit GASBOR berechnetes *ab initio* Modell von CT-B (türkis), überlagert mit dessen publizierter Kristallstruktur (rot, PDB: 1XTC²³).

Die ausgezeichnete Übereinstimmung von Kristallstruktur und *ab initio* Modell lässt auf eine sehr gute Modellierung schließen und bestätigt weiterhin, dass das CT-B im korrekten pentameren Zustand vorliegt.

5.7.2 Aptamer CT916

Als nächstes wurde das Aptamer CT916 im *Batch Mode* gemessen. Zur Auswertung wurde ein Durchschnitt aus einer Messung bei einer Konzentration von 100 μM und zwei Messungen bei einer Konzentration von 50 μM gebildet (Abb. 5.65A). Wie oben wurden daraus Guinier-Plot (Abb. 5.65B) und Abstandsverteilungsfunktion berechnet (Abb. 5.65C).

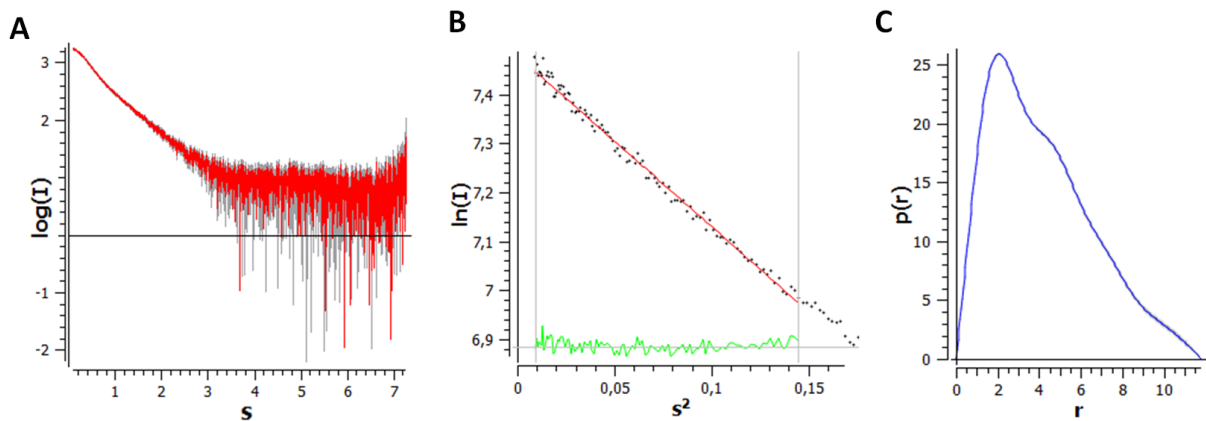


Abb. 5.65: (A) Mittlere Streudaten, (B) Guinier-Plot und (C) Abstandsverteilungsfunktion der SAXS-Daten für CT916.

Ähnlich zu oben deutet die sehr gute Korrelation im Guinier-Plot auf eine sehr gute Datenqualität hin. Der R_g beträgt $3,24 \pm 0,05$ nm und der maximale Durchmesser D_{max} beträgt 11,8 nm. Da die theoretische Länge eines Nukleotids 3,3 Å beträgt, ist die maximale Länge eines Aptamers mit 76 Basen 251 Å. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Aptamer so gefaltet ist, dass sich seine Länge etwas mehr als halbiert. Die Abstandsverteilungsfunktion mit nach links verschobenem Peak deutet auf eine langstreckte Form hin. Kleinere Rücken, wie sie in der Abstandsverteilungsfunktion zu sehen sind, sind typisch für mehr oder weniger unregelmäßig geformte Strukturen wie die der Aptamere, die *stem loops*, *hair pins* und andere Strukturelemente enthalten können.²²⁷ Das mit PRIMUS geschätzte Molekulargewicht liegt bei 28,9 kDa, wobei das theoretische Gewicht des Aptamers 23,3 kDa beträgt. Die Überschätzung lässt sich zum einen auf die unterschiedliche Kompaktheit von Nukleinsäuren und Proteinen, zum anderen auf eine möglicherweise nicht ganz korrekte Konzentrationsangabe des Herstellers zurückführen.

Da sich GASBOR nicht für die Modellierung von Nukleinsäuren eignet, erfolgte die *ab initio* Modellierung des Aptamer-*Envelopes* mit Hilfe des Programms DAMMIF. Im Gegensatz zu

GASBOR wird keine feste Anzahl an *dummy residues* vorgegeben, stattdessen wird die Struktur durch Kugeln auf einem Gitternetz dargestellt. Es wurden 20 Modelle berechnet, welche mit dem Programm DAMAVER zu einem finalen Modell gemittelt wurden. Das daraus errechnete *bead density* Modell ist in Abb 5.66 dargestellt.

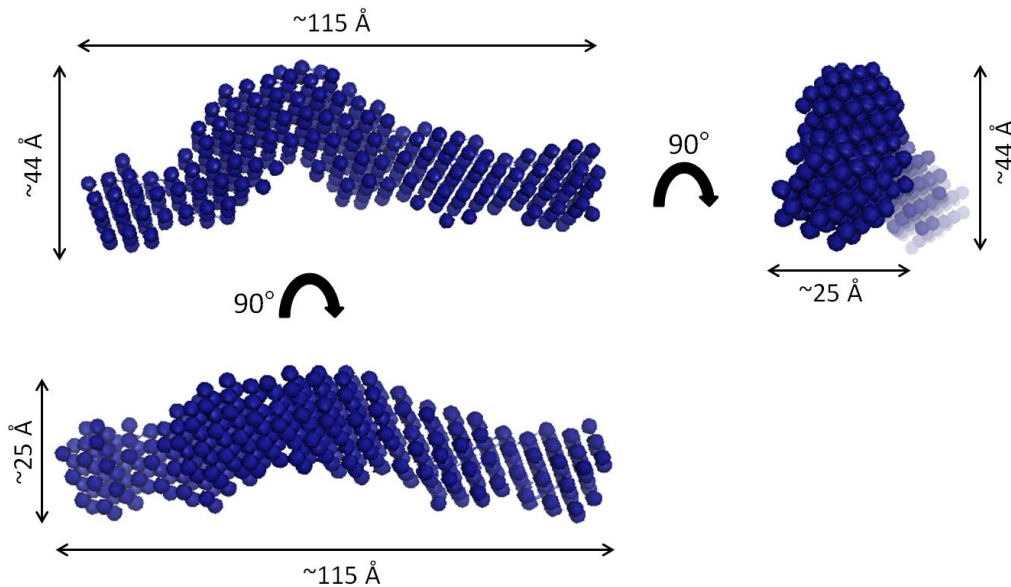


Abb. 5.66: Mit DAMMIF und DAMAVER berechnetes *bead density* Modell (*damfilt*) von CT916.

Der modellierte *Envelope* hat eine langgestreckte Form und bestätigt damit die anhand der Abstandsverteilungsfunktion getroffene Annahme.

Da zur Tertiärstrukturvorhersage von DNA-Aptameren keine Programme zur Verfügung stehen, wurde die Struktur des Aptamers CT916 unter Austausch von T durch U mit dem Webserver *SimRNAweb* als RNA modelliert. Eine Überlagerung des auf den SAXS-Daten basierenden *ab initio* Modells und dem *in silico* Modell ist in Abb. 5.67 dargestellt.

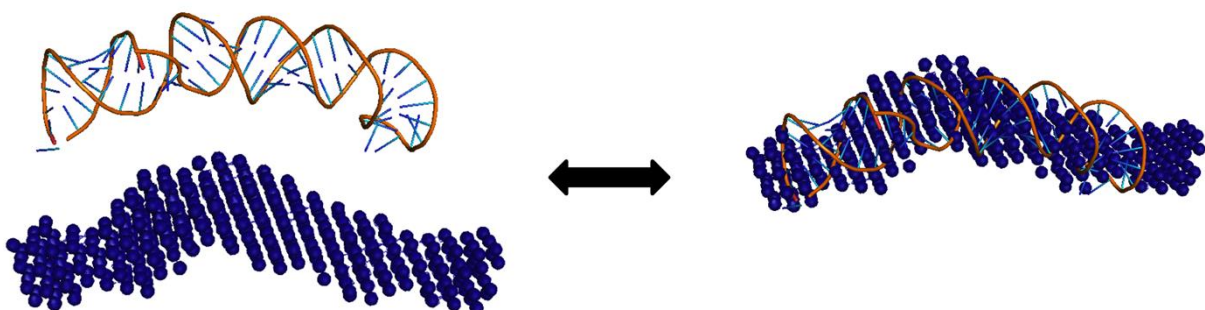


Abb. 5.67: *Ab initio* und *in silico* Modell des Aptamers CT916 sowie *overlay* der beiden Modelle.

5.7.3 Aptamer-Protein-Komplex

Als nächstes wurde der Komplex mittels SEC-SAXS analysiert. Bei SEC-SAXS wird der eigentlichen SAXS-Messung eine Größenausschlusschromatographie *in-line* vorgeschaltet. Dadurch, dass große Moleküle die Säule schneller durchlaufen als kleinere, kann der Komplex von eventuell überschüssigem Protein oder Aptamer getrennt werden. Pro Sekunde findet eine Messung (*frame*) statt, d.h. in einem fünfzigminütigen Lauf werden 3000 Einzelmessungen aufgezeichnet. Das mit dem Programm CHROMIX erstellte zugehörige Chromatogramm ist Abb. 5.68 zu entnehmen.

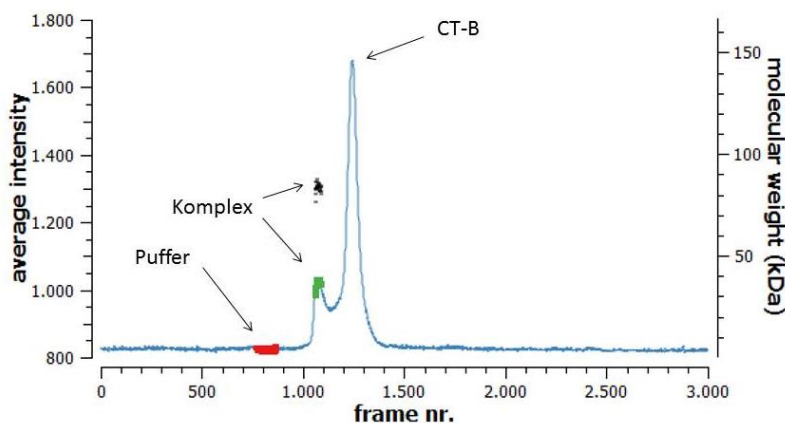


Abb. 5.68: SEC-SAXS Profil nach Streuintensität und vorhergesagtes Molekulargewicht des CT-B-CT916-Komplexes. Grün markiert sind die ausgewählten *frames*, rot markiert ist der Puffer, dessen Streuintensität von der Probenstreuintensität vor der weiteren Prozessierung subtrahiert wurde. Die schwarzen Punkte beschreiben das abgeschätzte Molekulargewicht der einzelnen *frames*.

Der rechte Peak (*~frame* 1200-1300) konnte unter Vergleich der Abstandsverteilungsfunktionen als CT-B identifiziert werden. Folglich musste der linke Peak (*~frame* 1050-1150) aus dem Komplex resultieren, wofür auch das für ausgewählten *frames* berechnete Molekulargewicht zwischen 80 und 90 kDa spricht (theoretisches Molekulargewicht des Komplexes 23 kDa + 67 kDa = 90 kDa). Aus den grün markierten *frames* wurde mit PRIMUS ein Durchschnitt gebildet und die Datenanalyse wie oben durchgeführt (Abb. 5.69).

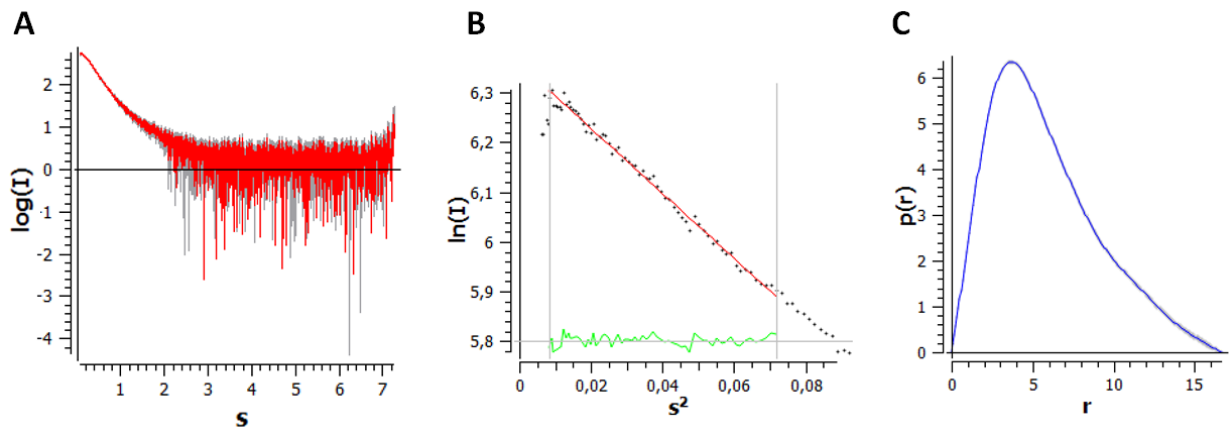


Abb. 5.69: (A) Mittlere Streudaten, (B) Guinier-Plot und (C) Abstandverteilungsfunktion der SAXS-Daten für den Aptamer-Protein-Komplex.

Wie zuvor kann aus dem Guinier-Plot auf eine sehr gute Datenqualität geschlossen werden. R_g und D_{max} wurden als $4,43 \pm 0,11$ nm und 16,6 nm berechnet. Somit ist der Komplex deutlich größer als die Einzelkomponenten CT916 und CT-B. Das mittels Bayes-Interferenz abgeschätzte Molekulargewicht liegt bei 94,2 kDa, wobei die leichte Überschätzung wahrscheinlich wieder auf die Nukleinsäure zurückzuführen ist. Die Bildung eines oligo- oder multimeren Komplexes ist auf Grund des geschätzten Molekulargewichts auszuschließen.

Im Folgenden wurde mittels DAMMIF und DAMAVER ein *ab initio* Modell des Komplexes berechnet. Dieses ist als Überlagerung mit dem *ab initio* Modell von CT-B in Abb. 5.70 dargestellt, wobei die Positionierung des Proteins nur beispielhaft ist.

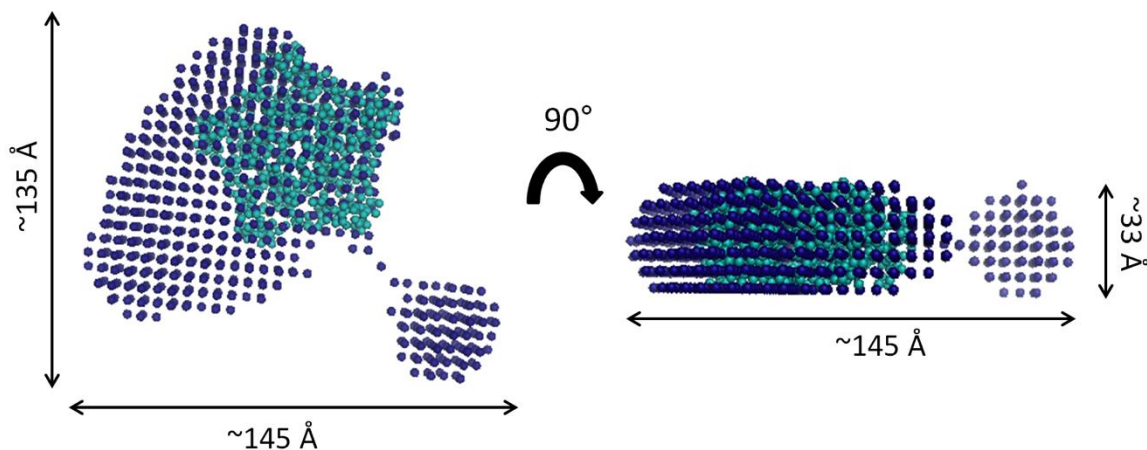


Abb. 5.70: Mit DAMMIF und DAMAVER berechnetes *bead density* Modell (*damfilt*) von des CT916-CT-B-Komplexes, beispielhaft überlagert mit der mittels GASBOR bestimmten Proteinstruktur.

Zur Überprüfung der oben dargestellten Ergebnisse wurden weiterhin SAXS-Messungen des Komplexes im *Batch Mode* durchgeführt. Da im SEC-SAXS-Lauf das Protein im Überschuss vorlag, wurden die *Batch*-Messungen mit doppelter und dreifacher Aptamer Menge durchgeführt. Die Streuprofile der beiden Messungen waren nahezu identisch, sie wurden gemittelt und analog zu oben ausgewertet und modelliert. Das mit DAMMIF und DAMAVER erstellte *ab initio* Modell (grün) ist in Abb. 5.71 als Überlagerung mit dem *ab initio* Modell der SEC-SAXS-Daten (blau) dargestellt. Beide Modelle stimmen sehr gut überein.

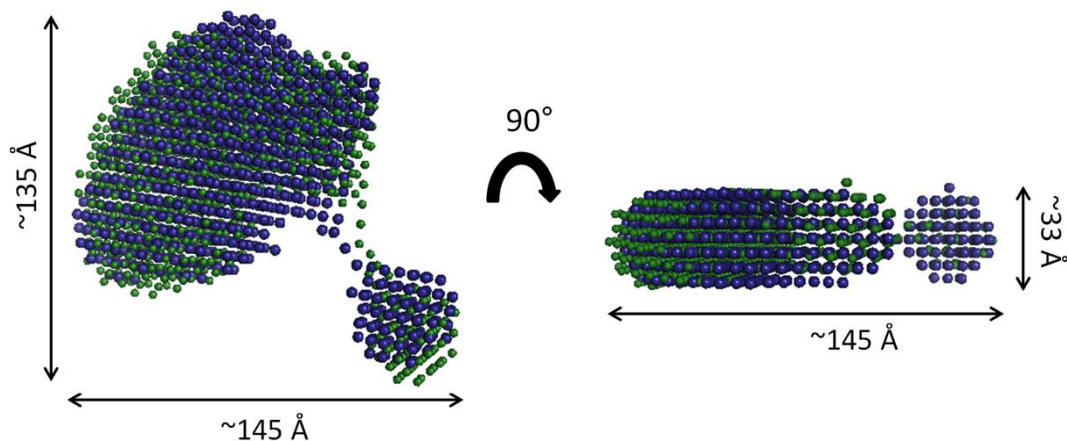


Abb. 5.71: Aus den *Batch*-Daten erstelltes *bead density* Modell überlagert mit dem aus den SEC-SAXS-Daten erstellten *bead density* Modell für den CT-B-CT916-Komplex.

Durch die *ab initio* Modellierung lassen sich keine endgültigen Aussagen über die Interaktionen von CT-B und CT916 treffen. Man kann dem Modell allerdings entnehmen, dass eine Seite des Komplexes mit 33 \AA genauso breit ist wie CT-B. Daher liegt die Annahme nahe, dass das Aptamer seitlich (bei frontaler Betrachtung als „Donut“) an CT-B bindet. Der mit einer dünnen Verbindung am Komplex hängende runde Teil resultiert möglicherweise aus einem flexiblen Bereich des Aptamers. Da der Komplex deutlich größer als Protein und Aptamer alleine ist, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei CT916 um ein *structure switching aptamer* handelt, welches durch die Bindung seine Struktur entfaltet. Die Hypothese, dass das Aptamer seitlich bindet wird zusätzlich dadurch unterstützt, dass (a) zwei Aptamere nicht gleichzeitig an CT-B binden können und (b) GM1 gleichzeitig mit CT916 an CT-B binden kann, da dessen Bindungsstelle nicht verdeckt wird.²²⁸

Bei ähnlichen Fragestellungen erfolgt als nächstes in der Regel ein *docking* oder *rigid body modelling*, bei dem unter Verwendung der SAXS-Daten sowie gegebenenfalls veröffentlichter

Kristallstrukturen die beiden Einzelkomponenten zu einem Komplex zusammengesetzt werden. Da das Aptamer allerdings seine Struktur bei der Bindung wahrscheinlich ändert, waren die Modellierungsversuche mit den einschlägigen Programmen (SASREF, CORAL, MONSA) nicht erfolgreich. Für endgültige Aussagen wären weitere Experimente mit komplementären, hochauflösenden Methoden wie NMR, Kryo-EM oder Kristallstrukturanalyse notwendig.

6 Literatur

- (1) Fan, E.; Merritt, E. A.; Verlinde, C. L.; Hol, W. G. AB₅ toxins: structures and inhibitor design. *Current Opinion in Structural Biology* 2000;10(6):680-686.
- (2) Lencer, W. I.; Saslowsky, D. Raft trafficking of AB₅ subunit bacterial toxins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2005;1746(3):314-321.
- (3) Beddoe, T.; Paton, A. W.; Le Nours, J.; Rossjohn, J.; Paton, J. C. Structure, biological functions and applications of the AB₅ toxins. *Trends in Biochemical Sciences* 2010;35(7):411-418.
- (4) Hajishengallis, G.; Connell, T. D. Type II Heat-labile Enterotoxins: Structure, Function, and Immunomodulatory Properties. *Veterinary immunology and immunopathology* 2013;152(1-2):68-77.
- (5) Li, J. Bacterial toxins. *Current Opinion in Structural Biology* 1992;2(4):545-556.
- (6) Ali, M.; Nelson, A. R.; Lopez, A. L.; Sack, D. A. Updated global burden of cholera in endemic countries. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2015;9(6).
- (7) World Health Organization. Yemen Cholera Response Weekly Epidemiological Bulletin W26 2018.
- (8) Heggelund, J. E.; Bjørnstad, V. A.; Kregel, U. *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins and beyond. In: Alouf J, Ladant D, Popoff MR, editors. The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins (Fourth Edition) Boston: Academic Press; 2015. p. 195-229.
- (9) Scallan, E.; Hoekstra, R. M.; Angulo, F. J.; Tauxe, R. V.; Widdowson, M. A.; Roy, S. L.; Jones, J. L.; Griffin, P. M. Foodborne Illness Acquired in the United States - Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases* 2011;17(1):7-15.
- (10) Majowicz, S. E.; Scallan, E.; Jones-Bitton, A.; Sargeant, J. M.; Stapleton, J.; Angulo, F. J.; Yeung, D. H.; Kirk, M. D. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne pathogens and disease* 2014;11(6):447-455.
- (11) Jokiranta, T. S. HUS and atypical HUS. *Blood* 2017;129(21):2847-2856.
- (12) Hunt, J. M. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). *Clinics in Laboratory Medicine* 2010;30(1):21-45.
- (13) Kase, J. A.; Maounounen-Laasri, A.; Lin, A. Rapid Identification of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O Serogroups from Fresh Produce and Raw Milk Enrichment Cultures by Luminex Bead-Based Suspension Array. *Journal of food protection* 2016;79(9):1623-1629.
- (14) Appel, B.; Böhl, G.; Greiner, M.; Lahrssen-Wiederholt, M.; Hensel, A. EHEC Outbreak 2011: Investigation of the Outbreak Along the Food Chain. Bericht 2011.
- (15) Robert Koch-Institut; Bericht: Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch, Deutschland 2011. Bericht 2011.
- (16) Paton, A. W.; Paton, J. C. *Escherichia coli* Subtilase Cytotoxin. *Toxins* 2010;2(2):215-228.

- (17) Krishnaswamy, S.; Wallace, E. M.; Cheng, A. C.; Buttery, J.; Giles, M. L. Protecting newborns from pertussis: The role of partner vaccination in the era of maternal immunization. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2017;216:159-163.
- (18) Sanchez, J.; Holmgren, J. Cholera toxin - a foe & a friend. *The Indian journal of medical research* 2011;133:153-163.
- (19) Guan, J.; Zhang, Z.; Hu, X.; Yang, Y.; Chai, Z.; Liu, X.; Liu, J.; Gao, B.; Lu, W.; Qian, J.; Zhan, C. Cholera Toxin Subunit B Enabled Multifunctional Glioma-Targeted Drug Delivery. *Advanced healthcare materials* 2017;6(23):1-10.
- (20) Tarrago-Trani, M. T.; Jiang, S.; Harich, K. C.; Storrie, B. Shiga-like toxin subunit B (SLTB)-enhanced delivery of chlorin e6 (Ce6) improves cell killing. *Photochemistry and photobiology* 2006;82(2):527-537.
- (21) Odumosu, O.; Nicholas, D.; Yano, H.; Langridge, W. AB Toxins: A Paradigm Switch from Deadly to Desirable. *Toxins* 2010;2(7):1612-1645.
- (22) Ludwig, D. S.; Ribi, H. O.; Schoolnik, G. K.; Kornberg, R. D. Two-dimensional crystals of cholera toxin B-subunit-receptor complexes: projected structure at 17-A resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986;83(22):8585-8588.
- (23) Zhang, R. G.; Scott, D. L.; Westbrook, M. L.; Nance, S.; Spangler, B. D.; Shipley, G. G.; Westbrook, E. M. The three-dimensional crystal structure of cholera toxin. *Journal of Molecular Biology* 1995;251(4):563-573.
- (24) Davis, B. M.; Moyer, K. E.; Boyd, E. F.; Waldor, M. K. CTX Prophages in Classical Biotype *Vibrio cholerae*: Functional Phage Genes but Dysfunctional Phage Genomes. *Journal of Bacteriology* 2000;182(24):6992-6998.
- (25) Lajoie, P.; Nabi, I. R. Lipid Rafts, Caveolae, and Their Endocytosis. *International Review of Cell and Molecular Biology* 2010;282:135-163.
- (26) Vanden Broeck, D.; Horvath, C.; De Wolf, M. J. S. *Vibrio cholerae*: Cholera toxin. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2007;39(10):1771-1775.
- (27) Sánchez, J.; Holmgren, J. Virulence factors, pathogenesis and vaccine protection in cholera and ETEC diarrhea. *Current Opinion in Immunology* 2005;17(4):388-398.
- (28) Farwanah, H.; Kolter, T. Lipidomics of glycosphingolipids. *Metabolites* 2012;2(1):134-164.
- (29) Said, B.; Scotland, S. M.; Rowe, B. The use of gene probes, immunoassays and tissue culture for the detection of toxin in *Vibrio cholerae* non-O1. *Journal of medical microbiology* 1994;40(1):31-36.
- (30) Evers, D. L.; He, J.; Mason, J. T.; O'Leary, T. J. The liposome PCR assay is more sensitive than the *Vibrio cholerae* enterotoxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin reversed passive latex agglutination test at detecting cholera toxin in feces and water. *Journal of clinical microbiology* 2010;48(12):4620-4622.
- (31) Almeida, R. J.; Hickmann-Brenner, F. W.; Sowers, E. G.; Puhr, N. D.; Farmer III, J. J.; Wachsmuth, I. K. Comparison of a latex agglutination assay and an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting cholera toxin. *Journal of clinical microbiology* 1990;28(1):128-130.
- (32) Kuziemko, G. M.; Stroh, M.; Stevens, R. C. Cholera toxin binding affinity and specificity for gangliosides determined by surface plasmon resonance. *Biochemistry* 1996;35(20):6375-6384.

- (33) Archibald, M. M.; Rizal, B.; Connolly, T.; Burns, M. J.; Naughton, M. J.; Chiles, T. C. A nanocoaxial-based electrochemical sensor for the detection of cholera toxin. *Biosensors and Bioelectronics* 2015;74:406-410.
- (34) Labib, M.; Hedstrom, M.; Amin, M.; Mattiasson, B. A capacitive immunosensor for detection of cholera toxin. *Analytica Chimica Acta* 2009;634(2):255-261.
- (35) Ramamurthy, T.; Pal, A.; Bag, P. K.; Bhattacharya, S. K.; Nair, G. B.; Kurozano, H.; Yamasaki, S.; Shirai, H.; Takeda, T.; Uesaka, Y. Detection of cholera toxin gene in stool specimens by polymerase chain reaction: comparison with bead enzyme-linked immunosorbent assay and culture method for laboratory diagnosis of cholera. *Journal of clinical microbiology* 1993;31(11):3068-3070.
- (36) Ahn-Yoon, S.; DeCory, T. R.; Baeumner, A. J.; Durst, R. A. Ganglioside-liposome immunoassay for the ultrasensitive detection of cholera toxin. *Analytical Chemistry* 2003;75(10):2256-2261.
- (37) Feng, P. C.; Reddy, S. Prevalences of Shiga toxin subtypes and selected other virulence factors among Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains isolated from fresh produce. *Applied and Environmental Microbiology* 2013;79(22):6917-6923.
- (38) Pezeshkian, W.; Gao, H.; Arumugam, S.; Becken, U.; Bassereau, P.; Florent, J. C.; Ipsen, J. H.; Johannes, L.; Shillcock, J. C. Mechanism of Shiga Toxin Clustering on Membranes. *ACS Nano* 2017;11(1):314-324.
- (39) Sandvig, K. Shiga toxins. *Toxicon* 2001;39(11):1629-1635.
- (40) Fraser, M. E.; Chernai, M. M.; Kozlov, Y. V.; James, M. N. Crystal structure of the holotoxin from *Shigella dysenteriae* at 2.5 Å resolution. *Nature structural biology* 1994;1(1):59-64.
- (41) Basu, D.; Tumer, N. E. Do the A Subunits Contribute to the Differences in the Toxicity of Shiga Toxin 1 and Shiga Toxin 2? *Toxins* 2015;7(5):1467-1485.
- (42) Gariépy, J. The use of Shiga-like toxin 1 in cancer therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2001;39(1):99-106.
- (43) Robert Koch-Institut. EHEC Erkrankung - RKI Ratgeber. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_EHEC.html (Zugriff 04.04.18).
- (44) Suzuki, N.; Khoo, K. H.; Chen, H. C.; Johnson, J. R.; Lee, Y. C. Isolation and characterization of major glycoproteins of pigeon egg white: ubiquitous presence of unique N-glycans containing Gal α 1-4Gal. *The Journal of biological chemistry* 2001;276(26):23221-23229.
- (45) He, X.; Kong, Q.; Patfield, S.; Skinner, C.; Rasooly, R. A New Immunoassay for Detecting All Subtypes of Shiga Toxins Produced by Shiga Toxin-Producing *E. coli* in Ground Beef. *PloS one* 2016;11(1):e0148092.
- (46) Skinner, C.; Patfield, S.; Stanker, L. H.; Fratamico, P.; He, X. New high-affinity monoclonal antibodies against Shiga toxin 1 facilitate the detection of hybrid Stx1/Stx2 in vivo. *PloS one* 2014;9(6):e99854.
- (47) Ching, K. H.; He, X.; Stanker, L. H.; Lin, A. V.; McGarvey, J. A.; Hnasko, R. Detection of shiga toxins by lateral flow assay. *Toxins* 2015;7(4):1163-1173.
- (48) Kuo, F. Y.; Chang, B. Y.; Wu, C. Y.; Mong, K. K.; Chen, Y. C. Magnetic Nanoparticle-Based Platform for Characterization of Shiga-like Toxin 1 from Complex Samples. *Analytical Chemistry* 2015;87(20):10513-10520.
- (49) Goldman, E. R.; Clapp, A. R.; Anderson, G. P.; Uyeda, H. T.; Mauro, J. M.; Medintz, I. L.; Mattoussi, H. Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents. *Analytical Chemistry* 2004;76(3):684-688.

