

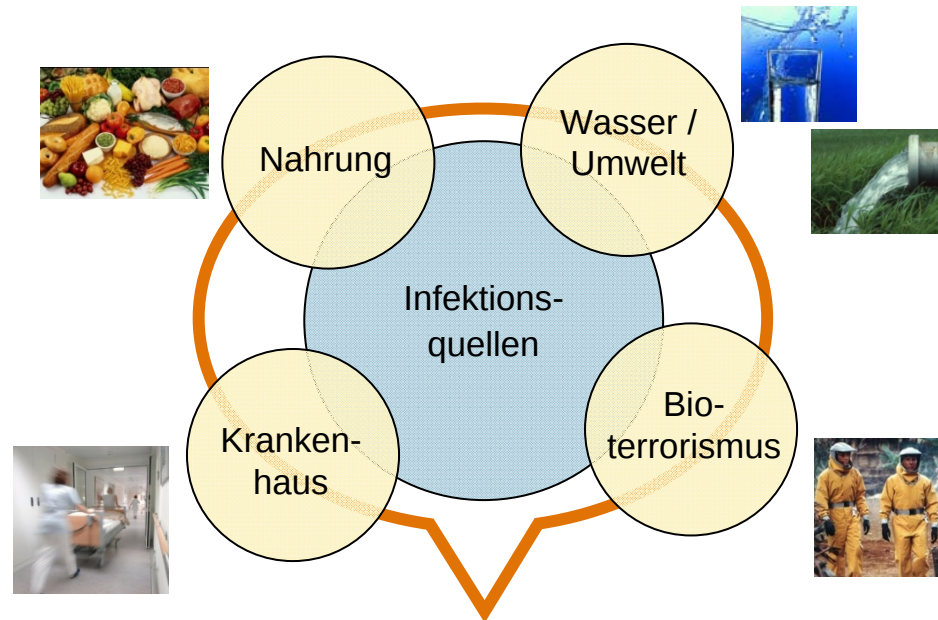
Entwicklung eines Aptamer-basierten Multisensorsystems zum Nachweis von Pathogenen in Wässern

Regina Stoltenburg, Sören Linkorn, Elke Boschke,
Frank Sonntag, Beate Strehnitz

2. IWAS - Statuskolloquium
KUBUS – Leipzig, 15. April 2011

Hintergrund: Schutz der menschlichen Gesundheit

- Mikroorganismen sind ein integraler Bestandteil des Lebens auf der Erde
- einige Mikroorganismen verursachen jedoch Krankheiten mit milden bis schweren Symptomen, bis hin zu lebensbedrohlichen Komplikationen



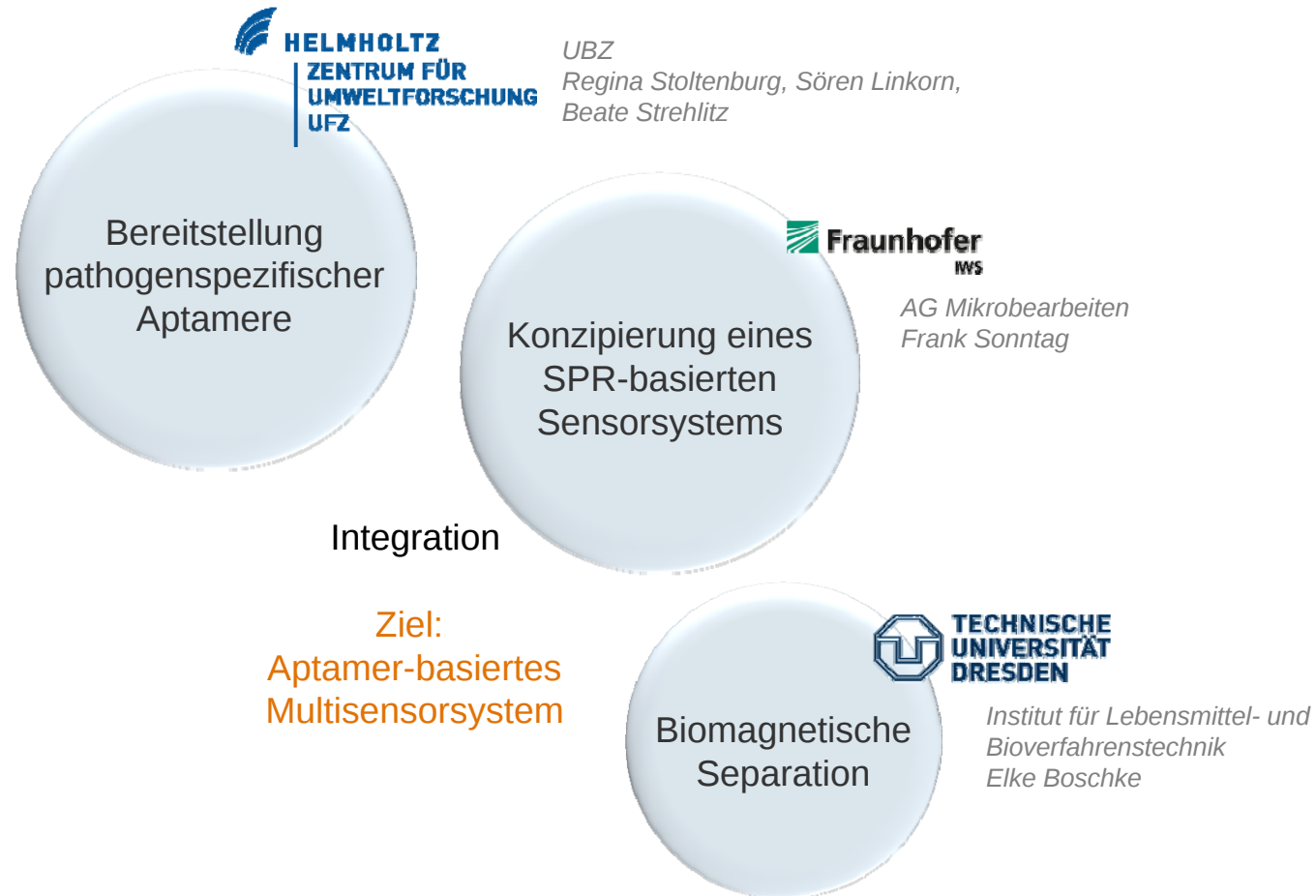
ein schneller, sensitiver and spezifischer Nachweis pathogener Mikroorganismen
ist für den Schutz der menschlichen Gesundheit von besonderer Bedeutung

