



Universität Hamburg
DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

HAMBURG SCHOOL OF FOOD SCIENCE



COMPETENCE IN FOOD AWARDS 2011

ENTWICKLUNG VON APTAMEREN FÜR SPOREN VON *BACILLUS CEREUS* MITTELS SELEX-VERFAHREN

Vortrag zur Präsentation der Diplomarbeit



Yvonne Peglow
Yvonne.Peglow@web.de



Aufgabenstellung

- Im Rahmen eines FEI/AiF-Projektes soll eine innovative Methode zur Anreicherung von *Bacillus cereus* Sporen in Milchprodukten entwickelt werden.
1. Selektion von Aptameren mit spezifischen Bindungseigenschaften
 2. Kopplung der Aptamere als Fängermoleküle an eine feste Phase zur Bioaffinitätsanreicherung der Sporen
 3. Nachweis der angereicherten Sporen über Standardverfahren, wie z.B. ELISA





Aufgabenstellung

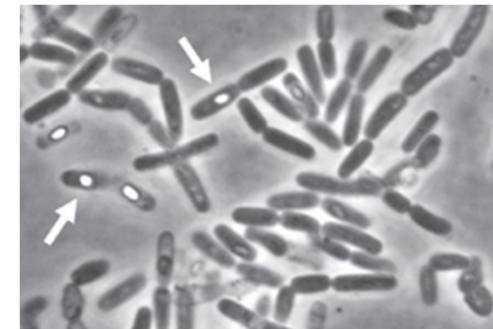
- Im Rahmen eines FEI/AiF-Projektes soll eine innovative Methode zur Anreicherung von *Bacillus cereus* Sporen in Milchprodukten entwickelt werden.

- Selektion von Aptameren mit spezifischen Bindungseigenschaften**
- Kopplung der Aptamere als Fängermoleküle an eine feste Phase zur Bioaffinitätsanreicherung der Sporen
- Nachweis der angereicherten Sporen über Standardverfahren, wie z.B. ELISA



Was ist das Problem mit *Bacillus cereus*?

- Grampositives Bakterium, bildet Endosporen, kommt ubiquitär vor
- **Sporen überstehen Pasteurisation der Milch**
 - Lediglich Abtötung vegetativer Zellen
 - Zusätzlich Induktionen der Auskeimung von vorhandenen Sporen
- Folge
 - Geschmacksfehler
 - Krankheitsauslösend
 - Diarrhoe: Durchfall und Abdominalkrämpfe
 - Emesis: Übelkeit und Erbrechen

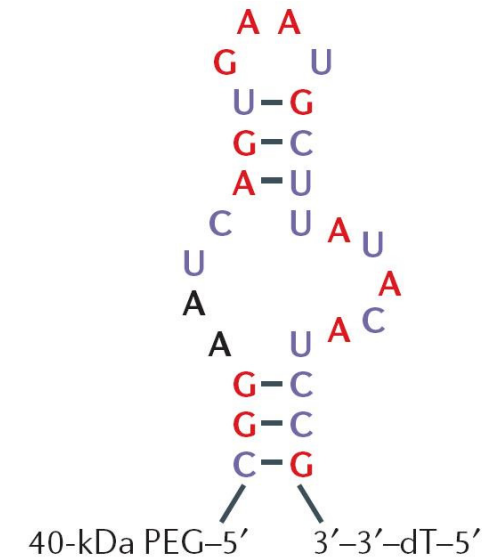


Quelle Bild: Bhunia, 2009



Aptamere

- „**aptus**“ (lat.): passend, „**meros**“ (griech.): Teil
- ssDNA oder ssRNA mit etwa 30 bis 80 Nukleotiden
- die Sequenz bedingt die dreidimensionale Struktur (Watson-Crick-Wechselwirkungen)
 - hohe Spezifität und Affinität für Zielmolekül/Target
- funktionelle Ähnlichkeit mit Antikörpern

