

# Einsatz Aptamer-modifizierter Gold- Nanopartikel in der Diagnostik

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Alina Eilers, M. Sc.

[2021]

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferentin: Dr. Janina Bahnemann

Tag der Promotion: 12.04.2021

## Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Thomas Scheper für die Möglichkeit danken, meine Dissertation am Institut für Technische Chemie anzufertigen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dr. Janina Bahnemann für die Übernahme des Korreferats und bei Herrn PD Dr. Ulrich Krings für den Prüfungsvorsitz.

Bei Frau Dr. Johanna Walter möchte ich mich für die tolle Betreuung und Unterstützung über die gesamte Zeit der Promotion bedanken. Danke für die Denkanstöße und Hilfestellungen!

Für die Mitarbeit an und rund um mein Promotionsthema danke ich meinen Bachelor- und Masterstudierenden Jenny, Jasper, Corinna und Giamper.

Dem ganzen TCI möchte ich für die schöne Zeit danken. Für die wissenschaftliche und organisatorische Unterstützung, aber auch für die tolle Arbeitsatmosphäre und vielen Feste. Ein besonderer Dank gilt dabei allen Kollegen meines Büros 165. Chantal, Katharina und Steffen: danke euch für die Hilfen bei wissenschaftlichen Problemen und vor allem für die entstandenen Freundschaften.

Meinen Lieblings-Laborpartnern Lisa und Torsten möchte ich für die vielen witzigen Gespräche und die musikalisch untermalten Stunden im Labor, auch bei negativen Ergebnissen, danken. Ohne euch hätte ich längst nicht so viel Spaß gehabt!

Chrissi und Marline, ich bin dankbar so gute Freunde als Kollegen und in der Nähe gehabt zu haben. Chrissi (und Lukas), danke für die super Unterstützung zum Ende der Promotion!

Danke an meine Eltern, meine Schwester und meine Freunde – für euer Vertrauen in mich.

Zuletzt gilt mein größter Dank meinem Verlobten Tim. Danke für deine emotionale Unterstützung während der gesamten Promotion sowie deine Geduld und Hilfe beim Anfertigen dieser Arbeit.

## Kurzfassung

Ein Lateral Flow Assay (LFA) ermöglicht eine schnelle Detektion von Krankheitserregern, Hormonen oder Verunreinigungen. Gleichzeitig sind LFAs kostengünstig und einfach anwendbar, so dass sie auch von nicht fachkundigen Personen durchgeführt werden können. In der vorliegenden Dissertation sollte ein Lateral Flow Assay entwickelt werden, der Aptamere bzw. Oligonukleotide anstelle der standardmäßig eingesetzten Antikörper als Detektionsmoleküle verwendet. Als diagnostisches Target wurde das Mykotoxin Ochratoxin A ausgewählt, das von Schimmelpilzen produziert wird und Lebensmittel verunreinigen kann. Zunächst wurde ein geeignetes Aptamer zur Detektion von Ochratoxin A ausgewählt. Dazu wurde die Affinität mithilfe der Microscale Thermophorese und Microarrays bestimmt. Für die Detektion des Mykotoxins auf einem Lateral Flow Assay wird ein zum Aptamer komplementäres Oligonukleotid (cOligo) benötigt, da der Assay auf einer Verdrängung des cOligos durch das Ochratoxin A beruht. Die Affinität des cOligos zum Aptamer sowie seine kompetitive Verdrängung durch Ochratoxin A wurde mit den gleichen Methoden untersucht. Der spätere Assay soll mithilfe einer optischen Testlinie, unter Verwendung von Gold-Nanopartikeln zur Signalgebung, ausgewertet werden. Diese Partikel wurden mithilfe verschiedener Methoden synthetisiert und durch die Rasterelektronenmikroskopie sowie UV-Vis-Spektroskopie analysiert. Für weitere Versuche wurden homogene Gold-Nanopartikel mit einem Durchmesser kleiner als 20 nm verwendet. Mit Thiol-modifizierten Oligonukleotiden wurden die Gold-Nanopartikel funktionalisiert und die Konjugate mittels UV-Vis-Spektroskopie und Dynamischer Lichtstreuung charakterisiert. Zur Überprüfung der Funktionalität der Konjugate wurde ein Bindungsassay der 3 Bindungspartner in Lösung entwickelt sowie Dot Blots mit immobilisierten Bindungspartnern durchgeführt. Abschließend wurde der Versuchsaufbau auf einen Lateral Flow Assay übertragen.

**Schlagwörter:** Aptamer, Oligonukleotid, Gold-Nanopartikel, Lateral Flow Assay, Diagnostik, Ochratoxin A

## Abstract

A Lateral Flow Assay (LFA) enables rapid detection of pathogens, hormones or contaminants. At the same time, it is an inexpensive and simple application that can also be performed by non-expert personnel. In the present dissertation a lateral flow assay was developed, which uses aptamers or oligonucleotides as detection molecules instead of the standard antibodies. The mycotoxin ochratoxin A, which is produced by moulds and can contaminate food, was selected as the diagnostic target. Initially, a suitable aptamer for the detection of ochratoxin A was chosen. For this purpose, the affinity was determined using Microscale Thermophoresis and Microarrays. For the detection of the mycotoxin on a lateral flow assay, an oligonucleotide (cOligo) complementary to the aptamer is required, since the assay is based on the displacement of the cOligo by ochratoxin A. The affinity of the cOligo to the aptamer as well as the displacement reaction was investigated using the same methods. The subsequent assay was evaluated using an optical test line using gold nanoparticles for signaling. These particles were synthesized using various methods and analyzed by scanning electron microscopy and UV-Vis spectroscopy. For further experiments homogeneous gold nanoparticles with a diameter smaller than 20 nm were used. With thiol-modified oligonucleotides the gold nanoparticles were functionalized and the conjugates were characterized by UV-Vis spectroscopy and dynamic light scattering. To investigate the functionality of the conjugates a binding assay of the 3 binding partners in solution was developed and dot blots with immobilized binding partners were performed. Finally, the experimental setup was transferred to a lateral flow assay.

**Keywords:** aptamer, oligonucleotide, gold-nanoparticle, lateral flow assay, diagnostics, Ochratoxin A

---

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	I
Kurzfassung .....	I
Abstract .....	III
Inhaltsverzeichnis .....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1 Einleitung .....	1
2 Zielsetzung .....	2
3 Theoretischer Hintergrund .....	3
3.1 Aptamere .....	3
3.1.1 Strukturelle Eigenschaften und Targetbindung .....	4
3.1.2 Anwendungen von Aptameren .....	5
3.2 Gold-Nanopartikel (AuNP) .....	5
3.2.1 Eigenschaften von AuNP .....	6
3.2.2 Synthese von AuNP .....	6
3.2.3 Aptamer-modifizierte Gold-Nanopartikel .....	10
3.3 Aptamer-modifizierte Gold-Nanopartikel in diagnostischen Anwendungen.....	13
3.3.1 Kolorimetrische Assays .....	14
3.3.2 Lateral Flow Assays .....	14
4 Experimenteller Teil .....	18
4.1 Charakterisierung eines Aptamers gegen Ochratoxin A.....	19
4.1.1 Strukturelle Eigenschaften des Aptamers .....	20
4.1.2 Bindungsstudien mittels Microscale Thermophoresis.....	22
4.1.3 Bindungsstudien mittels Microarrays.....	28
4.2 Herstellung und Charakterisierung von Gold-Nanopartikeln .....	34

---

4.2.1	Synthese von Gold-Nanopartikeln.....	34
4.2.2	Charakterisierungen der synthetisierten AuNP.....	37
4.3	Funktionalisierung von Gold-Nanopartikeln mit Oligonukleotiden.....	41
4.3.1	Optimierung der Konjugation .....	42
4.3.2	Funktionalitätsüberprüfung der Konjugate.....	66
4.3.3	Funktionalisierte Konjugate zum diagnostischen Einsatz beim Lateral Flow Assay.....	75
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	88
6	Literaturverzeichnis.....	93
7	Zusätzliche experimentelle Daten .....	103
A	Material.....	109
A.1	Geräte und Software .....	109
A.2	Verwendete Chemikalien.....	110
A.3	Puffer und weitere Lösungen.....	111
A.4	Verbrauchsmaterialien .....	113
A.5	Oligonukleotide.....	113
B	Methoden.....	115
8	Publikationsliste.....	132
9	Betreute Abschlussarbeiten .....	133
10	Abbildungsverzeichnis.....	134
11	Tabellenverzeichnis .....	140
12	Lebenslauf.....	142

## Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
A	Absorbanz
AP	Absorbent Pad
AuNP	Gold-Nanopartikel
BSA	Bovines Serumalbumin (engl. Bovine Serum Albumine)
BP	Bindepuffer
CD	Circulardichroismus
cOligo	komplementäres Oligonukleotid
CP	Conjugate Pad
d	Durchstrahlte Schichtdicke
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleid Acid)
DLS	Dynamische Lichtstreuung (engl. Dynamic Light Scattering)
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
H	Hybridisierung
IR	Infrarot
$K_d$	Dissoziationskonstante
KL	Kontrolllinie
LFA	Lateral Flow Assay
LP	Laufpuffer
MST	Microscale Thermophoresis (dt. Microskalige Thermophorese)
NZ	Nitrozellulose
OTA	Ochratoxin A
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
PDI	Polydispersitätsindex
pH	<i>Potentia hydrogenii</i>
PPI	Primärpartikelindex (engl. Primary Particle Index)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic Acid)

RT	Raumtemperatur
S.A.	Salt Aging
SELEX	engl. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
SH	Thiol
SP	Sample Pad
SPR	Oberflächenplasmonresonanz (engl. Surface Plasmon Resonance)
TID	Target-induzierte Dissoziation (engl. Target-Induced Dissociation)
TL	Testlinie
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Verdrängung
Vis	Sichtbar (engl. Visible)

## 1 Einleitung

Der Bereich Diagnostik ist im Jahr der Corona-Pandemie (2020) stark in den Fokus von Wissenschaft und Medien gerückt. So wurden vor allem Schnelltests zur Detektion des Coronavirus sowie von Antikörpern genesener Patienten gegen das Virus entwickelt.

Die Schnelltests, in Form eines Lateral Flow Assays, basieren auf Reaktionen der Analyten mit Membran-gebundenen Antikörpern [1], [2]. Die Verwendung von Antikörpern als Detektionsmoleküle ist bei Schnelltests geläufig, birgt jedoch auch Nachteile [3]. Antikörper werden meist in Kaninchen, Ziegen oder anderen Säugetieren produziert. Die Anzahl der Tiere, die beispielsweise 2013 in den Niederlanden dafür verwendet wurden, lag bei über 25.000. Eine Alternative, bei der auf die Verwendung von Tieren und die damit einhergehenden ethischen Probleme verzichtet werden kann, stellt die Produktion von Antikörpern mittels Phagen dar [4]. Eine andere Möglichkeit bietet der Austausch von Antikörpern durch Aptamere. Diese werden durch das *in vitro* Verfahren „SELEX“ zur spezifischen Bindung eines Targets selektiert. Außerdem besitzen sie oftmals eine bessere Stabilität gegenüber Temperatur und pH-Werten im Vergleich zu Antikörpern. Aufgrund ihrer geringen Größe und ihres Aufbaus aus DNA- oder RNA-Nukleotiden können sie leicht in großem Maßstab mittels Festphasensynthesen hergestellt werden. Des Weiteren können Aptamere zur Detektion kleiner Moleküle oder toxischer Substanzen selektiert werden. Die Antikörper-Selektion für diese Targets wird aufgrund des *in vivo* Prozesses und der Größe oftmals erschwert [5]. Viele Lateral Flow Assays benötigen neben Membran-gebundenen auch Nanopartikel-gebundene Detektionsmoleküle. Für die Funktionalisierung der Nanopartikel (z.B. Gold-Nanopartikel) mit Oligonukleotiden existieren diverse Methoden, abhängig von der Oligonukleotid-Sequenz und dem Verwendungszweck [6]. Aptamere ermöglichen aufgrund der geringen Größe auch kompetitive Teststrategien von Lateral Flow Assays. Daher bietet sich besonders für Targets, die nicht für einen Sandwich-Aufbau geeignet sind, mithilfe von Aptameren eine neue Detektionsmöglichkeit [3].

Der Einsatz von Aptameren als Detektionsmoleküle kann somit bereits gegenwärtig und zukünftig einen Beitrag dazu leisten, Alternativen zu konventionellen Methoden zu schaffen und den Anwendungsbereich von Schnelltests zu erweitern.

## 2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Dissertation ist die Entwicklung funktionaler Aptamer-Gold-Nanopartikel Konjugate für diagnostische Anwendungen, speziell am Beispiel eines Lateral Flow Assays. Als medizinisch relevantes Target dient exemplarisch das Mykotoxin Ochratoxin A.

Mithilfe der Microscale Thermophoresis und Microarrays soll die Affinität von einem Ochratoxin A-bindenden Aptamer untersucht werden. Für die spätere Anwendung auf einem Lateral Flow Assay ist ein kompetitiver Aufbau nötig, daher wird außerdem ein zum Aptamer komplementäres Oligonukleotid (cOligo) benötigt. Die Bindung und der kompetitive Verdrängungsmechanismus mit dem cOligo soll mit den gleichen Methoden untersucht werden.

Zur Synthese der signalgebenden Gold-Nanopartikel (AuNP) des Lateral Flow Assays sollen verschiedene Methoden untersucht und verglichen werden. Ziel ist dabei die Herstellung von AuNPs mit einer engen Größenverteilung.

Zur Erstellung funktionaler Konjugate sollen verschiedene Funktionalisierungsmethoden untersucht werden, dabei werden beide Assay-Ausrichtungen (Aptamer-AuNP und cOligo-AuNP) verglichen. Die Konjugate sollen bezüglich Stabilität und Bedeckungsgrad analysiert werden, dafür eignet sich ebenfalls die UV-Vis-Spektroskopie sowie eine Größenbestimmung mithilfe der Dynamischen Lichtstreuung.

Um die Funktionalität der Konjugate zu untersuchen, sollen nach der Konjugation verschiedene Bindungsassays wie Dot Blots durchgeführt werden, bevor eine Übertragung der Komponenten auf die Lateral Flow Assays erfolgt. Mithilfe von optimierten Parametern, wie Aufbau und Pufferzusammensetzungen des Lateral Flow Assays, wird das Ziel angestrebt, einen sensitiven Assay zur Detektion von Ochratoxin A zu etablieren.

### 3 Theoretischer Hintergrund

Zur Einführung in diese Arbeit werden zunächst die Grundlagen der unterschiedlichen Komponenten des Lateral Flow Assays erläutert. Dazu gehören die Selektion sowie Eigenschaften von Aptameren als auch die chemische Synthese und Eigenschaften von Gold-Nanopartikeln. Zur Zusammenführung der beiden Komponenten werden verschiedene Konjugationsmethoden aufgezeigt und zuletzt der Aufbau von Lateral Flow Assays dargestellt.

#### 3.1 Aptamere

Bei Aptameren handelt es sich um einzelsträngige Oligonukleotide aus DNA oder RNA. Sie haben eine Länge von wenigen bis über 100 Nukleotiden und bilden eine funktionale dreidimensionale Struktur aus [7]–[9]. Da Aptamere mit dieser Struktur andere Moleküle spezifisch binden können, werden sie zur Detektion von Biomolekülen wie Proteinen, Hormonen oder Toxinen eingesetzt [9], [10]. Aptamere können leicht mit Fluorophoren modifiziert oder auf Oberflächen immobilisiert werden, um einen diagnostischen Einsatz zu ermöglichen [11], [12]. Sie können mittels Festphasensynthese chemisch hergestellt werden [13], [14]. Aptamere werden für jedes Target spezifisch mittels SELEX-Verfahren selektiert, dieses wird im nächsten Abschnitt beschrieben.

##### *In vitro* Selektion von Aptameren

Aptamere werden durch ein *in vitro*-Verfahren namens SELEX (engl. Systematik Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) generiert [7]. Dieses Verfahren wird seit Anfang der 90er Jahre verwendet, um Aptamere gegen gewünschte Zielmoleküle zu generieren. Für das SELEX-Verfahren wird eine Nukleinsäure-Bibliothek mit  $10^{14}$  bis  $10^{15}$  verschiedenen Oligonukleotiden eingesetzt. Diese Oligonukleotide werden im ersten Schritt mit dem Zielmolekül inkubiert. Nicht-bindende Oligonukleotide werden durch Waschschriffe abgetrennt, danach erfolgt eine Vervielfältigung der bindenden Oligonukleotide. Die Inkubations-, Wasch- und Amplifikationsschritte werden mehrmals wiederholt bis am Ende ein Target-bindendes Oligonukleotid vorliegt. Das Verfahren kann zur Erhöhung der Affinität um Evolutions-/ Mutationsschritte erweitert werden [15], [16]. Für die Separation der nicht-bindenden Oligonukleotide ist es hilfreich, das Target zu immobilisieren, sodass bindende

Oligonukleotide an diesem verbleiben. Das Target kann z.B. an Magnetic Beads immobilisiert sein oder auf einem Chromatographieharz [17], [18]. Außerdem werden Selektions- und Bindepuffer verwendet, die aufgrund der Salinität die Ausbildung dreidimensionaler Strukturen der Aptamere induzieren. Nach einem abgeschlossenen SELEX-Prozess muss die Spezifität der Aptamere überprüft werden, da Kreuzreaktivitäten mit Derivaten des Zielmoleküls oder anderen relevanten Molekülen aus der zukünftig zu untersuchenden Probe auftreten können [19].

### 3.1.1 Strukturelle Eigenschaften und Targetbindung

Aptamere bestehen aus einzelsträngiger DNA oder RNA, die eine definierte dreidimensionale Struktur ausbilden, wodurch eine affine Targetbindung ermöglicht wird. In der Sekundärstruktur sind vielfältige Motive wie Stems, Loops, Bulges, aber auch Quadruplexe zu finden, die durch Watson-Crick-Interaktionen zwischen den Nukleinbasen gebildet werden [20], [21]. Eine räumlich übergeordnete Tertiärstruktur entsteht, wenn Elemente der Sekundärstruktur wechselwirken. Solche Tertiärstruktur-Motive bilden oft Grundlage zur Bindung eines Aptamers an ihr Zielmolekül. Zur Stabilisation der Struktur motive sind Kationen nötig: sie interagieren mit dem negativen Rückgrat der Nukleotide und vermindern somit störende elektrostatische Wechselwirkungen. Für bestimmte Struktur motive sind daher z.B. metallische Ionen zwingend notwendig [22]–[24]. Hierbei ist vor allem die Ausbildung eines G-Quadruplexes hervorzuheben. Dieses Motiv können Oligonukleotide mit mehrfachen aufeinander folgenden Guaninbasen ausbilden. Hierbei wechselwirken 4 quadratisch angeordnete Guanine (Guanin-Tetrade) über Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindungen und in deren Mitte ist ein Ion (z.B.  $K^+$  oder  $Na^+$ ) positioniert. Die Stapelung von zwei oder mehr Guanin-Tetraden führt schließlich zur Formation des G-Quadruplex-Motivs (Abbildung 1). Die Wechselwirkungen können innerhalb eines Aptamers intramolekular oder intermolekular auftreten, weiterhin wird zwischen Orientierungen wie antiparallel oder parallel unterschieden [23]–[25].

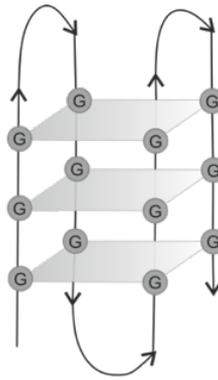


Abbildung 1: Strukturelle Darstellung eines G-Quadruplex, intramolekularer G4-Komplex.

Die Bindung von Aptamer und Target verläuft entweder nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip oder mittels adaptiver Bindung (Induced Fit). Verbleibt das Aptamer während der Bindung in seiner dreidimensionalen Struktur, liegt ein Schlüssel-Schloss Mechanismus vor. Wird die endgültige Faltung erst durch die Targetbindung eingenommen, handelt es sich um einen Induced Fit [26]–[28]. Die Strukturänderung durch Bindung des Aptamers an z.B. ein Small Molecule ist für Affinitätsstudien hilfreich, kann jedoch bei nicht optimalen Versuchsparametern und daraus resultierender inkorrektener Faltung des Aptamers zu Bindungsproblemen führen [29].

### 3.1.2 Anwendungen von Aptameren

Die Anwendung von Aptameren ist aufgrund der Möglichkeit, Aptamere auch gegen kleine und/ oder toxische Moleküle zu selektieren, vielfältig. Vor allem werden sie im medizinischen Bereich als Therapeutika oder in der Diagnostik eingesetzt [30]–[32]. Als Therapeutika können Aptamere durch ihre affine Bindung beispielsweise aktive Seiten von Proteinen inhibieren [30]. Als Wirkstoff im klinischen Einsatz ist das Aptamer Pegaptanib zu erwähnen, welches das Protein VEGF inhibiert und zur Behandlung der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) bei Erwachsenen dient [33], [34].

## 3.2 Gold-Nanopartikel (AuNP)

Metallische Nanopartikel finden aufgrund ihrer grundlegenden Eigenschaften wie eines großen Oberflächen-Volumen-Verhältnisses und der Möglichkeiten der Oberflächen-Modifikationen, in der heutigen Zeit vielseitigen Einsatz. Gold-Nanopartikel haben im Gegensatz zu Bulk-Gold eine charakteristische rote Farbe [35], [36], deswegen wurden sie

bereits seit einigen Jahrhunderten zur roten Färbung in Kirchenfenstern verwendet. Heutzutage finden sie Anwendung im medizinischen Bereich [37], [38], hier werden sie aufgrund der Farbe oftmals als Signalgeber verwendet [5], [39]–[41]. Aber auch in anderen Bereichen eignen sich AuNP durch ihre physikalischen Eigenschaften und eine kostengünstige Herstellung [42], [43]. In den folgenden Kapiteln werden die Eigenschaften, Synthesemethoden sowie Modifikationen von AuNP betrachtet.

### 3.2.1 Eigenschaften von AuNP

AuNP können zwischen wenigen bis über 100 nm groß sein und diverse Formen einnehmen (bspw. kugelförmig, eckig, stäbchenförmig) [44]. AuNP haben eine spezielle lokalisierte Oberflächenplasmon-Resonanz, die unter anderem für die optischen Eigenschaften verantwortlich ist. Ein AuNP ist von freien Elektronen umgeben, die kollektive Bewegung dieser wird Plasmon genannt. Nur Licht bestimmter Wellenlängen kann das Oberflächen-Plasmon anregen, das wellenförmig schwingt. Die maximale Amplitude wird bei einer bestimmten Wellenlänge, der sogenannten Oberflächenplasmon-Resonanz (SPR, Surface Plasmon Resonance), erreicht [43], [45], [46]. Die SPR von AuNP liegt im Bereich von 500 – 550 nm [44]. Kleine AuNP sind rot, mit zunehmender Größe verändert sich die Farbe durch einen SPR-Shift zu längeren Wellenlängen zu lila, Agglomerate mit zahlreichen AuNP sind schwarz [35]. Die meist verwendeten AuNP sind zwischen 10 und 20 nm groß und kugelförmig mit einer charakteristischen roten Farbe, sie weisen ein Absorptionsmaximum um 520 nm auf. Sie werden aufgrund ihres hohen Oberflächen-Volumen-Verhältnisses sowie hoher Stabilität zur Modifikation mit Liganden für diagnostische Anwendungen ausgewählt [6], [42], [47].

### 3.2.2 Synthese von AuNP

AuNP können durch die top-down- oder die bottom-up-Synthese hergestellt werden. Bei der top-down-Synthese handelt es sich um ein laser-basiertes Verfahren, wohingegen es sich bei der bottom-up-Synthese um ein chemisches Reduktionsverfahren handelt.

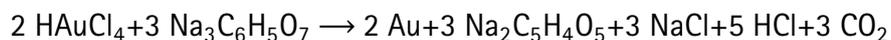
### 3.2.2.1 Laserablation

Mittels Laserablation werden aus Gold-Platten Nanopartikel gewonnen. Die Metall-Platte liegt in einer wässrigen Lösung mit z.B. Natriumlaurylsulfat (SDS, engl.: Sodium Lauryl Sulfate) [48], Polyethylenglykol (PEG) [49], oder weiteren Stabilisatoren [50] vor und wird mit einem Laser zur Abtragung der AuNP bestrahlt. Durch Variation der Bestrahlungs-Wellenlänge, Intensität, Position des Lasers und der Gold-Platte sowie Zusammensetzung der wässrigen Lösung kann die resultierende Größe der AuNP eingestellt werden [48], [49], [51]. AuNP der top-down-Methode können eine Liganden-freie Oberfläche aufweisen, was sie für z.B. Toxizitätsstudien interessant macht [52].

Liganden (wie Citrat-Ionen) verhelfen jedoch oftmals zu mehr Stabilität und erleichtern dadurch die Modifizierung der AuNP-Oberfläche. Solche AuNP können chemisch synthetisiert werden.

### 3.2.2.2 Chemische Synthese

Das bekannteste chemische Herstellungsverfahren wurde von Turkevich *et al.* 1951 publiziert [35]. Es handelt sich um ein Reduktionsverfahren mit Natriumcitrat, welches sowohl Reduktionsmittel als auch Stabilisator der entstehenden AuNPs darstellt. Als Gold-Vorläufer wird Tetrachlorogoldsäure (HAuCl<sub>4</sub>) verwendet. Diese wird zunächst unter Rühren zum Sieden erhitzt, daraufhin wird zügig Natriumcitrat zugegeben. Wie die folgende Reaktionsgleichung zeigt, entsteht atomares Gold der Nanopartikel und das Natriumcitrat liegt in Form von Ionen vor, die Citrat-Ionen fungieren als stabilisierende Liganden auf der AuNP-Oberfläche.



Durch das Ausbilden der AuNP wird die gelbliche Lösung nach Natriumcitrat-Zugabe für kurze Zeit klar, bevor über blaue Färbungen final eine dunkelrote Farbe der entstandenen kolloidalen AuNP verbleibt [35].

Die Theorie zur Bildung der Nanopartikel basiert auf Untersuchungen von LaMer [53], sie läuft in 3 Phasen ab (Abbildung 2). Zuerst findet die Keimbildung statt, bei welcher der Gold-Vorläufer zu Gold-Atomen reduziert wird. Die atomare Konzentration erreicht nach

einiger Zeit eine kritische Konzentration, sodass es zum Überschreiten des Übersättigungspunktes kommt. Hier erfolgt die Kristallisationskeimbildung: Mehrere Atome lagern sich schnell zu Kristallisationskernen zusammen, wodurch die kritische Atomkonzentration verringert wird. Wird die minimale Übersättigung wieder unterschritten, werden keine neuen Kristallisationskeime mehr gebildet, sondern die vorhandenen Kristallisationskeime wachsen weiter zu Nanokristallen [53], [54].

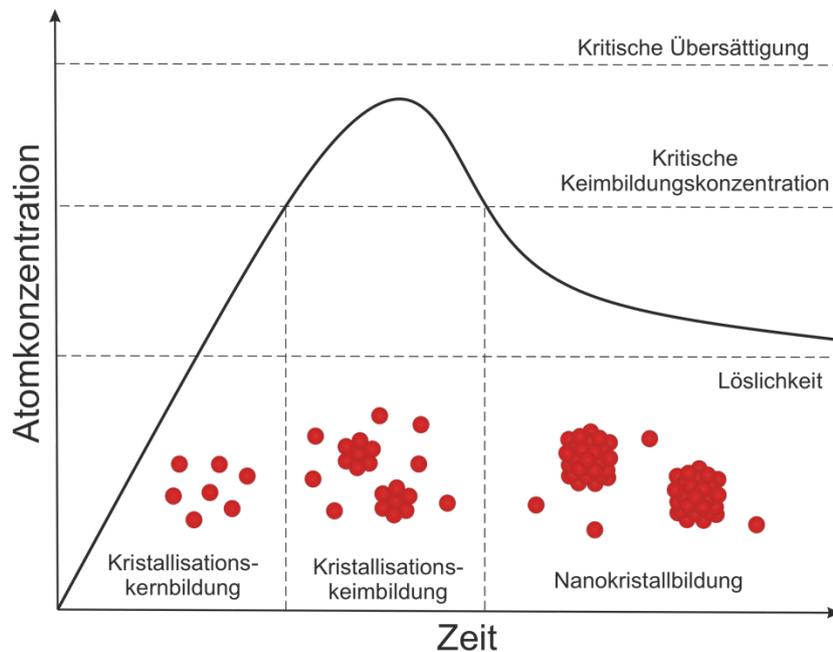


Abbildung 2: Darstellung der Keimbildung nach LaMer bei der AuNP-Synthese. Im Diagramm werden die drei Phasen der Synthese nanoskopischer Metallpartikel dargestellt.

Bei diesem Protokoll beeinflussen die Parameter Temperatur und Konzentration der Edukte gezielt die Größenverteilung der AuNP. Unter Standard-Bedingungen werden 13 nm große, kugelförmige AuNP erzeugt, die auf der Oberfläche stabilisierende adsorptiv gebundene Citrat-Liganden haben.

Das Protokoll nach Turkevich *et al.* wurde vielfach variiert, um andere AuNP-Größen sowie Formen zu erhalten. Eine Variante mit mehrmaliger Zugabe der gleichen Edukte wird folgend dargestellt.

### AuNP-Synthese durch mehrmalige Zugabe der Edukte

Die Synthese-Variante von Bastús *et al.* [36] bezieht sich auf die Herstellung von AuNP bis zu 200 nm. Die AuNP-Synthese basiert weiterhin auf der Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  durch Natriumcitrat, jedoch werden diese Edukte wiederholt zugegeben. Zunächst wird

Natriumcitrat (und nicht wie bei Turkevich *et al.*  $\text{HAuCl}_4$ ) bis zum Sieden erhitzt, dann wird  $\text{HAuCl}_4$  zugegeben und es kommt zum charakteristischen Farbumschlag über ca. 10 min. Nach dieser Rotfärbung wird die Temperatur auf 90 °C gesenkt. Durch die Temperaturerniedrigung wird weitere Kristallisationskeimbildung inhibiert und die AuNP-Bildung verlangsamt. Bei wiederholter Zugabe von Natriumcitrat und  $\text{HAuCl}_4$  kommt es durch Reduktion zwar erneut zum atomaren Zustand von Gold, diese Atome lagern sich aber an bestehende Nanokristalle an, statt neue Keime zu bilden. Die Zugabe der Edukte kann so oft erfolgen, bis die gewünschte AuNP-Größe erreicht wird. Aufgrund der wiederholten Natriumcitrat-Zugabe zur Reduktion und zur Erhaltung des pH 7 steigt jedoch die Ionenkonzentration stetig an. Zwar werden viele Citrat-Ionen zur Stabilisierung auf der AuNP-Oberfläche angelagert, bei einer kritischen Ionenkonzentration kann es jedoch zur Agglomeration der AuNP kommen. Demnach ist die Anzahl der Zugabe-Zyklen begrenzt und das Protokoll für AuNP bis zu 200 nm ausgelegt. Durch die stetig wachsenden Nanokristalle zur AuNP-Bildung sollen homogenere AuNP bezüglich Größe und Form erhalten werden, als durch die Turkevich-Synthese. [36]

Durch die Citrat-Liganden auf der Oberfläche werden die chemisch synthetisierten AuNP stabilisiert.

### Stabilität kolloidaler Nanopartikel

Die Stabilität der AuNP lässt sich mithilfe der DLVO (Theorie von Derjaguin [55], Landau [56], Verwey und Overbeek [57]) beschreiben. Bei Nanopartikeln liegt ein kolloid-disperses System vor, in welchem zwei Arten von Wechselwirkungen stattfinden: die attraktiven und die repulsiven. Van-der-Waals-Kräfte bewirken eine Anziehung unterschiedlicher Teilchen, die elektrostatischen Wechselwirkungen bewirken eine Abstoßung gleich geladener Teilchen. Bei genügend Abstand zwischen einzelnen AuNP überwiegt die Abstoßung. Wird jedoch ein kritischer Abstand zwischen Partikeln unterschritten, überwiegt die Anziehung zwischen den AuNP, so dass eine Agglomeration der AuNP stattfindet. Die Oberfläche chemisch synthetisierter AuNP ist mit Citrat-Liganden versehen. Diese Ionen verhelfen der Dispersion zu genügend elektrostatischen Abstoßungen, bei ungünstigen Bedingungen wie erhöhter Salz-Konzentration oder Temperatur reicht aber diese nicht mehr aus und die AuNP-Dispersion agglomeriert. Eine AuNP-Dispersion kann als stabil bezeichnet werden, wenn die Abstoßungen zwischen den Partikeln größer sind, als die Anziehung. Solch ein

stabiler Zustand kann auch erreicht werden, wenn die Citrat-Liganden durch nicht-ionische Detergenzien wie Tween 20 [58], [59] oder größere Moleküle wie Aptamere ausgetauscht werden.

### 3.2.3 Aptamer-modifizierte Gold-Nanopartikel

AuNP werden für zahlreiche Anwendungen mit Liganden versehen, die spezifisch Moleküle detektieren können [5], [47]. Klassische Liganden zur Detektion von biologischen Targets sind Antikörper, diese werden inzwischen häufiger durch Aptamere ersetzt [60], [61]. Diagnostische Anwendungen werden in Kapitel 3.3 genauer dargestellt. Zunächst soll die Funktionalisierung von AuNP mit Aptameren erläutert werden.

#### 3.2.3.1 Konjugationsmethoden

Im Rahmen dieser Arbeit werden AuNP chemisch synthetisiert und daraufhin modifiziert, daher wird nur auf die Konjugationsmethoden chemisch synthetisierter AuNP eingegangen. Die Oberfläche der AuNP ist mit negativ geladenen Citrat-Liganden versehen [45], [62]. Diese sind jedoch nur adsorptiv gebunden und können durch Liganden mit höherer Affinität zum AuNP ausgetauscht werden [62]. Sollen DNA-Moleküle wie Aptamere immobilisiert werden, ist jedoch die Hürde der elektrostatischen Abstoßungen der negativen DNA (aufgrund des negativ geladenen Phosphat-Rückgrats) sowie der negativen Citrat-Liganden zu überwinden [63], [64]. Dennoch binden DNA-Basen, aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen, hydrophoben Kräften und den Stickstoff- und Sauerstoff-Gruppen der Purin- und Pyrimidinringe [65], auch adsorptiv an eine AuNP-Oberfläche. Dabei unterscheiden sich die Affinitäten der vier DNA-Basen zu Gold folgendermaßen:

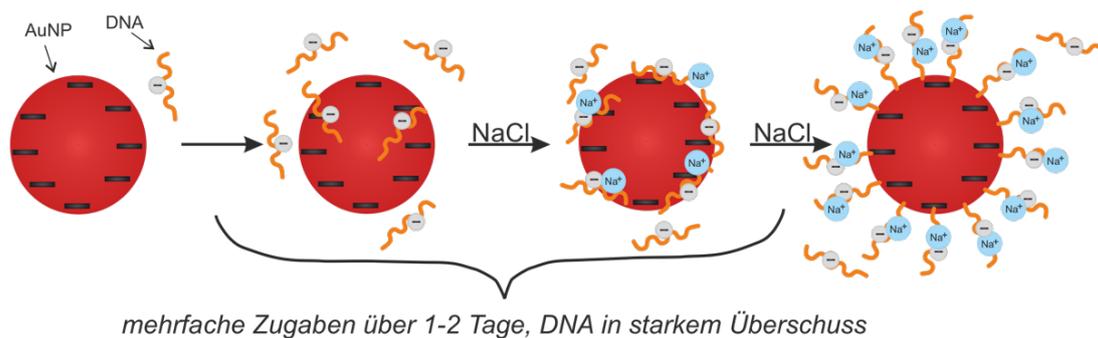
$$A > C \geq G > T,$$

[6], [65]–[67]. Adenin weist demnach die stärkste Bindung an Gold auf, Thymin die geringste. Um eine möglichst affine und gerichtete Bindung der DNA an der AuNP-Oberfläche zu gewährleisten, werden die DNA-Moleküle mit einer terminalen Thiol-Gruppe versehen [6], [63]. Die AuNP-Schwefel-Bindung hat eine nahezu kovalente Stärke, sie ist chemisorptiv [58]. Schwefelverbindungen binden an metallische Oberflächen meist in Form einer Self-Assembled Monolayer (SAM) [68], [69], wodurch Thiol-modifizierte DNA gerichtet immobilisiert werden und Adsorption unterbunden werden kann. Durch die neutrale Ladung der Thiol-Gruppe wird die Immobilisierung ebenfalls begünstigt [6], [70].

Die ersten Publikationen zu DNA-Immobilisierungen auf AuNP wurden 1996 zeitgleich von Mirkin *et al.* [63] und Alivisatos *et al.* [71] veröffentlicht. Das Protokoll des „Salt Agings“ [72] wird seit Erscheinen vielfach verwendet und modifiziert, die meisten Konjugationsmethoden basieren auf dieser Methodik.

### Salt Aging

Werden AuNP hohen Salz-Konzentrationen ausgesetzt, kommt es aufgrund von Neutralisationen der Citrat-Gruppen zu einem Abfall der repulsiven Kräfte zwischen AuNP und die attraktiven Kräfte überwiegen. Durch diese Änderung der Wechselwirkungen aggregieren die AuNP. Zur Konjugation von DNA an AuNP ist jedoch eine erhöhte Ionenkonzentration nötig, um die negativen Ladungen der DNA auszugleichen. Beim Salt Aging wird daher schrittweise die Salzkonzentration erhöht, um DNA zu immobilisieren. Durch die positiv geladenen Natriumionen werden die negativen Ladungen des Citrats und der DNA neutralisiert und so die Annäherung der DNA an die AuNP ermöglicht (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Konjugation mittels Salt Aging. Durch positive Natrium-Ionen werden die Ladungen der DNA ausgeglichen und eine Annäherung der AuNP und DNA ermöglicht. Nach zunächst adsorptiven Bindungen erfolgt durch eine Thiol-Gruppe der DNA (nicht gesondert dargestellt) eine gerichtete Immobilisierung der DNA.

Zunächst werden AuNP und DNA in großem Überschuss für mehrere Stunden inkubiert. Durch die erste NaCl-Zugabe wird erreicht, dass ein geringer Teil an DNA-Molekülen an die AuNP bindet und die Stabilität und Salztoleranz der AuNP erhöht wird, sodass mehr Salz zugegeben werden kann. Durch schrittweise Zugabe von NaCl kommt es demnach ebenfalls zur schrittweisen Erhöhung der DNA-Dichte auf AuNP sowie steigender Stabilität der Dispersion [63]. Eine Thiol-Modifikation der DNA-Moleküle gewährleistet dabei eine gerichtete Immobilisierung und vermindert adsorptive Bindungen. Die Salt Aging Methode dauert aufgrund der notwendigen längeren Inkubationszeiten 1 – 2 Tage und die

Konjugationseffizienz hängt aufgrund der Ladung von der Länge und Sequenz des DNA-Moleküls ab [6], [72].

### pH-Erniedrigung

Eine andere Konjugationsmethode basiert auf kurzzeitiger Erniedrigung des pH-Wertes (Abbildung 4). Wie beim Salt Aging werden zu Beginn AuNP und DNA inkubiert, die DNA liegt auch hier im Überschuss vor. Danach wird zügig Citrat-Puffer zugegeben, der den pH-Wert von ca. 6 auf nahe 3 bringt. Durch den niedrigen pH-Wert werden die negativen Ladungen der DNA neutralisiert bzw. zum Teil ins Positive verschoben und durch die verringerten repulsiven Kräfte nähern sich die DNA-Moleküle den AuNP so weit an, dass diese auf der AuNP-Oberfläche über die Thiol-Gruppe chemisorptiv immobilisiert werden.

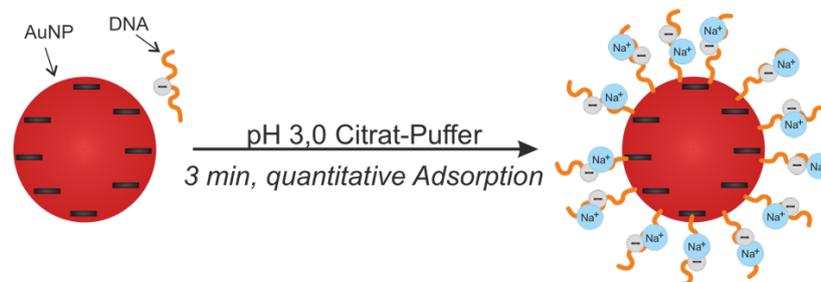


Abbildung 4: Konjugation mittels pH-Erniedrigung. Durch positive Natrium-Ionen und starke Erniedrigung des pH-Werts werden die Ladungen der DNA ausgeglichen. Durch eine Thiol-Gruppe der DNA (nicht gesondert dargestellt) kann eine gerichtete Immobilisierung der DNA erfolgen.

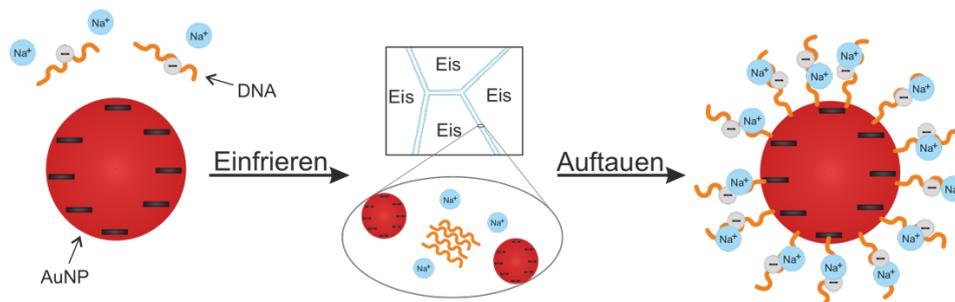
Hierbei haben sich vor allem DNA-Sequenzen mit einem Poly-Adenin-Spacer an der Thiol-Gruppe bewährt, da die pH-Erniedrigung die effektivste Wirkung auf Adenin hat (komplette Neutralisation bis hin zu positiver Ladung) und demnach die repulsiven Kräfte am leichtesten überwunden werden. Nach wenigen Minuten bei pH 3 wird der Konjugationsansatz zentrifugiert und das Konjugat-„Pellet“ final in einer weniger sauren Pufferlösung aufgenommen.

Bei dieser Methode werden Salz-Zugabe und Erniedrigung des pH-Wertes durch Zugabe eines Citrat-Puffers parallel eingesetzt und dadurch zügig DNA auf AuNP immobilisiert sowie eine gute Stabilität der Konjugate gewährleistet. [6], [70]

## Einfrieren

Das Einfrieren führt bei AuNP ebenso wie zu hohe Salz-Konzentrationen zur Agglomeration der Dispersion. Beim Einfrieren erhöht sich durch Kristall-Bildung des Wassers die lokale Molekül-Konzentration zwischen den Kristallen. Die repulsiven Kräfte zwischen AuNP werden dadurch überwunden und die attraktiven Anziehungskräfte überwiegen ab einer gewissen Distanz, sodass es zur Agglomerat-Bildung kommt. Diese erzwungene Distanzverminderung durch Kristall-Bildung wird bei der dritten Konjugationsmethode verwendet.

Liegen AuNP und DNA vermischt beim Einfrieren vor, werden die repulsiven Kräfte durch Kristall-Bildung überwunden, die attraktiven überwiegen und DNA kann chemisorptiv über eine Thiol-Gruppe oder auch adsorptiv immobilisiert werden. Hierbei ist kein zusätzliches Salz oder die Neutralisation der Ladungen durch pH-Wert-Erniedrigung nötig (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Konjugation mittels Einfrieren. Durch eine erzwungene Distanzverminderung bei Kristallbildung des umgebenen Wassers, nähern sich AuNP und DNA nah genug an, sodass die DNA gerichtet (über Thiol-Gruppen) oder adsorptiv immobilisiert werden kann. Die AuNP-Dispersion beinhaltet auch positive Natrium-Ionen, die durch Ladungsausgleich der DNA zusätzlich die Konjugation erleichtern.

Nach vollständigem Einfrieren kann das Konjugat aufgetaut werden. Bei dieser Methode handelt es sich um die schnellste Methode und es werden keine zusätzlichen Reagenzien benötigt. [73], [74]

### 3.3 Aptamer-modifizierte Gold-Nanopartikel in diagnostischen Anwendungen

Im Bereich der Diagnostik gibt es zahlreiche Anwendungen mit Aptamer-modifizierten Gold-Nanopartikeln, darunter Lateral Flow Assays (LFAs) sowie kolorimetrische Assays, bei denen die AuNP für das optische Signal sorgen. Der Großteil der Anwendungen ist jedoch noch nicht klinisch erprobt.

### 3.3.1 Kolorimetrische Assays

Bei kolorimetrischen Assays wird die SPR der AuNP zur Signalgabe verwendet. Die AuNP liegen in wässriger Umgebung vor und durch An- oder Abwesenheit der Zielsubstanz verändert sich die Farbe der Dispersion von rot zu lila/ blau durch Distanzänderungen der AuNP [45], [75]. Die Farbänderung bei AuNP mit adsorptiv gebundenen Aptameren kann bei Anwesenheit des Targets durch Dissoziation der Aptamere und folgende Salz-induzierte Agglomeration der „nackten“ AuNP erreicht werden (Abbildung 6A) [76], [77]. Weiterhin können Mischungen von AuNP vorliegen, die mit einem Aptamer „1“ oder einem Aptamer „2“ chemisorptiv konjugiert wurden. Beide Aptamere können das Target binden und einen Sandwich-Assay formieren. Wenn das Target in Lösung vorliegt, wird es von beiden Aptameren gebunden, wodurch sich die Distanz der AuNP so weit verringert, dass durch einen SPR-Shift eine Farbänderung auftritt (Abbildung 6B) [78].

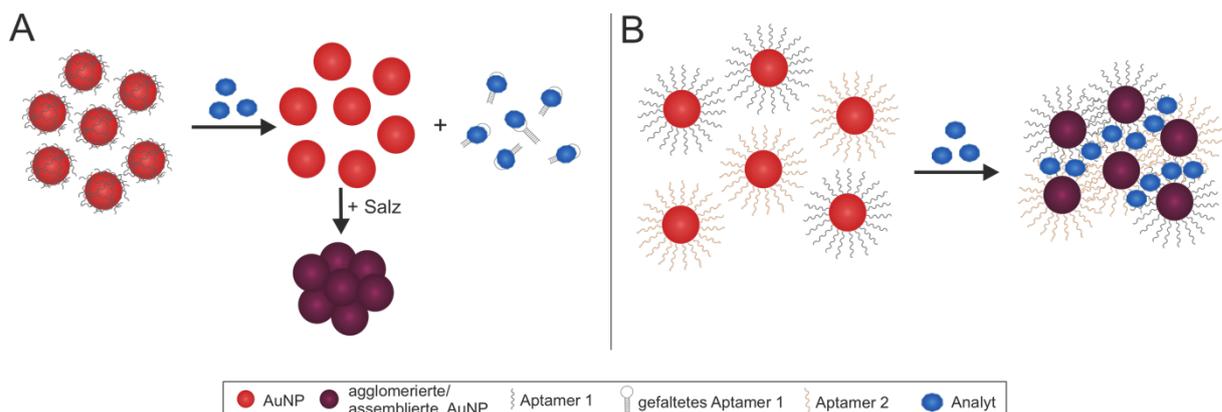


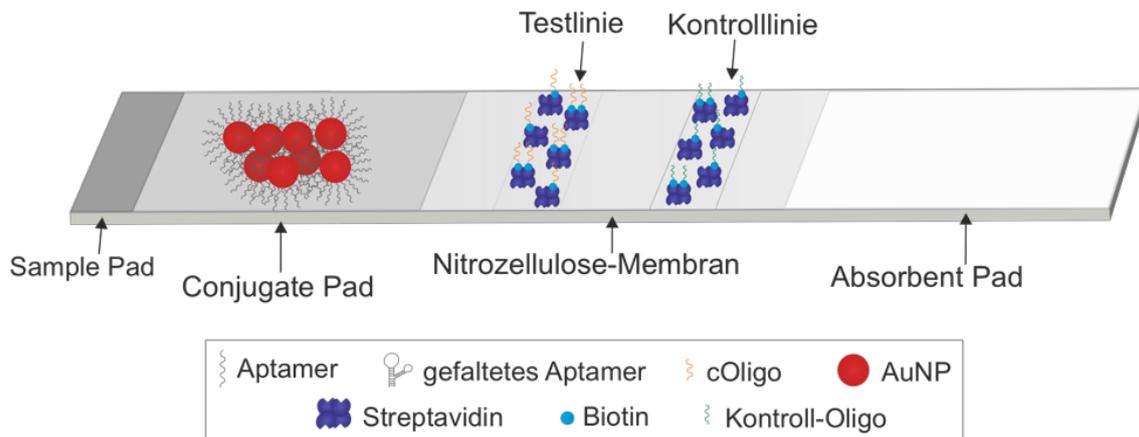
Abbildung 6: Kolorimetrische Assays mit AuNP. A: Assay mit adsorptiv gebundenen Aptameren und Salz-induzierter Agglomeration, B: Sandwich-Assay mit Aptamer-AuNP Konjugaten.

### 3.3.2 Lateral Flow Assays

Lateral Flow Assays sind vielfach verwendete Point-of-Care-Anwendungen, deren bekanntestes Beispiel der Schwangerschaftstest ist [79]. Auch für Krankheitserreger oder Kontaminationen von Proben werden die Papier-basierten Tests eingesetzt [80]–[84]. Bei LFAs werden komplexe Proben wie Blut, Urin, Speichel oder Serum verwendet. Üblicherweise werden zur Detektion des Targets Antikörper eingesetzt. Antikörper eignen sich jedoch nicht für alle Zielmoleküle, denn die Gewinnung von Antikörpern gegen toxische Substanzen oder kleine Moleküle gestaltet sich oft als schwierig [85], des Weiteren reagieren Antikörper sensitiv gegenüber pH- oder Temperatur-Änderungen [5]. Daher werden vermehrt LFAs

entwickelt, die zur Detektion des Targets Aptamere verwenden. Vor allem die Detektion kleiner Moleküle wird durch neuartige Detektionsmethoden von Verdrängungsreaktionen (z.B. Target-induzierte Dissoziation (TID)) ermöglicht [5].

LFA sind aus kostengünstigen Materialien aufgebaut und nutzen die Kapillarkräfte zur Aufnahme der Probenflüssigkeit. Der Aufbau ist in Abbildung 7 dargestellt.

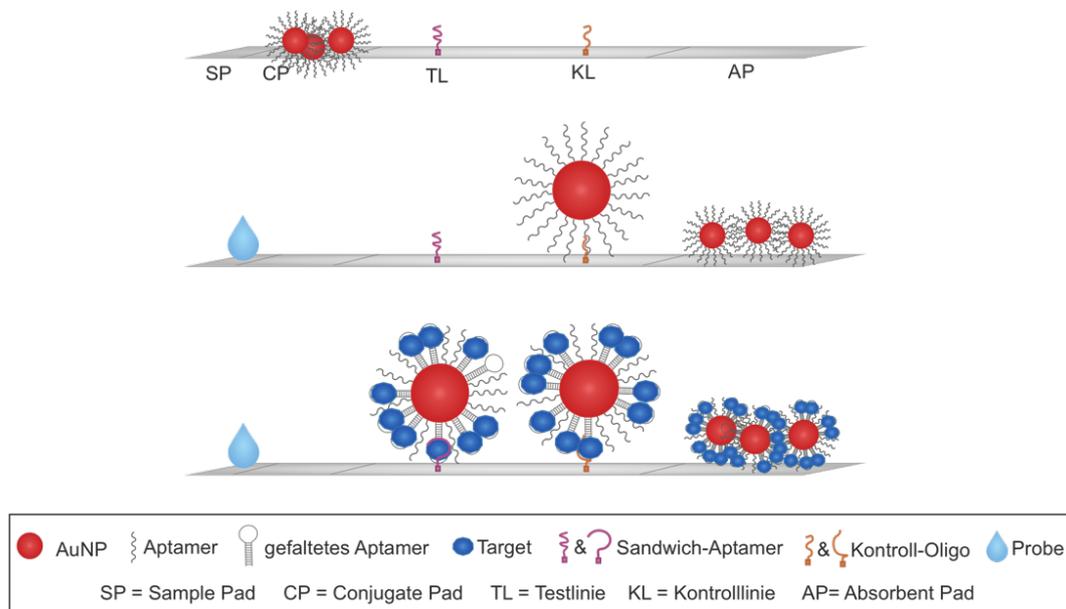


**Abbildung 7:** Schematischer Aufbau eines Lateral Flow Assay (LFA). Eine Probe kann auf das Sample Pad aufgegeben werden, Aptamer-AuNP Konjugate sind auf dem Conjugate Pad vorgelegt, Test- und Kontrolllinie bestehen im gezeigten Beispiel aus an Streptavidin immobilisierten Biotin-modifizierten Oligonukleotiden auf einer Nitrozellulose-Membran, ein Absorbent Pad ist zur Aufrechterhaltung der Kapillarkräfte aufgebracht.

Die Komponenten des LFAs sind zumeist auf einer Backing Card verklebt, welche die Stabilität der verwendeten Membran erhöht. Die erste Komponente ist das Sample Pad (SP), dieses kann jedoch auch im angrenzenden Conjugate Pad (CP) integriert sein. Ein SP wird vor allem benötigt, wenn Bedingungen wie pH-Wert oder Salz-Konzentration angepasst werden sollen. Das SP sowie das CP bestehen aus Glasfaser. In diesem verzweigten Material können getrocknete Moleküle (bspw. Puffersubstanzen) bei Flüssigkeitskontakt einfach gelöst und aufgenommen werden. Auf dem CP sind die mit Aptamer-konjugierten AuNP getrocknet vorgelegt. Wenn eine flüssige Probe aufgegeben wird, migriert sie durch das SP zum CP, dabei werden die AuNP gelöst, sodass sie mit der Flüssigkeitsfront wandern. Die Flüssigkeit passiert als nächstes die Nitrozellulose-Membran (NZ), auf der eine Test- (TL) und eine Kontrolllinie (KL) immobilisiert sind. Diese Linien sind Anbindungsstellen für die AuNP und bilden das visuelle Detektionssignal. Wenn die Flüssigkeit die Kontroll-Linie passiert hat, wird sie schließlich im Absorbent Pad (AP) aufgesogen, welches der Aufrechterhaltung der Kapillarkräfte dient. [5], [86], [87]

Es gibt 2 mögliche SetUps eines Aptamer-basierten LFAs: den Sandwich-Assay sowie den kompetitiven Assay. Beim Sandwich-Assay (Abbildung 8) sind 2 Aptamere nötig, die das

Target simultan binden können. Eines der Oligonukleotide ist auf der NZ immobilisiert, das andere auf den AuNP. Bei Anwesenheit des Targets in der Probenflüssigkeit bindet zuerst das AuNP-Aptamer das Target, bei Kontakt zur TL wird der Molekül-Komplex durch Bindung an das 2. Aptamer festgehalten. Dadurch verbleiben die AuNP auf der TL und es bildet sich die charakteristische rote Linie bei einem positiven Testergebnis. Ohne Target in der Probenflüssigkeit werden die AuNP nicht an der TL festgehalten und die Rotfärbung der Linie bleibt aus. In beiden Fällen verfärbt sich jedoch die KL rot, da hier die AuNP gebunden werden (z.B. durch anders modifizierte AuNP ohne Kompetitionsreaktion), um die fehlerfreie Funktion des Testergebnisses darzustellen.



**Abbildung 8:** Lateral Flow Assay mit einem Sandwich-Format. Oben: Teststreifen vor Durchführung. Mitte: Teststreifen nach Probendurchlauf ohne Target. Unten: Teststreifen nach Probendurchlauf mit Target.

Der kompetitive Assay funktioniert nach dem Verdrängungsprinzip der Target-induzierten Dissoziation (TID, engl. Target-induced dissociation) [88], [89]. Es werden ebenfalls 2 Oligonukleotide eingesetzt, von denen jedoch nur eins das Target bindet, hierbei handelt es sich um das Aptamer. Das andere Oligonukleotid (cOligo) ist komplementär zum Aptamer und hybridisiert mit diesem. Die Bindung von Aptamer und cOligo ist schwächer als die Bindung von Aptamer und Target. Beim TID-Assay gibt es 2 mögliche SetUps: die Aptamere sind an die AuNP konjugiert oder sie sind auf der NZ immobilisiert (das cOligo befindet sich jeweils auf der anderen Position), in Abbildung 9 ist ein TID-Assay mit Aptamer-AuNP dargestellt.

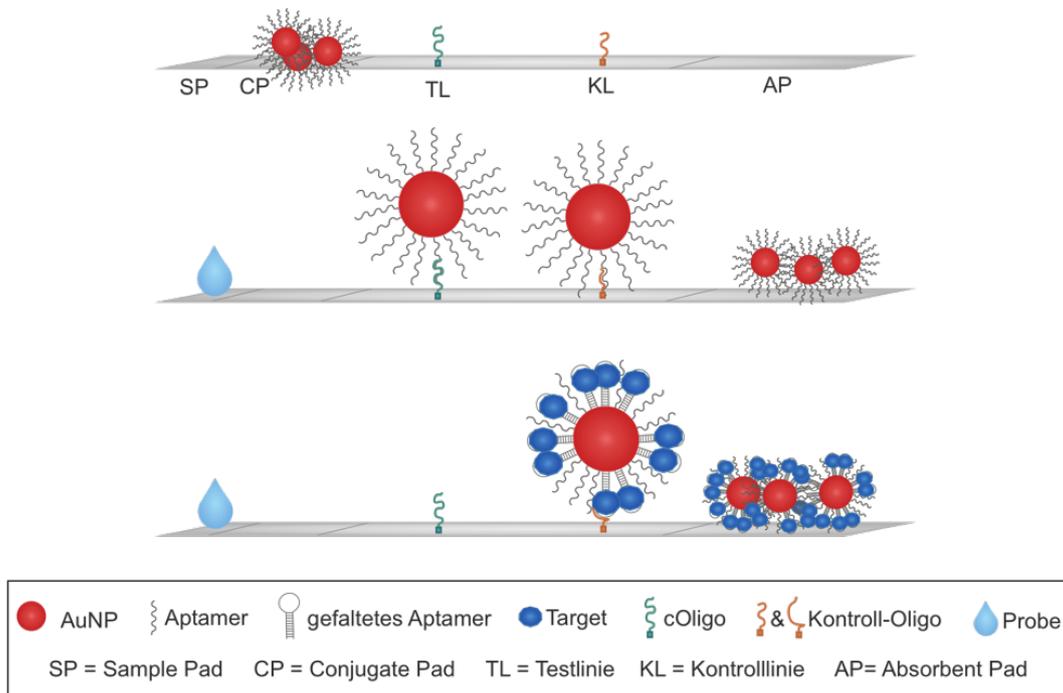


Abbildung 9: Lateral Flow Assay mit einem TID-Mechanismus und Aptamer-AuNP. Oben: Teststreifen vor Durchführung. Mitte: Teststreifen nach Probendurchlauf ohne Target. Unten: Teststreifen nach Probendurchlauf mit Target.

Bei Aptamer-AuNP bindet das Target aus der Probenflüssigkeit an die AuNP, dieser Komplex migriert ohne Bindungsreaktion über die TL, nur an der KL entsteht durch Bindung der AuNP eine Rotfärbung. Ein positives Testergebnis wird hier durch Ausbleiben der TL generiert. Ohne Target binden die Aptamer-AuNP an die cOligos der TL, wodurch eine Rotfärbung der Linie entsteht. Beim Setup mit cOligo-AuNP bindet das Target an die Aptamere der TL, wodurch auch hier keine rote TL beim positiven Testergebnis entsteht. Ohne Target binden die cOligo-AuNP an die Aptamere und sorgen für die Rotfärbung der TL beim negativen Testergebnis. Welcher kompetitive Aufbau verwendet wird, hängt zum einen von der Konjugationseffizienz der Oligos ab, zum anderen können Sensitivitätsunterschiede durch das gewählte Setup entstehen.

Vor allem bei kleinen Targets sind Sandwich-Assays oftmals nicht realisierbar, da das Target durch Bindung komplett umschlossen wird und nicht für eine zusätzliche Bindung zur Verfügung steht. Daher bieten kompetitive Assays eine Detektionsmöglichkeit ansonsten unzugänglicher Targets [5], [87].

## 4 Experimenteller Teil

Zur Entwicklung eines diagnostischen Assays werden in dieser Arbeit AuNP synthetisiert und mit Aptameren bzw. Oligonukleotiden funktionalisiert. Als diagnostische Anwendung wurde ein Lateral Flow Assay ausgewählt, da er zum Bereich des Point-of-Care-Testing zählt und durch kostengünstige Produktion und schnelle Ergebnisse überzeugt. Als relevantes Target für einen kommerziellen Assay wurde das Mykotoxin Ochratoxin A verwendet, für welches in der Literatur bereits Aptamere selektiert und hinreichend charakterisiert wurden. Das Mykotoxin wird von Schimmelpilzen gebildet und kann verschiedene Lebensmittel verunreinigen [90]. Aufgrund der kleinen Größe des Targets soll der Lateral Flow Assay mit einem kompetitiven Mechanismus aufgebaut werden, für welchen zusätzlich ein komplementäres Oligonukleotid benötigt wird.

Zunächst wurden die Bindungen der Komponenten Aptamer, Oligonukleotid und Target mit den Methoden CD-Spektroskopie und Microscale Thermophoresis untersucht, bevor sich durch Immobilisierung einer Komponente auf Microarrays eine Übertragung zum angestrebten Aufbau anschließt. Beim späteren Lateral Flow Assay müssen immobilisierte Aptamere sowie Oligonukleotide auf einer Membran oder Gold-Oberfläche weiterhin eine Bindung eingehen können und die Kompetition durch das Target muss gewährleistet sein. Nach erfolgreichen Bindungsstudien wurden Synthesemethoden von Gold-Nanopartikeln charakterisiert und verglichen. Mit den ausgewählten Gold-Nanopartikeln wurden verschiedene Konjugationsmethoden zum Funktionalisieren der Partikel mit den Oligonukleotiden untersucht. Dabei wurden verschiedene Parameter optimiert und u.A. die Verwendung eines Adenin-Spacers untersucht. Nach Optimierung der Konjugation wurde die Funktionalität der Konjugate zuerst mit einem Bindungsassay in Lösung und anschließend mit immobilisierten Bindungspartnern in einem Dot Blot Format untersucht. Schließlich wurden die Konjugate auf Lateral Flow Assays eingesetzt, wobei Komponenten des Lateral Flow Assays optimiert wurden, um eine Detektion des Targets zu visualisieren.

#### 4.1 Charakterisierung eines Aptamers gegen Ochratoxin A

Als Target-Molekül der diagnostischen Anwendung in dieser Arbeit wurde das Mykotoxin Ochratoxin A (OTA) ausgewählt. Das Small Molecule OTA (Abbildung 10) wird von den Schimmelpilz-Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* produziert [91].

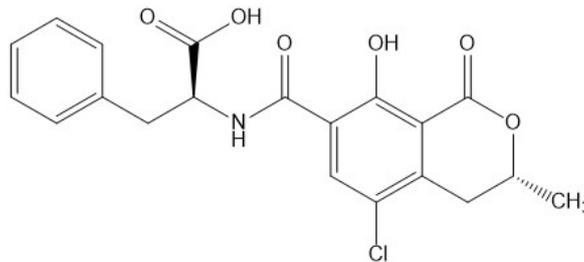


Abbildung 10: Strukturformel von Ochratoxin A.

Diese Schimmelpilze befallen hauptsächlich Getreide. Das produzierte OTA ist sehr hitzestabil und kann extreme Bedingungen wie Rösten überstehen und ist daher in verarbeiteten Getreide-Produkten wie Kaffee, Bier, Wein, aber auch Trockenobst und Gemüse nachweisbar [90].

OTA wirkt beim Menschen vor allem nierenschädigend. Aber auch neurotoxische, teratogene, immunotoxische sowie cancerogene Wirkungen konnten in Tierversuchen nachgewiesen werden [90]–[92].

Nach Aufnahme von OTA im gastrointestinalen Trakt bindet es an das humane Albumin (HSA) und wird daran gebunden durch den menschlichen Körper transportiert. Bei gesunden Menschen variiert die OTA-Menge im Plasma vom hohen pmol/L bis zum geringen nmol/L Bereich, in endemischen Regionen können Werte über 100 nmol/L nachgewiesen werden [92]. Gegen das Mykotoxin OTA existieren verschiedene Aptamere, in dieser Arbeit wurde mit einem von Cruz-Aguado *et al.* [93] selektierten Aptamer gearbeitet. Hierbei handelt es sich um ein DNA-Aptamer mit 61 Nukleotiden. Dieses wurde ausgewählt, da die Funktionalität bereits durch andere Arbeiten am TCI erfolgreich festgestellt wurde [88]. Bei der SELEX des Aptamers wurde das OTA mittels Kupplungschemie auf Agarose-Harz immobilisiert und es wurden Primer mit interner Zufallsabfolge verwendet. Die Affinität des Aptamers wurde anhand der Bestimmung der Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) erfasst und beträgt 360 nM [91].

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die strukturellen Eigenschaften des Aptamers unter anderem durch CD-Spektroskopie untersucht. Weiterhin sollte überprüft werden, ob die Affinität bestätigt werden kann, um das Aptamer später für diagnostische Zwecke zu verwenden. Für einen nachfolgenden Assay ist ein weiterer Bindungspartner nötig, daher wurde die Bindung an ein komplementäres Oligonukleotid untersucht. Dafür wurden zunächst Microscale Thermophoresis (MST) Experimente durchgeführt und anschließend wurde der Versuchsaufbau auf Microarray-Experimente übertragen.

#### 4.1.1 Strukturelle Eigenschaften des Aptamers

Das DNA-Aptamer mit 61 Nukleotiden wurde in der Literatur bereits mehrfach untersucht, vor allem bezüglich der strukturellen Ausbildung eines G-Quadruplex. Bei der 3D-Struktur des Aptamers handelt es sich vermutlich um einen intramolekularen antiparallelen G-Quadruplex, der aus 4 doppelt- oder dreifachgestapelten Guanin-Molekülen aufgebaut ist [94]–[96]. Der G-Quadruplex-Mapper<sup>1</sup> gibt über 30 mögliche G-Quadruplex Strukturen aus, die wahrscheinlichste wird mit dem höchsten G-Score von 20 bewertet, der geringste G-Score beträgt 7. Der höchste Score wurde für folgende Struktur erreicht, die interagierenden Guanin-Basen sind hervorgehoben (unterstrichen).

5'-TGGTGGCTGTAGGTCAGCATCTGATCGGGTGTGGGTGGCGTAAAGGGGAGCATCGGACAACG-3'

Der Score 20 wird für den G-Quadruplex-Beginn ab Nukleotid 28 zweimal vergeben, wobei entweder die Nukleotide 45 und 46 oder 46 und 47 (45 – 47 sind hellgrau dargestellt) beteiligt sein können. Zwischen den an dem G-Quadruplex beteiligten Nukleotiden befinden sich je 6 oder 7 nicht beteiligte Nukleotide.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen und zu überprüfen, ob sich die Struktur des Aptamers mit der Targetbindung ändert, wurden CD-Spektren aufgenommen, diese sind in Abbildung 11 dargestellt. Hierbei wurde neben dem Aptamer eine gekürzte (gek.) Variante des Aptamers verwendet, diese wurde im Rahmen einer Masterarbeit untersucht<sup>2</sup>. Die

<sup>1</sup> <http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/index.php> , Zugriff: 25.03.2020, 9:28 Uhr

<sup>2</sup> Masterarbeit „Entwicklung funktionaler Aptamer-Goldnanopartikel-Konjugate für diagnostische Tests“ von Giamper Escobar Cano, 2020 [120].

Kürzung des Aptamers fand außerhalb der G-Quadruplex Struktur statt und wurde aus der Literatur übernommen [93], die Variante wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter verwendet.

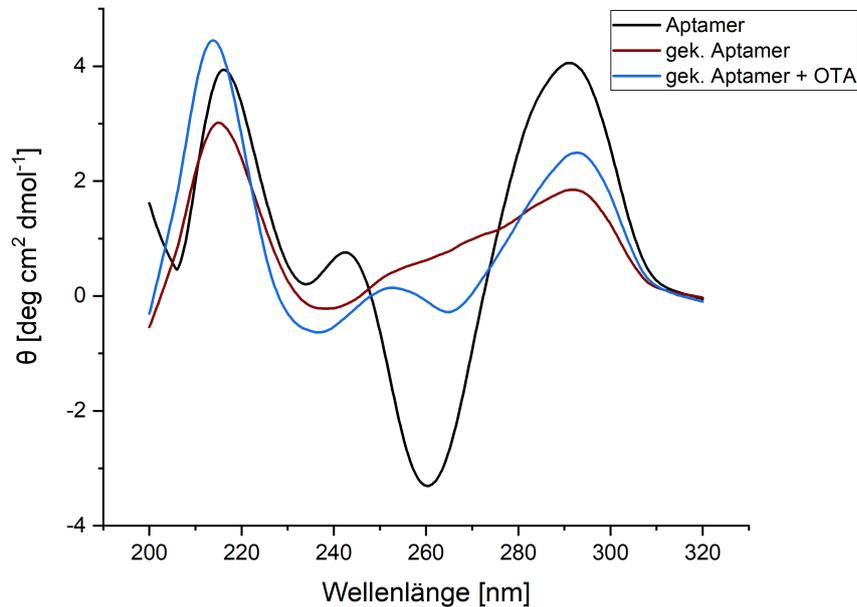


Abbildung 11: CD-Spektren des Aptamers (schwarz), des gekürzten Aptamers (rot) und des gekürzten Aptamers-OTA-Komplexes (blau).

Die Spektren zeigen verschiedene Strukturen des Aptamers auf. Das Aptamer liegt aufgrund des Maximums bei 295 nm, Minimums um 260 nm und lokalen Maximums bei 245 nm bereits ohne Target in einer antiparallelen G-Quadruplex Struktur vor [97], [98]. Die gekürzte Variante des Aptamers liegt hingegen in einer hybriden G-Quadruplex-Struktur vor, der Extrempunkt um 295 nm ist hier ebenfalls vorhanden, aber statt des Extrempunktes bei 245 nm findet ein Signalanstieg von 240 nm bis zum lokalen Maximum bei 295 nm statt [99]. Im Komplex mit OTA findet eine Strukturänderung beim gekürzten Aptamer statt, die G-Quadruplex Struktur verändert sich durch ein lokales Minimum um 265 nm, die Struktur kann aber keinem genauen Motiv zugeordnet werden [100]. Anhand der Spektren ist ersichtlich, dass das Aptamer in einer G-Quadruplex Struktur vorliegt und durch Targetbindung eine leichte Konformationsänderung bzw. Signalintensivierung stattfindet. Durch diese Änderung eignet sich das Aptamer für anschließende Analysen mittels Microscale Thermophoresis.

#### 4.1.2 Bindungsstudien mittels Microscale Thermophoresis

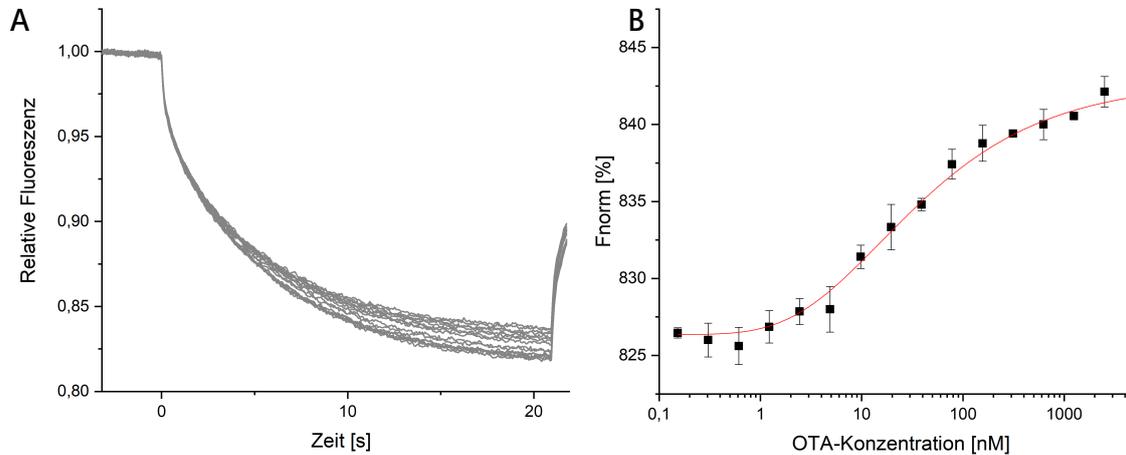
Zur Bestimmung der Affinität des Aptamers wurden Microscale Thermophoresis (MST)-Experimente durchgeführt. Bei der MST wird mittels Infrarot (IR)-Laser ein punktueller Temperatur-Gradient erzeugt, der zur Bewegung von Biomolekülen in diesem Bereich führt. Große Moleküle bzw. Molekül-Komplexe bewegen sich meist langsamer als kleinere Moleküle. Im Falle von Aptameren kann dadurch beobachtet werden, ob Moleküle einzeln vorliegen oder im Komplex, z.B. im Aptamer-Target-Komplex. Da jedes Molekül mit einer Hydrathülle umgeben ist, ist vor allem die Formänderung der umgebenden Hydrathülle ersichtlich, wenn sich ein Molekül-Komplex bildet. Die Formänderung kann jedoch nur mithilfe von Fluoreszenz beobachtet werden, daher ist ein Bindungspartner des Komplexes mit einem Fluoreszenzmolekül versehen und parallel zum IR-Laser wird die Fluoreszenz der Probe untersucht. Ein MST-Experiment besteht aus 16 Proben in Glaskapillaren, wobei ein Bindungspartner in einer Konzentrationsreihe vorliegt und der andere Bindungspartner Fluoreszenz-markiert ist und in konstanter Konzentration vorliegt. Anhand der Fluoreszenz-Änderung der 16 Proben im punktuellen Bereich des Temperatur-Gradienten kann schließlich ein Rückschluss auf die Affinität gezogen werden, bei erfolgreicher Bindung entsteht ein sigmoidaler Bindungsverlauf [101]–[103].

Zur Charakterisierung des OTA-bindenden Aptamers wurden MST-Experimente mit dem Aptamer und Target durchgeführt. Der spätere Assay soll nach dem Prinzip der Target-induzierten Dissoziation (TID) durchgeführt werden. Hierbei binden Target sowie ein komplementäres Oligonukleotid (cOligo) kompetitiv an das Aptamer. Das Target kann dabei, durch eine höhere Affinität, eine Verdrängung des cOligos hervorrufen und generiert im diagnostischen Assay ein anderes Signal als das cOligo. Die TID-Reaktion soll ebenfalls mit MST-Experimenten untersucht werden.

##### 4.1.2.1 Bindung des Aptamers an Ochratoxin A

Zur Ermittlung der Affinität von Aptamer und OTA wurde das 61-Nukleotid lange Aptamer (Apt) mit dem Farbstoff Cyanine 5 (Cy5) fluoreszenzmarkiert. Das OTA wurde über den Konzentrationsbereich von 5  $\mu$ M bis 153 pM verdünnt und mit 25 nM des Cy5-Aptamers für 10 min unter Lichtausschluss inkubiert. Zum Verdünnen der Komponenten wurde der Bindepuffer des Aptamers verwendet (A.3), um die bestmögliche Targetbindung zu

gewährleisten. Zusätzlich wurden 0,05 % Tween 20 zugesetzt, damit eine Absorption an den Wänden der MST-Kapillaren minimiert wird. Abbildung 12 zeigt die MST-Traces des Versuchs sowie die resultierende Bindungskurve des Experiments.



**Abbildung 12:** A: MST-Traces des Experiments, B: Bindungskurve vom Cy5-Apt (25 nM) und OTA im Bereich von 5  $\mu$ M – 153 pM (logarithmische Auftragung). Dargestellt ist die normierte Fluoreszenz ( $F_{norm}$  [%]) in Abhängigkeit von der Aptamer-Konzentration [nM]. Ausgewertet mittels MO.Control von NanoTemper, sigmoidaler Fit in Origin erstellt.

In Abbildung 12A sind die 16 MST-Traces unterschiedlicher OTA-Konzentration zu sehen. Sie zeigen, wie sich die Fluoreszenz der Proben im IR-bestrahlten Bereich über die Zeit verändert hat. Anfangs wurde die initiale Fluoreszenz gemessen, diese ist aufgrund derselben Konzentration des Cy5-Apt in allen Proben ungefähr gleich (Abweichung < 10 % nötig für eine erfolgreiche Messung) und wird auf 1 normiert. Danach wurde der IR-Laser angeschaltet (ab 0 s), woraufhin die Fluoreszenzsignale gesunken sind (Thermophorese): durch die Temperaturerhöhung um einige Grad Celsius wanderten die Moleküle aus dem erwärmten Bereich heraus. Gegen Ende der Thermophorese wurde die Fluoreszenz-Änderung geringer, die Moleküle näherten sich einem stationären Zustand an. Nach Ausschalten des IR-Lasers (20 s) diffundierten die Moleküle zurück und das Fluoreszenzsignal stieg an.

Die Probe mit der geringsten OTA-Konzentration (untere Kurve) wies die größte Fluoreszenz-Änderung auf, wohingegen die Probe mit der höchsten OTA-Konzentration die geringste Änderung zeigte. Die restlichen Proben befanden sich mit zunehmender Fluoreszenz-Änderung dazwischen. Zur Ermittlung der Affinität wurde die Fluoreszenz aller Proben zu einem Zeitpunkt verglichen, hier wurde  $t = 15$  s, der mittlere Bereich der Thermophorese, gewählt. Abbildung 12B zeigt die Messpunkte sowie die resultierende

sigmoidal verlaufende Bindungskurve. Hier zeigt sich deutlich, dass große Fluoreszenz-Unterschiede bei niedrigen und hohen OTA-Konzentrationen vorlagen, die maximale Fluoreszenz-Änderung (Amplitude) beträgt ca. 20. Für ein aussagekräftiges MST-Experiment sollte die Amplitude größer 3 sein, daher ist die vorliegende Amplitude ein Indiz für eine Bindung. Weiterhin ist ein beginnender Sättigungsbereich am Ende der Kurve vorhanden, bei hohen OTA-Konzentrationen wird eine Absättigung der Reaktion erreicht. Die ermittelte  $K_d$  beträgt 33,5 nM mit einer Standardabweichung von 7,1 nM. Damit ist die  $K_d$  um das 10-fache geringer als in der Literatur. Dieser Unterschied entsteht vermutlich durch die verschiedenen Methoden: Im Selektionspaper wurde ein Assay zur Bindungsermittlung eingesetzt, bei der die Eigenfluoreszenz von OTA bei einer Gleichgewichtsdialyse gemessen wurde. Die MST ist eine sehr präzise und bewährte Methode, um Affinitäten in Lösung zu bestimmen, durch die verschiedenen Methoden kann ein solcher Unterschied auftreten. Das Aptamer bindet sein Target OTA folglich hochaffin im niedrig nanomolaren Bereich. Um auszuschließen, dass das Aptamer nur unter idealen Bedingungen im Bindepuffer funktional ist und nicht in komplexen Medien, wurden die MST-Messungen auf ein komplexes Medium ausgeweitet. Da OTA hauptsächlich in Getreide und verarbeiteten Lebensmitteln zu finden ist, wurde Kuhmilch als komplexes Medium getestet. Über das Tierfutter gelangt OTA in die Kuhmilch, belastete Kuhmilch könnte somit eine Gefährdung darstellen [104], [105]. Die Bindungskurven bei verschiedenen Milch-Konzentrationen sind in Abbildung 13 dargestellt.

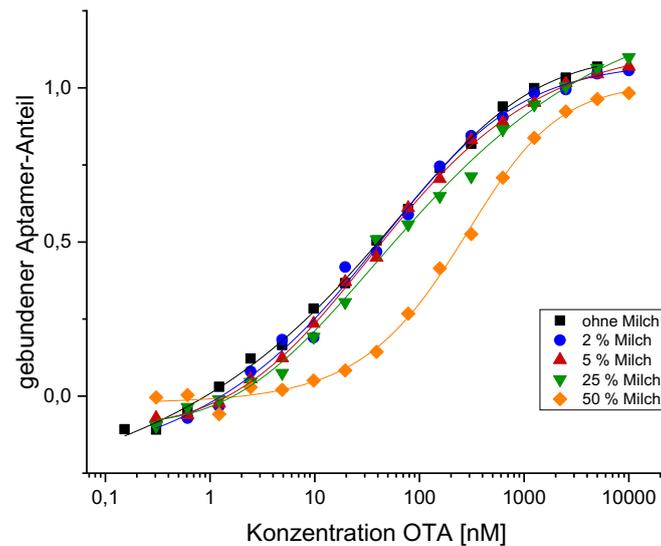


Abbildung 13: Bindungskurven des Cy5-Apt (25 nM) und OTA im Bereich von 10  $\mu$ M – 153 pM mit verschiedenen Milch-Konzentrationen, ermittelt durch MST-Messungen. Dargestellt ist der Anteil gebundener Aptamere in Abhängigkeit von der OTA-Konzentration [nM]. Ausgewertet mittels MO.Control von NanoTemper, sigmoidaler Fit mittels Origin erstellt.

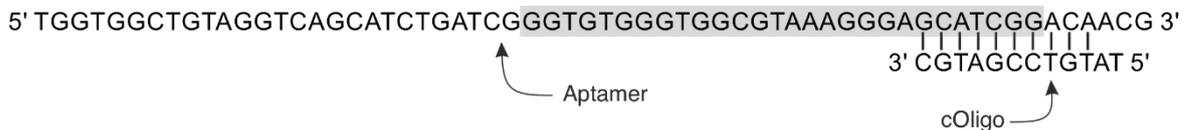
Zur besseren Vergleichbarkeit der Kurven miteinander wurde hier nicht die normierte Fluoreszenz, sondern der auf 1 (entspricht 100 %) normierte gebundene Aptamer-Anteil aufgetragen. Es ist ersichtlich, dass die Affinität des Aptamers zu OTA auch unter nicht idealen Bedingungen besteht. Im Konzentrationsbereich von 0 – 25 % Milch hat sich die  $K_d$  zunehmend nur leicht erhöht, bei 50 % Milch deutlich auf ca. 300 nM, sichtbar durch die Verschiebung der Kurve nach rechts. Dieser Wert zeigt dennoch die affine Bindung des Aptamers an OTA unter nicht idealen Bedingungen und ist erfolgsversprechend für zukünftige Anwendungen des Aptamers in komplexen Proben des LFAs.

Um das Aptamer später in einem Assay mit TID-Mechanismus anwenden zu können, wird ein komplementäres Oligonukleotid benötigt. Die Bindung an dieses wird im nächsten Abschnitt untersucht.

#### 4.1.2.2 Bindung des Aptamers an ein komplementäres Oligonukleotid

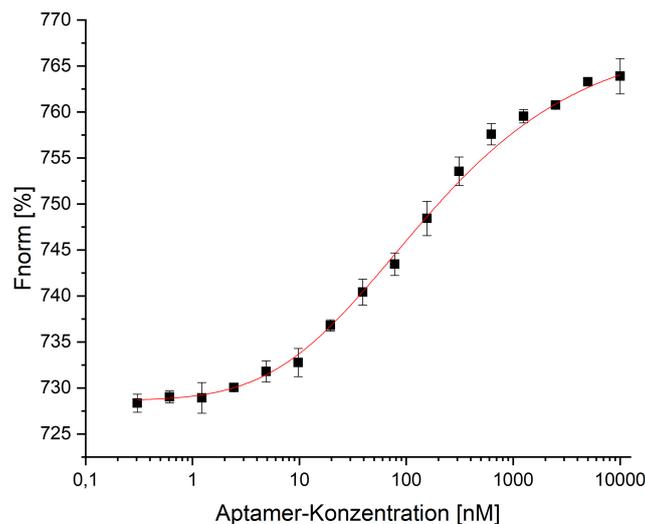
Für einen verdrängungsbasierten Assay wird ein Oligonukleotid benötigt, zu welchem das Aptamer eine geringere Affinität als zum Target besitzt. Für das OTA-Aptamer wurden bereits erfolgreich komplementäre Oligonukleotide ermittelt [106] und in einer vorherigen Arbeit am TCI verwendet [88]. Es handelt sich hierbei um eine 10 Nukleotide lange komplementäre Sequenz, auf die 2 nicht komplementäre Nukleotide folgen. Die

Basenpaarungen des Aptamers mit dem cOligo ist in Abbildung 14 dargestellt, dabei ist der Bereich der G-Quadruplex Struktur zur Bindung des Targets grau hinterlegt. Um ein paralleles Binden des Targets und des cOligos zu unterbinden, ist ein überschneidender Bereich des Strukturmotivs und der Basenpaarungen hilfreich.



**Abbildung 14:** Sequenzen von Aptamer und cOligo. Der Bereich der G-Quadruplex Struktur des Aptamers grau hinterlegt, die Basenpaarungen der Oligonukleotide sind durch Verbindungslinien dargestellt.

Zur Ermittlung der Affinität wurde einer der beiden Bindungspartner mit Cy5 modifiziert. Die Versuchsdurchführung ist unter B.3.1.2 beschrieben. Abbildung 15 zeigt die Bindungskurve des Aptamers und Cy5-cOligos.



**Abbildung 15:** Bindungskurve vom Cy5-cOligo (25 nM) und Apt im Bereich von 10  $\mu$ M – 306 pM. Auswertung der Fluoreszenz-Signale nach 15s Thermophorese. Dargestellt ist die normierte Fluoreszenz (Fnorm [%]) in Abhängigkeit von der Aptamer-Konzentration [nM]. Ausgewertet mittels MO.Control von NanoTemper, Sigmoidaler Fit in Origin erstellt.

Bei dieser Kurve ist ebenfalls ein beginnender Sättigungsbereich bei hohen Aptamer-Konzentrationen und ein sigmoideles Bindungsverhalten zu erkennen. Der  $K_d$ -Wert liegt bei 119,9 nM mit einer Standardabweichung von 40,6 nM und lässt demnach auf eine affine Bindung schließen. Aufgrund der mehr als dreifach erhöhten  $K_d$  im Vergleich zum Target (33,5 nM) eignet sich das cOligo für einen TID-Assay, welcher im nächsten Abschnitt untersucht wurde.

#### 4.1.2.3 Ermittlung der kompetitiven Bindung des Targets und cOligos an das Aptamer

Bei einem TID-Assay konkurrieren zwei Moleküle um die Bindung an ein weiteres Molekül, in dieser Arbeit konkurrieren das cOligo und das OTA um die Aptamer-Bindung. Aufgrund der zuvor bestimmten  $K_d$  sollte das Gleichgewicht der Reaktion auf Seiten der Aptamer-OTA-Bindung liegen. Für die Ermittlung der Competition mittels MST wurden Aptamer und cOligo in konstanter Konzentration verwendet, während OTA in einer Konzentrationsreihe vorlag. Als konstante Konzentrationen wurden, wie bei den vorherigen Messungen, je 25 nM Aptamer und Cy5-cOligo eingesetzt. Das OTA wurde in Bindepuffer gelöst und im Konzentrationsbereich von 20  $\mu\text{M}$  – 610 pM eingesetzt. Die resultierende Kurve der Messung ist in Abbildung 16 dargestellt.

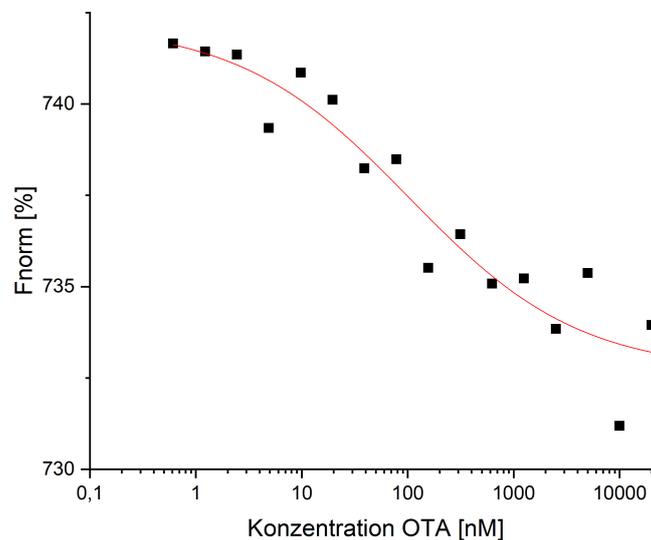


Abbildung 16: Bindungskurve des TID-Assays mit 25 nM Cy5-cOligo, 25 nM Apt und OTA im Bereich von 5  $\mu\text{M}$  – 153 pM. Dargestellt ist die normierte Fluoreszenz ( $F_{\text{norm}}$  [%]) in Abhängigkeit von der Aptamer-Konzentration [nM]. Ausgewertet mittels MO.Control von NanoTemper, sigmoideal Fit in Origin erstellt.

Die Kurve zeigt die Dissoziation des Cy5-Oligos vom Aptamer in Abhängigkeit von der OTA-Konzentration. Da Cy5-cOligo und Aptamer in gleicher Konzentration vorlagen und das OTA variiert wurde, ist der Effekt der kompetitiven Bindung deutlich zu erkennen. Die Fluoreszenzsignale des Cy5-cOligos nehmen mit steigender OTA-Konzentration ab. Die vorliegenden Konzentrationen sind nicht ausreichend, um einen Sättigungsbereich bei hohen OTA-Konzentrationen abzubilden, der Kurvenverlauf deutet jedoch auf einen Sättigungsbereich hin. Mit zunehmender OTA-Konzentration wurden mehr cOligos vom Aptamer „verdrängt“, die cOligos diffundierten dadurch schneller aus dem erwärmten

Messbereich und das Fluoreszenzsignal wurde vermindert. Das Target OTA ist folglich in der Lage bereits bei niedrigen Konzentrationen im nanomolaren Bereich das cOligo vom Aptamer zu verdrängen. Ein kompetitiver Versuchsaufbau für spätere Anwendungen kann auf dieser Grundlage weiter untersucht werden.

Für anschließende Studien des Systems wurden die MST-Messungen auf das Microarray-Format übertragen, diese werden im nächsten Kapitel dargestellt. Da Microarrays einen immobilisierten Bindungspartner erfordern, können weitere Informationen über das Bindungsverhalten der 3 Moleküle gewonnen werden. Die Immobilisierung der Oligonukleotide könnte zu einer Beeinträchtigung der Funktionalität durch Fehlfaltungen führen, weiterhin könnte eine zu hohe Konzentration immobilisierter Partner zu sterischen Hinderungen führen. Um diese möglichen Problematiken zu untersuchen und lösen zu können, wurde zunächst eine Übertragung auf Microarrays gewählt und später auf den LFA.

#### 4.1.3 Bindungsstudien mittels Microarrays

Für einen zukünftigen diagnostischen Aufbau müssen Aptamer und cOligo auch immobilisiert funktional sein, da sie entweder auf Gold-Nanopartikeln oder einer Oberfläche immobilisiert werden sollen. Im Microarray-Format kann diese Funktionalität bestimmt werden und es können mit sehr kleinen Volumina entscheidende Parameter wie Konzentrationen und Pufferzusammensetzung optimiert werden. Wie bei den MST-Experimenten sollten die Aptamer-cOligo-Bindung und der TID-Mechanismus untersucht werden. Dafür wurden Glasslides mit unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen ausgetestet: 3D-Aldehyd-Glasslides sowie Nitrozellulose (NZ) beschichtete Glasslides.

Auf der 3D-Aldehyd-Oberfläche ist eine Antifouling-Matrix kovalent auf der Glasoberfläche angebracht. Das Netzwerk der Matrix ist endständig mit freien Aldehyd-Gruppen funktionalisiert, die zur Immobilisierung mit z.B. Amino-modifizierten Oligonukleotiden (Imin-Bildung) verwendet werden können. Bei den mit einer dünnen Schicht Nitrozellulose beschichteten Glasslides gibt es keine funktionalen Gruppen, sondern ein Netzwerk aus Nitrozellulose, in dem die Oligonukleotide adsorptiv oder mittels Streptavidin-Biotin-Kupplung immobilisiert werden [107]. Die Nitrozellulose des Microarrays ist vergleichbar mit dem Testbereich eines LFAs, daher kann im miniaturisierten Format des Microarrays die spätere Bindung übertragbar getestet werden. Zur Auswertung eines Micorarrays ist ebenfalls ein fluoreszenz-markierter Bindungspartner nötig, weshalb Cy5-modifizierte

Oligonukleotide verwendet wurden. Aufgrund der kurzen Sequenz (12 Nukleotide) des cOligos wurde ein A<sub>25</sub>-Spacer zwischen Amino-Modifikation und Sequenz eingefügt. Dadurch sollte ein gewisser Abstand der hybridisierenden Basen zur NZ erreicht und sterische Hinderungen vermindert werden. Das Cy5-cOligo wurde ohne Spacer verwendet. Die Ergebnisse der Microarray-Versuche wurden im Rahmen einer Abschlussarbeit<sup>3</sup> erzielt.

#### 4.1.3.1 Bindung des Aptamers an ein komplementäres Oligonukleotid

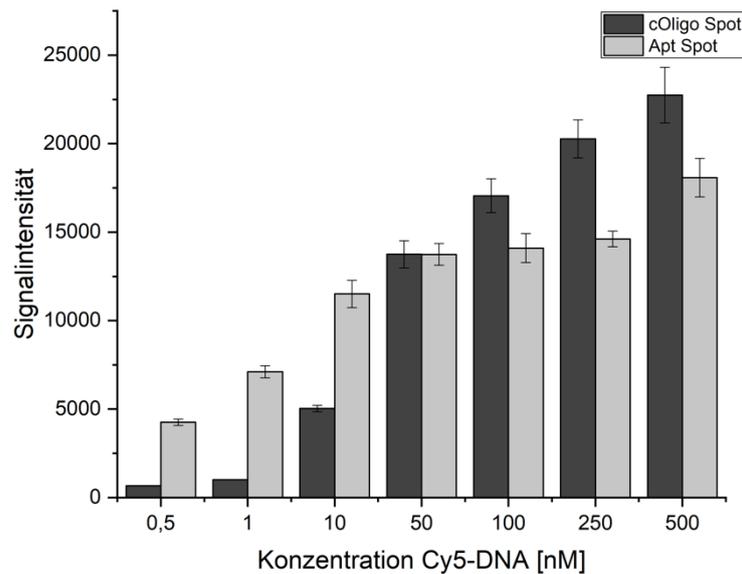
Zunächst wurde durch eine SYBR-Green Färbung sichergestellt, dass Oligonukleotide auf 3D-Aldehyd-Slides immobilisiert werden können. Dafür wurden das Aptamer sowie das cOligo in verschiedenen Konzentrationen und Puffern auf den Microarray aufgebracht. Hierbei konnte erfolgreich festgestellt werden, dass sich beide Oligonukleotide mittels Amino-Modifikation immobilisieren lassen und mit höherer Konzentration auch ein höheres Fluoreszenz-Signal detektiert wurde. Die Immobilisierung des Aptamers lieferte dabei stets höhere Signale, da das Aptamer mit 61 Nukleotiden wesentlich länger ist als das cOligo (12 Nukleotide) und daher mehr SYBR-Green pro Oligonukleotid interkalieren kann (Ergebnisse unter 7.1).

Im Microarray-Format kann keine direkte Aptamer-OTA-Bindung untersucht werden, da das OTA weder fluoreszenz-markiert noch auf den Microarrays immobilisiert werden kann. Zwar besitzt das OTA eine Eigenfluoreszenz im UV-Bereich [91], diese kann jedoch nicht mit dem zur Verfügung stehenden GenePix-Analyzer ausreichend ausgewertet werden. Daher konnte die Aptamer-OTA-Bindung lediglich durch den TID-Mechanismus untersucht werden. Zuvor sollte jedoch die Hybridisierung von Aptamer und cOligo festgestellt werden. Dafür wurden auf beiden Oberflächenarten je Aptamer und cOligo immobilisiert und mit dem Cy5-markierten Bindungspartner inkubiert. Zu erwarten wäre ein Anstieg des Fluoreszenz-Signals mit steigender Konzentration des Cy5-markierten Bindepartners. Dieser Verlauf konnte auf 3D-Aldehyd-Slides festgestellt werden (Ergebnisse unter 7.2), der Versuchsaufbau wurde daraufhin auf Nitrozellulose übertragen.

Dafür wurden Amino-modifizierte Oligonukleotide aufgegeben und mit verschiedenen Konzentrationen der Cy5-markierten Bindungspartner inkubiert. Die Ergebnisse sind in

<sup>3</sup> Entwicklung Aptamer-basierter Microarrays zur Detektion von Ochratoxin A, Jasper Schrammel, 2018 [154]

Abbildung 17 dargestellt.

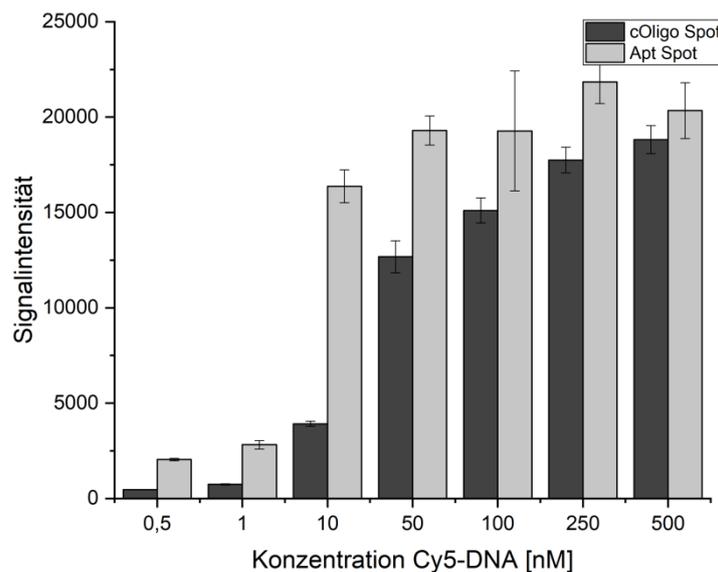


**Abbildung 17:** Hybridisierung von Aptamer (Apt) und cOligo auf Nitrozellulose-Slides. Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenz-Signalintensitäten. Aufgegebene Konzentrationen des NH<sub>2</sub>-Aptamers/ -cOligos: 25 µM. Cy5-DNA wurde in den Konzentrationen 0,5 – 500 nM zugegeben.

Auf Nitrozellulose-Slides war die Hybridisierung erfolgreich, mit zunehmender Cy5-DNA wurden höhere Fluoreszenz-Signale erhalten. Die höchsten Fluoreszenz-Signale konnten mit aufgegebenem cOligo und Cy5-Aptamer erzielt werden. Die Abnahme des Signals bei Verringerung der Cy5-Komponente ist deutlich zu erkennen. Bei den 3 höchsten Konzentrationen überwiegt auf Nitrozellulose (NZ) die Signalintensität des Cy5-cOligo gegenüber dem Aptamer. Der Signalabfall über die Konzentration ist beim Cy5-cOligo jedoch wesentlich stärker, sodass bei geringeren Konzentrationen die Signalintensität des Cy5-Aptamers überwiegt. Beide Oligonukleotide eignen sich somit für eine Immobilisierung auf der Nitrozellulose. Aufgrund der unterschiedlichen Sequenzlängen der Oligonukleotide und sterischen Hinderungen durch die Immobilisierung, kommt es zu den verschiedenen Signal-Verläufen.

Als dritte Immobilisierungsmöglichkeit wurde die Streptavidin-Biotin-Kupplung auf Nitrozellulose-Slides untersucht. Das tetramere Protein Streptavidin kann mit jeder der 4 Untereinheiten Biotin binden und die Bindungsstärke der Moleküle ähnelt einer kovalenten Bindung [108]–[110]. Mittels der Streptavidin-Biotin-Kupplung kann eine gerichtete Immobilisierung erreicht werden, für die Test- und Kontrolllinien von LFAs wird diese Immobilisierungsmethode oftmals eingesetzt [84]. Streptavidin wurde auf die

Nitrozellulose-Slides gegeben, nach Blockieren wurde der Slide mit biotinylierten Oligonukleotiden inkubiert, bevor die Inkubation mit der Cy5-Komponente erfolgte. Durch die Immobilisierung des Streptavidins auf der NZ 1 – 2 sollten Bindestellen unzugänglich sein. Durch ein äquimolares Verhältnis des Streptavidins und der biotinylierten Oligonukleotide wird gewährleistet, dass die Oligonukleotide nicht zu dicht immobilisiert und sterische Hinderungen unterbunden werden. Die Ergebnisse der Hybridisierung sind in Abbildung 18 dargestellt.