- (50) Li, C. H.; Bai, Y. L.; Selvaprakash, K.; Mong, K. T.; Chen, Y. C. Selective Detection of Shiga-like Toxin 1 from Complex Samples Using Pigeon Ovalbumin Functionalized Gold Nanoparticles as Affinity Probes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2017;65(21):4359-4365.
- (51) Yamasaki, E.; Watahiki, M.; Isobe, J.; Sata, T.; Nair, G. B.; Kurazono, H. Quantitative Detection of Shiga Toxins Directly from Stool Specimens of Patients Associated with an Outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Japan - Quantitative Shiga toxin detection from stool during EHEC outbreak. *Toxins* 2015;7(10):4381-4389.
- (52) Alere Inc. <https://www.alere.com/en/home/product-details/shiga-toxin-quick-check-test.html>. (Zugriff: 10.04.18).
- (53) Groff, K.; Brown, J.; Clippinger, A. J. Modern affinity reagents: Recombinant antibodies and aptamers. *Biotechnology Advances* 2015;33(8):1787-1798.
- (54) Hermann, T.; Patel, D. J. Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers. *Science* 2000;287(5454):820.
- (55) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 1990;346(6287):818-822.
- (56) Robertson, D. L.; Joyce, G. F. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature* 1990;344(6265):467-468.
- (57) Tuerk, C.; Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 1990;249(4968):505-510.
- (58) Ilgu, M.; Nilsen-Hamilton, M. Aptamers in analytics. *The Analyst* 2016;141(5):1551-1568.
- (59) McKeague, M.; DeRosa, M. Aptamers and SELEX: Tools for the Development of Transformative Molecular Recognition Technology. *Aptamers and Synthetic Antibodies* 2014;1(1)12-16.
- (60) Wu, Z.; Shen, H.; Hu, J.; Fu, Q.; Yao, C.; Yu, S.; Xiao, W.; Tang, Y. Aptamer-based fluorescence-quenching lateral flow strip for rapid detection of mercury (II) ion in water samples. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2017;409(22):5209-521.
- (61) McKeague, M.; DeRosa, M. C. Challenges and opportunities for small molecule aptamer development. *Journal of nucleic acids* 2012;2012:748913.
- (62) Agyei, D.; Acquah, C.; Tan, K. X.; Hii, H. K.; Rajendran, S. R. C. K.; Udenigwe, C. C.; Danquah, M. K. Prospects in the use of aptamers for characterizing the structure and stability of bioactive proteins and peptides in food. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2017;410(2):297-30.
- (63) Amraee, M.; Oloomi, M.; Yavari, A.; Bouzari, S. DNA aptamer identification and characterization for *E. coli* O157 detection using cell based SELEX method. *Analytical Biochemistry* 2017;536:36-44.
- (64) Hunniger, T.; Fischer, C.; Wessels, H.; Hoffmann, A.; Paschke-Kratzin, A.; Haase, I.; Fischer, M. Food sensing: selection and characterization of DNA aptamers to *Alicyclobacillus* spores for trapping and detection from orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2015;63(8):2189-2197.
- (65) Hirose, K.; Tsuchida, M.; Asakura, H.; Wakui, K.; Yoshimoto, K.; Iida, K.; Sato, M.; Shibukawa, M.; Suganuma, M.; Saito, S. A single-round selection of selective DNA aptamers for mammalian cells by polymer-enhanced capillary transient isotachopheresis. *The Analyst* 2017;142(21):4030-4038.

- (66) Russo Krauss, I.; Merlino, A.; Randazzo, A.; Novellino, E.; Mazzarella, L.; Sica, F. High-resolution structures of two complexes between thrombin and thrombin-binding aptamer shed light on the role of cations in the aptamer inhibitory activity. *Nucleic acids research* 2012;40(16):8119-8128.
- (67) Holleman, A. F.; Wiberg, E.; Wiberg, N. Lehrbuch der Anorganischen Chemie. 102. Auflage. de Gruyter, Berlin. 2007
- (68) Tan, W.; Wang, H.; Chen, Y.; Zhang, X.; Zhu, H.; Yang, C.; Yang, R. Molecular aptamers for drug delivery. *Trends in biotechnology* 2011;29(12):634-640.
- (69) Song, K.; Lee, S.; Ban, C. Aptamers and Their Biological Applications. *Sensors (Basel, Switzerland)* 2012;12(1):612-631.
- (70) Hong, K. L.; Sooter, L. J. Single-Stranded DNA Aptamers against Pathogens and Toxins: Identification and Biosensing Applications. *BioMed research international* 2015;2015:419318.
- (71) Sun, H.; Zu, Y. A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and Its Application. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2015;20(7):11959-11980.
- (72) Darmostuk, M.; Rimpelova, S.; Gbelcova, H.; Ruml, T. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnology Advances; BioTech 2014 and 6th Czech-Swiss Biotechnology Symposium* 2015;33(6):1141-1161.
- (73) Sanger, F.; Coulson, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* 1975;94(3):441-448.
- (74) Schutze, T.; Wilhelm, B.; Greiner, N.; Braun, H.; Peter, F.; Morl, M.; Erdmann, V. A.; Lehrach, H.; Konthur, Z.; Menger, M.; Arndt, P. F.; Glöckler, J. Probing the SELEX process with next-generation sequencing. *PLoS one* 2011;6(12):e29604.
- (75) Ohuchi, S.. Cell-SELEX Technology. *BioResearch Open Access* 2012;1(6):265-272.
- (76) Hamedani, N. S.; Müller, J. Capillary Electrophoresis for the Selection of DNA Aptamers Recognizing Activated Protein C. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2016;1380:61-75.
- (77) Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B. FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2005;383(1):83-91.
- (78) Wang, J.; Yu, J.; Yang, Q.; McDermott, J.; Scott, A.; Vukovich, M.; Lagrois, R.; Gong, Q.; Greenleaf, W.; Eisenstein, M.; Ferguson, B. S.; Soh, H. T. Multiparameter Particle Display (MPPD): A Quantitative Screening Method for the Discovery of Highly Specific Aptamers. *Angewandte Chemie (International ed.in English)* 2017;56(3):744-747.
- (79) Zimmermann, B.; Bilusic, I.; Lorenz, C.; Schroeder, R. Genomic SELEX: A discovery tool for genomic aptamers. *Methods (San Diego, Calif.)* 2010;52(2-2):125-132.
- (80) Tolle, F.; Brandle, G. M.; Matzner, D.; Mayer, G. A Versatile Approach Towards Nucleobase-Modified Aptamers. *Angewandte Chemie (International ed.in English)* 2015;54(37):10971-10974.
- (81) Kraemer, S.; Vaught, J. D.; Bock, C.; Gold, L.; Katilius, E.; Keeney, T. R.; Kim, N.; Saccomano, N. A.; Wilcox, S. K.; Zichi, D.; Sanders, G. M. From SOMAmer-based biomarker discovery to diagnostic and clinical applications: a SOMAmer-based, streamlined multiplex proteomic assay. *PLoS one* 2011;6(10):e26332.

- (82) Wlotzka, B.; Leva, S.; Eschgfäller, B.; Burmeister, J.; Kleinjung, F.; Kaduk, C.; Muhn, P.; Hess-Stumpff, H.; Klussmann, S. In vivo properties of an anti-GnRH Spiegelmer: an example of an oligonucleotide-based therapeutic substance class. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99(13):8898-8902.
- (83) Blind, M.; Blank, M. Aptamer Selection Technology and Recent Advances. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 2015;4(Supplement C):e223.
- (84) Caroli, J.; Taccioli, C.; De La Fuente, A.; Serafini, P.; Bicciato, S. APTANI: a computational tool to select aptamers through sequence-structure motif analysis of HT-SELEX data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2016;32(2):161-164.
- (85) Schütze, T.; Rubelt, F.; Repkow, J.; Greiner, N.; Erdmann, V. A.; Lehrach, H.; Konthur, Z.; Glokler, J. A streamlined protocol for emulsion polymerase chain reaction and subsequent purification. *Analytical Biochemistry* 2011;410(1):155-157.
- (86) Acinas, S. G.; Sarma-Rupavtarm, R.; Klepac-Ceraj, V.; Polz, M. F. PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Applied and Environmental Microbiology* 2005;71(12):8966-8969.
- (87) Salahudeen, M. S.; Nishtala, P. S. An overview of pharmacodynamic modelling, ligand-binding approach and its application in clinical practice. *Saudi Pharmaceutical Journal : SPJ* 2017;25(2):165-175.
- (88) McKeague, M.; De Girolamo, A.; Valenzano, S.; Pascale, M.; Ruscito, A.; Velu, R.; Frost, N. R.; Hill, K.; Smith, M.; McConnell, E. M.; DeRosa, M. C. Comprehensive analytical comparison of strategies used for small molecule aptamer evaluation. *Analytical Chemistry* 2015;87(17):8608-8612.
- (89) Fischer, C.; Kallinich, C.; Klockmann, S.; Schrader, J.; Fischer, M. Automated Enrichment of Sulfanilamide in Milk Matrices by Utilization of Aptamer-Linked Magnetic Particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2016;64(48):9246-9252.
- (90) Frohnmeyer, E.; Frisch, F.; Falke, S.; Betzel, C.; Fischer, M. Highly affine and selective aptamers against cholera toxin as capture elements in magnetic bead-based sandwich ELISA. *Journal of Biotechnology* 2018;269:35-42.
- (91) Jerabek-Willemsen, M.; André, T.; Wanner, R.; Roth, H. M.; Duhr, S.; Baaske, P.; Breitsprecher, D. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure* 2014;1077(Supplement C):101-113.
- (92) Jerabek-Willemsen, M.; Wienken, C. J.; Braun, D.; Baaske, P.; Duhr, S. Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. *Assay and Drug Development Technologies* 2011;9(4):342-353.
- (93) Nguyen, H. H.; Park, J.; Kang, S.; Kim, M. Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications. *Sensors (Basel, Switzerland)* 2015;15(5):10481-10510.
- (94) Ara, M. N.; Hyodo, M.; Ohga, N.; Hida, K.; Harashima, H. Development of a Novel DNA Aptamer Ligand Targeting to Primary Cultured Tumor Endothelial Cells by a Cell-Based SELEX Method. *PLoS ONE* 2012;7(12):e50174.
- (95) Jing, M.; Bowser, M. T. A Review of Methods for Measuring Aptamer-Protein Equilibria. *Analytica Chimica Acta* 2010;686(1-2):9-18.
- (96) Catuogno, S.; Esposito, C. L.; de Franciscis, V. Aptamer-Mediated Targeted Delivery of Therapeutics: An Update. *Pharmaceuticals* 2016;9(4):69.

- (97) Hu, Y.; Duan, J.; Zhan, Q.; Wang, F.; Lu, X.; Yang, X. D. Novel MUC1 aptamer selectively delivers cytotoxic agent to cancer cells in vitro. *PLoS one* 2012;7(2):e31970.
- (98) Liu, Z.; Duan, J. H.; Song, Y. M.; Ma, J.; Wang, F. D.; Lu, X.; Yang, X. D. Novel HER2 aptamer selectively delivers cytotoxic drug to HER2-positive breast cancer cells in vitro. *Journal of translational medicine* 2012;10:148-5876-10-148.
- (99) Wang, T.; Gantier, M. P.; Xiang, D.; Bean, A. G.; Bruce, M.; Zhou, S. F.; Khasraw, M.; Ward, A.; Wang, L.; Wei, M. Q.; AlShamaileh, H.; Chen, L.; She, X.; Lin, J.; Kong, L.; Shigdar, S.; Duan, W. EpCAM Aptamer-mediated Survivin Silencing Sensitized Cancer Stem Cells to Doxorubicin in a Breast Cancer Model. *Theranostics* 2015;5(12):1456-1472.
- (100) Meng, H. M.; Liu, H.; Kuai, H.; Peng, R.; Mo, L.; Zhang, X. B. Aptamer-integrated DNA nanostructures for biosensing, bioimaging and cancer therapy. *Chemical Society Reviews* 2016;45(9):2583-2602.
- (101) Rong, Y.; Chen, H.; Zhou, X.; Yin, C.; Wang, B.; Peng, C.; Liu, S.; Wang, F. Identification of an aptamer through whole cell-SELEX for targeting high metastatic liver cancers. *Oncotarget* 2016;7(7):8282-8294.
- (102) Ahmadzadeh-Raji, M.; Ghafar-Zadeh, E.; Amoabediny, G. An Optically-Transparent Aptamer-Based Detection System for Colon Cancer Applications Using Gold Nanoparticles Electrodeposited on Indium Tin Oxide. *Sensors (Basel, Switzerland)* 2016;16(7):1071.
- (103) Zheng, J.; Zhao, S.; Yu, X.; Huang, S.; Liu, H. Y. Simultaneous targeting of CD44 and EpCAM with a bispecific aptamer effectively inhibits intraperitoneal ovarian cancer growth. *Theranostics* 2017;7(5):1373-1388.
- (104) Kong, H. Y.; Byun, J. Screening and Characterization of a Novel RNA Aptamer That Specifically Binds to Human Prostatic Acid Phosphatase and Human Prostate Cancer Cells. *Molecules and cells* 2014;38(2):171-179.
- (105) Ahirwar, R.; Vellarikkal, S. K.; Sett, A.; Sivasubbu, S.; Scaria, V.; Bora, U.; Borthakur, B. B.; Kataki, A. C.; Sharma, J. D.; Nahar, P. Aptamer-Assisted Detection of the Altered Expression of Estrogen Receptor Alpha in Human Breast Cancer. *PLoS ONE* 2016;11(4):e0153001.
- (106) Viores, S. A. Pegaptanib in the treatment of wet, age-related macular degeneration. *International Journal of Nanomedicine* 2006;1(3):263-268.
- (107) Lao, Y. H.; Phua, K. K.; Leong, K. W. Aptamer nanomedicine for cancer therapeutics: barriers and potential for translation. *ACS nano* 2015;9(3):2235-2254.
- (108) Parashar, A. Aptamers in Therapeutics. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2016;10(6):1-6.
- (109) Purschke, W. G.; Eulberg, D.; Buchner, K.; Vonhoff, S.; Klussmann, S. An l-RNA-based aquaretic agent that inhibits vasopressin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;103(13):5173-5178.
- (110) Purschke, W. G.; Radtke, F.; Kleinjung, F.; Klussmann, S. A DNA Spiegelmer to staphylococcal enterotoxin B. *Nucleic acids research* 2003;31(12):3027-3032.
- (111) Teubner, B. J. W.; Bartness, T. J. Anti-ghrelin Spiegelmer inhibits exogenous ghrelin-induced increases in food intake, hoarding, and neural activation, but not food deprivation-induced increases. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2013;305(4):323-333.
- (112) Rapini, R.; Marrazza, G. Electrochemical aptasensors for contaminants detection in food and environment: Recent advances. *Bioelectrochemistry* 2017;118(Supplement C):47-61.

- (113) Ahmad Raston, N. H.; Nguyen, V. T.; Gu, M. B. A new lateral flow strip assay (LFSA) using a pair of aptamers for the detection of Vaspin. *Biosensors & bioelectronics* 2017;93:21-25.
- (114) Sajid, M.; Kawde, A.; Daud, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society* 2015;19(6):689-705.
- (115) Koczula, K. M.; Gallotta, A. Lateral flow assays. *Essays in biochemistry* 2016;60(1):111-120.
- (116) Jauset-Rubio, M.; El-Shahawi, M.; Bashammakh, A. S.; Alyoubi, A. O.; O'Sullivan, C. K. Advances in aptamers-based lateral flow assays. *Trends in Analytical Chemistry* 2017;97:385-398.
- (117) Assadollahi, S.; Reininger, C.; Palkovits, R.; Pointl, P.; Schalkhammer, T. From Lateral Flow Devices to a Novel Nano-Color Microfluidic Assay. *Sensors* 2009;9(8).
- (118) Xu, H.; Mao, X.; Zeng, Q.; Wang, S.; Kawde, A. N.; Liu, G. Aptamer-functionalized gold nanoparticles as probes in a dry-reagent strip biosensor for protein analysis. *Analytical Chemistry* 2009;81(2):669-675.
- (119) Minagawa, H.; Onodera, K.; Fujita, H.; Sakamoto, T.; Akitomi, J.; Kaneko, N.; Shiratori, I.; Kuwahara, M.; Horii, K.; Waga, I. Selection, Characterization and Application of Artificial DNA Aptamer Containing Appended Bases with Sub-nanomolar Affinity for a Salivary Biomarker. *Scientific reports* 2017;7:42716.
- (120) Seidel, C.; Peters, S.; Eschbach, E.; Feßler, A. T.; Oberheitmann, B.; Schwarz, S. Development of a nucleic acid lateral flow immunoassay (NALFIA) for reliable, simple and rapid detection of the methicillin resistance genes *mecA* and *mecC*. *Veterinary Microbiology* 2017;200(Supplement C):101-106.
- (121) Terao, Y.; Takeshita, K.; Nishiyama, Y.; Morishita, N.; Matsumoto, T.; Morimatsu, F. Promising Nucleic Acid Lateral Flow Assay Plus PCR for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Journal of food protection* 2015;78(8):1560-1568.
- (122) Park, J. H.; Cho, Y. S.; Kang, S.; Lee, E. J.; Lee, G. H.; Hah, S. S. A colorimetric sandwich-type assay for sensitive thrombin detection based on enzyme-linked aptamer assay. *Analytical Biochemistry* 2014;462:10-12.
- (123) Hianik, T.; Wang, J. Electrochemical Aptasensors - Recent Achievements and Perspectives. *Electroanalysis* 2009;21(11):1223-1235.
- (124) Ni, X.; Xia, B.; Wang, L.; Ye, J.; Du, G.; Feng, H.; Zhou, X.; Zhang, T.; Wang, W. Fluorescent aptasensor for 17beta-estradiol determination based on gold nanoparticles quenching the fluorescence of Rhodamine B. *Analytical Biochemistry* 2017;523:17-23.
- (125) Mukherjee, M.; Bhatt, P.; H, K. M. Fluorescent competitive aptasensor for detection of aflatoxin B1. *Journal of Molecular Recognition* 2017;30(12)e2650.
- (126) Vasilescu, A.; Purcarea, C.; Popa, E.; Zamfir, M.; Mihai, I.; Litescu, S.; David, S.; Gaspar, S.; Gheorghiu, M.; Jean-Louis, M. Versatile SPR aptasensor for detection of lysozyme dimer in oligomeric and aggregated mixtures. *Biosensors & bioelectronics* 2016;83:353-360.
- (127) Cennamo, N.; Pesavento, M.; Lunelli, L.; Vanzetti, L.; Pederzoli, C.; Zeni, L.; Pasquardini, L. An easy way to realize SPR aptasensor: A multimode plastic optical fiber platform for cancer biomarkers detection. *Talanta* 2015;140:88-95.
- (128) Zhao, Q.; Wu, M.; Chris Le, X.; Li, X. Applications of aptamer affinity chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* 2012;41(Supplement C):46-57.