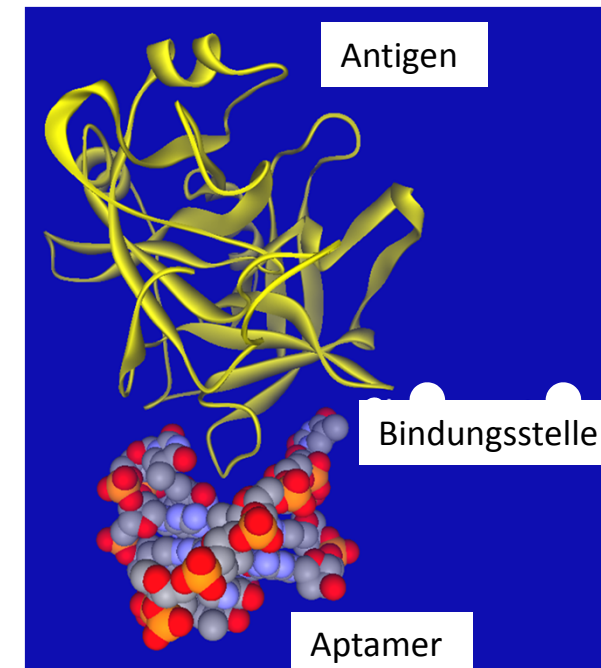


Quelle Bild: Ng et al., 2006



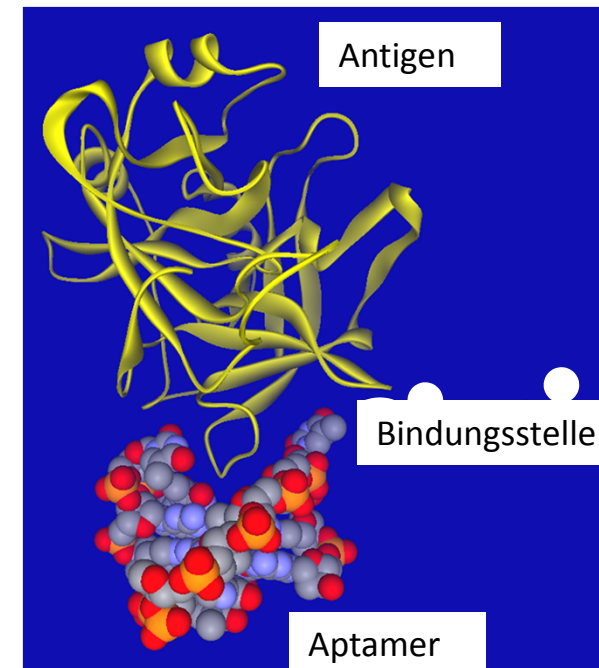
Aptamere

- „**aptus**“ (lat.): passend, „**meros**“ (griech.): Teil
- ssDNA oder ssRNA mit etwa 30 bis 80 Nukleotiden
- **die Sequenz bedingt die dreidimensionale Struktur (Watson-Crick-Wechselwirkungen)**
 - hohe Spezifität und Affinität für Zielmolekül/Target
- funktionelle Ähnlichkeit mit Antikörpern



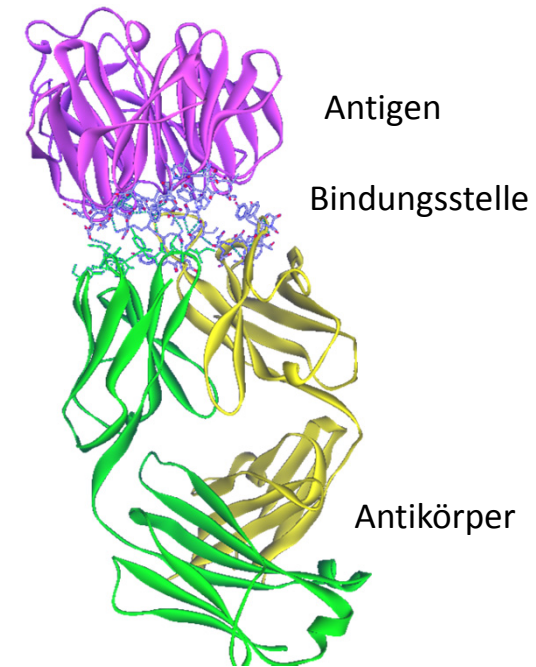
Aptamere

- „**aptus**“ (lat.): passend, „**meros**“ (griech.): Teil
- ssDNA oder ssRNA mit etwa 30 bis 80 Nukleotiden
- die Sequenz bedingt die dreidimensionale Struktur (Watson-Crick-Wechselwirkungen)
 - **hohe Spezifität und Affinität für Zielmolekül/Target**
- funktionelle Ähnlichkeit mit Antikörpern