**Abbildung 18:** Hybridisierung mittels Streptavidin-Biotin-Kupplung auf Nitrozellulose-Slides. Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenz-Signalintensitäten. Aufgegeben wurden 10  $\mu\text{M}$  Streptavidin und mit 10  $\mu\text{M}$  Biotin-Aptamer (Apt)/ -cOligo inkubiert. Cy5-DNA wurde in den Konzentrationen 0,5 – 500 nM zugegeben.

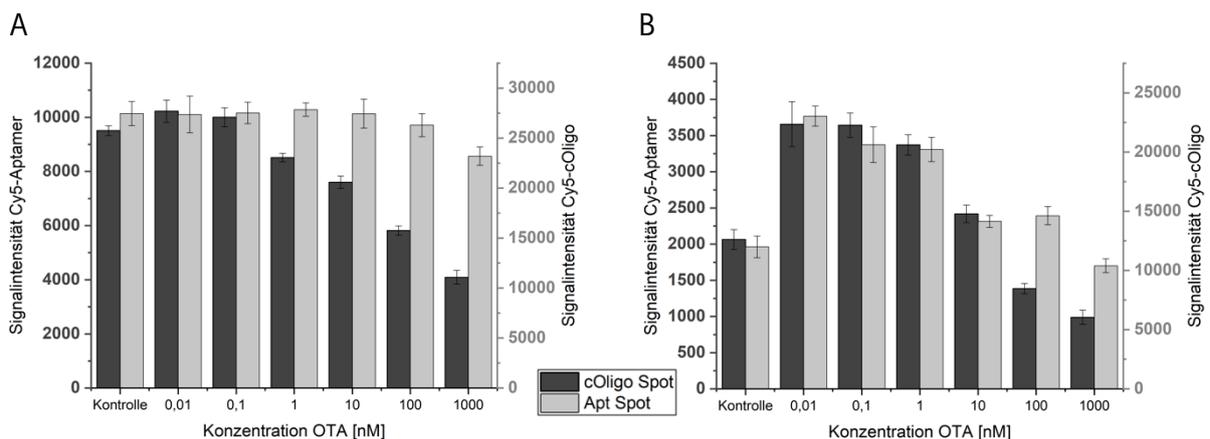
Die hier erreichten Signalintensitäten ähneln der Immobilisierung auf NZ ohne Streptavidin-Biotin-Kupplung. Jedoch hat hier bei allen eingesetzten Konzentrationen das Signal des Cy5-cOligos gegenüber dem des Cy5-Aptamers überwogen. Die Sättigung der immobilisierten Aptamere durch die Cy5-cOligos setzte bereits, nach starkem Signalanstieg von 1 nM auf 10 nM, bei 50 nM ein, beim Cy5-Aptamer ist der Beginn eines Plateaus erst ab 250 nM zu vermuten. Hier findet die größte Signalsteigerung von 10 nM auf 50 nM an. Die Hybridisierung des Cy5-Aptamers an das immobilisierte cOligo wird aufgrund der langen Sequenz erschwert, die großen Aptamere stoßen sich aufgrund der negativen Ladung gegenseitig ab. Freie Cy5-cOligos haben weniger sterische Hinderungen und können in dem „Netz“ langer immobilisierter Aptamersequenzen leichter binden. Eine Bindung des Cy5-Aptamers an das kurze immobilisierte cOligo ist dadurch bei geringen Konzentrationen

schwieriger und erst bei höheren Konzentrationen ähnlich erfolgreich, wie die Hybridisierung von Cy5-Oligos an immobilisierte Aptamere.

Auf beiden Oberflächen (3D-Aldehyd und NZ) erfolgte eine erfolgreiche Hybridisierung von Aptamer und cOligo. Da die spätere diagnostische Anwendung Nitrozellulose als Oberfläche verwenden soll, wurde für die weiteren Verdrängungsstudien auf Microarrays daher nur diese Oberfläche, mit beiden Immobilisierungsarten (direkt adsorbtiv und indirekt über Streptavidin), untersucht.

#### 4.1.3.2 Ermittlung der kompetitiven Bindung des Targets und cOligos an das Aptamer

Bei TID-Assays auf Microarrays wird ebenfalls ein Oligonukleotid auf der Oberfläche immobilisiert, während das andere Cy5-modifizierte Oligonukleotid sowie das Target (hier OTA) in Lösung vorliegen. Die in Lösung vorliegenden Komponenten wurden zeitgleich auf den Microarray aufgegeben und inkubiert. Mit zunehmender OTA-Konzentration wäre ein Signalabfall zu erwarten. Bei Cy5-markiertem Aptamer durch die Interaktion von Aptamer und OTA, wodurch weniger Aptamer am immobilisierten cOligo bindet. Andererseits beim Cy5-cOligo durch die Competition mit OTA und daraus resultierenden reduzierten Bindungsmöglichkeiten des cOligos an das immobilisierte Aptamer. Die Ergebnisse der Verdrängungsstudie für adsorptive Bindung sowie mit Streptavidin-Biotin-Kupplung sind in Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19:** Kompetitions-Assay auf Nitrozellulose-Slides. Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenz-Signalintensitäten. A: Gespottete Konzentrationen des NH<sub>2</sub>-Aptamers (Apt)/ cOligos: 25  $\mu$ M, behandelt mit 5 nM Cy5-DNA und 0,01 – 1000 nM OTA. B: Gespottet wurden 10  $\mu$ M Streptavidin, inkubiert mit 10  $\mu$ M Biotin-Aptamer/ -cOligo und 0,01 – 1000 nM OTA.

Es ist ersichtlich, dass durch die Zugabe von OTA ein geringeres Fluoreszenzsignal erhalten wurde. Jedoch wurde bei Streptavidin-Biotin-Kupplung der Kontrollwert ohne OTA von Proben mit geringer OTA-Konzentration überschritten. Hier kann ein Grund im Versuchsaufbau liegen: Die Gummidichtungen der Microarrays sollten die 16 Kammern voneinander abgrenzen, es kann jedoch passieren, dass Flüssigkeit in andere Kammern durch nicht ausreichende Dichtung passiert. Wenn OTA in die Kammer der Kontrolle gelangt, kann diese kontaminiert werden und verfälschte Ergebnisse liefern. Die Signalintensitäten bei adsorptiver Immobilisierung sind insgesamt höher als bei Immobilisierung mittels Streptavidin-Biotin-Kupplung. Das kann an der Dichte der immobilisierten Oligonukleotide auf der NZ liegen, da die aufgegebenen Konzentrationen nicht genau den immobilisierten entsprechen. Vor allem durch den zusätzlichen Bindungsschritt durch Streptavidin können hier mehr „Immobilisierungsverluste“ entstehen, durch Waschschrte vor Inkubation mit der Cy5-DNA wurden nicht-immobilisierte Oligonukleotide entfernt. Auffällig ist auch, dass sich die Signalintensitäten der Versuchsausrichtung teils stark unterscheiden. Bei adsorptiver Bindung ist das Signal der Cy5-cOligos fast 3-mal so hoch wie das des Cy5-Aptamers. Außerdem konnte mit dem Cy5-cOligo eine Verdrängung von über 50 % erreicht werden, mit dem Cy5-Apt hingegen nur um ca. 10 %. Diese Beobachtungen sind erneut durch die sterischen Hinderungen der langen Cy5-Aptamere im Vergleich zu den Cy5-cOligos zu erklären. Der Anteil gebundener Aptamere unterscheidet sich vermutlich bei Versuchsausrichtung: Bei immobilisierten Aptameren werden mehr Cy5-cOligos gebunden als Cy5-Aptamere an immobilisierte cOligos. Dadurch kann bei mehr verdrängten DNA-Molekülen ein größerer Signalunterschied erreicht werden.

Mit Streptavidin-Biotin-Kupplung waren die Signalintensitäten insgesamt geringer, für das Cy5-Apt ca. 75 % geringer und für das Cy5-cOligo nur etwas über 10 %, ebenfalls aufgrund der sterischen Hinderungen und Konzentrationsunterschiede der immobilisierten Moleküle. Von der Probe mit 0,1 nM OTA ausgehend, konnte mit 1  $\mu$ M OTA über 50 % des cOligos verdrängt werden, für beide Testausrichtungen (Abbildung 19B). Die Verdrängung des cOligos vom Aptamer war über Streptavidin-Biotin-Kupplung mit Cy5-markiertem cOligo wesentlich erfolgreicher als mit adsorptiver Immobilisierung. Gründe dafür können sterische Hinderungen sein. Bei der adsorptiven Bindung liegt das Aptamer eher planar auf der NZ, bei der Streptavidin-Biotin-Kupplung hat es eine größere Distanz zur NZ und liegt aufgerichtet vor, wodurch die korrekte Faltung zur Ausbildung des G-Quadruplex zur OTA-

Bindung erleichtert wird. Die Ausrichtung der Oligonukleotide sollte mittels Streptavidin-Biotin-Kupplung aufgrund des äquimolaren Verhältnisses für ausreichend Freiraum zwischen den Oligonukleotiden sorgen, zusätzlich sorgt das Streptavidin für weiteren Abstand und ermöglicht eine gerichtete Immobilisierung.

Abschließend ist festzuhalten, dass die Hybridisierung von Aptamer und cOligo auf Microarrays erreicht werden konnte und weiterhin durch Zugabe von OTA ein erfolgreicher TID-Assay durchgeführt wurde. Dieser kann mit beiden Oligonukleotid-Ausrichtungen vergleichbar erfolgreich durchgeführt werden, wenn als Immobilisierungsmethode die Streptavidin-Biotin-Kupplung verwendet wird. Beim späteren Aufbau eines LFA sollten beide Immobilisierungsmethoden parallel untersucht werden, da durch die Zusatzkomponente Gold-Nanopartikel und den erweiterten Testaufbau die Komplexität zunimmt.

Zur weiteren Entwicklung des diagnostischen Assays wurden im nächsten Kapitel die Gold-Nanopartikel hergestellt und später mit den Oligonukleotiden modifiziert.

## 4.2 Herstellung und Charakterisierung von Gold-Nanopartikeln

Gold-Nanopartikel (AuNP) kommen schon seit langem als optische Signalgeber in der Diagnostik zum Einsatz. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Oligonukleotide daran konjugiert werden und ein Aptamer-basierter LFA entwickelt werden. Zunächst sollte die Herstellung von AuNP erfolgen, dabei wurde sich für die chemische bottom-up Methode mit Natriumcitrat entschieden. Diese findet in der Literatur zahlreiche Verwendungen und liefert stabile AuNP mit recht homogener Größenverteilung. Es gibt jedoch unterschiedliche Synthese-Parameter bei dieser Methode, die bezüglich der resultierenden Größe und Stabilität der AuNP verglichen wurden. Es sollten AuNP mit einer Größe zwischen 10 und 20 nm, einer homogenen Größenverteilung und hoher Stabilität hergestellt werden. Zusätzlich sollten die AuNP leicht mit Oligonukleotiden zu modifizieren sein.

### 4.2.1 Synthese von Gold-Nanopartikeln

Die bottom-up Methode ist eine keim-vermittelte Methode, bei der die AuNP aus Zusammenschlüssen einzelner Au-Atome „wachsen“. Als Gold-Vorläufer wird Tetrachlorogoldsäure ( $\text{HAuCl}_4$ ) eingesetzt. Das 2. Edukt ist Natriumcitrat, das als Reduktionsmittel, Stabilisator und Puffer fungiert. Durch Erhitzen bis zum Siedepunkt

( $\sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) und einer folgenden Temperatur von  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  findet die AuNP-Synthese statt. Die zuerst publizierte chemische Synthese von Citrat-stabilisierten AuNP von Turkevich *et al.* [35] findet mit nur einer Zugabe der Edukte statt, Bastús *et al.* [36] haben bei der Methodik durch wiederholte Zugaben der Edukte ein konstantes Wachstum der AuNP erwirkt und dadurch eine gezielte Einstellung der Größe der resultierenden AuNP ermöglicht.

#### 4.2.1.1 Synthese von Citrat-stabilisierten AuNP nach Turkevich *et al.*

Für die Methode nach Turkevich *et al.* wurde nach dem Sieden einer  $\text{HAuCl}_4$ -Lösung Natriumcitrat zugegeben. Nach wenigen Sekunden war ein Farbumschlag der gelblichen Lösung über farblos zu dunkelrot, der charakteristischen Farbe von AuNP, zu erkennen. Die abgekühlten AuNP wurden nach der Synthese kühl und lichtgeschützt gelagert. In Abbildung 20 ist ein UV-Vis-Spektrum der AuNP dargestellt, Charakteristika werden hieran erläutert.

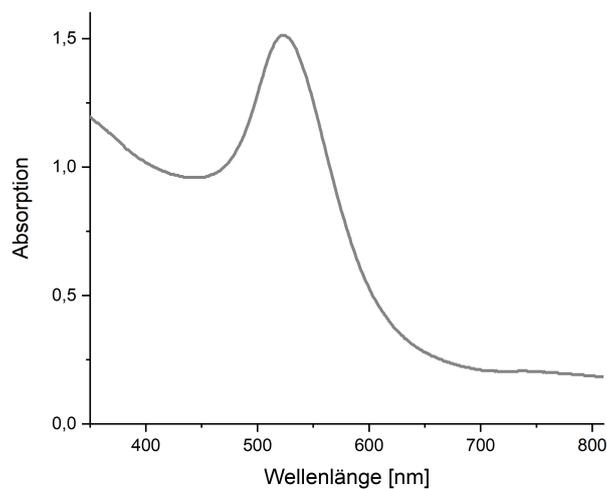


Abbildung 20: UV-Vis Spektrum von Citrat-stabilisierten AuNP nach Turkevich *et al.*

Im UV-Vis-Spektrum ist ein lokales Minimum bei ca.  $450\text{ nm}$  zu erkennen, danach folgt das Maximum um  $520\text{ nm}$  sowie ein starker Absorptionsabfall, der sich asymptotisch einem Minimum nahe 0 annähert. Damit weist das Spektrum einen typischen Verlauf für AuNP auf. Mit zunehmender Größe der AuNP verschiebt sich das Maximum nach rechts (bis zu über  $600\text{ nm}$  [36]), das Maximum der hergestellten AuNP liegt bei  $523\text{ nm}$  und lässt daher auf AuNP einer Größe zwischen  $10 - 30\text{ nm}$  schließen [111]. Bei stabilen AuNP sollte ein starker Signalabfall nach dem Maximum erfolgen, ein schwacher Abfall deutet auf Instabilität und Agglomeration hin. Die synthetisierten AuNP weisen einen starken

Absorptionsabfall, und somit ein Indiz für ein homogenes Kolloid ohne AuNP-Agglomerate, auf [112]. Weitere Analysen der AuNP sind unter 4.2.2 aufgeführt.

#### 4.2.1.2 Synthese Citrat-stabilisierter AuNP mit wiederholter Zugabe der Edukte

Als zweite Methode der AuNP-Synthese wurde die wiederholte Zugabe der Edukte durchgeführt. Hierbei wurde mehrfach Natriumcitrat und Tetrachlorogoldsäure zugegeben und die Temperatur konstant bei 90 °C gehalten. Durch Absenken der Temperatur unterhalb des Siedepunktes wird die sekundäre Keimbildung reduziert und das Partikelwachstum begünstigt. Das bedeutet zugegebene Gold-Atome bilden keinen neuen „Kern“ für AuNP aus, sondern fügen sich an bereits bestehende, kleine AuNP an und somit „wachsen“ die Gold-Atom-Zusammenschlüsse der Anfangslösung konstant. Durch Anzahl der Zugabe-Zyklen kann die Partikelgröße somit gezielt beeinflusst werden. Damit sich der pH-Wert des Syntheseansatzes durch die mehrmalige Zugabe von  $\text{HAuCl}_4$  nicht ins Saure verschiebt, ist zusätzliches Natriumcitrat nötig. [36] Im Rahmen dieser Arbeit wurden AuNP mit verschiedene Zugabe-Zyklen getestet, für stabile AuNP haben sich dabei 3 Zyklen bewährt<sup>4</sup>. Ein UV-Vis Spektrum der AuNP nach 3 Zyklen ist in Abbildung 21 dargestellt.

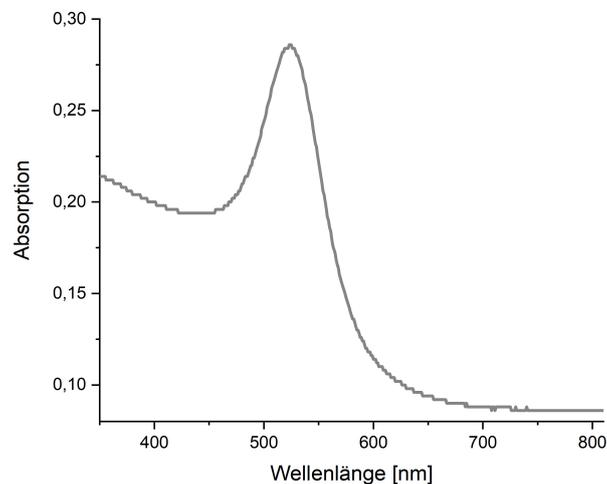


Abbildung 21: UV-Vis Spektrum von Citrat-stabilisierten AuNP mit dreimaliger Zugabe der Edukte.

<sup>4</sup> Dieses Ergebnis wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Jenny Irwan erhalten. „Synthese und Modifikation von Gold-Nanopartikeln“, 2018 [155].

Das UV-Vis-Spektrum weist die gleichen Extrempunkte auf, wie das der AuNP mit nur einer Edukt-Zugabe. Das Maximum liegt mit 524 nm minimal höher, die AuNP dieser Synthese scheinen daher geringfügig größer zu sein. Der Absorptionsabfall nach 520 nm ist bei diesem Spektrum etwas stärker als zuvor und suggeriert eine stabile, Agglomerat-arme Dispersion. Die Absorption der AuNP ist insgesamt niedriger, was auf eine geringere Konzentration der AuNP hinweist. Die Analyse mit zusätzlichen Methoden erfolgt im nächsten Abschnitt.

#### 4.2.2 Charakterisierungen der synthetisierten AuNP

Mit den 2 durchgeführten Synthesemethoden konnten AuNP hergestellt werden, die unterschiedlichen UV-Vis-Spektren deuten dabei auf verschieden große AuNP hin. Die Größe der Partikel kann zum einen anhand des Spektrums ermittelt werden, eine genaue Größenbestimmung erfolgt weiterhin mittels Rasterelektronenmikroskopie. Zur späteren Analyse von funktionalisierten AuNP soll in diesem Kapitel ebenfalls die AuNP-Konzentration berechnet werden.

##### 4.2.2.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Eine genaue Bestimmung der Größe und auch Form von Nanopartikeln wird klassisch über Elektronenmikroskopie, Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) oder Raster-Elektronenmikroskopie (REM), durchgeführt. Für diese Arbeit wurden die AuNP mittels REM analysiert und die Größe anhand der Aufnahmen in Abbildung 22 bestimmt.

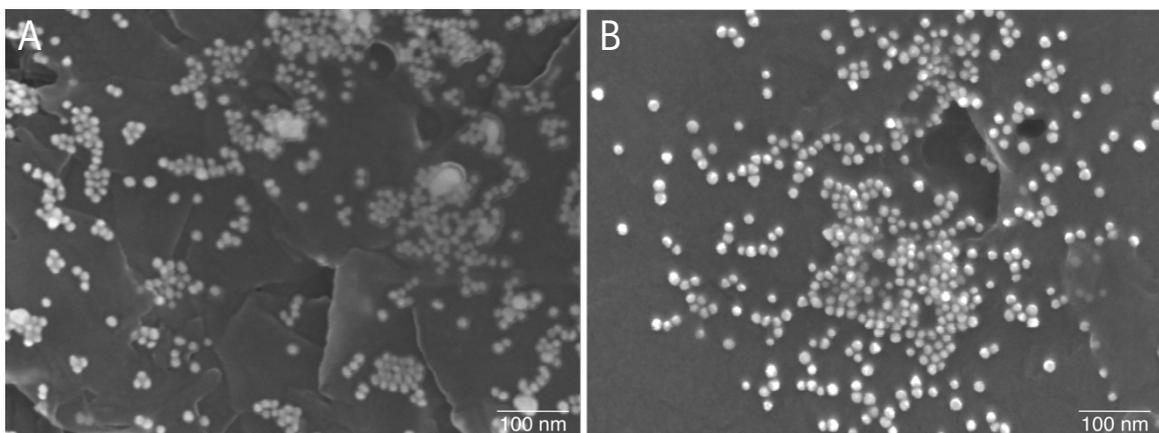


Abbildung 22: REM-Aufnahmen von AuNP. A: Citrat-stabilisierte AuNP mit einer Edukt-Zugabe nach *Turkevich et al.*, B: Citrat-stabilisierte AuNP mit dreimaliger Edukt-Zugabe.

Mithilfe von ImageJ wurde die Größe anhand von 20 einzelnen AuNP bestimmt, die AuNP mit nur einer Edukt-Zugabe sind  $13 \text{ nm} \pm 1,65 \text{ nm}$  groß und entsprechen den Angaben in der Literatur [6], [35], [70]. Die AuNP mit dreimaliger Edukt-Zugabe sind größer, bestimmt wurde hier eine Größe von  $17,4 \text{ nm} \pm 1,6 \text{ nm}$ . Auf den Aufnahmen ist weiterhin zu erkennen, dass die meisten AuNP eine runde Form haben, selten etwas oval oder eckig. Jedoch liegen die AuNP unterschiedlich vereinzelt oder in kleineren Agglomeraten vor. Die AuNP mit dreimaliger Edukt-Zugabe liegen größtenteils vereinzelt vor und wenn sie nahe an anderen AuNP sind, kann man dennoch deutlich die Konturen der einzelnen AuNP erkennen. Die AuNP mit einer Edukt-Zugabe hingegen weisen einige Agglomerate auf, bei denen auch keine AuNP-Konturen mehr erkennbar sind. Insgesamt weisen die AuNP mit dreimaliger Edukt-Zugabe eine homogenere Form und Größe auf, wohingegen die AuNP mit einer Edukt-Zugabe teilweise auch in kleinen Agglomeraten vorliegen können. Die Beobachtung der Agglomerat-Bildung wird zusätzlich durch das UV-Vis-Spektrum unterstützt. Das Spektrum der AuNP mit einer Edukt-Zugabe zeigt einen etwas schwächeren Absorptionsabfall nach dem Maximum als das der AuNP mit dreimaliger Edukt-Zugabe, diese leichte Flankenbildung kann auf Agglomerate hindeuten.

Da nicht von jeder AuNP-Charge REM-Aufnahmen zur Größenbestimmung angefertigt werden konnten, wurden weitere Methoden zur Bestimmung herangezogen, mit denen jede neue Charge überprüft wurde.

#### 4.2.2.2 UV-Vis-Analyse

Anhand des UV-Vis Spektrums kann nach Haiss *et al.* [111] neben der AuNP-Größe auch die Konzentration der AuNP-Dispersion bestimmt werden. Diese Berechnungen basieren auf dem Verhältnis der Absorptionssignale des Maximums sowie bei 450 nm und sie wurden in Tabelle 1 angewendet.

Tabelle 1: UV-Vis Charakteristika von Citrat-stabilisierten AuNP.

	Eine Edukt-Zugabe	dreimalige Edukt-Zugabe	
SPR Maximum [nm]	523	524	
$A_{\max}$	1,51	1,11	
$A_{450}$	0,96	0,67	
$A_{\max} / A_{450}$	1,575	1,67	
Größe [nm]	~ 12	~ 17	mittels Verhältnis $A_{\max} / A_{450}$ [111]
E	$1,09 \cdot 10^8$	$3,24 \cdot 10^8$	aus [111]
Konzentration [nM]	35,3	2,1	( $A_{450} / \epsilon$ )

Für die AuNP mit einer Edukt-Zugabe wurde mittels UV-Vis-Spektrum eine Größe von ca. 12 nm berechnet, für die AuNP mit dreimaliger Edukt-Zugabe ca. 17 nm. Diese Größen stimmen mit denen der REM-Aufnahmen (13 und 17,4 nm) überein. Weiterhin befand sich das Maximum der AuNP mit einer Edukt-Zugabe bei 523 nm, das der AuNP mit dreimaliger Edukt-Zugabe bei 524 nm. Je größer die AuNP, desto mehr verschiebt sich das Maximum zu höheren Wellenlängen. Desweiterem wurde die Konzentration der AuNP berechnet, die für beide AuNP-Varianten im nanomolaren Bereich lag, die der AuNP mit einer Edukt-Zugabe ist jedoch um ein Vielfaches höher. Dieser Konzentrationsunterschied resultiert aufgrund der unterschiedlichen Synthesen und wurde als nächstes genauer untersucht.

#### 4.2.2.3 Berechnungen der AuNP-Konzentration

Da die Größe der synthetisierten AuNP durch REM ermittelt wurde und die UV-Vis-Spektroskopie diese Größe bekräftigen, konnte die Anzahl der Gold-Atome pro Nanopartikel errechnet werden. Die hier gezeigte Berechnung bezieht sich auf die AuNP, welche mit dreimaliger Edukt-Zugabe synthetisiert wurden. Für die AuNP mit einer Edukt-Zugabe sind die berechneten Ergebnisse vergleichend in Tabelle 2 zu finden. Anhand des UV-Vis-Spektrums ist eine Konzentrations-Berechnung möglich (siehe Tabelle 1), diese wird mit der eingesetzten Au-Menge für die Synthese abgeglichen.

Die Konzentration an Au-Atomen wurde mit Formel (1) berechnet:

$$c_{Au} = \frac{c_{HAuCl_4} \cdot V_{HAuCl_4}}{V_{Au}} \quad (1)$$

Wobei  $V_{HAuCl_4}$  = eingesetztes Volumen von  $HAuCl_4$  für die AuNP-Synthese und  
 $V_{Au}$  = finales Volumen des Syntheseansatzes.

Damit ergibt sich:  $c_{Au} = \frac{25 \text{ mM} \cdot 0,0013 \text{ L}}{0,0528 \text{ L}} = 0,63 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Zur Berechnung wie viele Au-Atome sich in einem AuNP befinden, wird das Modell von Leff *et al.* [113], [114] für eine quasi-kugelförmige AuNP-Form herangezogen.

$$N_{Au} = \frac{4\pi r^3}{3V_{Au}} = \frac{\pi D^3}{102} \quad (2)$$

Dabei ist  $r = 87 \text{ \AA}$ , der Radius eines AuNP mit 17,4 nm Durchmesser und  
 $D = 174 \text{ \AA}$ , der Durchmesser eines AuNP. Weiterhin ist  
 $V_{Au} = 17 \text{ \AA}^3$ , das Volumen eines Au-Atoms [113].

Damit bilden nach Formel (2) 162.255 Au-Atome einen AuNP.

Die Konzentration der synthetisierten AuNP ( $c_{AuNP}$ ) errechnet sich schließlich durch Division von  $c_{Au}$  und  $N_{Au}$  in Formel (3), dabei wird angenommen, dass alle eingesetzten Gold-Atome AuNP bilden.

$$c_{AuNP} = \frac{c_{Au}}{N_{Au}} = \frac{0,63 \text{ mM}}{162.255} = 0,388 \cdot 10^{-6} \text{ mM} = 3,88 \text{ nM} \quad (3)$$

In Tabelle 2 sind die berechneten Ergebnisse für die zwei verschiedenen synthetisierten AuNP dargestellt.

Tabelle 2: Berechnung der AuNP-Zusammensetzung für beide Synthesarten.

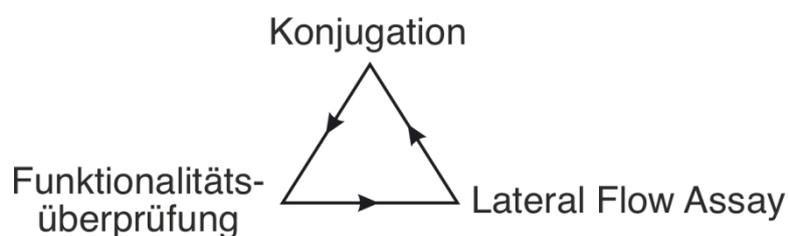
	eine Edukt-Zugabe	dreimalige Edukt-Zugabe
Größe [nm]	13	17,4
Konzentration „Au“ in Syntheseansatz [mmol]	0,9	0,63
Au-Atome pro AuNP	67.667	162.255
Konzentration AuNP (berechnet) [nM]	13,4	3,9
Konzentration AuNP (nach UV-Vis) [nM]	35,3	2,1

In den 17,4 nm großen AuNP sind 2,4mal so viele Au-Atome enthalten wie in den 13 nm großen AuNP. Da für die Synthese der kleineren AuNP mehr  $HAuCl_4$  eingesetzt wurde (höhere Konzentration), resultiert für die 13 nm AuNP eine Konzentration von 13,4 nM, für

die 17,4 nm AuNP hingegen nur 3,9 nM. Die mittels UV-Vis bestimmte Konzentration ist bei den 17,4 nm AuNP um fast die Hälfte geringer, bei den 13 nm AuNP jedoch um mehr als das doppelte höher. Eine so hohe Konzentration kann nach den Berechnungen nicht möglich sein. Da aber auch nur mit Näherungen die Zusammensetzung der AuNP berechnet wurde, kann es zu Abweichungen kommen. Für weitere Berechnungen in dieser Arbeit werden der Einfachheit halber die berechneten Konzentrationen verwendet und damit wird von einer vollständigen Synthese der Au-Atome zu AuNP ausgegangen. Für alle weiteren Versuche dieser Arbeit wurden AuNP mit dreimaliger Edukt-Zugabe gewählt, da diese eine homogenere Form-Verteilung sowie eine höhere kolloidale Stabilität aufweisen.

### 4.3 Funktionalisierung von Gold-Nanopartikeln mit Oligonukleotiden

In vorherigen Kapiteln wurde die Bindung eines Aptamers an sein Target sowie ein TID-Mechanismus mit einem komplementären Oligonukleotid untersucht. Außerdem wurden AuNP synthetisiert und charakterisiert. Die folgenden Kapitel behandeln die Funktionalisierung der AuNP mit den Aptameren bzw. Oligonukleotiden. Die Anwendbarkeit der funktionalisierten Partikel wird mit der in Abschnitt 4.1.2.3 und 4.1.3.2 vorgestellten TID-Reaktion untersucht. Bei dem Entwicklungsprozess des finalen Lateral Flow Assays werden verschiedene Prozessschritte parallel in einem iterativem Prozess untersucht (Abbildung 23), um den Prozess zu optimieren. Für die Funktionalisierung der AuNP wird fortan der Begriff „Konjugation“ verwendet.



**Abbildung 23:** Prozess zur Entwicklung eines Lateral Flow Assays. Beginn bei Konjugation, anschließende Funktionalitätsüberprüfung und Übertragung auf den Lateral Flow Assay. Aufgrund unzureichender Ergebnisse bei der Funktionalitätsüberprüfung und des Lateral Flow Assays, wurde die Konjugation weiter untersucht und optimiert.

Im Folgenden wird zuerst die Optimierung der Konjugation aufgezeigt, danach folgt die Funktionalitätsüberprüfung und schließlich der Aufbau und die Optimierung des Lateral Flow Assays.

### 4.3.1 Optimierung der Konjugation

Eine Herausforderung bei der Konjugation von AuNP mit Oligonukleotiden besteht darin, dass beide negativ geladen sind. AuNP sind aufgrund der Synthese mit negativ geladenen Citrat-Molekülen besetzt und DNA hat ein negativ geladenes Rückgrat. Nukleinbasen besitzen jedoch vorteilhafterweise eine natürliche Affinität zur Gold-Oberfläche [6], [66]. Diese resultiert aus den Amino-Gruppen und Sauerstoff-Atomen der Purine und Pyrimidine. Adenin hat die höchste Affinität zu Gold und Thymin die geringste [65]. Um die Bindungsaffinität eines Oligonukleotids zu erhöhen, werden Oligonukleotide meist mit einer Thiol-Gruppe (SH) modifiziert, da Schwefel eine hohe Affinität zu Gold hat (chemisorptive Bindung) und eine gerichtete Konjugation ermöglicht [63], [70], [115]. Zur Überwindung der elektrostatischen Wechselwirkungen der negativen Ladungen werden häufig Salze wie NaCl oder MgCl<sub>2</sub> bei der Konjugation eingesetzt [6], [72].

Eine der ersten Konjugationsmethoden, das „Salt aging“, wird seit ihrer Veröffentlichung im Jahr 2006 erfolgreich verwendet und individuell optimiert [72]. Weitere Konjugationsmethoden beruhen auf einer pH-Erniedrigung [70] oder benötigen keine zusätzlichen Reagenzien sondern das Einfrieren des Konjugationsansatzes [73]. In diesem Kapitel werden die drei angesprochenen Methoden verglichen und die jeweiligen Vor- und Nachteile herausgearbeitet.

Zusätzlich wurden beide Ausrichtungsmöglichkeiten des Assays untersucht, d.h. die Konjugation des Aptamers auf AuNP und ebenso die Konjugation des cOligos. Dafür wurden die Oligonukleotide mit einer Thiol-Gruppe am 5'-Ende versehen, da nahe am 3'-Ende die Sequenzbereiche für die Target-Bindung sowie Hybridisierung liegen und diese somit frei zugänglich bleiben. Weiterhin wurde die Verwendung eines Spacers untersucht, der zwischen der Thiol-Gruppe und den Nukleotiden angebracht ist, um sterische Hinderungen zu verringern und mehr Faltungsflexibilität durch eine längere Sequenz zu gewährleisten. Der gewählte Spacer besteht aus 25 Adenin-Nukleotiden (A<sub>25</sub>), da seine Verwendung aufgrund der Adenin-Gold-Affinität vorteilhaft ist [6], [70].

Folgende Parameter wurden für alle Konjugationsparameter konstant gehalten:

- Die AuNP wurden unbehandelt eingesetzt, d.h. der direkte Syntheseansatz verwendet.

- Thiol-Oligonukleotide wurden zu den AuNP gegeben und der Konjugationsansatz sofort durchmischt.
- Nach Beendigung der Konjugation wurde der Konjugationsansatz zentrifugiert, der klare Überstand abgenommen und das Konjugat-„Pellet“ zweimal mit optimiertem Puffer (siehe 4.3.1.1) resuspendiert und zentrifugiert. Nach der letzten Überstands-Abnahme wurde das Pellet nicht erneut resuspendiert, sodass final eine Aufkonzentrierung der AuNP-Konjugate erfolgt.

#### 4.3.1.1 Konjugation mittels pH-Erniedrigung

Diese Konjugationsmethodik basiert auf der Erniedrigung des pH-Werts, wodurch die negativen Ladungen der Nukleotide ausgeglichen bzw. protoniert und elektrostatische Abstoßungen verringert werden [70]. Dadurch kann die Konjugation der Oligonukleotide auf AuNP mittels Thiol-Gruppe in kurzer Zeit erreicht werden. AuNP und Oligonukleotide werden über Nacht inkubiert, bevor durch Natriumcitratpuffer ein pH-Wert von 3 eingestellt wird. Zum einen verhilft die Protonierung der Basen zur Überwindung der repulsiven Kräfte, zum anderen neutralisieren die Natrium-Ionen die DNA und vermindern die Kräfte zusätzlich. Der niedrige pH-Wert wird nur für wenige Minuten beibehalten, bevor der Konjugationsansatz zentrifugiert wird. Der A<sub>25</sub>-Spacer sollte sich positiv auswirken, da Adenin von den 4 DNA-Basen die höchste Affinität zur Gold-Oberfläche hat. Durch Ausgleichen bzw. ein Verringern der Negativität mittels pH-Änderung wird die Anlagerung der Oligonukleotide mit affinen Adeninen zusätzlich begünstigt [6], [116].

Folgende Parameter wurden für die pH-Erniedrigung untersucht und optimiert:

- a. DNA-Konzentration
- b. Volumen bzw. Salzkonzentration des Natriumcitratpuffers
- c. Inkubationszeiten vor und nach Zugabe des Natriumcitratpuffers
- d. Resuspensionspuffer für die Konjugate

Bei der Optimierung der Konjugation wurde die Konjugat-Lösung zunächst nach optischen Merkmalen bewertet. Da bei jeder Konjugationsmethode reine AuNP bei gleicher Behandlung (hier: Verringerung des pH-Werts) agglomerieren, weist eine rote Farbe des Konjugats auf eine erfolgreiche Konjugation hin. Zur weiteren Optimierung wurden UV-Vis-

Analysen und eine Größenbestimmung mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) durchgeführt. Zu Beginn wurde das Thiol-modifizierte OTA-bindende Aptamer zur Konjugation verwendet (Durchführung unter B.6.1 beschrieben).

#### **a. DNA-Konzentration**

Zunächst wurde die nötige DNA-Konzentration untersucht, dies geschah im Rahmen der Bachelorarbeit von Corinna Brandt<sup>5</sup>. Laut Autoren der Konjugationsmethode sollen 3  $\mu\text{M}$  DNA verwendet werden [70]. Da jedoch gerade die SH-modifizierten Oligonukleotide einen maßgeblichen Kostenfaktor für LFAs darstellen, wurden verschiedene Konzentrationen getestet: 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  sowie 4  $\mu\text{M}$ . Bei Verwendung von 0,5  $\mu\text{M}$  DNA waren die Konjugate nur schwach rot und enthielten ein schwarzes Pellet. Die Konjugate mit 1, 2 oder 4  $\mu\text{M}$  DNA wiesen alle eine vergleichbare rote Färbung auf, sodass für weitere Versuche zunächst aus Kostengründen die niedrigste Konzentration (1  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt wurden.

#### **b. Volumen bzw. Konzentration des Natriumcitratpuffers**

Zur Überprüfung, ob die zugegebene Menge des Natriumcitratpuffers zur Neutralisation der DNA-Ladung ausreicht oder mehr Salz-Ionen die Konjugation begünstigen, wurde das dreifache Volumen des Natriumcitratpuffers zur Konjugation zugegeben. Die Konjugation war zwar anhand der roten Farbe erfolgreich, wies aber keine Verbesserung auf, sodass zugunsten der Aptamer-Stabilität und -Konformation das ursprüngliche Volumen des Puffers beibehalten wurde.

#### **c. Inkubationszeiten vor und nach Zugabe des Natriumcitratpuffers**

Die Konjugationsmethode beinhaltet zwei Inkubationszeiten: Nach Mischen von AuNP und DNA (1.) sowie nach Zugabe des Natriumcitratpuffers (2.). Üblicherweise beträgt die 1. Inkubationszeit 16 h und die 2. 20 min. Eine Verkürzung des 1. Inkubationsschritts war nicht vorteilhaft, sondern führte zu mehr Agglomeraten. Eine Veränderung des 2. Inkubationsschritts war ebenfalls nicht förderlich: eine Verkürzung auf 3 min führte zur

<sup>5</sup> „Entwicklung eines Aptamer-basierten Lateral Flow Assays zur Detektion von Ochratoxin A“, Corinna Brandt, 2019 [156]

ineffizienteren Konjugation, ebenso wie eine Verlängerung auf mehrere Stunden. Die analytischen Daten dieser Konjugate sind unter 7.3 zu finden.

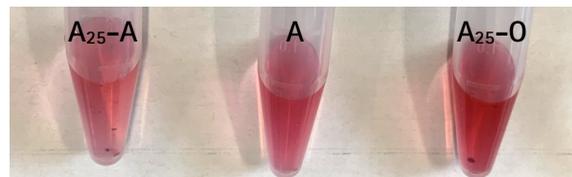
#### d. Resuspensionspuffer der Konjugate

Als Resuspensionspuffer wurde anfangs ddH<sub>2</sub>O verwendet. Die Verwendung des Bindepuffers (A.3) des Aptamers wäre vorteilhaft, damit alle nötigen Ionen für eine korrekte Aptamerfaltung vorhanden sind, um eine spätere Target-Bindung gewährleisten zu können. Saccharose ist ein häufiger Zusatz für Konjugate [117], [118] und wurde auch daher mit einer Konzentration von 2 % im Resuspensionspuffer getestet. Zur Stabilisation und Funktionalitätsgewährleistung der Konjugate wurde daher die Zugabe von Saccharose sowie des Bindepuffers untersucht. Der Einsatz des Bindepuffers war zunächst nicht erfolgreich, nur bei starken Verdünnungen auf 5 – 10 % Bindepuffer trat keine Agglomeration der Konjugate aufgrund der Salinität auf. Eine zugesetzte Saccharose-Konzentration von 2 % konnte die Stabilität bei Einsatz des Bindepuffers nicht optimieren. Mit den im verdünnten Bindepuffer resuspendierten Konjugaten konnten erfolgreiche Hybridisierungen auf Lateral Flow Assays erreicht werden. Kompetitive Verdrängungen durch das Target OTA konnte jedoch nicht erreicht werden. Daher wurde untersucht, ob der Bindepuffer um störende Komponenten reduziert und dadurch mit höherer Konzentration eingesetzt werden kann, um die ideale Aptamer-Konformation zu gewährleisten und die OTA-Bindung zu erleichtern bzw. ermöglichen. Der Bindepuffer beinhaltet die Salze NaCl, KCl sowie CaCl<sub>2</sub>. Monovalente Ionen wie Na<sup>+</sup> und vor allem K<sup>+</sup> stabilisieren G-Quadruplexe durch eine zentrale Bindung in der Struktur [24], [119]. Zwar zeigen Ergebnisse der CD-Spektrometrie die Target-Bindung des Aptamers in Abwesenheit von Kalium [120], jedoch trägt die Anwesenheit des Targets maßgeblich zur Bildung des G-Quadruplex bei. Um eine effiziente G-Quadruplex Bildung auf dem LFA zu gewährleisten, sollten die monovalenten Ionen daher zur Resuspension beibehalten werden. Zweiwertige Ionen wie Ca<sup>2+</sup> können die AuNP-Stabilität negativ beeinflussen und Aggregation hervorrufen [66], [121], [122]. Daher wurde das Konjugat in Bindepuffer ohne CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Hierbei konnte 100 % Bindepuffer mit 2 % Saccharose eingesetzt werden, ohne die Stabilität der Konjugate zu beeinträchtigen.

Durch den Einsatz des Bindepuffers ohne  $\text{CaCl}_2$  und Saccharose konnten stabile Konjugate erhalten werden. Als nächstes wurden mit dieser Methodik die Konjugationen folgender Oligonukleotide verglichen:

- SH-Aptamer (A) → 61 Nukleotide
- SH- $A_{25}$ -Aptamer ( $A_{25}$ -A) → 86 Nukleotide
- SH- $A_{25}$ -cOligo ( $A_{25}$ -O) → 37 Nukleotide

Aufgrund der kurzen Sequenz (12 Nukleotide) des cOligos wurde ein  $A_{25}$ -Spacer eingebaut. Dadurch kann gewährleistet werden, dass die komplementären Basen des konjugierten cOligos zur Hybridisierung mit dem Aptamer zugänglich sind und sterische Hinderungen aufgrund direkter AuNP-Nähe und benachbarter cOligos vermindert werden. Abbildung 24 zeigt die resuspendierten Konjugate mit charakteristischer Rotfärbung.



**Abbildung 24:** Konjugate nach pH-Erniedrigung. Nach 1. Zentrifugation resuspendiert in Bindepuffer ohne  $\text{CaCl}_2$  mit 2 % Saccharose (siehe A.3).

Die Konjugate A und  $A_{25}$ -O waren deutlich rot und wiesen nur ein kleines schwarzes Agglomerat auf,  $A_{25}$ -A hingegen war blasser rot und verfügte über mehr Agglomerate. Diese optischen Merkmale implizieren für  $A_{25}$ -A eine weniger effiziente Konjugation als für die anderen beiden Oligonukleotide. Für alle Konjugate wurde anschließend eine UV-Vis- und DLS-Analytik durchgeführt.

### Analytik der Konjugate mittels pH-Erniedrigung

Die Konjugate wurden mithilfe verschiedener Methoden analysiert. Anhand eines UV-Vis-Spektrums erfolgte ein Vergleich der Konzentrationen sowie der kolloidalen Stabilität der Konjugate (siehe Tabelle 4). Mithilfe der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) wurde der hydrodynamische Durchmesser ( $\emptyset$  [nm]) und der Polydispersitätsindex (PDI [%]) bestimmt, ein Indikator für die Mono- oder Polydispersität der Konjugate [123].

Für die Auswertung des hydrodynamischen Durchmessers wurde zunächst die theoretische Größe der Konjugate berechnet. Mittels REM konnte die Größe der AuNP auf 17,4 nm

bestimmt werden. Die theoretische Länge der Oligonukleotide wird mittels Multiplikation von Nukleotidanzahl und Nukleotidgröße (ca. 0,34 nm) bestimmt. Diese Länge multipliziert mal 2, addiert mit der Größe des AuNP [124], ergibt den theoretisch maximal möglichen Durchmesser eines konjugierten AuNP, bei welchem die Oligonukleotide vollständig gestreckt und nicht gefaltet vorliegen. Diese berechneten Durchmesser können jedoch nur als Näherung herangezogen werden, da die Hydrathülle nicht einberechnet ist. Die Partikel-Durchmesser sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Berechnete Durchmesser von Konjugaten bei unterschiedlichen Oligonukleotiden. Die verwendeten AuNP sind 17,4 nm groß.

Oligonukleotid	Nukleotidanzahl	Sequenzlänge [nm]	berechneter Durchmesser der Konjugate [nm]
A	61	21	~ 60
A <sub>25</sub> -A	86	30	~ 78
A <sub>25</sub> -O	37	13	~ 44

Der mittels DLS bestimmte hydrodynamische Durchmesser beinhaltet die Hydrathülle eines konjugierten AuNP, der durch die negativen Ladungen der Oligonukleotide und die Sequenzlängen beeinflusst wird. Für das Bestimmen des hydrodynamischen Durchmessers beim DLS wird der Diffusionskoeffizient bestimmt, der sowohl von der Masse, der Form sowie der Oberflächenbeschaffenheit des Partikels abhängt [125]. Daher sollte der mittels DLS bestimmte hydrodynamische Durchmesser etwas größer sein als der Partikeldurchmesser [123], [125]. Die Ergebnisse der analytischen Messungen sind in Tabelle 4 dargestellt (Durchführung des DLS unter B.5.3.2).

Tabelle 4: Analytik der Konjugate nach pH-Erniedrigung. Konjugate A, A<sub>25</sub>-A und A<sub>25</sub>-O. Analytische Daten von AuNP sind ebenfalls aufgeführt.

	A	A <sub>25</sub> -A	A <sub>25</sub> -O	AuNP
SPR Maximum [nm]	526	524	526	524
A <sub>max</sub>	0,71	0,37	1,44	0,29
PPI (A <sub>380</sub> /A <sub>800</sub> )	5,78	3,39	10,35	2,37
Ø [nm]	 90	 106,5	 75,1	 26,6
PDI [%]	22,9	27,5	24,4	16

Das SPR Maximum verschob sich wie erwartet durch Anlagerung der Oligonukleotide an die AuNP-Oberfläche in höhere Wellenlängen. Das SPR Maximum der reinen AuNP lag bei 524 nm, nach der Konjugation mit A sowie A<sub>25</sub>-O lag es bei 526, mit A<sub>25</sub>-A hat es sich jedoch entgegen der Erwartung nicht verschoben. Das höchste Absorptionssignal ( $A_{\max}$ ) sollte nach der Konjugation um ein Vielfaches höher sein, da eine 10-fache Aufkonzentrierung der AuNP erfolgte. Für A<sub>25</sub>-O ist das  $A_{\max}$  fast 5mal erhöht, für A mehr als 2-mal und für A<sub>25</sub>-A nur minimal. Beide Daten deuten für A<sub>25</sub>-A auf eine wenig effiziente Konjugation hin, davon war aufgrund der schwach roten Farbe des Konjugats bereits auszugehen. Die beiden anderen Konjugationen waren erfolgreicher, wobei die Konjugation von A<sub>25</sub>-O die besten Ergebnisse liefert. Der PPI (Primary Particle Index) gibt aufgrund des Verhältnisses der Interband Absorption der Konjugate ( $A_{380}$ ) und des Streuungssignals von Aggregaten ( $A_{800}$ ) die Stabilität des Konjugats oder der AuNP an [126]. Je höher der PPI, desto weniger Agglomerate liegen vor und die Dispersion ist stabiler. Alle drei Konjugate haben einen höheren PPI als die reinen AuNP und sind dementsprechend stabiler. Der PPI von A<sub>25</sub>-A war nur leicht höher als der PPI der AuNP, wobei der PPI von A mehr als 2-mal so hoch war. A<sub>25</sub>-O hat den weitaus höchsten PPI, mehr als 4-mal so hoch, und stellt dadurch das stabilste Konjugat dar. Aufgrund der kürzesten Sequenz und dadurch geringsten negativen Ladung wurde die Konjugation dieses Oligonukleotids vermutlich begünstigt.

Anhand der DLS Daten zum hydrodynamischen Durchmesser und dem Polydispersitätsindex (PDI) sind weitere Konjugat-Unterschiede ersichtlich. Der hydrodynamische Durchmesser der reinen AuNP beträgt 26,6 nm, für die Konjugate wäre abhängig von Sequenzlänge eine zunehmende Größe zu erwarten. Der Effekt der Sequenzlänge auf den hydrodynamischen Durchmesser ist in den DLS-Werten zu erkennen, da A<sub>25</sub>-O 75,1 nm groß ist, A etwas größer mit 90 nm und A<sub>25</sub>-A am größten mit 106,5 nm. Alle hydrodynamischen Durchmesser sind weitaus größer als die maximal berechneten Durchmesser, was durch die dort nicht einberechnete Hydrathülle zu erklären ist. Bei der Betrachtung des PDI gilt, je geringer, desto homogener ist die vorliegende Dispersion. Alle Konjugate haben einen PDI zwischen 22 und 28, dieser liegt damit etwas oberhalb des PDI der unkonjugierten AuNP und impliziert eine höhere Agglomerat-Menge als bei reinen AuNP. Anhand der passenden hydrodynamischen Durchmesser und des moderaten PDI ist insgesamt jedoch von erfolgreicher Konjugation auszugehen. Die Konjugation führt aber auch zu teilweiser Agglomerat-Bildung der AuNP, da der PDI der Konjugate höher ist als bei den reinen AuNP.

Bei dieser Konjugation mittels pH-Erniedrigung wäre zu erwarten gewesen, dass sich der A<sub>25</sub>-Spacer positiv auf die Konjugation des Aptamers auswirkt [6]. Denn Adenin liegt bei einem pH-Wert von 3 protoniert vor und reduziert dadurch die negative Ladung des gesamten Oligonukleotids, vor allem jedoch den Sequenzbereich direkt an der Thiol-Gruppe, wodurch eine gerichtete Konjugation angestrebt wird [6], [116]. Weiterhin hat Adenin von den 4 DNA-Basen die höchste Affinität zur AuNP-Oberfläche [6], [67], [72]. A<sub>25</sub>-A resultierte hier anhand von A<sub>max</sub> und des PDI in ein instabileres Konjugat als A. Das A<sub>25</sub>-O-Konjugat hingegen war wiederum stabiler und stärker konzentriert als das A-Konjugat. Daher war eventuell nicht der A<sub>25</sub>-Spacer problematisch für die Aptamer-Konjugation, sondern lediglich die resultierende lange Sequenz. Eine längere Sequenz entspricht mehr negativer Ladung, wodurch die Anlagerung des Oligonukleotids erschwert wird. Durch den Adenin-Spacer wäre es möglich, dass einige Adenine adsorptiv auf der AuNP-Oberfläche gebunden haben und dadurch weniger freie Oberfläche für eine mittels Thiol gerichtete Immobilisierung zur Verfügung stand. Welcher Faktor bei dieser Methodik ausschlaggebend ist, kann mit den zugrunde liegenden Oligonukleotiden nicht ermittelt werden, dafür wäre ein bspw. randomisierter Spacer mit 25 Nukleotiden erforderlich. Die Vor- oder Nachteile des A<sub>25</sub>-Spacers werden bei den folgenden Konjugationsmethoden (4.3.1.2 und 4.3.1.3) noch untersucht.

Zur weiteren Analyse sollte die Menge gebundener Oligonukleotide pro AuNP bestimmt werden. Als erstes wurde daher berechnet, wie viele Oligonukleotide theoretisch auf einem AuNP immobilisiert werden können. Diese Berechnung bietet aufgrund des ungewissen Faltungsverhaltens und sterischer Hinderungen auf der AuNP-Oberfläche nur eine Schätzung.

Da die Oligonukleotide mittels Thiol-Modifizierung an AuNP binden, wird zunächst der Durchmesser eines Schwefel-Atoms betrachtet, dieser beträgt 0,206 nm. Am Schwefel-Atom sind jedoch Nukleotide gebunden, diese messen in der Länge ca. 0,34 nm [127], dieser Wert wird aufgrund unterschiedlicher Ausrichtungen der Oligonukleotide auf der AuNP-Oberfläche zur Berechnung herangezogen. Ein Nukleotid benötigt zum Immobilisieren entsprechend 0,1156 nm<sup>2</sup> AuNP-Oberfläche. Ausgehend von der dichtest möglichen Kugelpackung [128] können 74 % der AuNP-Oberfläche mit Oligonukleotiden bedeckt werden, die Oligonukleotid-Anzahl wird entsprechend mit Formel (4) berechnet.

$$N_{\text{Oligonukleotid}} = \frac{\text{Oberfläche}_{\text{AuNP}}}{\text{Platzbedarf}_{\text{Oligonukleotid}}} \cdot 0,74 = \frac{951,15 \text{ nm}^2}{0,1156 \text{ nm}^2} \cdot 0,74 = 6089 \quad (4)$$

Bei einer Bedeckung von 74 % können demnach maximal 6089 Oligonukleotide pro AuNP immobilisiert werden. Hierbei sind sterische Hinderungen durch Faltungen und elektrostatische Wechselwirkungen, die mehr Immobilisierungsfläche pro Oligonukleotid erfordern bzw. zu nicht-immobilisierbaren Räumen führen, nicht einberechnet. Daher ist die berechnete Anzahl der Oligonukleotide pro AuNP als maximaler Grenzwert zu betrachten. Je nach Oligonukleotid-Länge und Beschaffenheit (Ladung aufgrund der Sequenz, Faltungsmotive) benötigen Oligonukleotide unterschiedlich viel Platz, bzw. ist nur eine bestimmte Anzahl an Oligonukleotiden pro AuNP möglich. Weiterhin wird die Immobilisierung von Oligonukleotiden mit zunehmender Bedeckung aufgrund der negativen Ladung und sterischen Hinderungen erschwert. In der Literatur werden bei erfolgreicher Konjugation auf einem 13 nm großen AuNP 70 – 110 Oligonukleotide immobilisiert [6], auf den vorliegenden ca. 18 nm großen AuNP wäre anhand der größeren Oberfläche die doppelte Zahl an Oligonukleotiden (140 – 220) für eine erfolgreiche Konjugation zu erwarten. Das entspricht einer weitaus geringeren Oligonukleotid-Bedeckung auf AuNP als maximal berechnet, zum Vergleich der praktisch ermittelten Bedeckung wird dieser Literaturwert jedoch herangezogen.

Die Überstände der Konjugate wurden nach den Zentrifugationsschritten untersucht. Mithilfe einer Kalibrationsgerade der Oligonukleotide wurde die Stoffmenge der freien, ungebundenen Oligonukleotide in den Überständen ermittelt (siehe B.7). Mithilfe der mit Formel (3) ermittelten AuNP-Konzentration von 3,88 nM (4.2.2.3) konnte schließlich die Anzahl der gebundenen Oligonukleotide berechnet werden. Die errechneten Daten sind in Abbildung 25 dargestellt.

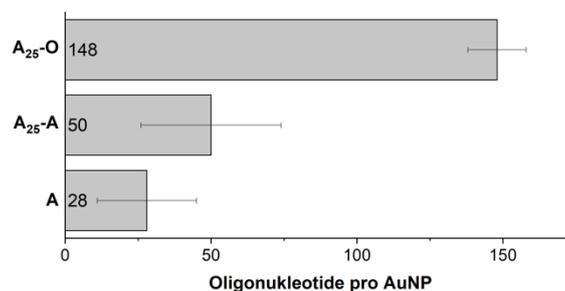


Abbildung 25: Anzahl der gebundenen Oligonukleotide pro AuNP für die Konjugate A, A<sub>25</sub>-A und A<sub>25</sub>-O nach pH-Erniedrigung. Bei der Konjugation wurde jedes Oligonukleotid in einer Konzentration von 1 µM eingesetzt, was einem Vielfachen der immobilisierten Menge entspricht.

Je nach Konjugat wurden unterschiedlich viele Oligonukleotide pro AuNP immobilisiert. Beim  $A_{25}$ -O wurden 148 cOligos konjugiert, bei den Aptamer-Konjugaten sind es deutlich weniger Moleküle. Aufgrund der hohen Standardabweichung beider Aptamer-Konjugate ist von ähnlich vielen immobilisierten Molekülen auszugehen, dabei ist die Zahl deutlich geringer als bei den cOligos. Insgesamt wurden mit der pH-Erniedrigung, verglichen mit der möglichen Anzahl an Molekülen, recht wenig Oligonukleotide konjugiert. Nur bei der Konjugation von  $A_{25}$ -O liegen die gebundenen 148 Moleküle im erwarteten Bereich (verglichen mit den Literaturwerten). Die geringe Anzahl gebundener Oligonukleotide kann die geringe Stabilität (PPI) sowie die geringe Ausbeute bei der Konjugation der Aptamer-Varianten erklären. Die geringere Dichte des Aptamers gegenüber des cOligos auf der AuNP-Oberfläche kann durch die Sequenzlänge und einhergehende Faltungsmotive erklärt werden. Durch die längere Sequenz hat das Aptamer eine stärker negative Ladung und die Annäherung an einen ebenfalls negativen AuNP wird erschwert. Bezüglich der Bedeckung erwies sich der  $A_{25}$ -Spacer beim Aptamer jedoch nicht nachteilig, da in etwa die gleiche Anzahl bzw. sogar mehr  $A_{25}$ -Aptamere als Aptamere ohne Spacer immobilisiert werden konnten, lediglich die Stabilität der Konjugate unterscheidet sich. Mit der pH-Erniedrigung konnten für alle 3 Oligonukleotid-Varianten erfolgreiche Konjugate hergestellt werden. Um spezifische Aussagen zur Konjugationseffizienz zu treffen, wurden zunächst die anderen Konjugationsmethoden untersucht und abschließend werden die drei Methoden verglichen.

#### 4.3.1.2 Konjugation mittels Salt Aging

Beim Salt Aging werden AuNP und Oligonukleotide zunächst über Nacht inkubiert, bevor eine schrittweise Zugabe von NaCl erfolgt. Durch die Natrium-Ionen wird die negative Ladung der DNA ausgeglichen, sodass die repulsiven Kräfte vermindert werden und sich AuNP und DNA annähern können. Die Bindung der Oligonukleotide kann dann mittels Thiol-Gruppe an die AuNP-Oberfläche stattfinden, wodurch die AuNP stabiler und salztoleranter werden. Durch schrittweise Erhöhung der Salz-Konzentration kann schließlich die Oligonukleotid-Dichte auf den AuNP erhöht werden und es entstehen stabile Konjugate. Der Salt Aging Prozess hat durch lange Inkubationszeiten die längste Dauer von 3 Tagen. Laut Autoren [72] soll final eine NaCl-Konzentration von 1 M erreicht werden. Dafür sind zahlreiche NaCl-Zugaben nötig, bei den ersten 2 Zugaben erfolgt eine geringere NaCl-Zugabe als bei den folgenden, damit die Salinität der Dispersion nicht zu stark erhöht wird

und Agglomeration verhindert wird. Die Konjugate werden nach jeder NaCl-Zugabe für wenige Sekunden im Ultraschallbad inkubiert, um mögliche kleine Agglomerate wieder zu resuspendieren. Nach der letzten NaCl-Zugabe werden die Konjugate nochmals über Nacht inkubiert, bevor durch Zentrifugation ungebundene Oligonukleotide von den Konjugaten abgetrennt werden.

Die folgenden Parameter wurden beim Salt Aging optimiert, um stabile und funktionale Konjugate zu erhalten:

- a. Salze und ihre Zusätze
- b. Anzahl und Konzentration der Salz-Zugaben

Ein zu hoher Bedeckungsgrad auf den AuNP ist nicht immer erwünscht, da dieser zu sterischen Hinderungen sowie Sensitivitätsproblemen (bei TID-Systemen durch Avidität) auf dem späteren LFA führen kann. Daher wurden verschiedene Konzentrationen und die Anzahl der Salz-Zugaben variiert.

- a. Salze und ihre Zusätze

In der Ursprungsmethode wird NaCl verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben NaCl der Einsatz von MgCl<sub>2</sub> untersucht. Da MgCl<sub>2</sub> zweiwertige Kationen enthält, könnte der Salt Aging Prozess mit geringerer Konzentration und zeitlicher Dauer erreicht werden. Jedoch können zweiwertige Ionen zur Agglomeration der AuNP führen, das wurde im vorigen Kapitel für CaCl<sub>2</sub> bestätigt und wäre für MgCl<sub>2</sub> auch zu erwarten. Bei einem Salt Aging Prozess mit drei MgCl<sub>2</sub>-Zugaben sind instabile Konjugate entstanden, daher wurde auf weitere Versuche mit MgCl<sub>2</sub> verzichtet und stattdessen NaCl verwendet. Als Zusätze der verwendeten 2 M NaCl-Lösung eignen sich Tenside wie SDS oder Tween 20 [47], [129]. Da Tween 20 bereits für vorherige Versuche erfolgreich verwendet wurde, wurde der Zusatz von 0,05 % Tween 20 untersucht. Durch das Tensid kann ein höherer Bedeckungsgrad erreicht werden, bessere Reproduzierbarkeit und vor allem weniger Agglomeration [72]. Die 2 M NaCl-Lösung mit 0,05 % Tween 20 führte gegenüber der Salz-Lösung ohne Tensid zu stabileren Konjugaten und wurde daher für folgende Versuche verwendet.

Weiterhin konnte der Resuspensionspuffer der Konjugate auf Basis der Versuche aus 4.3.1.1 optimiert werden. Dieser beinhaltet den unverdünnten Bindepuffer ohne CaCl<sub>2</sub> und 2 % Saccharose (A.3).

### b. Anzahl und Konzentration der Salz-Zugaben

Beim Salt Aging sollen zunächst zwei NaCl-Zugaben für eine Konzentrationserhöhung des Konjugationsansatzes um 0,05 M NaCl erfolgen. Danach folgen schrittweise Konzentrationserhöhungen von 0,1 M NaCl bis nach 11 Zugaben eine Konzentration des Konjugationsansatzes von 1 M NaCl erreicht wird [72]. Der Ablauf des Salt Agings mit Volumen-Angaben ist in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5:** Ablauf des Salt Aging Prozesses. Die angegebenen Zugabe-Volumen der 2 M NaCl-Lösung beziehen sich auf ein Startvolumen des Konjugationsansatzes von 1 mL. Durch die 11 Zugaben wird ein finales Volumen von 2 mL erreicht. Nach jeder Zugabe erfolgt eine Behandlung des Konjugationsansatzes im Ultraschallbad für 10 s und eine 10-minütige Inkubationszeit.

Zugabe	Zugegebenes Volumen der 2 M NaCl-Lösung [ $\mu$ L]	Resultierende NaCl-Konzentration des Konjugationsansatzes [M]
1	25,6	0,05
2	27,0	0,1
3	58,5	0,2
4	65,4	0,3
5	73,5	0,4
6	83,3	0,5
7	95,2	0,6
8	109,9	0,7
9	128,2	0,8
10	151,5	0,9
11	181,8	1

Bei einer Konzentration von 0,7 M NaCl (nach 8 NaCl-Zugaben) wird laut Autoren bereits nahezu der höchste Bedeckungsgrad erreicht. Für eine maximale Bedeckung sollte der Salt Aging Prozess daher bis mind. 0,7 M NaCl durchgeführt werden [72].

Die Konjugation mittels Salt Aging wurde wie bei der pH-Erniedrigung mit dem Aptamer, A<sub>25</sub>-Aptamer sowie A<sub>25</sub>-cOligo mit final 0,7 M NaCl durchgeführt. Die analytischen Ergebnisse nach UV-Vis- und DLS-Analyse sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Analytik der Konjugate A, A<sub>25</sub>-A und A<sub>25</sub>-O nach 0,7 M Salt Aging.

	A	A <sub>25</sub> -A	A <sub>25</sub> -O	AuNP
SPR Maximum [nm]	526	531	528	524
A <sub>max</sub>	2,1	6,8	2,7	0,29
PPI (A <sub>380</sub> /A <sub>800</sub> )	11,5	22,8	8,1	2,37
Ø [nm]	 92,9	 65,5	 64,9	 26,6
PDI [%]	27,3	11,8	24,9	16

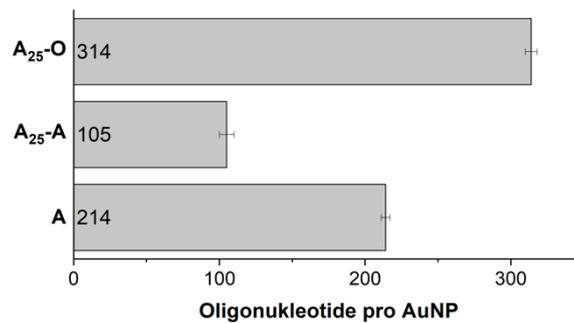


Abbildung 26: Anzahl gebundener Oligonukleotide pro AuNP nach Konjugation mittels Salt Aging.

Neben der charakteristischen Rotfärbung des Konjugats weisen die analytischen Daten auf eine erfolgreiche Konjugation bei allen Konjugaten hin. Das SPR Maximum hat sich für alle 3 Konjugate wie erwartet verschoben. Das A<sub>max</sub> für A und A<sub>25</sub>-O hat sich im Vergleich zu den AuNP vervielfacht, zwar nicht um den Faktor 10 der Aufkonzentrierung, jedoch um mehr als 7. Das zeigt eine wesentlich höhere Ausbeute der Konjugation als bei der pH-Erniedrigung, hier konnte das A<sub>max</sub> nur um das 5-fache erhöht werden. Beim A<sub>25</sub>-A wurde ein mehr 20-faches Signal für A<sub>max</sub> erhalten. Das Signal liegt damit über dem erwarteten Signal, aufgrund einer nicht vollständig homogenen Dispersion können lokale Konzentrationsunterschiede auftreten und eine entsprechende Signalerhöhung auftreten. Alle drei Konjugate weisen laut PPI eine hohe Stabilität auf, dabei hat A<sub>25</sub>-O mit 8,1 die geringste Stabilität und A<sub>25</sub>-A mit 22,8 die weitaus höchste. A<sub>25</sub>-A hat außerdem den besten PDI-Wert, dieser liegt mit 11,8 noch unter dem PDI von reinen AuNP (16). Die anderen Konjugate weisen weniger Homogenität auf. Der hydrodynamische Durchmesser für die Konjugate A<sub>25</sub>-A und A<sub>25</sub>-O liegt bei ca. 65 nm, für A bei ca. 93 nm. Die Konjugat-Größen von A und A<sub>25</sub>-O sind daher vergleichbar zur pH-Erniedrigung. A<sub>25</sub>-A hat hingegen einen

sehr viel niedrigeren Wert beim Salt Aging, dieser liegt sogar unter dem berechneten maximalen Durchmesser (78 nm). Er ist durch Aptamer-Faltung jedoch als realistisch einzustufen, da der maximale Durchmesser für ungefaltete Oligonukleotiden berechnet wurde und das Aptamer bestenfalls eine G-Quadruplex Struktur auf den AuNP einnimmt. Dieser vergleichbar geringe hydrodynamische Durchmesser kann auf die gute Homogenität und geringe Agglomeratbildung zurückzuführen sein. Gegensätzlich zur pH-Erniedrigung scheint beim Salt Aging die Konjugation von A<sub>25</sub>-A das stabilste Konjugat mit höchster Ausbeute zu liefern.

Die ermittelten Werte zur gebundenen DNA-Menge (Abbildung 26) sind schlüssig bezüglich der Methode des Salt Agings: Bei dem längsten Oligonukleotid A<sub>25</sub>-A (86 nt) wurde die geringste Menge immobilisiert, 105 Oligos pro AuNP. Bei A (mit 25 Nukleotiden weniger) konnten etwa 214 Moleküle und bei A<sub>25</sub>-O (mit wiederum 24 Nukleotiden weniger) die meisten Moleküle, 314, immobilisiert werden. Von den kurzen cOligos konnten durch die 0,7 M NaCl am meisten Moleküle konjugiert werden, mit zunehmender Sequenzlänge konnten vermutlich aufgrund der sterischen Gründe und negativen Ladung weniger Moleküle immobilisiert werden. Mehr gebundene DNA-Moleküle bedeuten jedoch nicht mehr Stabilität, beim A<sub>25</sub>-A reichen rund 100 Moleküle für eine hohe Konjugatstabilität aus. Vermutlich ermöglichen die langen Sequenzen durch elektrostatische Abstoßungen den größten Abstand zwischen den einzelnen AuNP, sodass die Dispersion insgesamt weniger agglomerieren kann und stabiler ist.

In einem späteren Kapitel wurden alle drei Konjugate auf ihre Funktionalität überprüft (4.3.2). Eine Hybridisierung mit dem komplementären DNA-Molekül wurde mit diesen Konjugaten erfolgreich festgestellt, jedoch konnte keine kompetitive Verdrängung durch das Target OTA erreicht werden. Ein Grund kann eine zu hohe DNA-Bedeckung der AuNP sein. Diese kann zu Faltungsproblemen führen [130] und aufgrund vielfacher Bindungspartner pro AuNP die Avidität des konjugierten AuNP erhöhen. Durch eine starke Avidität kann die TID-Reaktion durch das Target erschwert werden [131]. Als nächstes wurde daher untersucht, wie die DNA-Bedeckung beim Salt Aging deutlich reduziert werden kann.

Um ein funktionales und dennoch stabiles Konjugat zu erhalten, wurden daher die Parameter Zugabe-Anzahl sowie -Volumen (Tabelle 7) beim Salt Aging angepasst.

Tabelle 7: Variierte Parameter beim Salt Aging zur Verringerung der DNA-Bedeckung der AuNP.

Finale NaCl-Konzentration [M]	0,7	0,2	0,084
Anzahl Zugaben der 2 M Stammlösung	11	4	8

Der vorige Einsatz von 0,7 M NaCl wurde zur Vergleichbarkeit wiederholt, ebenso wurden nur 4 NaCl-Zugaben für eine finale Konzentration von 0,2 M NaCl durchgeführt. Außerdem sollte noch eine weitaus geringere NaCl-Konzentration getestet werden. Da normalerweise Zugaben in 0,05 bzw. 0,1 M Schritten erfolgen, musste hierfür das Volumen angepasst werden, woraus 8 Zugaben gleichen Volumens resultieren.

Für diesen Vergleich wurden nur  $A_{25}$ -A und  $A_{25}$ -O Konjugate untersucht, da der Bedeckungsgrad bei  $A_{25}$ -A bereits geringer ist, als bei A und das Konjugat außerdem eine bessere Stabilität aufweist. In Tabelle 8 werden zunächst die analytischen Ergebnisse mittels UV-Vis- und DLS-Analyse für die verschiedenen  $A_{25}$ -A Konjugate dargestellt.

Tabelle 8: Analytik der  $A_{25}$ -A Konjugate nach variiertem Salt Aging.

	0,7 M	0,2 M	0,84 M
SPR Maximum [nm]	526	526	526
$A_{max}$	2	1,8	1,9
PPI ( $A_{380}/A_{800}$ )	9,3	11,7	12,5
$\varnothing$ [nm]	 66,4	 57,1	 57,6
PDI [%]	12,3	13,7	9,5

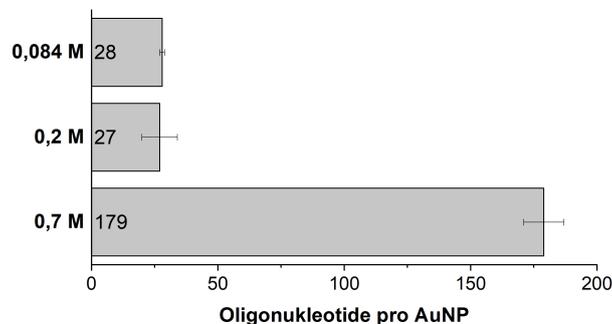


Abbildung 27: Anzahl gebundener Oligonukleotide ( $A_{25}$ -A) pro AuNP nach Konjugation mittels Salt Aging. Jeweils für Salt Aging mit 0,7 M, 0,2 M und 0,084 M NaCl.

Die Werte des  $A_{25}$ -A Konjugats nach erneutem Salt Aging mit 0,7 M NaCl weichen von den vorigen ab. Der SPR-Shift ist geringer, das  $A_{max}$  ebenfalls und der PPI auch. Der hydrodynamische Durchmesser sowie der PDI sind jedoch ähnlich. Der Bedeckungsgrad (Abbildung 27) ist mit 179 zu 105 Molekülen höher als bei der vorigen Durchführung. Es wurde dieselbe AuNP-Charge verwendet, ebenso dieselbe NaCl-Lösung und der gleiche Resuspensionspuffer. Der Salt Aging Prozess für das  $A_{25}$ -Aptamer scheint nicht gänzlich reproduzierbar zu sein.

Die Konjugation mit geringerer NaCl-Konzentration (0,2 und 0,084 M) führte ebenfalls zu stabilen Konjugaten, die Absorptionssignale aller 3  $A_{25}$ -A Konjugate sind vergleichbar, die PPIs ebenfalls. Der hydrodynamische Durchmesser für die Konjugate mit geringerer Salzkonzentration ist aufgrund der geringeren Bedeckung kleiner und der PDI zeigt mit unter 15 % erneut eine homogene Dispersion. Bezüglich der DNA-Bedeckung sind deutliche Unterschiede zwischen dem Konjugat mit 0,7 M NaCl und den Konjugaten mit weniger NaCl zu verzeichnen. Mit final 0,2 M NaCl und 0,084 M NaCl konnte auf den AuNP die gleiche und eher geringe Anzahl an DNA-Molekülen, ca. 28, konjugiert. Der hydrodynamische Durchmesser ist mit ca. 57 nm für beide Konjugate gleich und bekräftigt die ermittelte DNA-Bedeckung der AuNP.

Die Salt Aging Konjugation des cOligos wurde mit der gleichen Methodik untersucht, die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Analytik der  $A_{25}$ -O Konjugate nach variiertem Salt Aging

	1 (0,7 M)	2 (0,2 M)	3 (0,084 M)
SPR Maximum [nm]	526	526	526
$A_{max}$	1,9	1,9	1,6
PPI ( $A_{380}/A_{800}$ )	12,4	12,8	10,2
$\emptyset$ [nm]	 45,5	 40,1	 42,2
PDI [%]	6,9	12,9	8,2

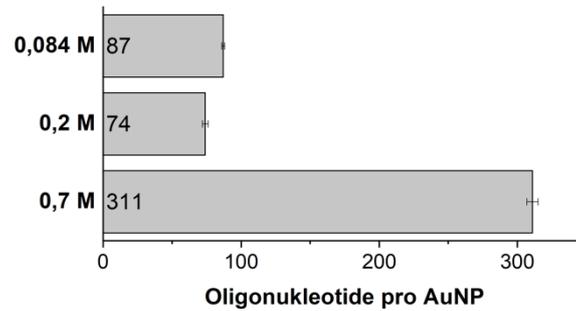


Abbildung 28: Anzahl gebundener Oligonukleotide ( $A_{25-O}$ ) pro AuNP nach Konjugation mittels Salt Aging. Jeweils für Salt Aging mit 0,7 M, 0,2 M und 0,084 M NaCl.