neue Methoden und Instrumente

(einfach handhabbar, schnell und zuverlässig, portabel, kosteneffektiv)

Aptamer-basiertes Multisensorsystem

→ Schwerpunkte



Aptamere

- hoch affine Nukleinsäuremoleküle

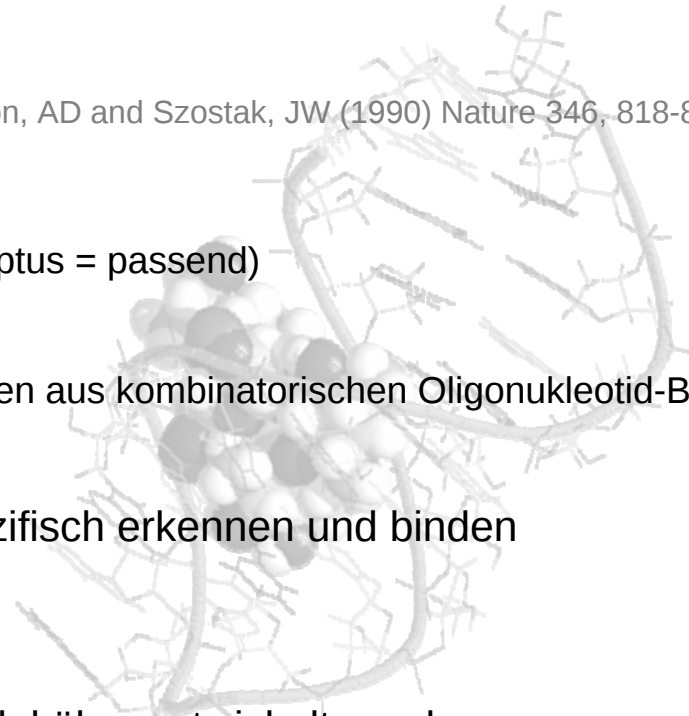
- erstmalig 1990 beschrieben

(Tuerk, C and Gold, L (1990) *Science* 249, 505-510; Ellington, AD and Szostak, JW (1990) *Nature* 346, 818-822; Robertson, DL and Joyce, GF (1990) *Nature* 344, 467-468)

→ **Aptamere** (abgeleitet vom lateinischen Wort aptus = passend)

→ **SELEX** (Methode zur Gewinnung von Aptameren aus kombinatorischen Oligonukleotid-Bibliotheken)

- können ihre vorgegebenen Zielmoleküle spezifisch erkennen und binden (Schlüssel-Schloß-Prinzip)
- können für verschiedene Klassen von Zielmolekülen entwickelt werden



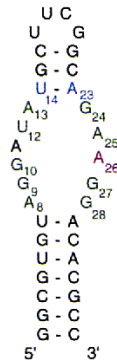
Aptamere als funktionale Nukleinsäuren

- einzelsträngige Oligonukleotide (<100nt) → RNA oder DNA
 - Primärstruktur → z.B. anti-FMN-Aptamer* 5'-GGCGUG.....CACGCC-3'

- Faltung in eine komplexe räumliche Struktur

- Sekundärstruktur

- Stems
 - Loops
 - Hairpins
 - interne Loops
 - Bulges

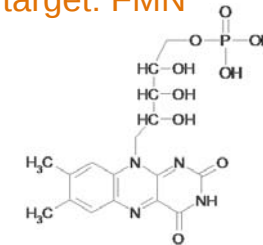


- Tertiärstruktur

- Pseudoknots
 - Triplicates
 - Kissing Loops
 - G-Quartets



target: FMN



- Bindungsmechanismen zwischen Aptamer und Target

- strukturelle Komplementarität
 - hydrophobe Wechselwirkungen, Stapelkräfte
 - elektrostatische Interaktionen
 - Wasserstoffbrückenbindungen