Aptamere

- „**aptus**“ (lat.): passend, „**meros**“ (griech.): Teil
- ssDNA oder ssRNA mit etwa 30 bis 80 Nukleotiden
- die Sequenz bedingt die dreidimensionale Struktur (Watson-Crick-Wechselwirkungen)
 - hohe Spezifität und Affinität für Zielmolekül/Target
- **funktionelle Ähnlichkeit mit Antikörpern**



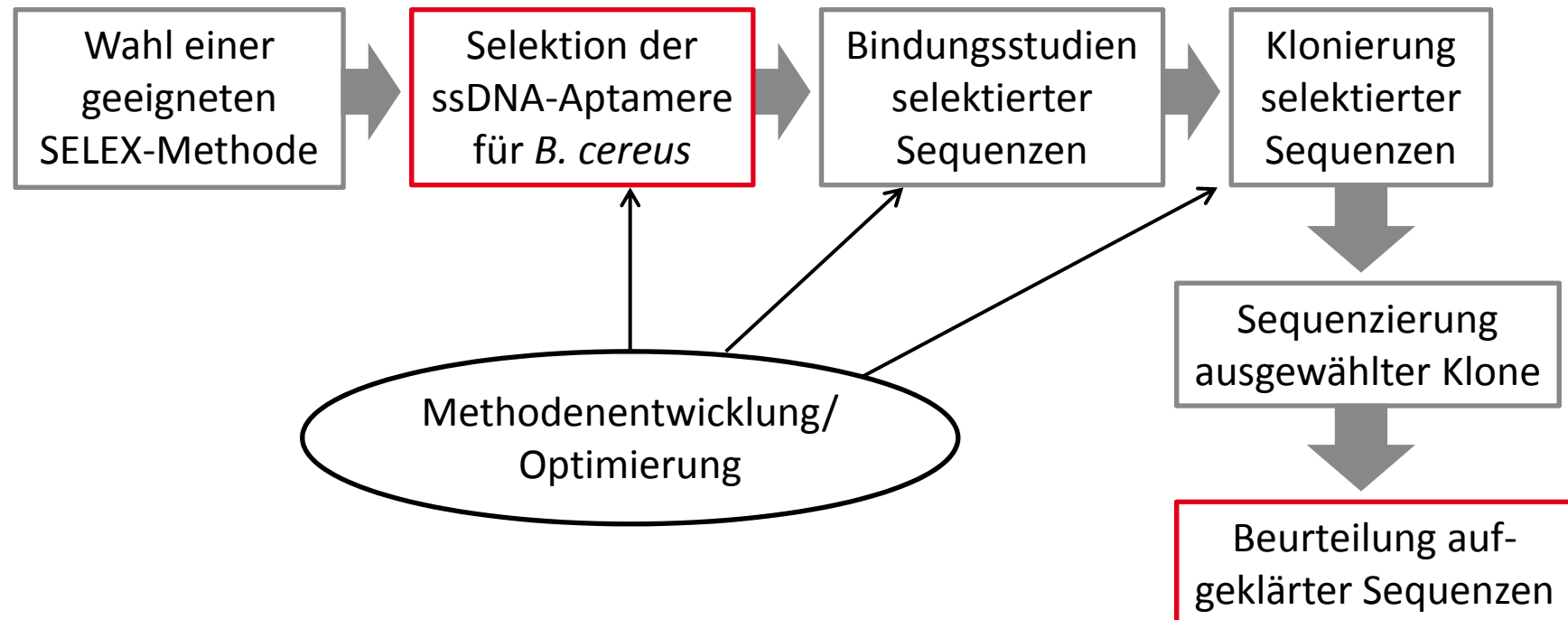


SELEX – Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung

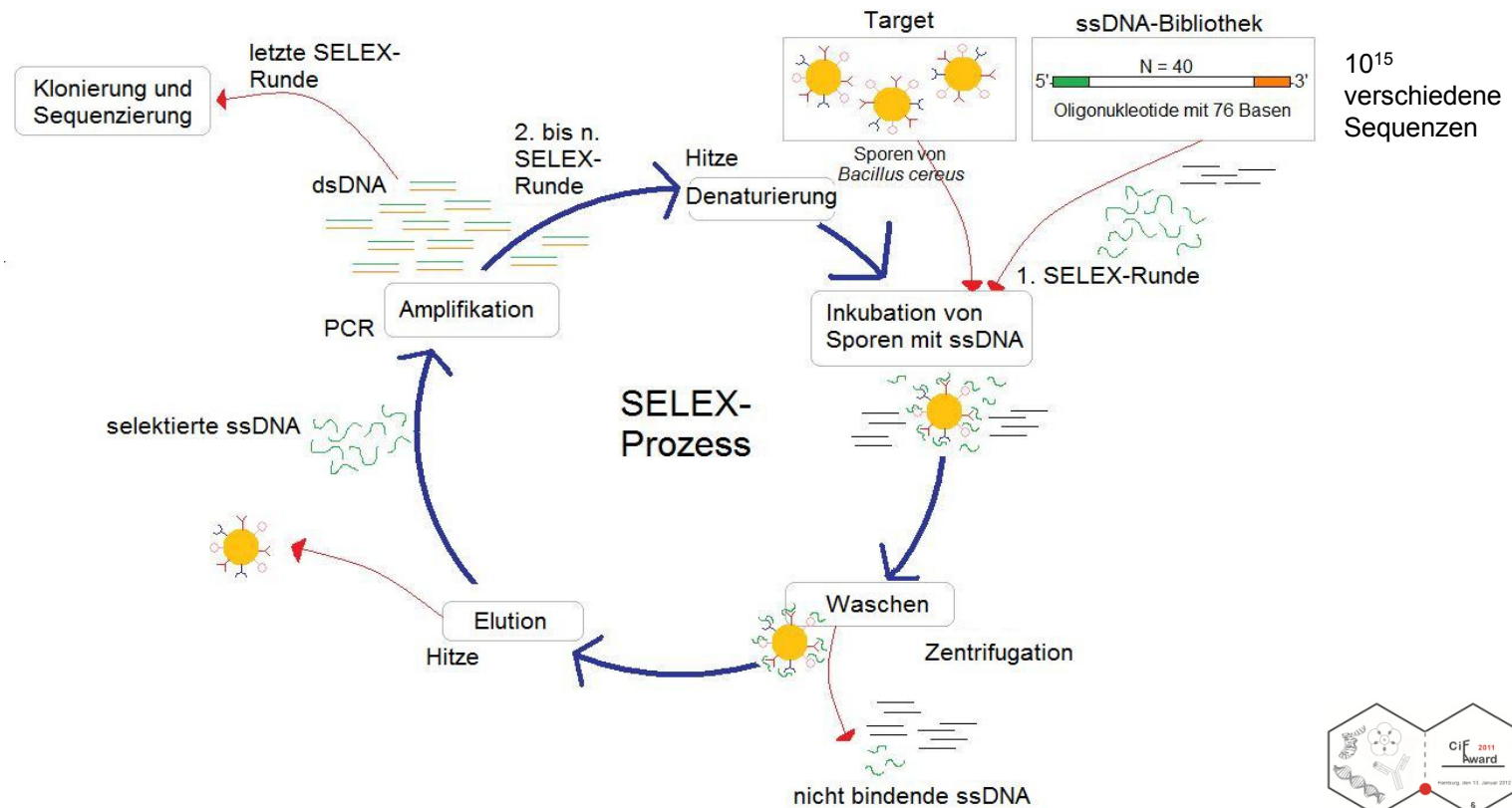
- Seit 1990 bestehendes Verfahren zur Entwicklung von Aptameren
- Ausgangsbibliothek mit ca. 10^{15} verschiedenen Sequenzen randomisierter, unbekannter Basenabfolge (Länge: 40 – 60 Basen)
- Folgende Schritte können bis zu 20-fach wiederholt werden:
 1. **Inkubation** mit dem Zielmolekül/Target in geeignetem Puffersystem
 2. **Trennung** bindende/nicht-bindende Sequenzen
 3. **Vervielfältigung** der Sequenzen mit Bindungsaffinität mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)
 4. Einsatz der vervielfältigten DNA für eine **erneute Inkubation** mit dem Target



Vorgehen bei der Diplomarbeit



Ergebnisse: verwendete SELEX





Ergebnisse: gefundene Sequenzen

Erwartungen:

- Viele verschiedene Oberflächenstrukturen der Sporen als mögliche Bindungsstellen für die Aptamere
- ➔ **Unterschiedliche Sequenzen** in den aufzuklärenden Bereichen der selektierten Aptamere

Ergebnis:

- **15 unterschiedliche Sequenzen**, die jedoch Gemeinsamkeiten zeigen
- 2 Paare mit sehr ähnlicher Sequenz



Ergebnisse: gefundene Sequenzen

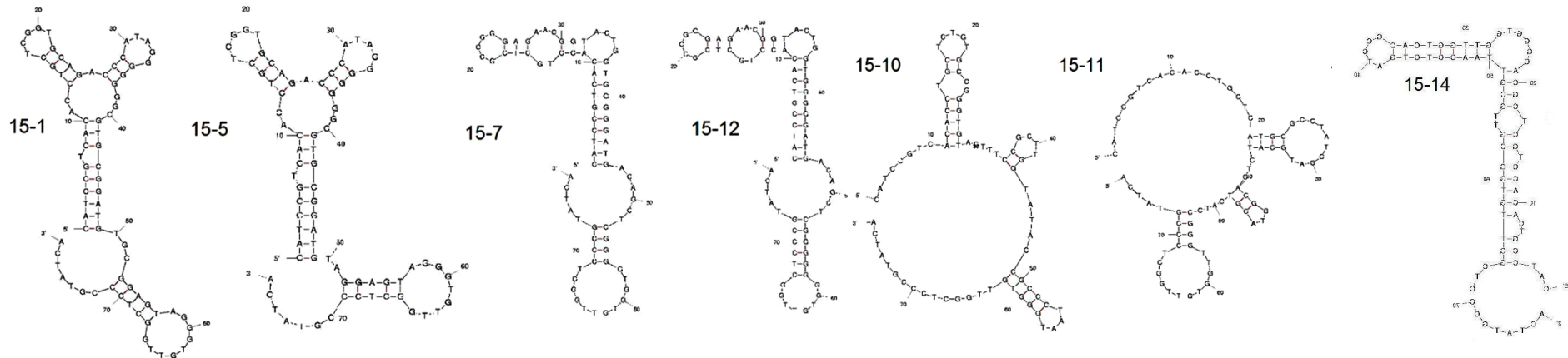
a	
15-1	CATCCGTCAC ACCTGCTCGG TGCAGACCCA TAGGGGGGGC GTGCGGATGT GCGGAGTAGG GTGTTGGCTC CCGTATCA
15-5 A-.....
Identity	*****
b	
15-7	CATCCGTCAC ACCTGCTCGC CGGGAGAACG GTACTGGTGG GGGATGACAG CTCGGGGTGG TGTTGGCTCC CGTATCA
15-12G.....
Identity	***** ** *****

Ergebnis:

- 15 verschiedene Sequenzen, die jedoch Gemeinsamkeiten zeigen
- **2 Paare mit sehr ähnlicher Sequenz**



Ergebnisse: gefundene Sequenzen

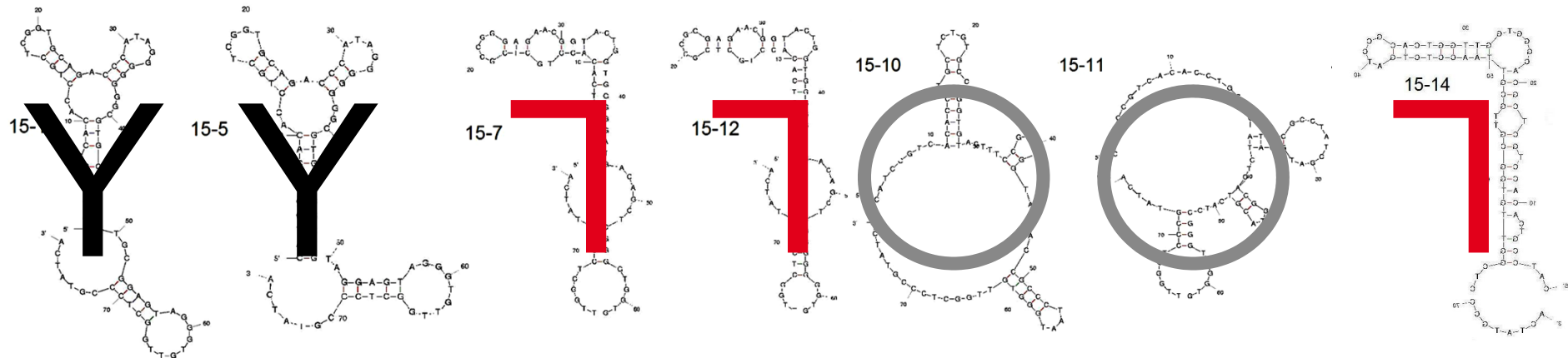


Ergebnis:

- 15 verschiedene Sequenzen, die jedoch Gemeinsamkeiten zeigen
- 2 Paare mit sehr ähnlicher Sequenz
- **ähnliche Merkmale in den Sekundärstrukturen**



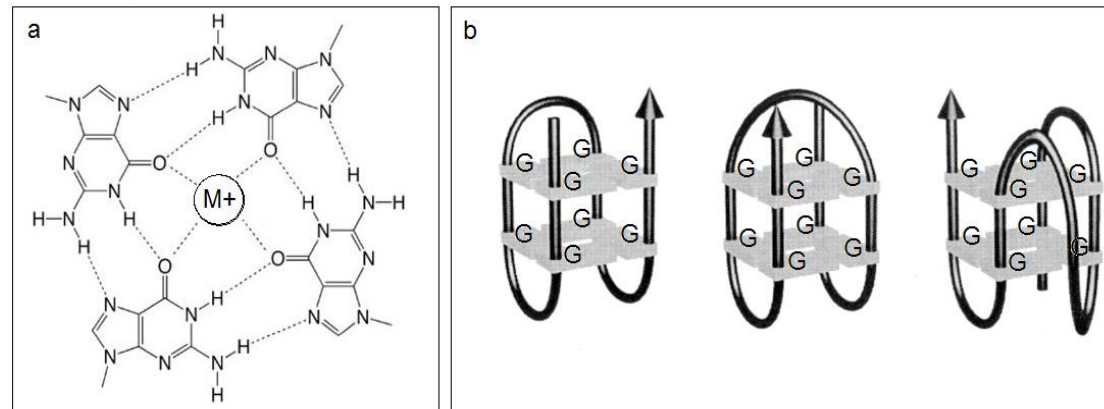
Ergebnisse: gefundene Sequenzen



Ergebnis:

- 15 verschiedene Sequenzen, die jedoch Gemeinsamkeiten zeigen
- 2 Paare mit sehr ähnlicher Sequenz
- **ähnliche Merkmale in den Sekundärstrukturen**

Ergebnisse: gefundene Sequenzen



Ergebnis:

- 15 verschiedene Sequenzen, die jedoch Gemeinsamkeiten zeigen
- 2 Paare mit sehr ähnlicher Sequenz
- ähnliche Merkmale in den Sekundärstrukturen
- **Guanin-reiche Bereiche: Tertiärstrukturen mit G-Quadruplexen**

Quelle Bild: Bates et al., 2009; Simmonson, 2001





Zusammenfassung

- Entwicklung einer geeigneten SELEX-Methode
- 15 Selektionsrunden
- erfolgreiche Anreicherung
- 15 verschiedene gefundene Sequenzen
- verwandtschaftliche Beziehungen der Sequenzen
- Sekundär- und Tertiärstrukturen mit ähnlichen Strukturmustern





Ausblick

- Weitere Charakterisierung der im Rahmen der Diplomarbeit gefundenen Sequenzen
 - Ermittlung der Affinitäten der aufgeklärten Sequenzen zu den Sporen
 - Filterbindungsstudien
 - Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR)
 - Untersuchung der Sequenzen auf Kreuzreaktionen mit Sporen weiterer *Bacillus* sp. (z.B. *B. subtilis*)





Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Markus Fischer (Institut für Lebensmittelchemie)

Prof. Dr. Ulrich Hahn (Institut für Biochemie und Molekularbiologie)

Dr. Ilka Haase

Jan-Hinnerk Jarck und dem „Team DNA“

den Projektförderern/-partnern:



FORSCHUNGSKREIS DER ERNÄHRUNGSINDUSTRIE E.V.



den Sponsoren:

