



Universität Hamburg

DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

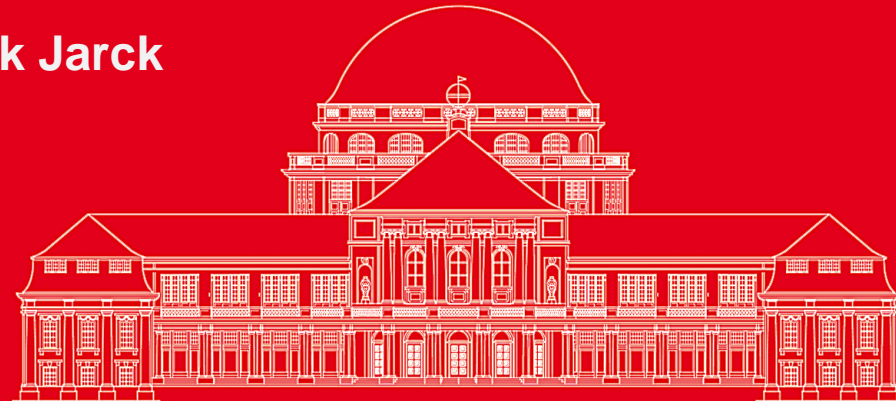


„APTAMERREZEPTOREN – EIN NEUER WEG IN DER MIKROBIELLEN ROUTINEANALYTIK VON LEBENSMITTELN?“

Universität Hamburg

Institut für Lebensmittelchemie und Institut für Biochemie

Jan-Hinnerk Jarck



Aptamere – Kurze Einführung

Synthetische einzelsträngige Nukleinsäuren (single stranded NA (ssDNA, ssRNA)) als bindendes Molekül

- Aptamere (lat. *aptus*, gut passend und gr. *meros*, Region) können andere Moleküle mit hoher Spezifität binden

in vitro Selektion – Evolution im Labormaßstab

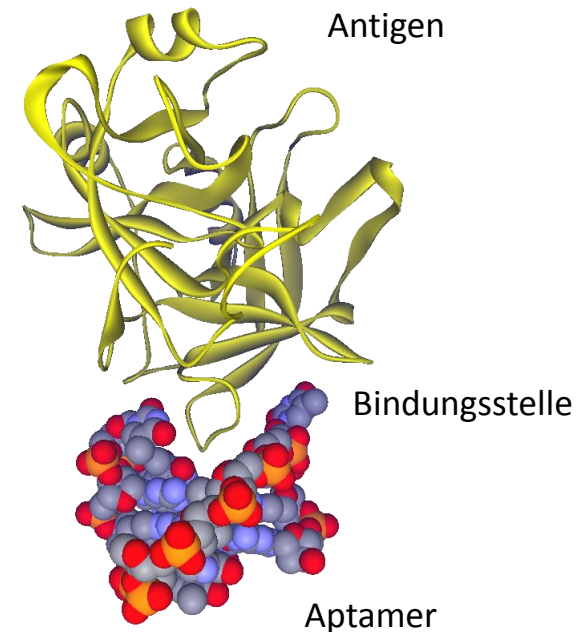
SELEX – **S**ystematic **E**volution of **L**igands by **E**xponential Enrichment

Auslese durch mehrere Runden der Anreicherung aus einem breiten Pool von Sequenzen, um das Molekül zu finden, welches am stärksten bindet

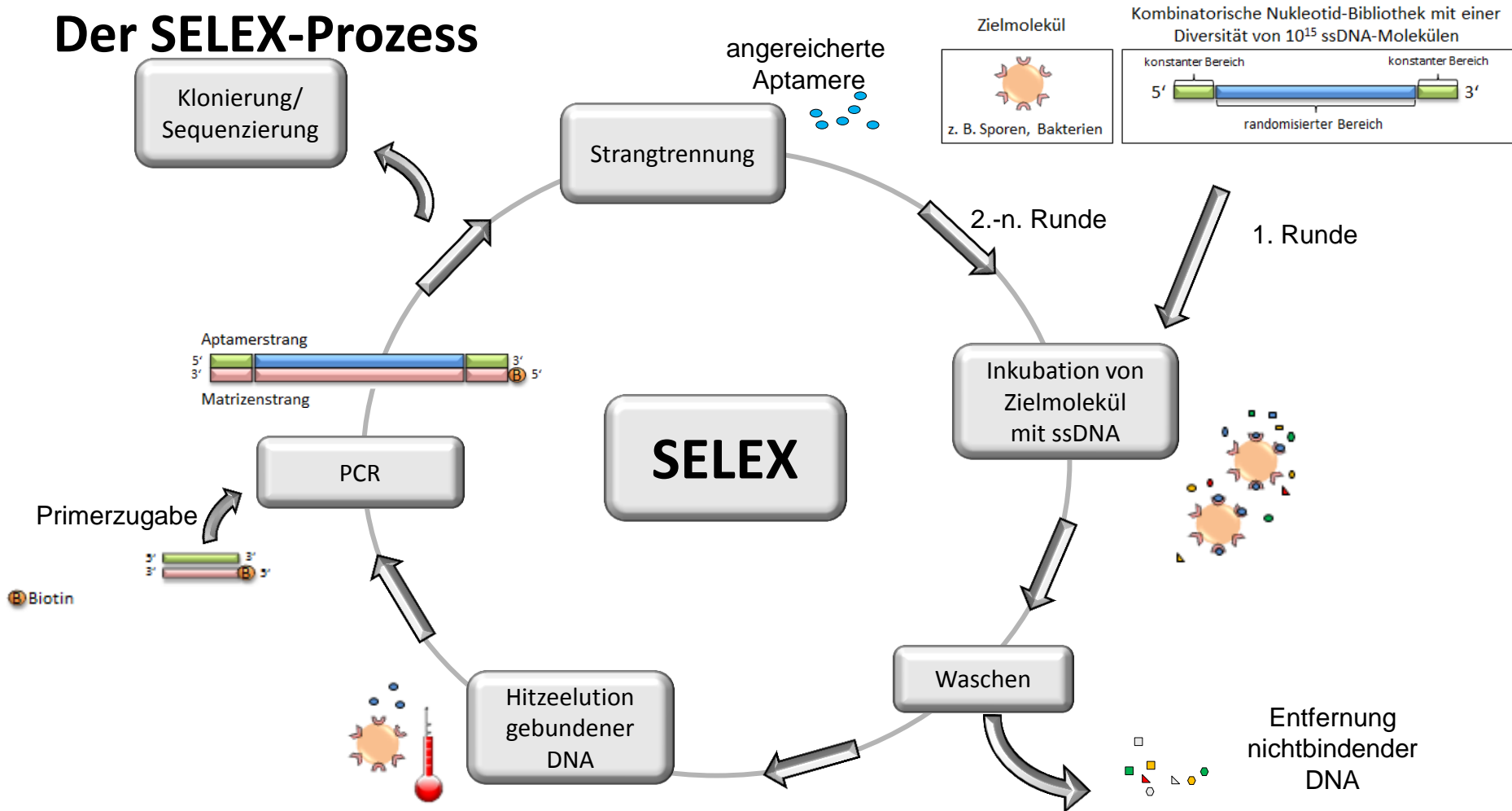
- theoretisch 4^X ($4^{40} \approx 10^{23}$) verschiedene Sequenzen möglich
- praktisch Diversität von 10^{15} herstellbar

Aptamere – Konkurrenz zu Antikörpern

- binden spezifisch an Zielmolekül
- Antikörper-ähnliche Spezifität und Empfindlichkeit
- fehlende Immunogenität
- große Breite an möglichen Zielmolekülen
- leicht zu produzieren (synthetisch, ohne Tiereinsatz)
- relativ stabil gegenüber biologischem Abbau
- können ohne Verlust der Bindungsfähigkeit oder Aktivität renaturiert werden



Der SELEX-Prozess



Aptamere – Anwendungsbereiche

- Medizinische Diagnosen
- Lebensmittelanalytik
- Umweltüberwachung
- u.v.m

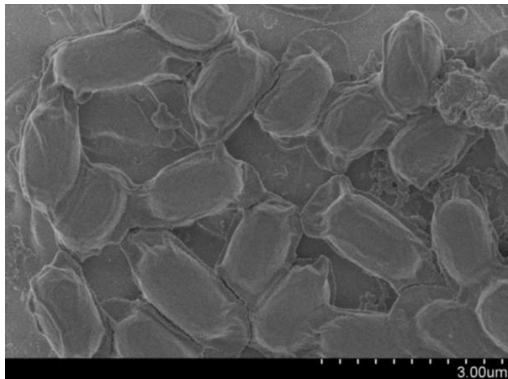
Klasse	Zielmolekül	Aptamertyp	
Ionen	Zn ²⁺	DNA	Ellington & Rajendran 2008
Nukleotide	ATP	DNA/RNA	Holeman et al. 1998
Aminosäuren	Arginin	DNA	Harada & Frankel 1995
Antibiotika	Moenomycin A	RNA	Schurer et al. 2008
Peptide	Neuropeptid Y	DNA	Mendosa & Bowser 2005
Proteine	MUC1	DNA	Cheng et al. 2009
	VEGF	DNA	Vinoreos 2006
Toxine	Rizin	DNA	Tang et al. 2006
Alkaloide	Kokain	DNA	Kawano et al. 2011
Zellen	Trypanosomen	RNA	Homann & Goring 1999
Komplexe Strukturen	Sporen von <i>Bacillus anthracis</i>	DNA	Bruno & Kiel 1999

Nachweis von lebensmittelpathogenen Mikroorganismen in Milch

- Warnwert in Milch und Milchprodukten nach (EG) Nr. 2073/2005, (EG) Nr. 1441/2007
 - *Staphylococcus aureus* (100 KbE/g)
 - *Bacillus cereus* (500 KbE/g)
- Nachweise in der Routineanalytik erfolgen durch Inkubation in Selektivkulturmedium
 - sehr zeitintensiv: Ergebnisse nach 24-144 h
- Ziel: Schnelle Nachweismethode durch Einsatz moderner analytischer Verfahren
- Basistechnik: Anreicherung des Zielmoleküls mittels Bioaffinität
- Isolierung aus großen Probenvolumen, um die nachzuweisenden Bakterien in einer ausreichenden Konzentration für eine Analyse zu erhalten

Bacillus cereus

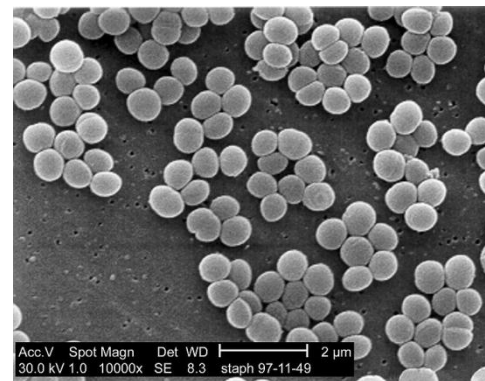
- Bodenbakterium, Sporenbildner
- ubiquitär vorkommend
- Wachstum: 5 °C - 50°C; pH 4,9 - 9,3;
- verursacht Lebensmittelintoxikationen
- produziert **Endosporen, stabil gegenüber hohen Temperaturen** (z.B. Pasteurisation)



Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *B. cereus*-Sporen (Shaheen, 2009)

Staphylococcus aureus

- Koagulase-positiv
- breites Vorkommen
- Hygieneindikator
- verursacht Lebensmittelintoxikationen
- produziert **Toxine, stabil gegenüber hohen Temperaturen** (z.B. Pasteurisation)

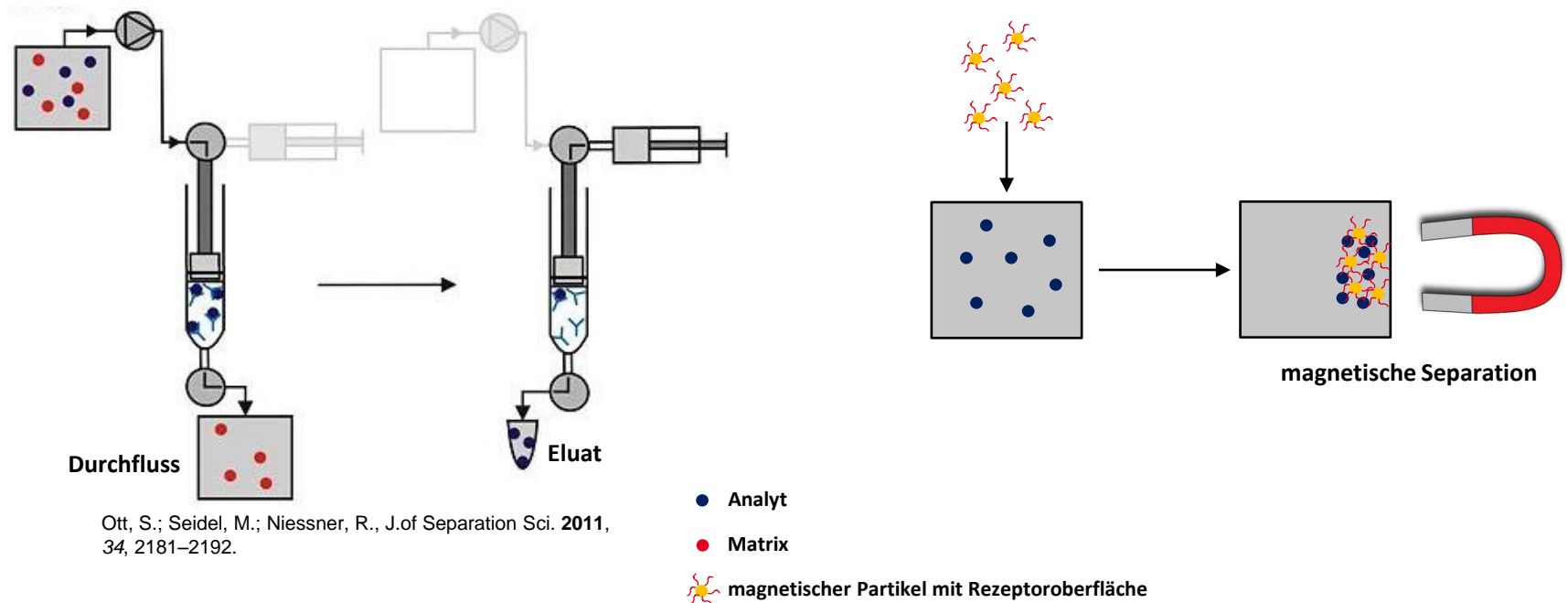


Staphylococcus aureus Bakterium (Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library/ Matthew J. Arduino, DRPH; Janice Carr)

Aptamere für Mikroorganismen

- Selektion über definierte Zelloberflächenmoleküle
 - z. B. Protein A bei *S. aureus* (über Kopplung an magnetische Partikel)
 - bekanntes spezifisches Zielmolekül
 - Übertragung und Evaluierung auf Zellorganismus nötig
- Selektion mit intakten Bakterienzellen/-sporen
 - B. cereus* Sporen (Zell-SELEX)
 - heterogener Aptamerpool
 - große Zahl an potentiellen Zielstrukturen
 - näher am Endsystem

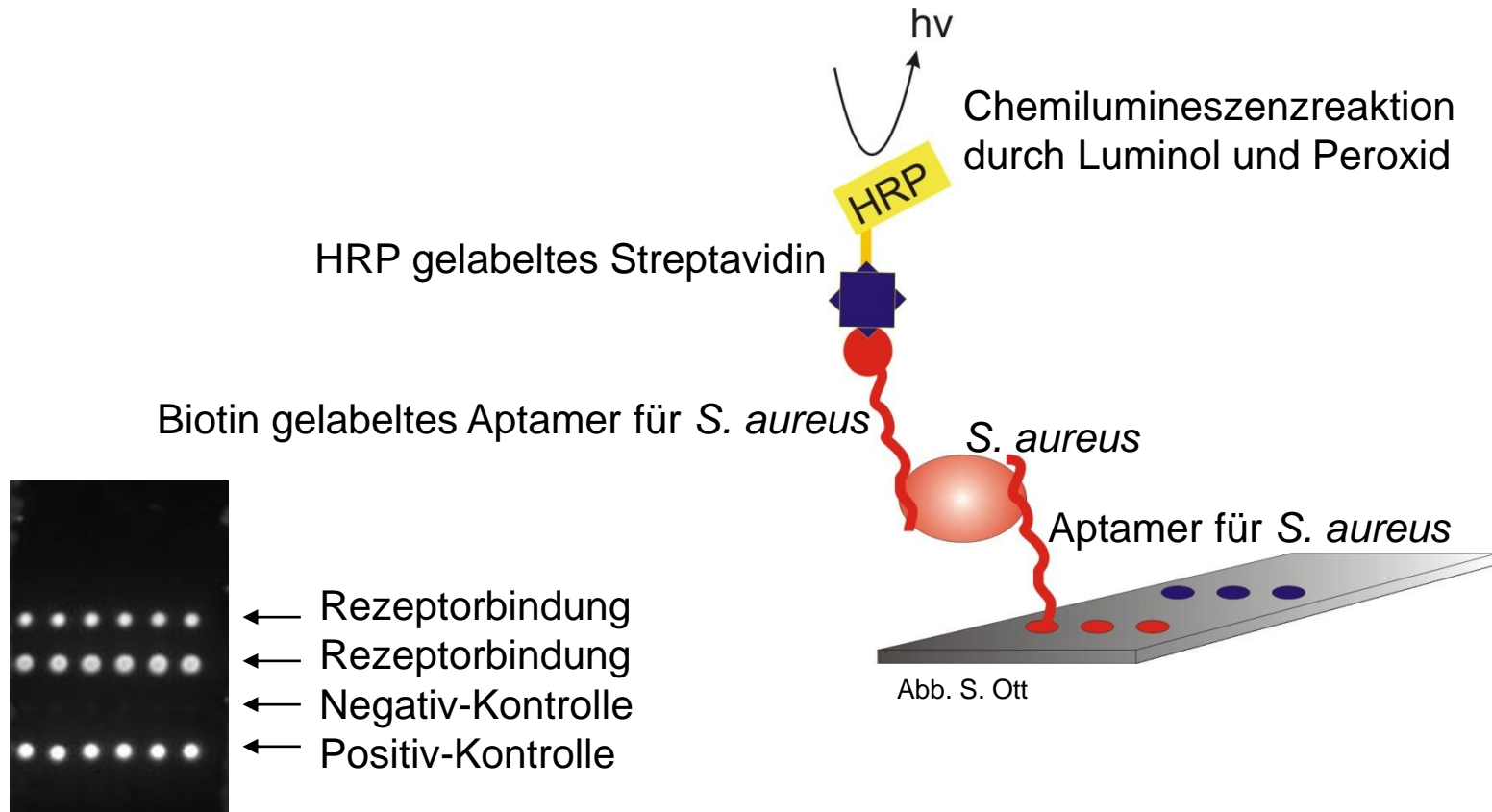
Anreicherung z. B. über Säulensystem oder Batch-Verfahren



Ott, S.; Seidel, M.; Niessner, R., J.of Separation Sci. 2011, 34, 2181–2192.

1 L Ausgangsvolumen kann z. B. in 1 mL Eluat aufgenommen werden (Anreicherung um Faktor 10^3)

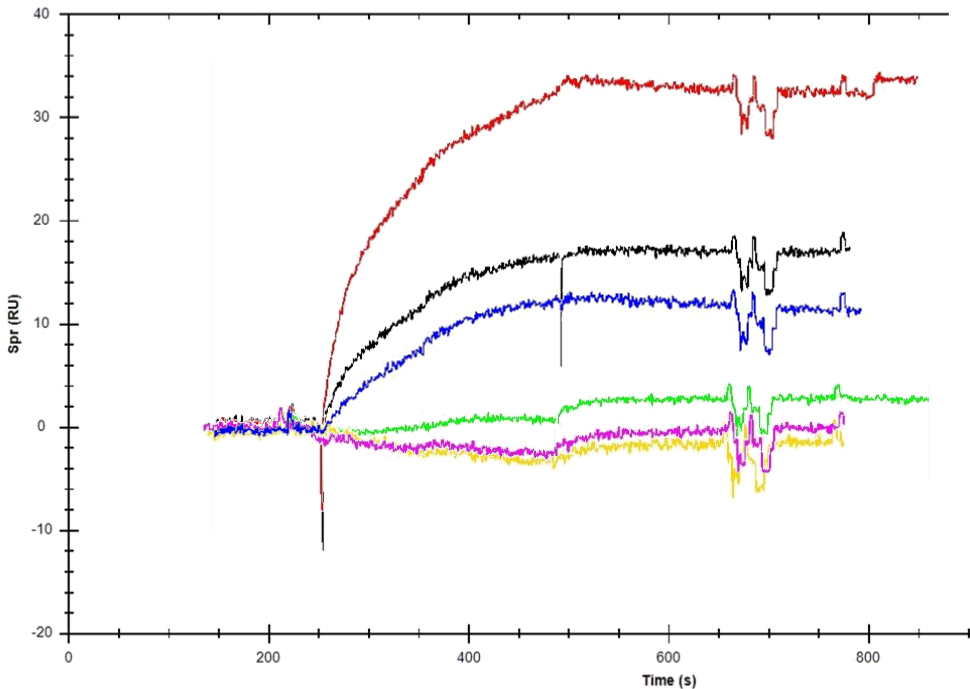
Mikroarray-System zur Detektion



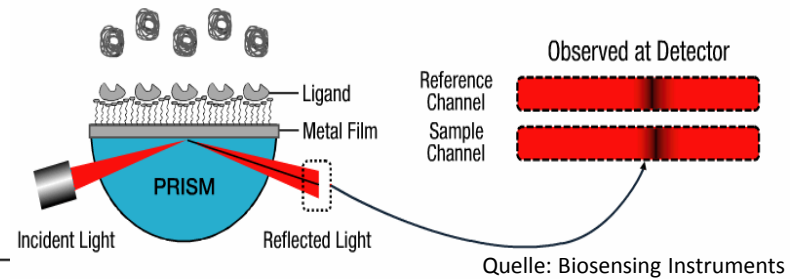
- ← Rezeptorbindung
- ← Rezeptorbindung
- ← Negativ-Kontrolle
- ← Positiv-Kontrolle

Beispiel

Surface Plasmon Resonance-Sensor mit Protein A -Aptamer



- *S. aureus* (Prot. A positiv) 10⁷ KbE/mL
- *S. aureus* (Prot. A positiv) 10⁵ KbE/mL
- *S. aureus* (Prot. A unbek.) 10⁸ KbE/mL
- *S. aureus* (Prot. A unbek.) 10⁵ KbE/mL
- *E. coli* 10⁸ KbE/mL
- *E. coli* 10⁵ KbE/mL




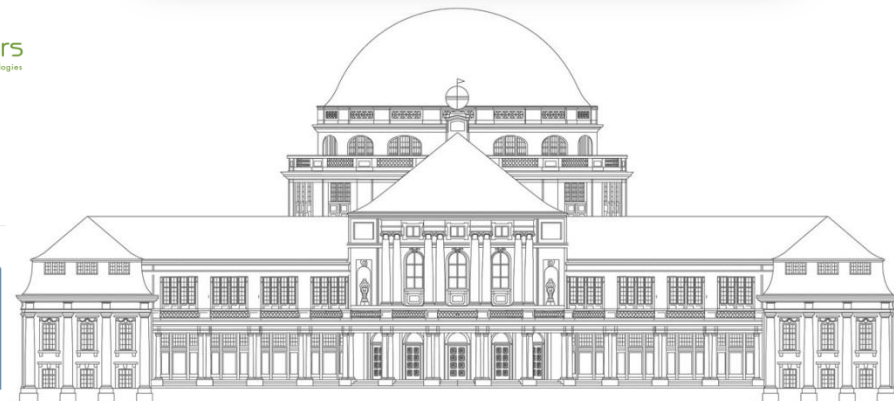
Zusammenfassung

Aptamerrezeptoren ein neuer Weg in der mikrobiellen Routineanalytik von Lebensmitteln?

- als Alternative zu Antikörpern zur Identifizierung und Konzentrationsbestimmung geeignet
- Einsatz als Anreicherungsrezeptor ist möglich (umfangreiche physikalische Parameter nötig)

HERZLICHEN DANK

Prof. Fischer und Prof. Hahn (Uni Hamburg)
Prof. Märtlbauer und Herrn Wiescher (LMU München),
Prof. Niessner und Frau Ott (TU München),
meinen Diplomanden Frau Peglow, Frau Schilling, Herr
Hünniger, Frau Luck Villanueva
sowie der AG DNA-Analytik und AK Hahn
der Firma Sierra Sensors 
sowie den Projektförderern





Universität Hamburg

DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG



Herzlichen Dank für Ihre Aufmerksamkeit