(* Fan, P. et al. (1996) J. Mol. Biol. 258, 480-500)

Aptamere für verschiedene Klassen von Zielmolekülen

→ vornehmlich für Nicht-Nukleinsäuremoleküle

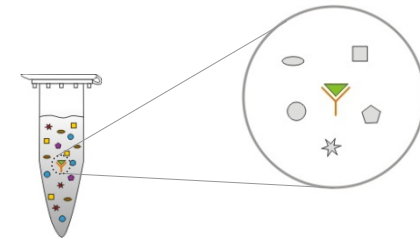


SELEX-Technologie

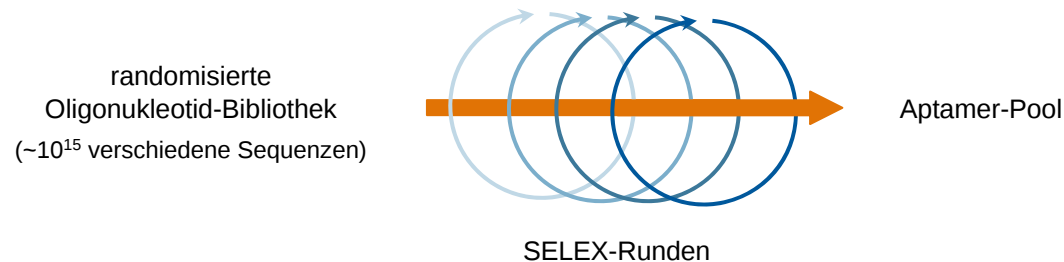
SELEX → Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment

- *in vitro* Selektions- und Amplifikationsmethode

└→ “evolutionärer Prozess im Eppendorfgefäß”

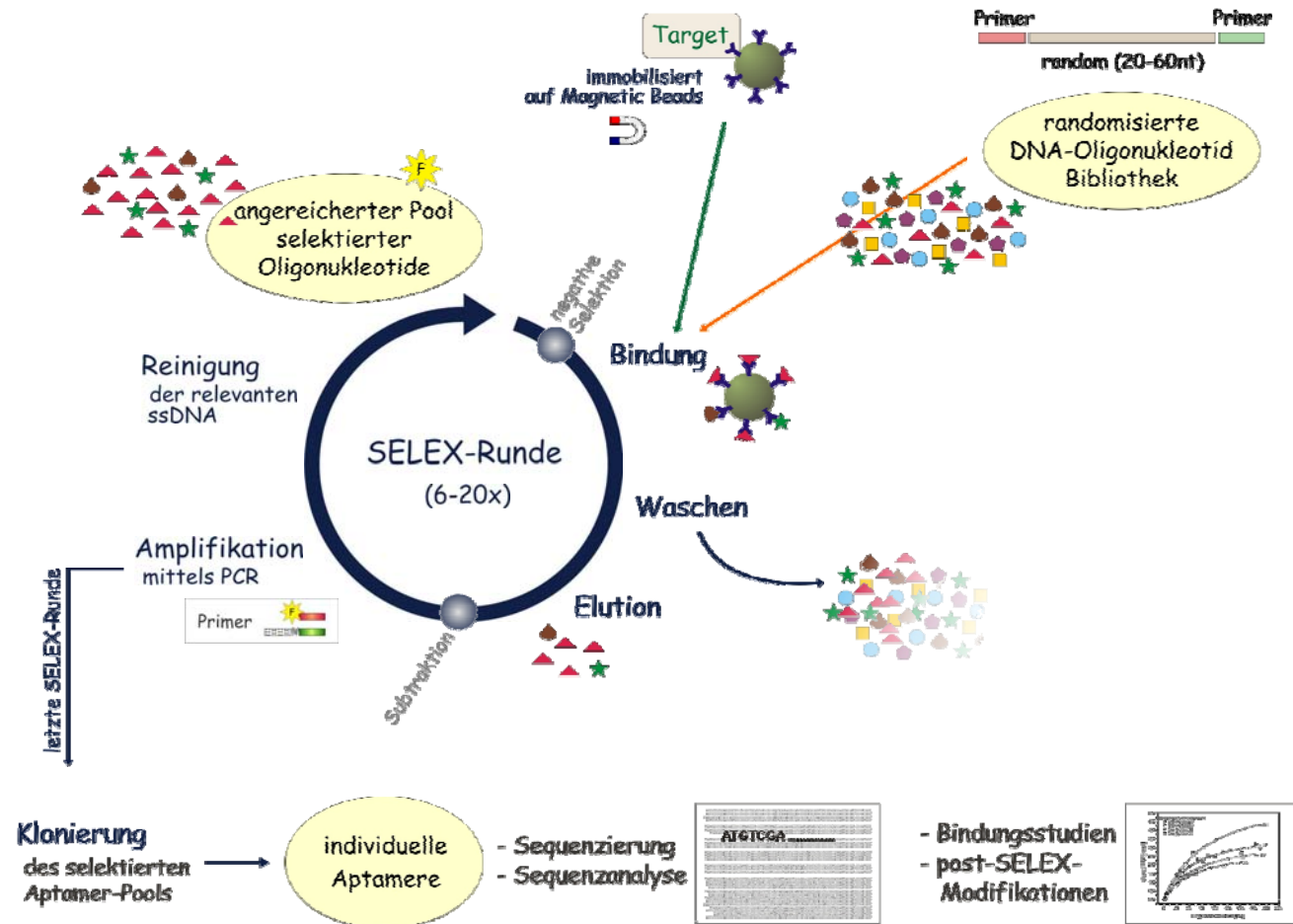


- sich wiederholender Kreislauf, bestehend aus Selektion, enzymatischer Amplifikation und Aufreinigung → SELEX-Runden



SELEX-Technologie

→ zur Selektion von DNA-Aptameren



Aptamere / SELEX – Vorteile und Grenzen

Vorteile

SELEX

- universeller Prozess
- *in vitro* Selektionsmethode (unabhängig von Tierversuchen oder Zellkulturen)
- anwendbar unter nichtphysiologischen Bedingungen und für toxische Targets
- Bedingungen können entsprechend den Erfordernissen angepasst werden
- prinzipiell automatisierbar

Aptamere

- hohe Affinität und Spezifität zum Target
- Produktion durch chemische Synthese
- sehr gut modifizierbar
- Aptamer-Target-Bindung ist regenerierbar

Grenzen

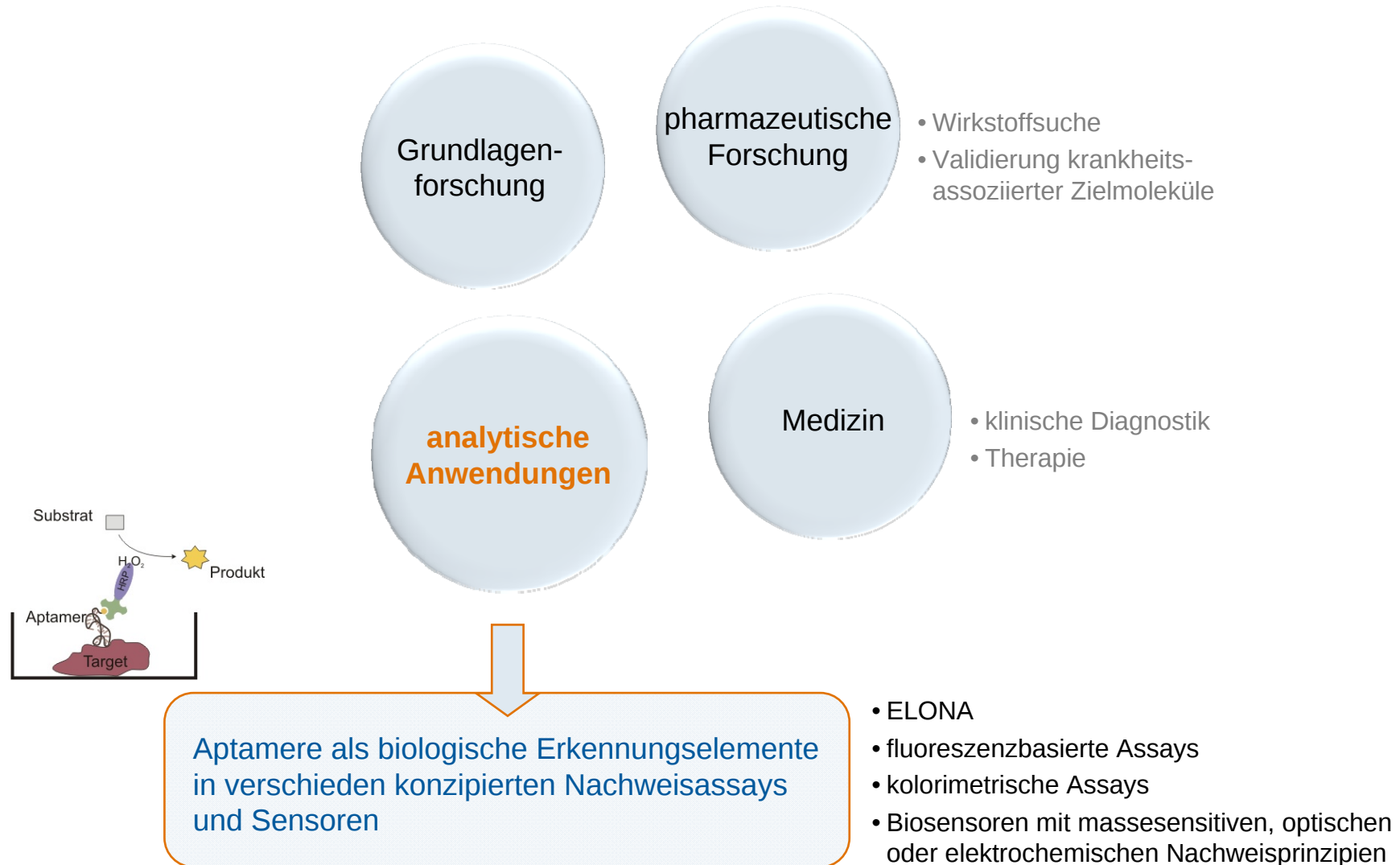
SELEX

- keine Routinemethode – kein Standardprotokoll
- nicht alle Targets sind gleichermaßen geeignet
- Koselektion unspezifischer Oligonukleotide
- zeitaufwendig (manuell)

Aptamere

- Stabilität

Anwendung von Aptameren



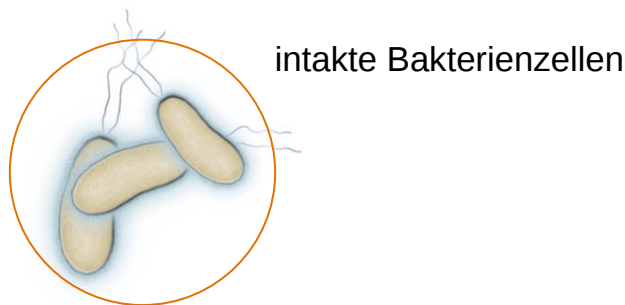
Aptamere für mikrobielle Pathogene

→ Selektion von Aptameren für pathogene Mikroorganismen

- mikrobielle Toxine (Choleratoxin, Botulinum-Neurotoxin, Staphylokokken Enterotoxin B, Shigatoxin)
- virale Pathogene (RSV, HCV, HIV, Influenza A Virus, SCV)
- **bakterielle Pathogene**
- einzellige Parasiten (*Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*)

→ Auswahl des Selektionstargets

- komplexe Targets



- Vielzahl potentieller Targets (unbekannter Art)
- heterogener Aptamer-Pool
- post-SELEX Identifizierung der Aptamertargets
- sehr praxisnaher Ansatz

- gereinigte Targetmoleküle



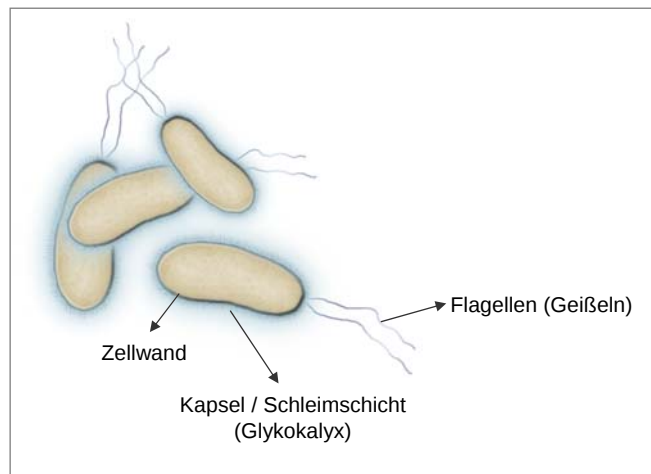
- bekanntes, spezifisches Targetmolekül
- Evaluierung der Aptamer-Target-Bindung im Zellkontext

Aptamere für bakterielle Pathogene

- relevante bakterielle Pathogene:

Escherichia coli, *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*

- Auswahl des Selektionstargets



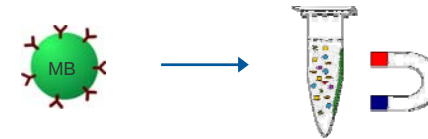
- definierte Zelloberflächenmoleküle Y Y Y

Flagellin von *S. typhimurium* (Strukturprotein der Flagellen)

Protein A von *St. aureus* (Zellwandprotein)

O-spezifische Seitenketten der Lipopolysaccharide von *E. coli* und *S. typhimurium* (Strukturkomponente der gramnegativen Zellwand)

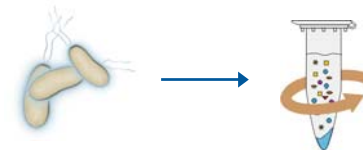
→ FluMag-SELEX:



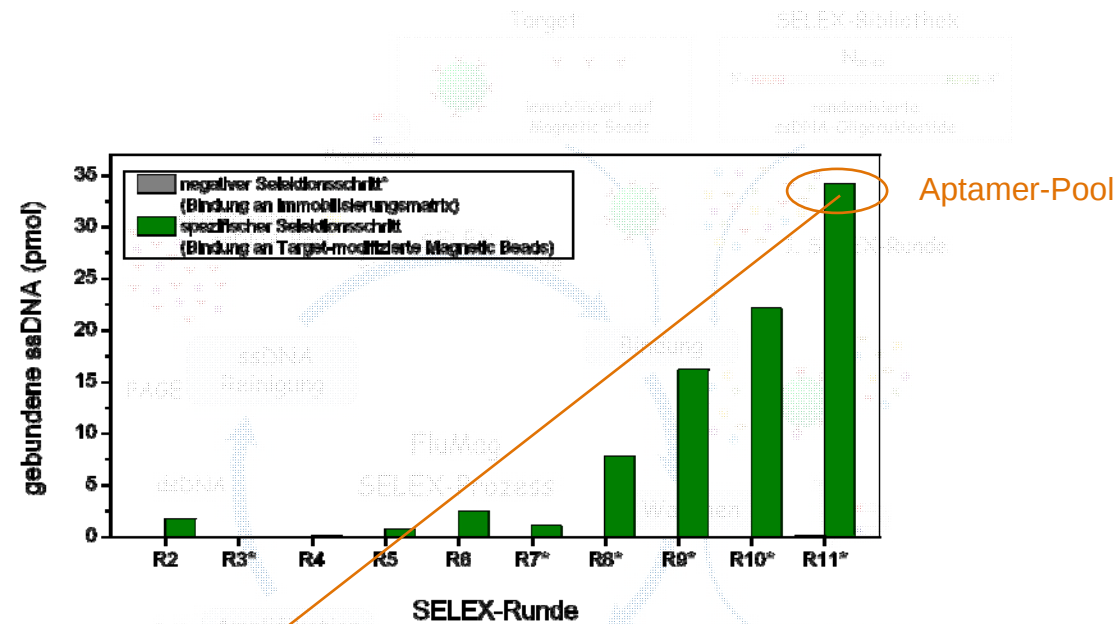
- intakte Bakterienzellen

E. coli, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*

→ Zell-SELEX:



Aptamere für Protein A



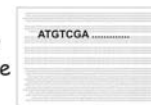
Klonierung
des selektierten
Aptamer-Pools

96
Aptamer-Klone

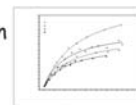
individuelle
Aptamere

heterogener
Aptamer-Pool

- Sequenzierung
- Sequenzanalyse



- Bindungsstudien
- post-SELEX-
Modifikationen

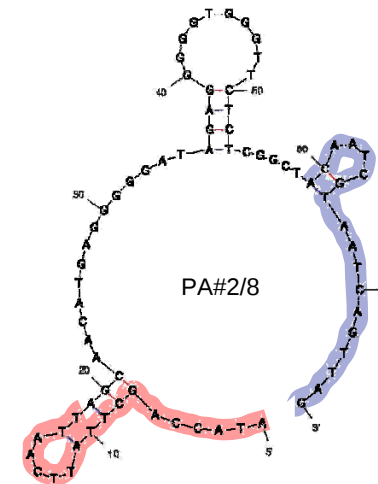
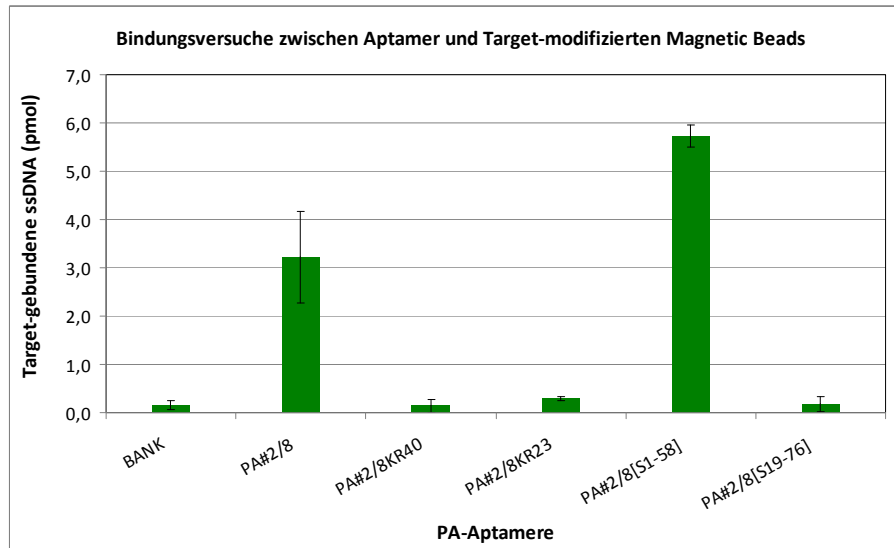