- (129) Sakamoto, T. NMR study of aptamers. *Aptamers* 2017(1):13-18.
- (130) Ruigrok, V. J.; Levisson, M.; Hekelaar, J.; Smidt, H.; Dijkstra, B. W.; van der Oost, J. Characterization of aptamer-protein complexes by X-ray crystallography and alternative approaches. *International journal of molecular sciences* 2012;13(8):10537-10552.
- (131) Milne, J. L. S.; Borgnia, M. J.; Bartesaghi, A.; Tran, E. E. H.; Earl, L. A.; Schauder, D. M.; Lengyel, J.; Pierson, J.; Patwardhan, A.; Subramaniam, S. Cryo-electron microscopy: A primer for the non-microscopist. *The FEBS journal* 2012;280(1):28-45.
- (132) Bartesaghi, A.; Merk, A.; Banerjee, S.; Matthies, D.; Wu, X.; Milne, J. L. S.; Subramaniam, S. 2.2 Å resolution cryo-EM structure of β -galactosidase in complex with a cell-permeant inhibitor. *Science* 2015;348(6239):1147-1151.
- (133) Schmidt, A.; Teeter, M.; Weckert, E.; Lamzin, V. S. Crystal structure of small protein crambin at 0.48 Å resolution. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* 2011;67(Pt 4):424-428.
- (134) European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Technical characteristics of beamline P12. <https://www.embl-hamburg.de/biosaxs/p12/characteristics.html> (Zugriff: 30.04.18).
- (135) Petoukhov, M. V.; Svergun, D. I. Applications of small-angle X-ray scattering to biomacromolecular solutions. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2013;45(2):429-437.
- (136) Sayers, Z.; Avsar, B.; Cholak, E.; Karmous, I. Application of advanced X-ray methods in life sciences. *Biochimica et biophysica acta* 2017;1861(1 Pt B):3671-3685.
- (137) Korasick, D. A.; Tanner, J. J. Determination of protein oligomeric structure from small-angle X-ray scattering. *Protein science: a publication of the Protein Society* 2018;27(4):814-824.
- (138) Szameit, K.; Berg, K.; Kruspe, S.; Valentini, E.; Magbanua, E.; Kwiatkowski, M.; Chauvot, d. B.; Krichel, B.; Schamoni, K.; Uetrecht, C.; Svergun, D. I.; Schlüter, H.; Zacharias, M.; Hahn, U. Structure and target interaction of a G-quadruplex RNA-aptamer. *RNA Biology* 2016;13:973-987.
- (139) Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979;76(9):4350-4354.
- (140) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-254.
- (141) Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M. R.; Appel, R. D.; Bairoch, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. 2005:571-607 (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press. pp. 571-607
- (142) Hünninger, T.; Wessels, H.; Fischer, C.; Paschke-Kratzin, A.; Fischer, M. Just in time -selection: A rapid semiautomated SELEX of DNA aptamers using magnetic separation and BEAMing. *Analytical Chemistry* 2014;86(21):10940-10947.
- (143) Britten, R. J.; Kohne, D. E. Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. *Science* 1968;161(3841):529-540.
- (144) Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* 2003;31(13):3406-3415.

- (145) Bailey, T. L.; Boden, M.; Buske, F. A.; Frith, M.; Grant, C. E.; Clementi, L.; Ren, J.; Li, W. W.; Noble, W. S. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research* 2009;37:W202-8.
- (146) Lam, E. Y.; Beraldi, D.; Tannahill, D.; Balasubramanian, S. G-quadruplex structures are stable and detectable in human genomic DNA. *Nature communications* 2013;4:1796.
- (147) Kikin, O.; D'Antonio, L.; Bagga, P. S. QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic acids research* 2006;34:W676-82.
- (148) DIN 32645:2008-11, Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung.
- (149) Schulz, F.; Vossmeier, T.; Bastus, N. G.; Weller, H. Effect of the spacer structure on the stability of gold nanoparticles functionalized with monodentate thiolated poly(ethylene glycol) ligands. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* 2013;29(31):9897-9908.
- (150) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* 1951;11(0):55-75.
- (151) Haiss, W.; Thanh, N. T.; Aveyard, J.; Fernig, D. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. *Analytical Chemistry* 2007;79(11):4215-4221.
- (152) Hurst, S. J.; Lytton-Jean, A.; Mirkin, C. A. Maximizing DNA Loading on a Range of Gold Nanoparticle Sizes. *Analytical Chemistry* 2006;78(24):8313-8318.
- (153) Fenzl, C.; Genslein, C.; Domonkos, C.; Edwards, K. A.; Hirsch, T.; Baeumner, A. J. Investigating non-specific binding to chemically engineered sensor surfaces using liposomes as models. *Analyst* 2016;141(18):5265-5273.
- (154) Anfossi, L.; Di Nardo, F.; Giovannoli, C.; Passini, C.; Baggiani, C. Increased sensitivity of lateral flow immunoassay for ochratoxin A through silver enhancement. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2013;405(30):9859-9867.
- (155) Dias, J. T.; Svedberg, G.; Nystrand, M.; Andersson-Svahn, H.; Gantelius, J. Rapid signal enhancement method for nanoprobe-based biosensing. *Scientific reports* 2017;7(1):6837.
- (156) Edwards, K. A.; Korff, R.; Baeumner, A. J. Liposome-Enhanced Lateral-Flow Assays for Clinical Analyses. *Methods in molecular biology* 2017;1571:407-434.
- (157) Kikhney, A. G.; Svergun, D. I. A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. *FEBS letters* 2015;589(19 Pt A):2570-2577.
- (158) Franke, D.; Petoukhov, M. V.; Konarev, P. V.; Panjkovich, A.; Tuukkanen, A.; Mertens, H. D. T.; Kikhney, A. G.; Hajizadeh, N. R.; Franklin, J. M.; Jeffries, C. M.; Svergun, D. I. ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. *J Appl Crystallogr* 2017;26;50(Pt 4):1212-1225.
- (159) Konarev, P. V.; Volkov, V. V.; Sokolova, A. V.; Koch, M. H. J.; Svergun, D. I. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of applied crystallography* 2003;36(5):1277-1282.
- (160) Svergun, D. I.; Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *Journal of applied crystallography* 1992;25:495-503.

- (161) Svergun, D. I.; Petoukhov, M. V.; Koch, M. H. Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophysical journal* 2001;80(6):2946-2953.
- (162) Franke, D.; Svergun, D. I. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of applied crystallography* 2009;42(Pt 2):342-346.
- (163) Volkov, V. V.; Svergun, D. I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *J Appl Crystallogr* 2003(36):860-864.
- (164) Magnus, M.; Boniecki, M.; Dawson, W.; Bujnicki, J. M. SimRNAweb: a web server for RNA 3D structure modeling with optional restraints. *Nucleic acids research* 2016;44:W315-W319.
- (165) Panjkovich, A.; Svergun, D. I. CHROMIXS: automatic and interactive analysis of chromatography-coupled small-angle X-ray scattering data. *Bioinformatics* 2018;34(11):1944-1946.
- (166) Svergun, D. I.; Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophysical journal* 1999;76(6):2879-2886.
- (167) Petoukhov, M. V.; Franke, D.; Shkumatov, A. V.; Tria, G.; Kikhney, A. G.; Gajda, M.; Gorba, C.; Mertens, H. D.; Konarev, P. V.; Svergun, D. I. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *Journal of applied crystallography* 2012;45(Pt 2):342-350.
- (168) Petoukhov, M. V.; Svergun, D. I. Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophysical journal* 2005;89(2):1237-1250.
- (169) Dakterzada, F.; Mobarez, A. M.; Roudkenar, M. H.; Forouzandeh, M. Production of Pentameric Cholera Toxin B Subunit in *Escherichia coli*. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 2012;4(2):89-94.
- (170) Oliveira, C.; Domingues, L. Guidelines to reach high-quality purified recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2017; 102(1):81-9.
- (171) Merritt, E. A.; Zhang, Z.; Pickens, J. C.; Ahn, M.; Hol, W. G. J.; Fan, E. Characterization and Crystal Structure of a High-Affinity Pentavalent Receptor-Binding Inhibitor for Cholera Toxin and *E. coli* Heat-Labile Enterotoxin. *Journal of the American Chemical Society* 2002;124(30):8818-8824.
- (172) Spangler, B. D.; Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiological reviews* 1992;56(4):622-647.
- (173) Pezeshkian, W.; Hansen, A. G.; Johannes, L.; Khandelia, H.; Shillcock, J. C.; Kumar, P. B.; Ipsen, J. H. Membrane invagination induced by Shiga toxin B-subunit: from molecular structure to tube formation. *Soft matter* 2016;12(23):5164-5171.
- (174) Solovyeva, V.; Johannes, L.; Simonsen, A. C. Shiga toxin induces membrane reorganization and formation of long range lipid order. *Soft matter* 2015;11(1):186-192.
- (175) Tolle, F.; Wilke, J.; Wengel, J.; Mayer, G. By-product formation in repetitive PCR amplification of DNA libraries during SELEX. *PloS one* 2014;9(12):e114693.
- (176) Williams, R.; Peisajovich, S. G.; Miller, O. J.; Magdassi, S.; Tawfik, D. S.; Griffiths, A. D. Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR. *Nature methods* 2006;3(7):545-550.
- (177) Jayasena, S. D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical chemistry* 1999;45(9):1628-1650.

- (178) Schütze, T.; Arndt, P. F.; Menger, M.; Wochner, A.; Vingron, M.; Erdmann, V. A.; Lehrach, H.; Kaps, C.; Glökler, J. A calibrated diversity assay for nucleic acid libraries using DiStRO - a Diversity Standard of Random Oligonucleotides. *Nucleic acids research* 2009;38(4):e23-e23.
- (179) Pan, W.; Byrne-Steele, M.; Wang, C.; Lu, S.; Clemmons, S.; Zahorchak, R. J.; Han, J. DNA polymerase preference determines PCR priming efficiency. *BMC biotechnology* 2014;14:10-6750-14-10.
- (180) Behjati, S.; Tarpey, P. S. What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition* 2013;98(6):236-238.
- (181) Chen, H. L.; Hsiao, W. H.; Lee, H. C.; Wu, S. C.; Cheng, J. W. Selection and Characterization of DNA Aptamers Targeting All Four Serotypes of Dengue Viruses. *PloS one* 2015;10(6):e0131240.
- (182) Cao, X.; Li, S.; Chen, L.; Ding, H.; Xu, H.; Huang, Y.; Li, J.; Liu, N.; Cao, W.; Zhu, Y.; Shen, B.; Shao, N. Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic acids research* 2009;37(14):4621-4628.
- (183) Cella, L. N.; Sanchez, P.; Zhong, W.; Myung, N. V.; Chen, W.; Mulchandani, A. Nano aptasensor for protective antigen toxin of anthrax. *Analytical Chemistry* 2010;82(5):2042-2047.
- (184) DeGrasse, J. A. A single-stranded DNA aptamer that selectively binds to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *PloS one* 2012;7(3):e33410.
- (185) Hong, K. L.; Battistella, L.; Salva, A. D.; Williams, R. M.; Sooter, L. J. In vitro selection of single-stranded DNA molecular recognition elements against *S. aureus* alpha toxin and sensitive detection in human serum. *International journal of molecular sciences* 2015;16(2):2794-2809.
- (186) Hong, K. L.; Yancey, K.; Battistella, L.; Williams, R. M.; Hickey, K. M.; Bostick, C. D.; Gannett, P. M.; Sooter, L. J. Selection of Single-Stranded DNA Molecular Recognition Elements against Exotoxin A Using a Novel Decoy-SELEX Method and Sensitive Detection of Exotoxin A in Human Serum. *BioMed research international* 2015:417641.
- (187) Huang, Y.; Chen, X.; Duan, N.; Wu, S.; Wang, Z.; Wei, X.; Wang, Y. Selection and characterization of DNA aptamers against *Staphylococcus aureus* enterotoxin C1. *Food Chemistry* 2015;166:623-629.
- (188) Ochsner, U. A.; Katilius, E.; Janjic, N. Detection of *Clostridium difficile* toxins A, B and binary toxin with slow off-rate modified aptamers. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2013;76(3):278-285.
- (189) Tok, J. B.; Fischer, N. O. Single microbead SELEX for efficient ssDNA aptamer generation against botulinum neurotoxin. *Chemical communications* 2008;(16):1883-85.
- (190) Wang, K.; Gan, L.; Jiang, L.; Zhang, X.; Yang, X.; Chen, M.; Lan, X. Neutralization of staphylococcal enterotoxin B by an aptamer antagonist. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2015;59(4):2072-2077.
- (191) Bruno, J. G.; Kiel, J. L. Use of magnetic beads in selection and detection of biotoxin aptamers by electrochemiluminescence and enzymatic methods. *BioTechniques* 2002;32(1):178-80, 182-3.
- (192) Credou, J.; Berthelot, T. Cellulose: from biocompatible to bioactive material. *Journal of Materials Chemistry B* 2014;2(30):4767-4788.
- (193) Hong, K. L.; Maher, E.; Williams, R. M.; Sooter, L. J. In Vitro Selection of a Single-Stranded DNA Molecular Recognition Element against *Clostridium difficile* Toxin B and Sensitive Detection in Human Fecal Matter. *Journal of nucleic acids* 2015;2015:808495.

- (194) Yakovchuk, P.; Protozanova, E.; Frank-Kamenetskii, M. D. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic acids research* 2006;34(2):564-574.
- (195) Chen, A.; Yang, S. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. *Biosensors & bioelectronics* 2015;71:230-242.
- (196) Bruno, J. G.; Carrillo, M. P.; Phillips, T.; Edge, A. Discrimination of recombinant from natural human growth hormone using DNA aptamers. *Journal of biomolecular techniques* 2011;22(1):27-36.
- (197) Challa, S.; Tzipori, S.; Sheoran, A. Selective Evolution of Ligands by Exponential Enrichment to Identify RNA Aptamers against Shiga Toxins. *Journal of nucleic acids* 2014:214929.
- (198) Bruno, J. G.; Phillips, T.; Richarte, A. M.; Montez, T.; Garcia, A.; Sivils, J. C. Fluorescent DNA Aptamer-Magnetic Bead Sandwich Assays and Portable Fluorometer for Sensitive and Rapid Foodborne Pathogen Detection and Epidemiology. *Journal of Infectious Diseases and Epidemiology* 2016;2(2):2-11.
- (199) H. Wessels. Methoden zum Nachweis von Allergenen im Wein. Dissertation. Universität Hamburg; 2017.
- (200) K. L. Laer. Selektion und Charakterisierung von RNA-Aptameren zur Genregulation und Antibiotikatherapie. Dissertation. TU Darmstadt; 2012.
- (201) Dong, S.; Zhang, C.; Zhang, X.; Liu, Y.; Zhong, J.; Xie, Y.; Xu, C.; Ding, Y.; Zhang, L.; Liu, X. Production and Characterization of Monoclonal Antibody Broadly Recognizing Cry1 Toxins by Use of Designed Polypeptide as Hapten. *Analytical Chemistry* 2016;88(14):7023-7032.
- (202) Abcam. <http://www.abcam.com/primary-antibodies/kd-value-a-quantitive-measurement-of-antibody-affinity>. (Zugriff: 08.01.18).
- (203) Takahashi, N.; Khoo, K. H.; Suzuki, N.; Johnson, J. R.; Lee, Y. C. N-glycan structures from the major glycoproteins of pigeon egg white: predominance of terminal Galalpha(1)Gal. *The Journal of biological chemistry* 2001;276(26):23230-23239.
- (204) Tomoda, H.; Arai, M.; Koyama, N.; Matsui, H.; O mura, S.; Obata, R.; Lee, Y. C. Purification of Shiga-like toxin 1 by pigeon egg white glycoproteins immobilized on Sepharose gels. *Analytical Biochemistry* 2002;311(1):50-56.
- (205) Forier, C.; Boschetti, E.; Ouhammouch, M.; Cibiel, A.; Duconge, F.; Nogre, M.; Tellier, M.; Bataille, D.; Bihoreau, N.; Santambien, P.; Chtourou, S.; Perret, G. DNA aptamer affinity ligands for highly selective purification of human plasma-related proteins from multiple sources. *Journal of chromatography.A* 2017;1489:39-50.
- (206) Qiao, L.; Lv, B.; Feng, X.; Li, C. A new application of aptamer: One-step purification and immobilization of enzyme from cell lysates for biocatalysis. *Journal of Biotechnology* 2015;203:68-76.
- (207) Javaherian, S.; Musheev, M. U.; Kanoatov, M.; Berezovski, M. V.; Krylov, S. N. Selection of aptamers for a protein target in cell lysate and their application to protein purification. *Nucleic acids research* 2009;37(8):e62.
- (208) Ahirwar, R.; Nahar, P. Development of an aptamer-affinity chromatography for efficient single step purification of Concanavalin A from *Canavalia ensiformis*. *Journal of chromatography.B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 2015;997:105-109.
- (209) Beloborodov, S. S.; Bao, J.; Krylova, S. M.; Shala-Lawrence, A.; Johnson, P. E.; Krylov, S. N. Aptamer facilitated purification of functional proteins. *Journal of chromatography.B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 2018;1073:201-206.

- (210) Citartan, M.; Ch'ng, E.; Rozhdestvensky, T. S.; Tang, T. Aptamers as the 'capturing' agents in aptamer-based capture assays. *Microchemical Journal* 2016;128:187-197.
- (211) Khan, S. A.; DeGrasse, J. A.; Yakes, B. J.; Croley, T. R. Rapid and sensitive detection of cholera toxin using gold nanoparticle-based simple colorimetric and dynamic light scattering assay. *Analytica Chimica Acta* 2015;892:167-174.
- (212) Liu, J.; Gao, S.; Kang, L.; Ji, B.; Xin, W.; Kang, J.; Li, P.; Gao, J.; Wang, H.; Wang, J.; Yang, H. An Ultrasensitive Gold Nanoparticle-based Lateral Flow Test for the Detection of Active Botulinum Neurotoxin Type A. *Nanoscale research letters* 2017;12(1):227-017-1944-9.
- (213) Krause, N.; Moravek, M.; Dietrich, R.; Wehrle, E.; Slaghuis, J.; Martlbauer, E. Performance characteristics of the Duopath(R) cereus enterotoxins assay for rapid detection of enterotoxinogenic *Bacillus cereus* strains. *International journal of food microbiology* 2010;144(2):322-326.
- (214) Schulz, F.; Dahl, G. T.; Besztejan, S.; Schroer, M. A.; Lehmkuhler, F.; Grubel, G.; Vossmeier, T.; Lange, H. Ligand Layer Engineering To Control Stability and Interfacial Properties of Nanoparticles. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* 2016;32(31):7897-7907.
- (215) Bhattacharjee, S.; DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* 2016;235:337-351.
- (216) Patel, V. R.; Agrawal, Y. K. Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 2011;2(2):81-87.
- (217) MerckMillipore; Hi-Flow™ Plus Membranes and SureWick® Pad Materials. Broschüre. 2015.
- (218) Sartorius Stedim; UniSart® Nitrocellulose Membranes - The Substrate of Choice for Protein Assays. Broschüre. 2015.
- (219) Rodriguez, M. O.; Covian, L. B.; Garcia, A. C.; Blanco-Lopez, M. C. Silver and gold enhancement methods for lateral flow immunoassays. *Talanta* 2016;148:272-278.
- (220) Ho, J. A.; Wu, L. C.; Huang, M. R.; Lin, Y. J.; Baeumner, A. J.; Durst, R. A. Application of ganglioside-sensitized liposomes in a flow injection immunoanalytical system for the determination of cholera toxin. *Analytical Chemistry* 2007;79(1):246-250.
- (221) Jauset-Rubio, M.; Svobodova, M.; Mairal, T.; McNeil, C.; Keegan, N.; El-Shahawi, M. S.; Bashammakh, A. S.; Alyoubi, A. O.; O'Sullivan, C. K. Aptamer Lateral Flow Assays for Ultrasensitive Detection of beta-Conglutinin Combining Recombinase Polymerase Amplification and Tailed Primers. *Analytical Chemistry* 2016;88(21):10701-10709.
- (222) Wang, J.; Katani, R.; Li, L.; Hegde, N.; Roberts, E. L.; Kapur, V.; DebRoy, C. Rapid Detection of *Escherichia coli* O157 and Shiga Toxins by Lateral Flow Immunoassays. *Toxins* 2016;8(4):92.
- (223) Skou, S.; Gillilan, R. E.; Ando, N. Synchrotron-based small-angle X-ray scattering (SAXS) of proteins in solution. *Nature protocols* 2014;9(7):1727-1739.
- (224) Burke, J. E.; Butcher, S. E. Nucleic acid structure characterization by small angle X-ray scattering (SAXS). *Current protocols in nucleic acid chemistry*. 2012; Chapter 7, Unit7.18.
- (225) Capp, J. A.; Hagarman, A.; Richardson, D. C.; Oas, T. G. The statistical conformation of a highly flexible protein: Small angle X-ray scattering of *S. aureus* protein A. *Structure* 2014;22(8):1184-1195.

(226) Nyman, M.; McQuade, L. Small Angle X-ray Scattering of Group V Polyoxometalates. In book: Trends in Polyoxometalates Research, 2015:151-170. Publisher: Nova Science Publishers Inc, Editors: L. Ruhlmann, D. Schaming.

(227) Choi, S. J.; Ban, C. Crystal structure of a DNA aptamer bound to PvLDH elucidates novel single-stranded DNA structural elements for folding and recognition. *Scientific reports* 2016;6:34998.

(228) Merritt, E. A.; Sarfaty, S.; Jobling, M. G.; Chang, T.; Holmes, R. K.; Hirst, T. R.; Hol, W. G. Structural studies of receptor binding by cholera toxin mutants. *Protein science: a publication of the Protein Society* 1997;6(7):1516-1528.

7 Anhang

7.1 Auflistung aller verwendeten Standardchemikalien/Gefahrenstoffe nach GHS

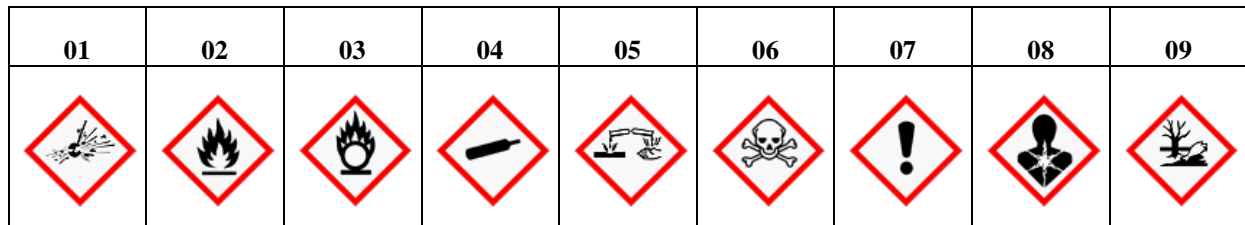


Abb. 7.1: Gefahrenpiktogramme nach GHS.

Tab. 7.1: Gefahrenstoffe.

Gefahrenstoff	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller
1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin (DPPC)	-	-	-	Avant Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA
1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol (DPPG)	-	-	-	Avant Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbo-diimid (EDC)	05	314	280, 305 + 351 + 338, 310	AppliChem, Darmstadt
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure	07	315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
2-Methyl-1-Propanol	02, 05, 07	226, 335, 315, 318, 336		Carl Roth, Karlsruhe
3,3'-Diaminobenzidin (DONS)	08	341, 35	201, 281, 308+313	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	07	315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	-	-	-	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Aceton	02, 07	225, 319, 336	210, 233, 305 + 351 + 338	Eigene Abfüllung
Acrylamid (40 %, w/v)	08	302 + 312, 315, 319, 317, 340, 350, 361f, 372	260, 280, 321, 305 + 351 + 338, 405, 501	Carl Roth, Karlsruhe
Agar	-	-	-	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	-	-	-	Serva, Heidelberg
Ammonium-peroxodisulfat	03, 07, 08	372, 302, 315, 319, 335, 334, 317	280, 305 + 351 + 338, 302 + 352, 304 + 341, 342 + 311	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	08	315, 317, 319,	261, 280, 305 +	Carl Roth, Karlsruhe

Gefahrenstoff	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller
(Fortsetzung)		334, 335	351 + 338, 342 + 311	
Biotin	-	-	-	Fluka, St.Gallen, Schweiz
Bromphenolblau	-	-	-	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Casein	-	-	-	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Casein-Hydrolysat	-	-	-	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Choloroform	06, 08	302, 331, 315, 319, 351, 361d, 336 + 372	261, 281, 305 + 351 + 338, 311	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Cholesterol	-	-	-	Avanti Polar Lipidis, Alabaster, Alabama, USA
Zitronensäure-Monohydrat	07	319	280, 305 + 351 + 338, 337 + 313	MerckMillipore, Burlington, Massachusetts, USA
Coomassie-Brilliant Blue G-250 & R-250	-	-	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	-	-	-	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure (99 %, Eisessig)	02, 05	226, 290, 314	210, 280, 301 + 330 + 331, 305 + 351 + 338, 308 + 310	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol (96 %)	02, 07	225, 319	210, 240, 305 + 351 + 338, 403 + 233	Eigene Abfüllung
Ethanolamin-hydrochlorid	05, 07	302, 312, 332, 314, 335, 412	261, 273, 301 + 312, 330, 303 + 361 + 353, 304 + 340 + 310, 305 + 351 + 338	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	06, 08	302, 330, 341	260, 281, 284, 310	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	07	319	305 + 351 + 338	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Glucose	-	-	-	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	-	-	-	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	-	-	-	Carl Roth, Karlsruhe
Imidazol	05, 07, 08	360D, 302, 314	201, 280, 301 + 330 + 331, 305 + 351 + 338, 308 + 310	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	-	-	-	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	-	-	-	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogen-phosphat	-	-	-	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	05	290, 302, 314	280, 301 + 330 + 331, 305 + 351 + 338, 308 + 310	Carl Roth, Karlsruhe

Gefahrenstoff	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller
Magnesiumchlorid	-	-	-	Grüssing, Filsum
Magnesiumsulfat-Hexahydrat	-	-	-	Grüssing, Filsum
Methanol	02, 06, 08	225, 331, 311, 301, 370	210, 233, 280, 302 + 352, 304 + 340, 308 + 310, 403 + 235	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; VWR, Radnos, Pennsylvania, USA
Mineralöl	-	-	-	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumazid	06, 08, 09	300, 310, 373, 410 EUH032	273, 280, 301 + 310 + 330, 302 + 352, 310, 391, 501	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumchlorid	-	-	-	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	-	-	-	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	-	-	-	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	02, 05	228, 302 + 332, 315, 318, 335, 412	210, 261, 280, 301 + 312 + 330, 305 + 351 + 338 + 310, 370 + 378	MerckMillipore, Burlington, Massachusetts, USA
Natriumhydrogen-carbonat	-	-	-	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	05	290, 314	280, 301 + 330 + 331, 305 + 351 + 338, 308 + 310	MerckMillipore, Burlington, Massachusetts, USA
N-Hydroxysuccinimid	-	-	-	AppliChem, Darmstadt
Phosphorsäure	05	314, 290	280, 301 + 330 + 331, 305 + 351 + 338, 309 + 310	MerckMillipore, Burlington, Massachusetts, USA
Polyethylenglycol	-	-	-	unbekannt
OliGreen	07	227, 316, 320, 335	312, 304 + 340, 305 + 351 + 338, 337 + 313, 332 + 313, 264	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Saccharose	-	-	-	MerckMillipore, Burlington, Massachusetts, USA
Salzsäure	05	290, 314, 335	260, 280, 303 + 361 + 353, 304 + 340 + 310, 305 + 351 + 338	MerckMillipore, Burlington, Massachusetts, USA
Schwefelsäure	05	290, 314	280, 301 + 330 + 331, 305 + 351 + 338, 308 + 310	MerckMillipore, Burlington, Massachusetts, USA
Sulforhodamine B monosodium salt (SRB)	-	-	-	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
SYBR-Green I 10000x Konz.	-	-	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tetrachlorogoldsäure	05, 07	314-317	280, 301 + 330 + 331, 302 + 352, 305 + 351 + 338,	Alfa Aesar, Ward Hill, Massachusetts, USA

Gefahrenstoff	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller
(Fortsetzung)			308 + 310	
Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	02, 05	225, 332, 302, 314	210, 280, 305 + 351 + 338, 310	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin hydrochlorid (TCEP)	05	314	280, 305 + 351 + 338, 310	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Base)	07	315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Säure)	07	315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tween 20	-	-	-	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	03, 05	271, 302, 314, 332, 335, 412	210, 220, 260, 280, 305 + 351 + 338, 370 + 378	MerckMillipore, Burlington, Massachusetts, USA
Xylencyanolblau	07	315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338	unbekannt
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	Carl Roth, Karlsruhe

7.2 Auflistung aller verwendeten Puffer und Lösungen

Tab. 7.2: Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer	Zusammensetzung
Acetatpuffer	500 mM Natriumacetat 500 mM Essigsäure pH 5,2
Anodenpuffer I	300 mM Tris-HCl 20 % Ethanol 0,01% Natriumazid pH 7,8
Anodenpuffer II	25 mM Tris-HCl 20 % Ethanol 0,01 % Natriumazid pH 8,9
APS-Lösung	10 % Ammoniumperoxodisulfat
Blockierungspuffer I	PBS-Puffer 0,1 % Ethanolamin 0,05 % Natriumazid pH 7,4
Blockierungspuffer II	PBS-Puffer 0,1 % Bovine Serum Albumin 0,05 % Natriumazid pH 7,4

Puffer

Zusammensetzung

BRADFORD-Lösung	0,04 % Coomassie Brilliantblau G-250 10 % Ethanol 40 % Phosphorsäure, 85%ig
Carbonatpuffer	75 mM Natriumcarbonat 175 mM Natriumhydrogencarbonat pH 9,6 oder pH 9
Coomassie-Färbelösung	40 % Ethanol 10 % Eisessig 0,2 % Coomassie Brilliantblau R-250
Coomassie-Entfärbelösung	40 % Ethanol 10 % Eisessig
Dream Taq-Puffer (10x) (Thermo Fisher Scientific)	10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan 50 mM Kaliumchlorid 1,5 mM Magnesiumchlorid pH 8,3
EDC-Lösung	0,4 M 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC)
EDC-MES-Puffer	0,1 M 2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure 10 mg EDC pH 5,0
Färbelösung (Western Blot)	12 mg TMB 40 mg Diaminodenzidin 5 ml Ethanol 15 ml Citratpuffer 10 µl Wasserstoffperoxid
Färbelösung (ELISA)	1,25 mg TMB 31 µl Aceton 219 µl Methanol 4,75 ml Citratpuffer 2,5 µl Wasserstoffperoxid
HEPES-Puffer	10 mM HEPES
HSS-Puffer	10 mM HEPES 200 mM Natriumchlorid 150 mM Saccharose 0,01 % Natriumazid pH 7,5
Kathodenpuffer	40 mM Aminohexansäure 20 % Ethanol 0,01 % SDS 0,01 % Natriumazid pH 8,3
Laufpuffer	0,25 M Tris-Base 0,2 M Glycin 0,1 % SDS pH 8,3
LoadingDye	50 % Glycerin 50 % TAE-Puffer 0,05 % Xylencynolblau
MES-Puffer	0,1 M 2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure pH 5
PBS-Puffer	137 M Natriumchlorid 2,7 M Kaliumchlorid 12 mM Natriumhydrogenphosphat pH 7,4

Puffer**Zusammensetzung**

PBS-T-Puffer	PBS-Puffer 0,01-0,5 % Tween 20 pH 7,4
Puffer A (Proteinreinigung)	50 mM Tris-HCl pH 8.0 500 mM NaCl 15 mM Imidazol 15 % Glycerin 0,02 % Natriumazid
Puffer B (Proteinreinigung)	50 mM Tris-HCl pH 8.0 500 mM NaCl 800 mM Imidazol 0,02 % Natriumazid
Saline	0,9 % Natriumchlorid
SDS-PAGE-Probenpuffer	100 mM Tris-HCl, pH 6,8 20 % Glycerin 4 % SDS 4 % Mercaptoethanol 0,05 % Bromophenolblau
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	0,25 M Tris-Base 0,1 % SDS pH 6,8
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	1,5 M Tris-Base 0,2 % SDS pH 8,8
TAE-Puffer (50-fach)	2 M Trometamol 100 mM EDTA pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl-Puffer 1 mM EDTA pH 7,5
TEMED-Lösung	10 % Tetramethylethyldiamin
Tris-Acetat-Puffer	500 mM Tris-Base 500 mM Natriumacetat pH 8,2
Tris-Puffer (Proteinlagerpuffer)	50 mM Tris-HCl 500 mM Natriumchlorid (bzw. 200 mM für SAXS-Experimente) pH 8,0
Tris-Puffer (Western Blot)	50 mM Tris-HCl 150 mM Natriumchlorid 0,5 % Tween 20
Wasch-Puffer	0,5 mM EDTA 1 M Natriumchlorid 5 mM Tris-HCl pH 7,5
Zitratpuffer (Nanopartikelsynthese)	2,35 mM Natriumcitrat 684 µM Zitronensäure 32,5 µM EDTA
Zitratpuffer (Western Blot & ELISA)	50 mM Zitronensäure 100 mM Natriumhydrogenphosphat pH 5,0

Puffer	Zusammensetzung
β-Mercaptoethanol-Reduktionspuffer	0,1 M Tris-HCl 20 % Glycerin 10 % SDS-Lösung 4 % Mercaptoethanol 10 % Bromphenolblau-Lösung (5%ig)

7.3 Auflistung aller verwendeten Nährmedien

Tab. 7.3: Verwendete Medien.

Medium	Zusammensetzung
LB Flüssigmedium	15 g/l Casein-Hydrolysat 7,5 g/l Hefeextrakt 5 g/l Natriumchlorid 1 Plätzchen Natriumhydroxid
LB Agar	LB-Medium 15 g/l Agar
SOC Medium	20 mM Glucose 10 mM Magnesiumsulfat 10 mM Magnesiumchlorid 2,5 mM Kaliumchlorid 10 mM Natriumchlorid 0,5 % Hefeextrakt 2 % Caseinhydrolysat

7.4 Auflistung aller verwendeten Oligonukleotide und weiteren Materialien

Tab. 7.4: Verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5'-3')	Hersteller
Bibliothek 1	CATCCGTCACACCTGCTC-N ₄₀ -GGTGTTCCGGTCCCCTATC	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Bibliothek 2	ATCCAGAGTGACGCAGCA-N ₄₀ -TGGACACGGTGGCTTAGT	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
CT910	CATCCGTCACACCTGCTCGGCTTCAGGTTGGTCTGGTTGGGT TTGGCTCCTGTGTACGGGTGTTCCGGTCCCCTATC	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
CT916	CATCCGTCACACCTGCTCGGCAAAAAGGATTGCCAGGTCT GCTGTCTAGCCGGATTCGGTGTTCGGTCCCCTATC	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
CT928	CATCCGTCACACCTGCTCCACCCGTCACACTTATCCGTCAAC TGGGCTCCCCTGTTGGGGTGTTCGGTCCCCTATC	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA

Name	Sequenz (5'-3')	Hersteller
CT931	CATCCGTCACACCTGCTCCCAGCGTGCGTCGAGGGGGACCC CTGTCAGCCCCCTCGCGGGTGTTCGGTCCCGTATC	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
CT938	CATCCGTCACACCTGCTCCACCCGTCCACTCATCCGTCACAC CTGTTCTCCCCATGGGTGTTCGGTCCCGTATC	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
CT939	CATCCGTCACACCTGCTCCACCCGTCCACTTATCCGTCACA CTGGGCCCCACTGGGGGTGTTCGGTCCCGTATC	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
CT943	CATCCGTCACACCTGCTCCACCCGTCCACTCATCCGACACA CCTGCTCTCCCCACTGGGTGTTCGGTCCCGTATC	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
CT946	CATCCGTCACACCTGCTCCCCACAACCGGTCCGGTGTTCGG TCCCCGTATCACGCCCCGGTGTTCGGTCCCGTATC	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
ST1063	ATCCAGAGTGACGCAGCAACAATTAACATTGTGGTTAGTCT GAATGATTTTCGGTGCAGTGGACACGGTGGCTTAGT	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
ST1064	ATCCAGAGTGACGCAGCAGCATTGGAGAGCATTGTGGTCACTGC CTGGTGGGTGTCTCGCATGGACACGGTGGCTTAGT	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
ST1065	ATCCAGAGTGACGCAGCATGACCAGCTACGTGTTCTTGTAT CGTTCGCAGTGGAGTGGTGGACACGGTGGCTTAGT	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
ST1066	ATCCAGAGTGACGCAGCACAAACGTCTGTCAATGCCCTAA GTGTACGGAACGGGTGGTGGACACGGTGGCTTAGT	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
ST1068	ATCCAGAGTGACGCAGCACCAACGTCTTGAGGTTACAGCATT TAAGCATCATCAGCCTGTGGACACGGTGGCTTAGT	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
ST1075	ATCCAGAGTGACGCAGCACGCGAGATTGCCTTGGTTTAAAC AACGACCGCTCGTGAGGTGGACACGGTGGCTTAGT	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
ST1076	ATCCAGAGTGACGCAGCATCATTAGTCTCCGTTATGATAAA CTATAACCATGTTGTTCGGTGGACACGGTGGCTTAGT	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Primer Fw 1	CATCCGTCACACCTGCTC	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Primer Rw 1	GATACGGGAGCCAACACC	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Primer Fw 2	ATCCAGAGTGACGCAGCA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Primer Rw 2	ACTAAGCCACCGTGTCCA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
FAM-CT916	[FAM]CATCCGTCACACCTGCTCGGCAAAAAGGATTGCCAG GTCTGCTGTCTAGCCGATTTCGGTGTTCGGTCCCGTATC	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Biotin-910	[Biotin]CATCCGTCACACCTGCTCGGCTTCAGGTTGGTCTGGT TGGGTTTGGCTCCTGTGTACGGGTGTTCGGTCCCGTATC	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Biotin-916	[Biotin]CATCCGTCACACCTGCTCGGCAAAAAGGATTGCCA GGTCTGCTGTCTAGCCGATTTCGGTGTTCGGTCCCGTATC	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Biotin-928	[Biotin]CATCCGTCACACCTGCTCCACCCGTCCACTTATCCG TCAACTGGGCTCCCACTGGGGGTGTTCGGTCCCGTATC	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Biotin-931	[Biotin]CATCCGTCACACCTGCTCCCAGCGTGCGTCGAGGGG GACCCCTGTAGCCCCCTCGCGGGTGTTCGGTCCCGTATC	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Biotin-Rw 1	[Biotin]GATACGGGAGCCAACACC	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
AminC12- Rw 1	[AminC12]GATACGGGAGCCAACACC	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
AminC12- Rw 2	[AminC12]ACTAAGCCACCGTGTCCA	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Alexa488- Fw 1	[Alexa488]CATCCGTCACACCTGCTC	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Amin-CT916	[AminC6]CATCCGTCACACCTGCTCGGCAAAAAGGATTGCC AGGTCTGCTGTCTAGCCGATTTCGGTGTTCGGTCCCGTATC	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Amin-CT928	[AminC6]CATCCGTCACACCTGCTCCACCCGTCCACTTATCC GTCAACTGGGCTCCCACTGGGGGTGTTCGGTCCCGTATC	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Name	Sequenz (5'-3')	Hersteller
Amin-ST1065	[AminC6]ATCCAGAGTGACGCAGCATGACCAGCTACGTGTTCTTGTATCGTTCGCAGTGGAGTGGTGGACACGGTGGCTTAGT	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Amin-ST1076	[AminC6]ATCCAGAGTGACGCAGCATCATTAGTCTCCGTTATGATAAACTATACCATGTTGTTCGGTGGACACGGTGGCTTAGT	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Thiol-CT916	[ThiolC6]CATCCGTCACACCTGCTCGGCAAAAAGGATTGCCAGGTCTGCTGTCTAGCCGGATTTCGGTGTTCGGTCCCCTATC	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Tab. 7.5: Weitere verwendete Materialien und Reagenzien.

Material	Hersteller
Amicon Ultra-15 Centrifugal Filters MWCO 3 kDa, 5 kDa, 10 kDa	MerckMillipore, Burlington, Massachusetts, USA
Cellulose Fiber Sample Pad Strips	MerckMillipore, Burlington, Massachusetts, USA
dNTP Solution Set 10 mM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Dream Taq Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DynaBeads His-Tag and Pulldown Magnetpartikel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Hackfleisch	EDEKA AG & Co. KG, Hamburg
HF075 NC-Membran	MerckMillipore, Burlington, Massachusetts, USA
HF180 NC-Membran	MerckMillipore, Burlington, Massachusetts, USA
Membranfilter (0,4 µm & 1 µm)	MerckMillipore, Burlington, Massachusetts, USA
Milch (verschiedene Fettstufen)	EDEKA AG & Co. KG, Hamburg
Pferdekot	Pferdehof, Dassel
PVDF Membran	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Reinstwasser MilliQ (Widerstand: 18,2 Ω (bei 25°C), TOC-Wert <5ppb)	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA
SiMAG Carboxyl-Magnetpartikel	Chemicell, Berlin
UniSart 140 CN NC-Membran	Sartorius AG, Göttingen

7.5 Verwendete Geräte und Software

Tab. 7.6: Verwendete Geräte.

Gerätebezeichnung	Model	Hersteller
Agarose-Gelelektrophoreseeinheiten	-	Appligene, Illkirch, Frankreich
ÄKTAPrime Plus	ÄKTAPrime Plus	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Analysenwaage	New Classic Balances TLE Model	Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA

Gerätebezeichnung	Model	Hersteller
Autoklav	Systec DX-23 Systec VX-95	Systec GmbH Labor Systemtechnik, Linden
CD-Spektrometer	Jasco J-815	Jasco, Gross-Umstadt
Dynamische Lichtstreuung	SpectroLight 300	Xtal Concepts, Hamburg
Dynamische Lichtstreuung	Zetasizer Nano ZS	Malvern, Malvern, UK
Elektrophoresekammer (SDS-PAGE)	SE250-10A-.75	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Fluorometer	Quantus	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Fotodokumentationseinheit	Dark Hood DH-40/50	Biostep, Jahnsdorf
French Press	Constant Cell Disruption System	Constant Systems Ltd, Low March, UK
Gelscanner	ImageScanner III	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
ICP-AES	Spectro Flame-EOP	Analytical Instruments GmbH, Kleve
Inkubator	Heraeus/Thermo Typ B 20	Thermo Electron LED GmbH, Langensebold
Kipproller	Stuart STR6	Cole Parmer, Staffordshire, UK
Lyophylle	Beta1-8LDplus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode
Magnetischer Separator	KingFisher Duo	Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finnland
Mikroplatten-Reader	SpektraMax M 5	Molecular Devices, Ismaning
Mikrowelle	Typ 7810	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern
NanoDrop	ND-1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
PCR Hood	UVC-T-M-AR	Kisker Biotech, Steinfurt
pH-Meter	PY-P11/ PB-11	Satorius AG, Göttingen
Real-Time PCR	CFX96 Touch	BioRad, Hercules, Kalifornien, USA
Real-Time PCR	iQ5	BioRad, Hercules, Kalifornien, USA
Real-Time PCR	Professional Thermocycler	Analytic Jena AG, Jena
Reinraumwerkbank (Laminar Flow Cabinet)	S2020 1.2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Schüttelinkubator	Type 3016, No. 1028847	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Schüttelinkubator	MaxQ 8000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Schüttler	KL-2	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Stromquelle	EV231	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Stromquelle	Power Ease 500	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Transmissionselektronenmikroskop	JEM-1011	JEOL, Peabody, MA, USA
TLC Applikator	ATS 4	CAMAG, Berlin
Ultraschall-Homogenisator	HD 2070	BANDELIN, Berlin
Ultraschallbad	Transsonic Digital	Elma, Singen
UV/Vis Spectrometer	Varian Cary 50	Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA
Vortex-Schüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Vortex-Schüttler	PEQTwist	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Wasserbad	AQUAline AL2	LAUDA, Lauda-Königshofen
Western Blot	V20-SDB	Biostep, Jahnsdorf
Zentrifuge	SCANSPEED 1524M	LaboGene, Lillerød, Dänemark
Zentrifuge	SCANSPEED 1236R	LaboGene, Lillerød, Dänemark
Zentrifuge	Microfuge16	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA
Zentrifuge	SORVALL RC 6 PLUS	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

Tab. 7.7: Verwendete Software.

Software	Hersteller/Website
<i>ATSAS Package</i>	EMBL Hamburg, https://www.embl-hamburg.de/biosaxs/atsas-online/
<i>ExPASy Compute pI/MW tool</i>	https://web.expasy.org/compute_pi/
<i>GENtle v1.9.4</i>	M. Manske, Universität Köln
<i>ImageJ 1.51</i>	M. D. Abràmoff, National Institutes of Health, USA
<i>MEME Suite 5.0.1</i>	http://meme-suite.org/
<i>mfold</i>	http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold
<i>Office (2010)</i>	Microsoft, Redmond, Washington, USA
<i>OriginPro 8G</i>	OriginLab, Northampton, USA
<i>PyMOL Viewer v0.99</i>	DeLano Scientific LLC, Schrödinger, San Carlos, California, USA
<i>QGRS Mapper</i>	http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/index.php
<i>SimRNAweb</i>	https://iimcb.genesilico.pl/SimRNAweb/

7.6 SDS-PAGE-Gele der Expression und Proteinaufreinigung von ST1-B und CT-B

Als Molekulargewichtsmarker wurde der Pierce Unstained Protein Molecular Weight Marker verwendet.

7.6.1 7.7.1 CT-B Aufreinigung

Metallchelate-Affinitätschromatographie

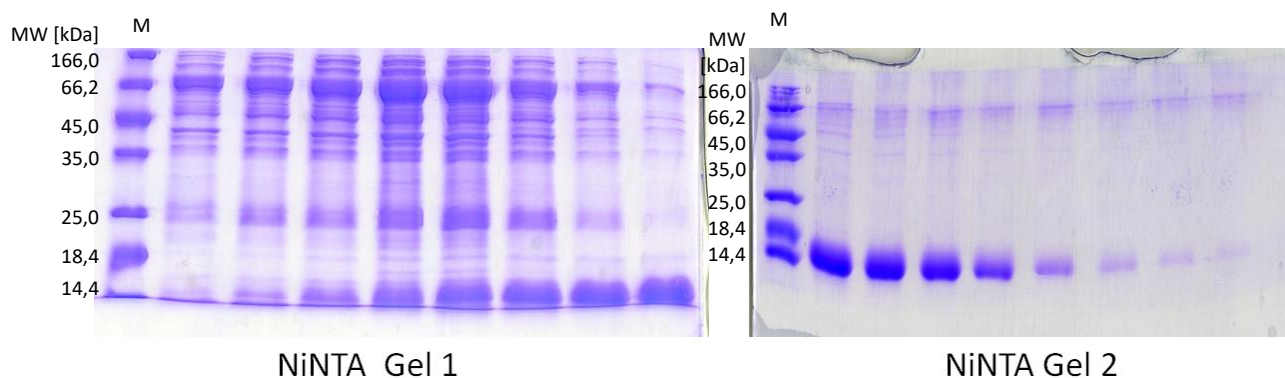


Abb. 7.2: SDS-PAGE-Gele der CT-B Aufreinigung mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie. NiNTA-Fraktionen 7-14 (Gel 1) und 15-22 (Gel 2), v.l.n.r.

Größenausschlusschromatographie

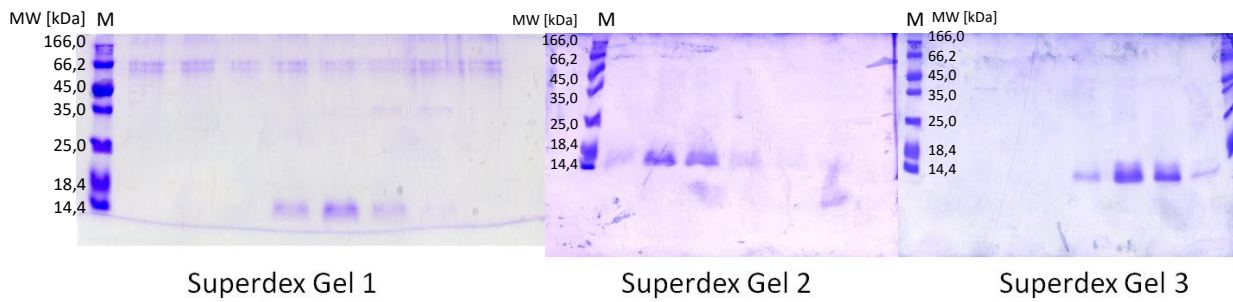


Abb. 7.3: SDS-PAGE-Gele der CT-B Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie. Superdex-Fractionen 3, 4, 5, 12, 13, 14, 15 und 25 aus NiNTA-Fraktion 17 (Gel 1), Superdex-Fractionen 3, 4, 5, 13, 14, 15 und 16 aus NiNTA-Fractionen 15+16 (Gel 2) und Superdex-Fractionen 13-19 aus NiNTA-Fractionen 14+18 (Gel 3), v.l.n.r.

7.6.2 ST1-B Aufreinigung

Metallchelate-Affinitätschromatographie

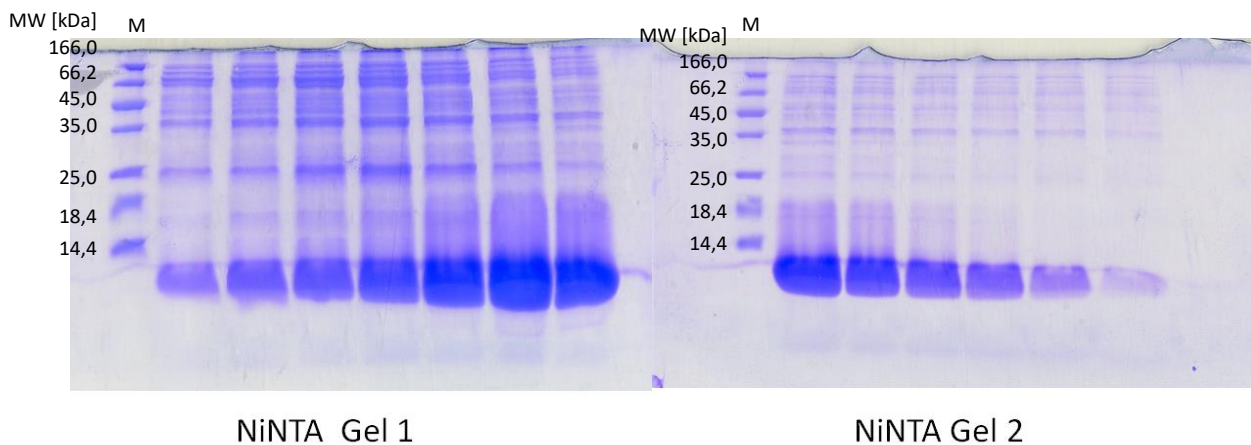


Abb. 7.4: SDS-PAGE-Gele der ST1-B Aufreinigung mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie. NiNTA-Fractionen 7-13 (Gel 1) und 1-21+27 (Gel2), v.l.n.r.

Größenausschlusschromatographie

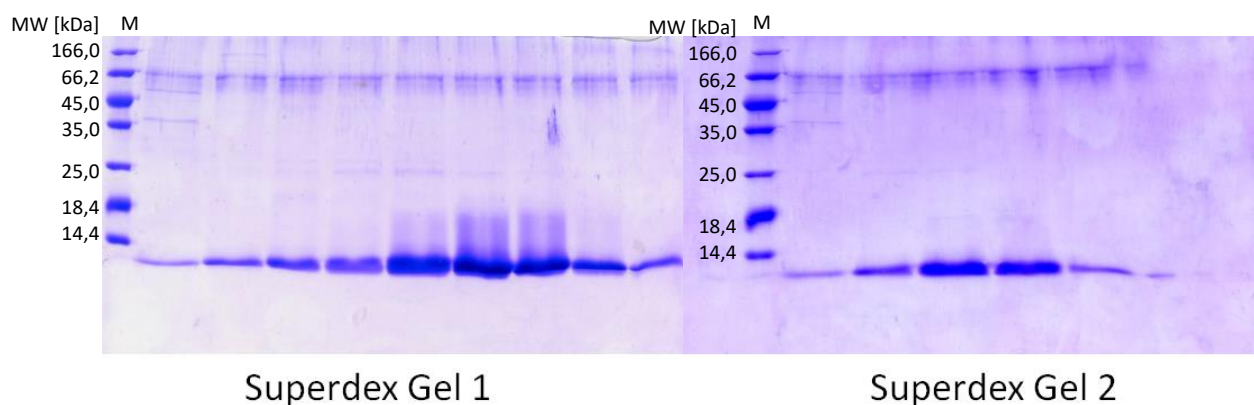


Abb. 7.5: SDS-PAGE-Gele der ST1-B Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie. Superdex-Fractionen 14, 15, 16, 17, 21, 27 aus NiNTA-Fractionen 13-15 (Gel 1), Superdex-Fractionen 4, 15, 16, 17 und 18 aus NiNTA-Fractionen 16-18 (Gel 2), v.l.n.r.

7.6.3 CT-B Aufreinigung für SAXS

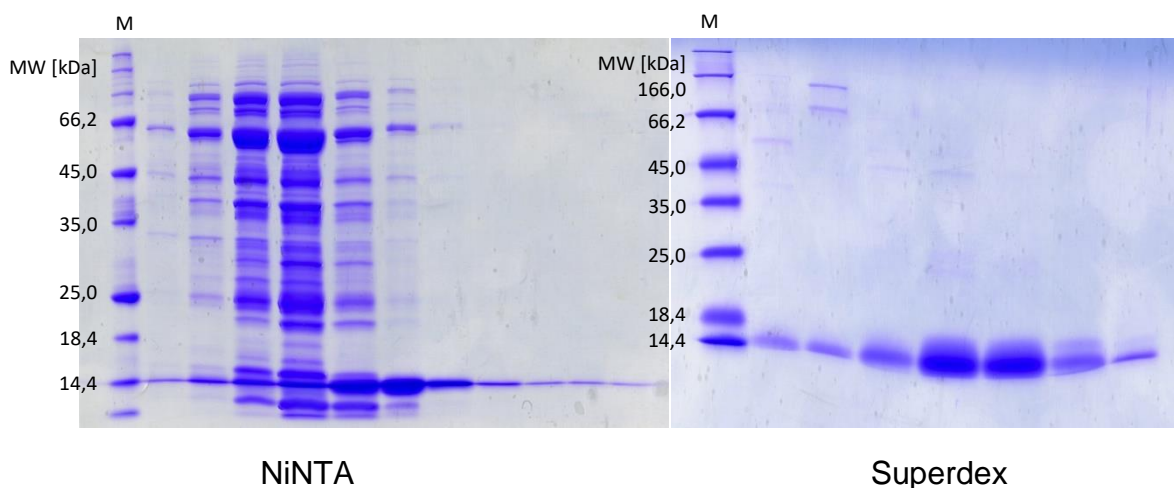


Abb. 7.6: SDS-PAGE-Gele der CT-B Aufreinigung für SAXS. NiNTA-Fraktion 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18+19, 20+21, 22+23, 24+25, 26+27 (Gel 1) und Superdex-Fractionen 11, 18, 20, 21, 22, 23 und 24 aus NiNTA-Fractionen 16-19 (Gel 2), v.l.n.r.

7.7 KingFisher 96-deep well-Layout CT-B-SELEX

Tab. 7.8: KingFisher 96-deep well-Layout CT-B-SELEX Runde 1-4.

Reihe	Volumen [μ l]	Inhalt
A	16	Targetbeads (=CT-B-Magnetpartikel)
	184	Wasch-Puffer
B		Kamm
C	200	Wasch-Puffer
D	50	BEAMing-Eluat (Aptamerpool)
	(20)	(Aptamerbibliothek bei FISHing R 1)
	950 (980)	SELEX-Puffer (SELEX-Puffer bei FISHing Runde 1)
E	200	Wasch-Puffer
F	16	Gegenbeads (=Ethanolamin-geblockte
	184	Magnetpartikel)
		Wasch-Puffer
G	200	Wasch-Puffer
H	200	Reinstwasser
Elution	70	Reinstwasser

Tab. 7.9: KingFisher 96-deep well-Layout CT-B-SELEX Runde 5-10.

Reihe	Volumen [μ l]	Inhalt
A	16	Targetbeads
	184	Wasch-Puffer
B		Kamm
C	200	Wasch-Puffer
D	50	BEAMing-Eluat (Aptamerpool)
	950	SELEX-Puffer
E	200	Wasch-Puffer
F	200	Wasch-Puffer
G	200	Wasch-Puffer
H	200	Reinstwasser
Elution	70	Reinstwasser

Tab. 7.10: KingFisher 96-deep well-Layout CT-B-SELEX Runde 11.

Reihe	Volumen [μ l]	Inhalt
A	16	Targetbeads
	184	Wasch-Puffer
B		Kamm
C	200	Wasch-Puffer
D	50	BEAMing-Eluat (Aptamerpool)
	950	SELEX-Puffer
E	400	Wasch-Puffer
F	400	Wasch-Puffer
G	400	Wasch-Puffer
H	200	Reinstwasser






Tab. 7.11: KingFisher 96-deep well-Layout CT-B-SELEX Runde 12.










Reihe	Volumen [μ l]	Inhalt
A	16	Targetbeads
	184	Wasch-Puffer
B		Kamm
C	200	Wasch-Puffer
D	50	BEAMing-Eluat (Aptamerpool)
	950	SELEX-Puffer
E	600	Wasch-Puffer
F	600	Wasch-Puffer
G	600	Wasch-Puffer
H	200	Reinstwasser
Elution	70	Reinstwasser

7.8 FISHing-Programm (KingFisherDuo)

Dargestellt ist das ausführliche FISHing-Programm für die ersten vier SELEX-Runden. In den weiteren Runden wurden jeweils die Inkubationsdauer, Gegen-SELEX (ja/nein) und Anzahl der Waschschrirte, wie in Tab. 4.7 beschrieben, variiert.

Tab. 7.12: FISHing-Programm Runde 1-4.

	Pick-Up	Fishing	(B) - Comb
	Gegenbeadcollect	Fishing	(F) - Gegenbeads
		Collect count	3
		Collect time [s]	5
	Gegenbeadwash	Fishing	(G) - Gegenbeadwash
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:15, Fast
	Mixing / heating:	Shake 1 time, speed	00:00:15, Bottom mix
		Shake 2 time, speed	00:05:00, Slow
		Shake 3 time, speed	00:00:15, Bottom mix
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix	No
		Collect count	3
		Collect time [s]	5
		Post-temperature	No
	Gegenbeadrelease	Fishing	(D) - Incubation
		Release time, speed	00:00:15, Fast
	Gegenbeadincubation	Fishing	(D) - Incubation
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:15, Fast
	Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:30:00, Slow
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix	No
		Collect count	3
		Collect time [s]	5
		Post-temperature	No

	Gegenbeadrelease	Fishing	(H) - Beadrelease	
		Release time, speed	00:00:15, Fast	
	Targetcollect	Fishing	(A) - Targetbeads	
		Collect count	3	
		Collect time [s]	5	
	Targetwash	Fishing	(C) - Beadwash	
		Beginning of step	Precollect No	
		Mixing / heating:	Release time, speed	00:00:15, Fast
			Shake 1 time, speed	00:00:15, Bottom mix
			Shake 2 time, speed	00:05:00, Slow
			Shake 3 time, speed	00:00:15, Bottom mix
		End of step	Heating during mixing	No
			Postmix	No
			Collect count	3
			Collect time [s]	5
	Targetrelease	Fishing	(D) - Incubation	
		Release time, speed	00:00:15, Fast	
	Incubation	Fishing	(D) - Incubation	
		Beginning of step	Precollect No	
		Mixing / heating:	Release time, speed	00:00:15, Fast
			Mixing time, speed	00:40:00, Slow
			Heating during mixing	No
		End of step	Postmix	No
			Collect count	3
			Collect time [s]	5
	Aptamerwash	Fishing	(E) - Wash	
		Release time, speed	00:00:15, Fast	
	Aptamerelution	FishingElution	(A) - for BEAMing	
		Beginning of step	Precollect No	
		Mixing / heating:	Release time, speed	00:00:15, Fast
			Mixing time, speed	00:10:00, Slow
			Heating temperature [°C]	75
		End of step	Postmix	No
			Collect count	3
			Collect time [s]	1
			Post-temperature	No
			Targetreleas	Fishing
Release time, speed	00:00:15, Fast			
	Leave	Fishing	(B) - Comb	

7.9 Agarose-Gele der Klonierungen

7.9.1 CT-B-SELEX

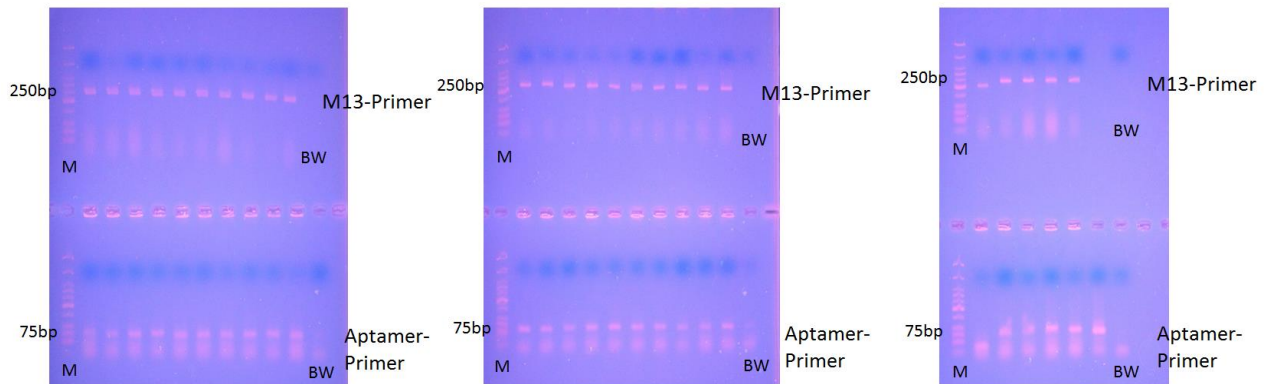


Abb. 7.7: Agarose-Gele zur Visualisierung der Kolonie-PCR-Produkte mit Aptamer-spezifischen und Plasmid-spezifischen Primern der CT-B-SELEX. M – Marker, BW – Blindwert. Bis auf eine Kolonie sind alle Kolonien positiv, d.h. sie haben ein mit Aptamer ligiertes Plasmid (mit M13-Primer) aufgenommen. Eine Kolonie hat zwar ein Plasmid aufgenommen, dieses enthält jedoch kein Aptamer (erste Lane neben Marker im 3. Gel).

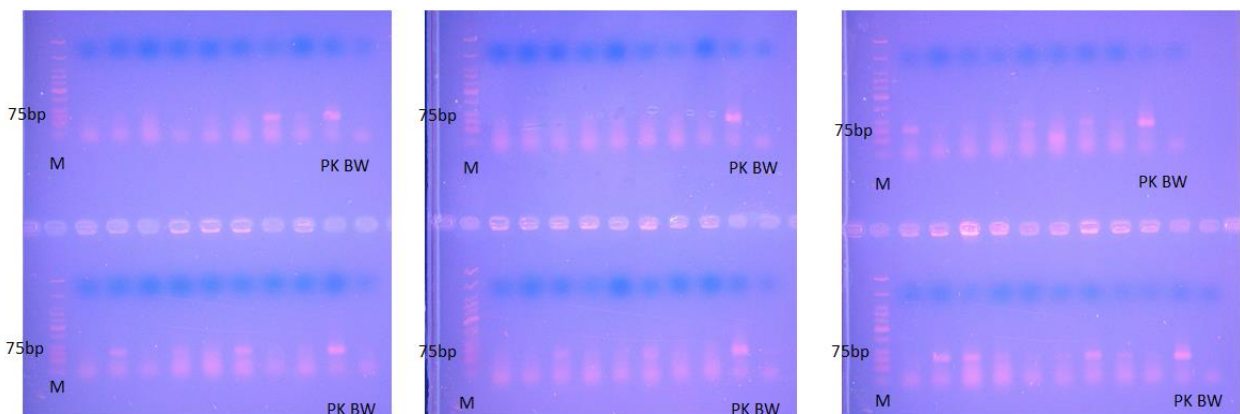


Abb. 7.8: Weitere Agarose-Gele zur Visualisierung der Kolonie-PCR-Produkte mit Aptamer-spezifischen und der CT-B-SELEX. M – Marker, BW – Blindwert, PK – Positivkontrolle (=Aptamerbibliothek 100 nM). Auf ein zusätzliches Screening mit M13-Primern wurde verzichtet.

7.9.2 ST1-B-SELEX

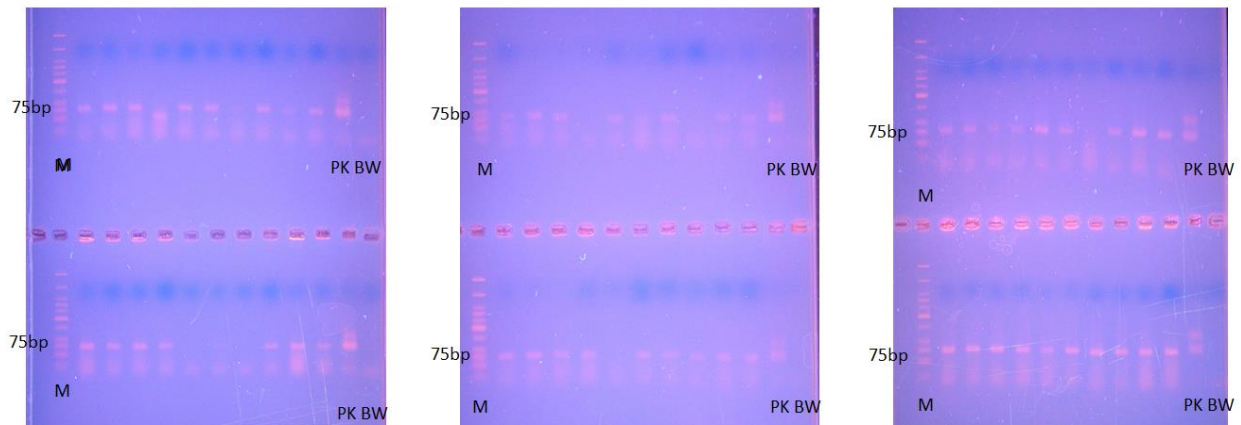


Abb. 7.9: Agarose-Gele zur Visualisierung der Kolonie-PCR-Produkte der durchgemusterten Kolonien mit Aptamer-spezifischen Primern der ST1-B-SELEX. M – Marker, BW – Blindwert, PK – Positivkontrolle (=Aptamerbibliothek 100 nM). Auf ein zusätzliches Screening mit M13-Primern wurde verzichtet.

7.10 *mfold* Strukturvorhersagen

7.10.1 CT-B-Aptamere

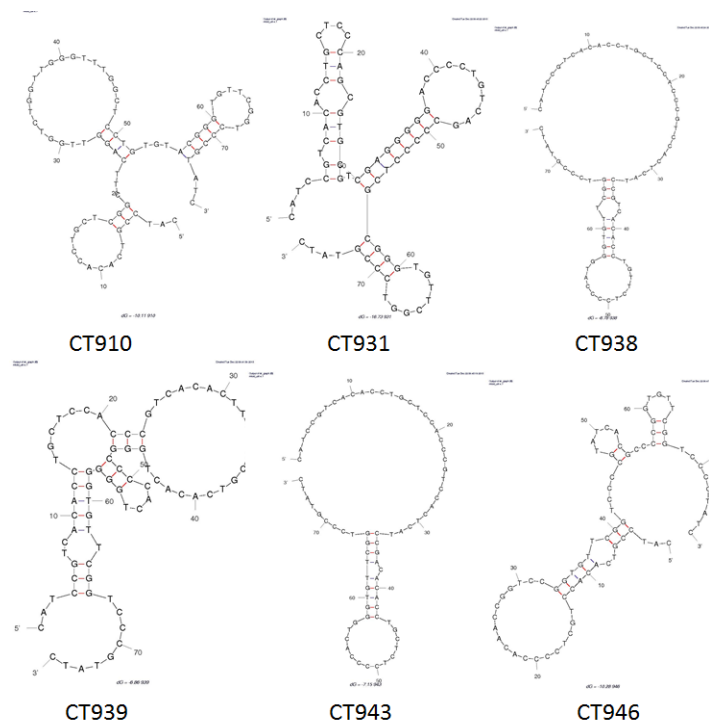


Abb. 7.10: Mittels *mfold* vorhergesagte Sekundärstrukturen der Choleratoxin-Aptamere. Als Parameter wurden dafür eine Na^+ -Konzentration von 137 mM und eine Temperatur von 22 °C gewählt.

7.10.2 ST1-B-Aptamere

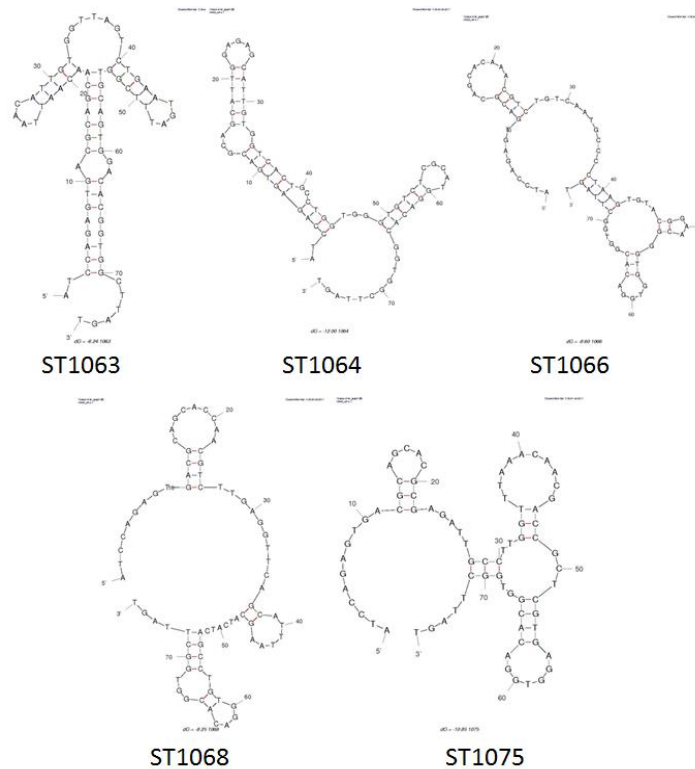


Abb. 7.11: Mittels *mfold* vorhergesagte Sekundärstrukturen der Shigatoxin 1-Aptamere. Als Parameter wurden dafür eine Na^+ -Konzentration von 137 mM und eine Temperatur von 22 °C gewählt.

7.11 CD-Spektroskopie

7.11.1 CT-B-Aptamere

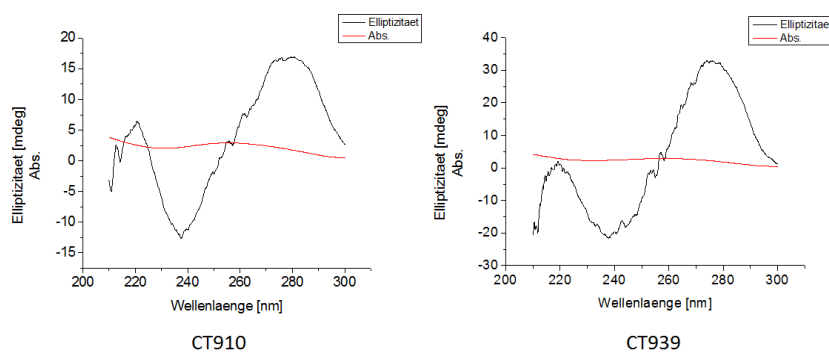


Abb. 7.12: Elliptizität der Aptamere CT910 und CT939 im Wellenlängenbereich von 210-300 nm. Die Pufferkurve wurde subtrahiert.

7.11.2 ST1-B-Aptamere

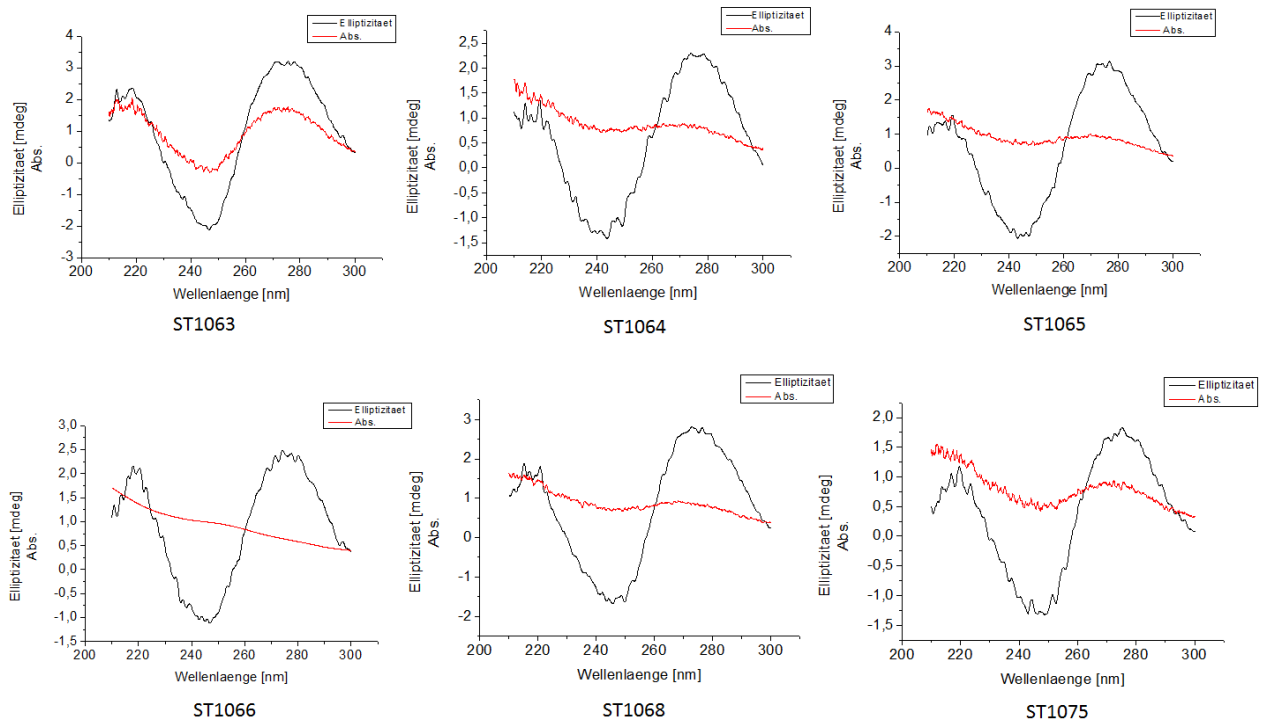


Abb. 7.13: Elliptizität der Aptamere ST1063, ST1064, ST1065, ST1066, ST1068 und ST1075 im Wellenlängenbereich von 210-300 nm. Die Pufferkurve wurde subtrahiert.

7.12 Selektivitätsmessungen ST1-B-Aptamere

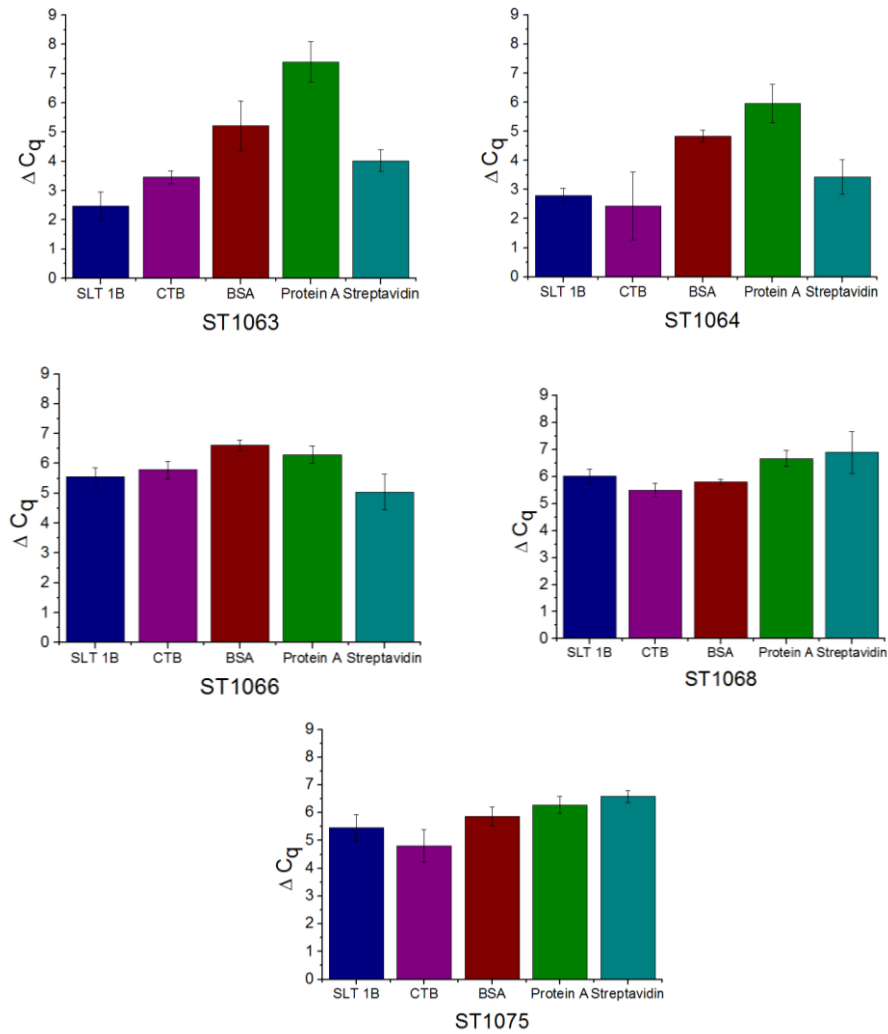


Abb. 7.14: Selektivität der Aptamere ST1063, ST1064, ST1066, ST1068 und ST1075 bestimmt mit Affinitätschromatographie und anschließender qPCR.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen 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.

Hamburg, den 14.02.19

Esther Frohnmeyer