Screening nach
besten Bindern

Aptamere für Protein A



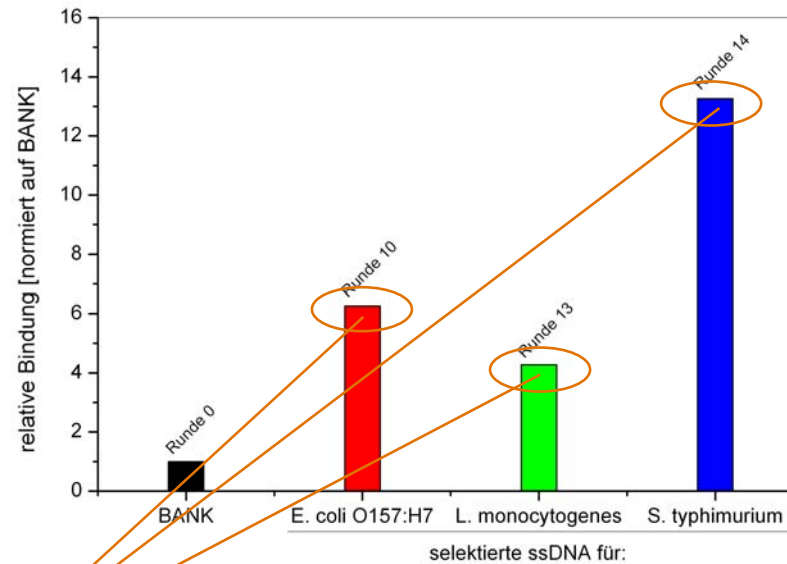
Aptamer	Sequenz (5' → 3')	Länge
PA#2/8	ATACCAGCTTATTCAATTAGCAACATGAGGGGGATAGAGGGGGTGGGTTCTCTCGGCTACAATCGTAATCAGTTAG	76nt
PA#2/8 - Fragmente		
PA#2/8KR40	AGCAACATGAGGGGGATAGAGGGGGTGGGTTCTCTCGGCT	40nt
PA#2/8KR23	GATAGAGGGGGTGGGTTCTCTCG	23nt
PA#2/8[S1-58]	ATACCAGCTTATTCAATTAGCAACATGAGGGGGATAGAGGGGGTGGGTTCTCTCGGCT	58nt
PA#2/8[S19-76]	AGCAACATGAGGGGGATAGAGGGGGTGGGTTCTCTCGGCTACAATCGTAATCAGTTAG	58nt



Aptamere für Bakterienzellen



→ Aptamere für E. coli O157:H7, Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium



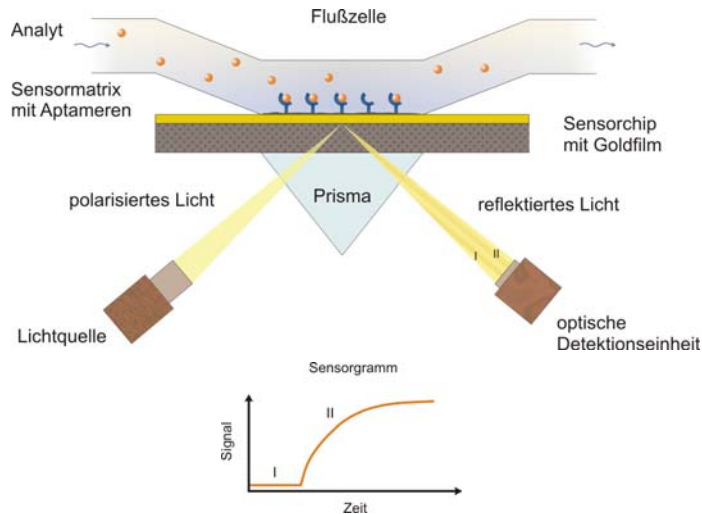
drei
Aptamer-Pools



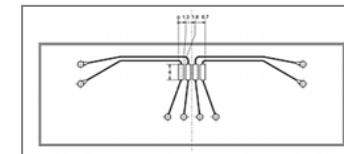
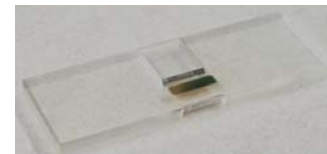
gerätetechnische Entwicklung des Sensorsystems

- Konzipierung eines SPR-basierten Sensorsystems (Fraunhofer IWS)
als kompaktes, portables, bench-top Multisensorsystem

➤ SPR-Funktionsprinzip (SPR = Surface Plasmon Resonance)



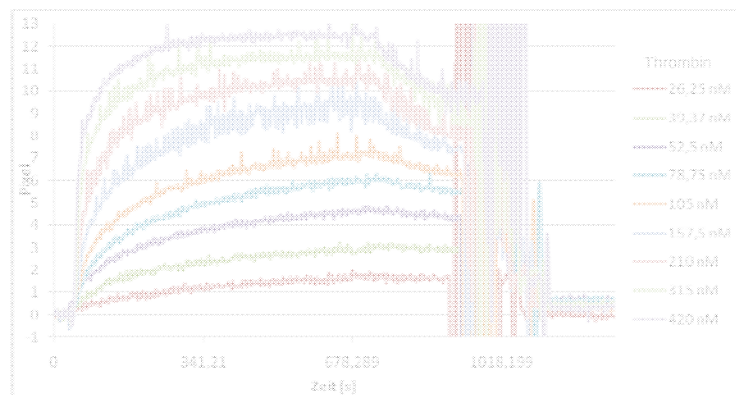
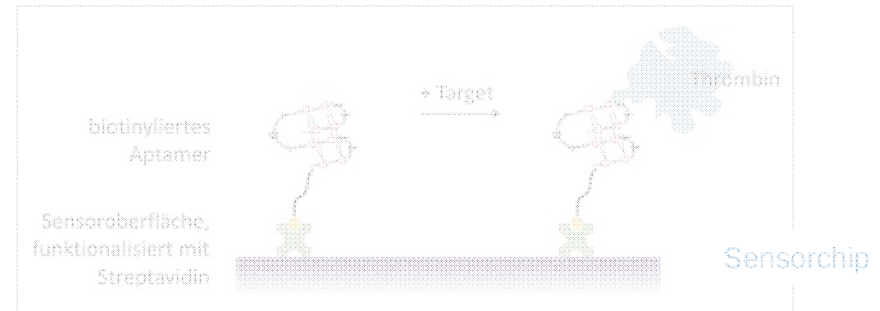
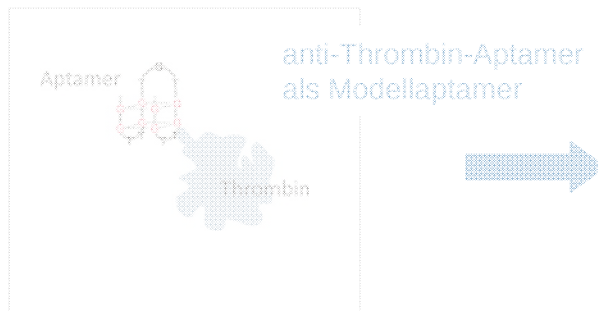
➤ Gerätekonzept → erstes Labormessgerät (Messgerät mit Lab-on-Chip-System, Sensorchip mit Goldfilm, On-Chip-Mikrofluidik, 4- bzw. 17-Kanal-Flusssystem)



gerätetechnische Entwicklung des Sensorsystems

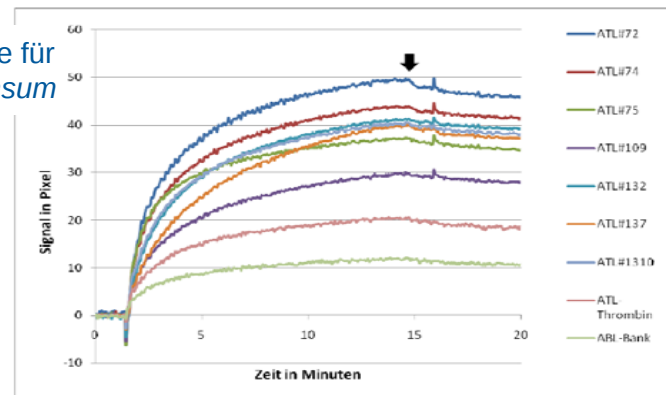
■ SPR-basiertes Multisensorsystem

- erste Messungen mit einem Modellaptamer (Fraunhofer IWS, TU Dresden)
(Immobilisierung, Blockierung, Bindung, Regeneration, Stabilität ...)



Änderung des SPR-Signals in Abhängigkeit der Targetkonzentration

Aptamere für *P. expansum*



parallele Testung verschiedener Aptamere
Target: Proteine des Sporenextraktes von *P. expansum*

Zusammenfassung, ➤ künftige Aufgaben

- **Aptamer-Pools für bakterielle Targets selektiert (Protein A, Bakterienzellen EC, LM, ST)**
 - Klonierung und Screening der Aptamer-Pools → Auswahl der besten Binder
 - Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Aptamere (Affinität, Spezifität)
(fluoreszenzbasierte Assays, ELONA, Biacore ...)
 - Optimierung der Aptamersequenzen und Modifizierungen
 - Adaptierung der Aptamere an das SPR-basierte Multisensorsystem und Durchführung von Messreihen

- **Prototyp des SPR-basierten Multisensorsystems entwickelt, Testmessungen mit Modell-Aptameren**
 - Integration eines automatischen Probenhandlingsystems
 - Softwareentwicklung
 - Optimierung der Funktionalisierung der Chipoberflächen

- **Biomagnetische Separation in der Entwicklung**
 - Parameteroptimierung: magnetische Partikel (Oberflächenfunktionalisierung, Größe, Menge), Separation (Volumen, Zeit, Durchmischung, Probenmatrix)
 - Entwicklung eines Magnetmixers mit Elektromagneten
 - Einsatz selektierter Aptamere zur Abtrennung von Bakterien

Perspektiven

- **Einsatz von Aptameren als spezifische Erkennungselemente im Multisensorsystem**

bedarfsgerechte Entwicklung pathogenspezifischer Aptamere prinzipiell möglich durch Anwendung der SELEX-Technologie → hohe Flexibilität und Erweiterbarkeit des Multisensorsystems

darüber hinaus: Einsatz von Aptameren für andere Analyte

- **Multisensorsystem als kompakter, portabler Messplatz mit automatisiertem Probenhandlingsystem**

prinzipiell in verschiedenen Regionen/Standorten oder unterschiedlichen Bereichen der Wasserwirtschaft einsetzbar, überall dort, wo eine mikrobielle Beurteilung der Qualität von Wässern gefragt ist

darüber hinaus: Einsatz des Multisensorsystems in anderen Bereichen (z. B. Lebensmittelanalytik)

Verwendung verschiedener Erkennungselemente (z. B. Aptamere, Antikörper, Peptide, DNA)

Vielen Dank

für Ihre Aufmerksamkeit