Auch für  $A_{25-O}$  mit 0,7 M NaCl wurden nach Wiederholung abweichende analytische Daten erhalten. Das Konjugat wies bei zweiter Durchführung zwar eine geringere Konzentration auf, war jedoch anhand des PPI von 12,4 gegenüber zuvor 8,1 stabiler. Der hydrodynamische Durchmesser war geringer, die Polydispersität ebenfalls. Trotz dieser Unterschiede war die Menge der gebundenen DNA-Moleküle (Abbildung 28) fast gleich, unterschied sich bei sehr geringer Standardabweichung eines Messwerts über 300 nur um 3 DNA-Moleküle pro AuNP. Durch die Verwendung von weniger NaCl beim Salt Aging wurden für alle Konjugate ähnliche Daten der UV-Vis-Analyse sowie beim DLS erhalten. Der hydrodynamische Durchmesser entsprach hier in etwa dem maximal berechneten Durchmesser von 44 nm. Die DNA-Dichte pro AuNP wurde durch eine geringere NaCl-Konzentration auch hier vermindert, beträgt ca. 80, gegenüber 300 Molekülen mit 0,7 M NaCl. Durch Verwendung der geringsten Salz-Menge wurden sogar ca. 10 Moleküle mehr konjugiert als durch die vielfache Menge von 0,2 M. Mit diesen variierten Salt Aging Methoden wurden für  $A_{25-A}$  sowie  $A_{25-O}$  Konjugate mit geringer DNA-Bedeckung und dennoch hoher Stabilität erhalten, welche für einen gewünschten sensitiven Assay erforderlich sind.

Ob die geringere DNA-Bedeckung auch den gewünschten funktionalen und sensitiven Effekt hat, wurde erneut mittels Funktionalitätsassay untersucht (unter 4.3.2).

#### 4.3.1.3 Konjugation mittels Einfrieren

Als letzte Konjugationsmethode wurde das Einfrieren untersucht. Diese Methode benötigt keine Vorinkubation von AuNP und Oligonukleotid sowie keine zusätzlichen Reagenzien wie Salz oder Tenside. Der Konjugationsansatz wird für kurze Zeit eingefroren und danach bei Raumtemperatur langsam aufgetaut. Beim Einfrieren erhöhen sich lokal die Konzentrationen der AuNP und Oligonukleotide durch Kristallbildung des umgebenden

Wassers, wodurch die Distanz der Teilchen verringert wird. Bei reinen AuNP ohne Oligonukleotide werden durchs Einfrieren und resultierende Distanzverminderung zwischen AuNP die repulsiven, elektrostatischen Kräfte überwunden und Agglomeration hervorgerufen. Diese, für reine AuNP-Dispersionen, ungünstige, gezwungene Überwindung der repulsiven Kräfte wird für die Konjugation mit Oligonukleotiden genutzt. Werden Oligonukleotide vor dem Einfrieren zu AuNP zugegeben, werden nach der Überwindung der repulsiven Kräfte (wie Ladungsabstoßungen) die Oligonukleotide aufgrund der attraktiven Kräfte (z.B. Thiol-Gold-Bindung) auf den AuNP konjugiert. Beim Einfrieren liegen die Oligonukleotide vermehrt gestreckt vor, wodurch zusätzlich eine gerichtete Immobilisierung gefördert wird [73], [74], [132]. Die folgenden Parameter wurden für die Konjugation mittels Einfrieren untersucht und optimiert:

- a. Konzentration der Oligonukleotide
- b. Einfrierdauer und -temperatur

**a. Konzentration der Oligonukleotide**

In der Methode von Liu *et al.* [73] werden ca. 3  $\mu\text{M}$  DNA zur Konjugation eingesetzt, denn bei weniger als 1,5  $\mu\text{M}$  DNA konnte keine erfolgreiche Konjugation erreicht werden [74]. Jedoch wurden hier 13 nm große AuNPs eingesetzt sowie eine andere DNA-Sequenz [73]. Aufgrund des erfolgreichen Einsatzes geringerer DNA-Mengen bei den vorherigen Konjugationsmethoden sowie einer gewünschten geringen DNA-Bedeckung der AuNP wurde auch hier eine niedrigere Konzentration getestet. Zunächst wurden A<sub>25</sub>-A sowie A<sub>25</sub>-O Konjugate mit DNA-Konzentrationen von 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  hergestellt. Das Einfrieren wurde bei -20 °C für 2 h durchgeführt. In Abbildung 29 sind die Konjugate gezeigt.



**Abbildung 29:** A<sub>25</sub>-A und A<sub>25</sub>-O Konjugate mit je 0,5, 1 oder 3  $\mu\text{M}$  Oligonukleotiden nach Abschluss der Konjugation mittels Einfrieren. Als Kontrolle wurden AuNP ohne Oligonukleotide eingesetzt.

Anhand der roten Farbe der Konjugate war die Konjugation für beide Oligonukleotid-Konjugate erfolgreich. Es sind jedoch deutliche Unterschiede zwischen den Konzentrationen sowie zwischen den verwendeten Oligonukleotiden zu erkennen. Alle A<sub>25</sub>-A Konjugate hatten eine rote Farbe, jedoch auch ein deutliches schwarzes Agglomerat. Beim 0,5 µM A<sub>25</sub>-O Konjugat ist keine rote Farbe, sondern nur ein schwarzes Agglomerat zu erkennen, bei höheren Konzentrationen weist das Konjugat jedoch eine dunkelrote Farbe ohne Agglomerat auf. Die reinen AuNP sind wie erwartet agglomeriert. Zur genaueren Analyse wurde eine UV-Vis-Analyse der Konjugate durchgeführt, die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: UV-Vis Daten der A<sub>25</sub>-A und A<sub>25</sub>-O Konjugate mit je 0,5, 1 oder 3 µM Oligonukleotiden nach der Konjugation mittels Einfrieren. \* Es handelt sich hierbei um eine andere AuNP-Charge als zuvor.

	A <sub>25</sub> -A			A <sub>25</sub> -O			AuNP*
	0,5	1	3	0,5	1	3	
DNA-Konzentration [µM]	0,5	1	3	0,5	1	3	-
SPR Maximum [nm]	524	524	523	520	526	525	520
A <sub>max</sub>	1,8	2,3	1,5	0,2	2,4	3,4	0,7
PPI (A <sub>380</sub> /A <sub>800</sub> )	4,8	6,3	4,8	1,1	6,1	8,1	3,1

Die Ergebnisse der UV-Vis-Analyse stimmten weitestgehend mit der optischen Beobachtung der Dispersions-Färbung überein. Bis auf das 0,5 µM A<sub>25</sub>-O Konjugat wiesen alle Konjugate ein verschobenes SPR Maximum, ein höheres Absorptionssignal sowie einen besseren PPI auf. Die besten Werte wurden beim A<sub>25</sub>-O Konjugat beim Einsatz von 3 µM DNA erreicht, beim A<sub>25</sub>-A Konjugat jedoch bei 1 µM DNA. Bei 1 µM lieferten beide Konjugate einen vergleichbaren PPI von ca. 6, sowie ein A<sub>max</sub> von ca. 2,3. Die hohe Absorption des A<sub>25</sub>-A Konjugats weicht von der optischen Beobachtung ab, kann aber folgendermaßen erklärt werden: Nach Abschluss der Konjugation kam es bei den A<sub>25</sub>-A teilweise später zur „Resuspension“ des Agglomerats, sodass die Dispersion sich intensiver rot verfärbte. Durch Zentrifugation werden die konjugierten AuNP gezwungen eine unerwünschte Nähe einzugehen. Diese führt zu scheinbar reversiblen Agglomeraten, beim Salt Aging „self-aggregation“ genannt [6], sodass die konjugierten AuNP durch die repulsiven Kräfte eine Distanz aufbauen und sich weitläufiger in der Dispersion verteilen. Vor allem die lange Sequenz des A<sub>25</sub>-A befähigt Basenpaarungen oder schwache Wechselwirkungen zwischen Aptameren verschiedener AuNP, sodass bei höheren Temperaturen (wie RT) solche reversiblen Agglomerate möglich sind.

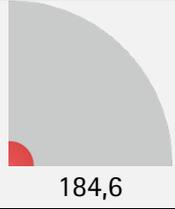
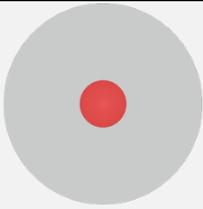
Der Einsatz von mindestens 1  $\mu\text{M}$  DNA führte bei der Konjugationsmethode „Einfrieren“ bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  zu stabilen Konjugaten. Bei einem höheren Einsatz des cOligos könnte die Konjugation noch effizienter verlaufen bzw. würde durch höhere Bedeckung mehr Stabilität erreicht. Für das lange Aptamer sind jedoch 1  $\mu\text{M}$  DNA vorteilhafter, höhere Konzentrationen begünstigen womöglich Selbsthybridisierung und weniger konjugierte AuNP liegen vereinzelt vor. Dadurch vermindert sich die Stabilität der Dispersion. Um ebenfalls keine zu hohe DNA-Bedeckung bei cOligos zu erreichen, bietet sich der Einsatz von 1  $\mu\text{M}$  gegenüber 3  $\mu\text{M}$  DNA für weitere Versuche an. Da durch das Konjugieren mittels Salt Aging weitaus bessere Stabilitäten (PPI) erreicht wurden, wurde der Einfluss der Einfrierdauer und -temperatur beim Einfrieren zur Optimierung der Methode untersucht.

#### **b. Einfrierdauer und -temperatur**

Bei den anderen Konjugationsmethoden werden AuNP und DNA über mehrere Stunden inkubiert und mittels Salzzugabe werden die repulsiven Kräfte überwunden. Bei der pH-Erniedrigung werden die negativen Ladungen neutralisiert und die Konjugation erfolgt in wenigen Minuten, beim Salt Aging wird die DNA-Dichte schrittweise erhöht. Beim Einfrieren hingegen werden die Konzentrationen aller Komponenten lokal erhöht und die repulsiven Kräfte dadurch überwunden. Durch die in der AuNP-Dispersion vorhandenen positiven Natrium-Ionen kann ein Teil der negativen DNA-Ladung ebenfalls neutralisiert werden und die attraktiven Kräfte werden dadurch verstärkt. Die Konjugation wird ohne Vorinkubation durchgeführt. Daher kann die Einfriertemperatur die Konjugationseffizienz, aufgrund der unterschiedlich langen Zeit des Einfrierprozesses der Dispersion, beeinflussen. Zur Überprüfung dieser These wurden die AuNP-DNA-Dispersionen bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren. Für eine weitere Analyse des Konjugationsprozesses wurden DNA-Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  und 2  $\mu\text{M}$  eingesetzt.

Es wurden, wie bei den anderen Konjugationen, drei Oligonukleotide untersucht: A, A<sub>25</sub>-A und A<sub>25</sub>-O. Das A-Konjugat war jedoch stets instabiler als das A<sub>25</sub>-A Konjugat, die Ergebnisse zum A-Konjugat sind zur besseren Übersicht nur im Anhang zu finden (unter 7.4), die restlichen Ergebnisse sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Konjugation von A<sub>25</sub>-A und A<sub>25</sub>-O mittels Einfrieren, bei - 20 sowie - 80 °C. Wenn nicht anders angegeben, wurde 1 µM des Oligonukleotids zur Konjugation eingesetzt.

		A <sub>25</sub> -A		
		- 20 °C	- 80 °C	- 80 °C, 2 µM
SPR Maximum [nm]		527	527	526
A <sub>max</sub>		1,3	1,4	2,1
PPI (A <sub>380</sub> /A <sub>800</sub> )		8,9	9,7	12,7
∅ [nm]		184,6		
PDI [%]		27	24,7	12,9
		A <sub>25</sub> -O		
		- 20 °C	- 80 °C	- 80 °C, 2 µM
SPR Maximum [nm]		532	527	527
A <sub>max</sub>		6	2	1,8
PPI (A <sub>380</sub> /A <sub>800</sub> )		12,1	11,7	12,1
∅ [nm]		114		
PDI [%]		26	24,4	23,2

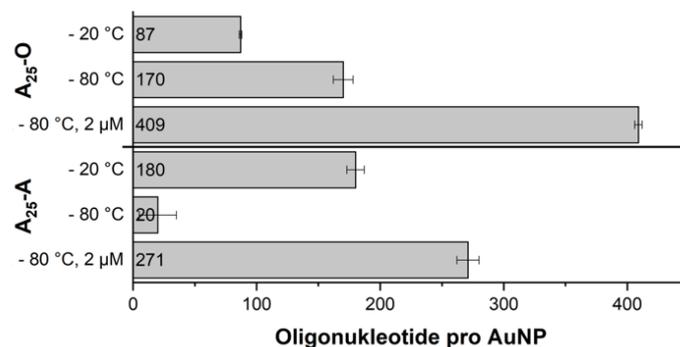


Abbildung 30: Anzahl gebundener Oligonukleotide pro AuNP nach Konjugation mittels Einfrieren. Es wurden die Oligonukleotide A<sub>25</sub>-A und A<sub>25</sub>-O verwendet. Zum Einfrieren wurden die Temperaturen -20 °C und - 80 °C mit je 1 µM DNA getestet, sowie - 80 °C mit 2 µM DNA.

Bei allen Konjugaten hat sich wie gewohnt das SPR Maximum verschoben, was ein erster Hinweis für den Erfolg der Konjugation ist. Beim A<sub>25</sub>-O Konjugat, das bei - 20 °C hergestellt wurde, trat der größte Shift auf und das A<sub>max</sub> war mit einem Wert von 6 am höchsten. Auch

hier können aufgrund der Polydispersität Konzentrationsunterschiede innerhalb der Probe auftreten und eine entsprechend extreme Signalerhöhung hervorrufen. Der PPI aller Konjugate liegt ca. zwischen 9 und 13, demnach weisen alle eine gute Stabilität auf, die vergleichbar mit dem Salt Aging ist. Der hydrodynamische Durchmesser von den bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen Konjugaten war deutlich höher als bei anderen Methoden und als berechnet, hier lagen auch die höchsten PDIs vor. Der hydrodynamische Durchmesser bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  beim Einsatz von  $2\text{ }\mu\text{M}$  fällt geringer aus als bei  $1\text{ }\mu\text{M}$ . Der PDI verbesserte sich zwar in gleicher Abhängigkeit wie der hydrodynamische Durchmesser, lag meist jedoch zwischen 20 und 30 %. Nur durch das Einfrieren von  $A_{25}\text{-A}$  bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  konnte eine Polydispersität erreicht, die mit vorherigen Methoden vergleichbar ist (PDI 12,9).

Die Anzahl gebundener Oligonukleotide pro AuNP (Abbildung 30) lag grob im erwarteten Bereich, von unter 100 bis über 200 (Aptamer) bzw. 400 (cOligo). Auffällig ist jedoch, dass durch das Einfrieren bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  beim  $A_{25}\text{-A}$  mit 180 Molekülen ein Vielfaches von den 20 Molekülen durch die Einfriertemperatur  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  konjugiert wurden. Eventuell ist die kurze Einfrierdauer bei der langen Aptamer-Sequenz für eine hohe Bedeckung nicht ausreichend. Bei doppelter Konzentration wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit 271 die meisten gebundenen Moleküle für das  $A_{25}\text{-A}$  erreicht. Beim cOligo wurden hingegen bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  nur 87 Moleküle immobilisiert und damit weniger Moleküle als beim Aptamer. Durch das Einfrieren bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  und höhere Konzentrationen wurden jedoch 170 bzw. 409 cOligo-Moleküle gebunden, diese Anzahl entspricht wieder den Erwartungen.

Mit der Konjugation mittels Einfrieren bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit  $1\text{ }\mu\text{M}$  eingesetzter DNA können für  $A_{25}\text{-A}$  und  $A_{25}\text{-O}$  geringe Bedeckungen und dennoch stabile Konjugate erreicht werden. Zwar haben die Konjugate mit dieser Methode recht hohe PDI, da aber laut PPI eine ausreichende Stabilität gegeben ist, könnten sich die Konjugate für einen diagnostischen Einsatz eignen und stellen aufgrund der einfachsten und schnellsten Konjugationsmethodik einen relevanten Vorteil gegenüber den vorherigen Methoden dar. Die Konjugationsmethoden wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese abschließend verglichen, bevor die Funktionalitätsüberprüfung der Konjugate in 4.3.2 vorgenommen wurde.

#### 4.3.1.4 Vergleich der Konjugationsmethoden mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird in der Literatur oftmals zur Ermittlung der Molekülmenge pro AuNP sowie zum Überprüfen des Konjugationserfolges von DNA auf AuNP herangezogen [133]–[136]. Die Migrationsstrecke von AuNP-Konjugaten in einem Agarosegel hängt von der Größe und Ladung ab. Beide Faktoren werden von der DNA-Dichte der AuNP beeinflusst, denn je mehr DNA-Moleküle immobilisiert sind, desto größer kann der Durchmesser des Partikels werden und weiterhin erhöht sich die Ladung durch die negativ geladenen DNA-Moleküle. Die Wanderungsgeschwindigkeit nimmt mit zunehmender Größe ab, durch mehr Ladung jedoch zu, die Migrationsstrecke hängt somit von mehreren Faktoren [134]. Mittels Agarose-Gelelektrophorese kann zudem erneut die Polydispersität von Konjugaten analysiert werden, indem die Anzahl der Banden bzw. „Schlierenbildung“ betrachtet wird. Die Agarose-Gelelektrophorese wird als zusätzliche Analytik zum Vergleich der Konjugate vorgenommen, um die Polydispersität, Stabilität und Konzentration zu bewerten. Die indirekte Bestimmung der konjugierten Oligonukleotid-Menge durch Bestimmung der nicht-konjugierten DNA aus dem Konjugationsüberstand, ähnlich zur Analytik mittels Nanodrop, wäre ebenfalls möglich. Nach dem Konjugationsprozess wird das Konjugat zentrifugiert und der klare Überstand entnommen, die konjugierten AuNP werden daraufhin in Pufferlösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Resuspensionschritt wird wiederholt und nach einer zusätzlichen dritten Zentrifugationsschritt wird nach Überstandsentsnahme das Konjugat nicht resuspendiert. Die Quantifizierung der DNA in den Überständen wurde für einige Konjugate im Agarose-Gel untersucht. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht konnten DNA-Banden im 1. Überstand mittels ImageJ ausgewertet werden, die etwas schwächer waren als die zur Konjugation eingesetzte DNA-Menge von 1  $\mu\text{M}$ . Für den 2. Überstand konnten nur teilweise sehr schwache Banden beobachtet werden und für den 3. Überstand keine Banden. Demnach genügen die 3 verwendeten Zentrifugationsschritte zum Entfernen der freien DNA aus den Konjugaten. Eine genauere Quantifizierung war aufgrund unscharfer Fokussierung und insgesamt schwacher Banden aufgrund der geringen DNA-Konzentration nicht möglich, jedoch bestätigen die Beobachtungen die Analytik der UV-Vis-Spektroskopie der Überstände.

Repräsentative Konjugate der 3 Konjugationsmethoden wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Konjugate mittels pH-Erniedrigung, des 0,7 M Salt Aging und

des Einfrierens bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit  $1\text{ }\mu\text{M}$  DNA, jeweils in den Varianten  $A_{25}\text{-A}$ , A und  $A_{25}\text{-O}$  wurden mit dieser Methode vermessen (Abbildung 31).

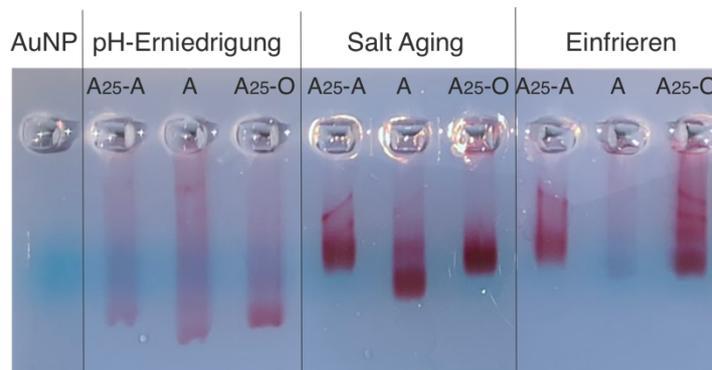


Abbildung 31: Agarose-Gelelektrophorese von Konjugaten verschiedener Methoden. 2 % Agarose, 100 V, 25 min.

Reine AuNP agglomerierten direkt beim Auftragen in die Geltasche, daher konnte für die AuNP keinerlei rote Bande beobachtet werden und die AuNP dienen als Negativkontrolle. Die aufgetrennten konjugierten AuNP sind erkennbar an der roten Farbe, aber die Banden der Konjugate unterscheiden sich. Die Konjugate der pH-Erniedrigung weisen eine durchgängige rote Bande über die komplette Laufstrecke auf. Das A-Konjugat hat dabei die weiteste Strecke zurückgelegt, das  $A_{25}\text{-A}$ -Konjugat die kürzeste, diese Tendenz ist methodenübergreifend zu finden. Vermutlich können die Konjugate A und  $A_{25}\text{-O}$  ähnlich gut durch die Poren des Gels migrieren, für  $A_{25}\text{-A}$  sind die Poren etwas zu klein, sodass durch den größeren hydrodynamischen Durchmesser und die hohe Ladung die kürzeste Strecke resultiert. Die Auftrennung im Gel hängt von Ladung und Größe ab, die A-Konjugate hatten immer eine geringere DNA-Bedeckung als die  $A_{25}\text{-O}$  Konjugate. Zwar durch die längere Sequenz auch mehr Ladung pro Oligonukleotid, jedoch durch die geringere Bedeckung ein kleineres Volumen des konjugierten AuNP, das vorteilhafter für die Migration durch die Gelporen ist und gegenüber der Ladung offenbar überwiegt. Verglichen mit den restlichen Konjugaten haben die Konjugate nach pH-Erniedrigung die weiteste Distanz zurückgelegt, jedoch sind die Konjugate nicht in einer Bande konzentriert, sondern über den Großteil der Laufstrecke. Das deutet darauf hin, dass eine stark heterogene Verteilung der Bedeckung vorliegt und AuNP mit sehr wenigen Oligonukleotiden eine weitere Strecke zurücklegen als die AuNP mit mehr Oligonukleotiden. Die Konjugate mittels Salt Aging und Einfrieren weisen am Ende der Laufstrecke rote, höherkonzentrierte Bereiche auf und eine weniger

starke Verteilung der Konjugate über die gesamte Laufstrecke. Die „Bandenbildung“ ist beim Salt Aging am stärksten ausgeprägt. Die Bande des A-Konjugats nach Einfrieren war sehr schwach, die analytische Auswertung dieses Konjugats wies ebenfalls auf ein instabiles Konjugat hin. Die Konjugate des Salt Agings zeigen durch die starke Bandenbildung eine hohe Homogenität und Stabilität, die PDIs sowie PPIs der vorherigen Untersuchungen unterstützen das ebenfalls. Da die Konjugate des 0,7 M Salt Agings gegenüber den anderen Konjugaten eine höhere Anzahl gebundener Oligonukleotide aufweisen, lässt sich deren Stabilität und gute Bandenbildung im Gel erklären. Die Konjugate sind durch die hohe Bedeckung sehr salztolerant und durch die Konjugationsmethodik sehr homogen, die Untersuchung im Gel bestätigt somit die analytischen Daten. Die Banden der Konjugate nach Einfrieren sind weniger stark ausgeprägt. Die PDIs und PPIs waren zwar vergleichbar, aber die Größe der Konjugate (nach DLS) war höher als erwartet und hier ist von etwas weniger homogenen Konjugaten auszugehen. Insgesamt stützen die Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese erneut die analytischen DLS Daten: Die Konjugation mittels pH-Erniedrigung resultiert in minderwertige Konjugate mit hoher Polydispersität und geringerer Ausbeute. Das Salt Aging liefert homogene Konjugate mit hoher Ausbeute und hoher DNA-Bedeckung. Die Konjugation mittels Einfrieren erzeugt zwar eine geringere Bedeckung als das Salt Aging, dadurch eine abgeschwächte Stabilität und etwas mehr Polydispersität, die Konjugate sind jedoch größtenteils vergleichbar mit denen des Salt Agings. Bei allen 3 Konjugationsmethoden wurde durch kürzere Sequenzen eine höhere DNA-Bedeckung erreicht. Weiterhin wirkte sich der Adenin-Spacer bei der Konjugation mittels Einfrieren vorteilhaft aus. Beim Salt Aging sowie bei der pH-Erniedrigung konnte der Einfluss der Nukleotidabfolge des Spacers nicht bestimmt werden, hier konnte lediglich der Einfluss der Sequenzlänge ermittelt werden.

Die Einsetzbarkeit der hergestellten Konjugate für diagnostische Zwecke wurde als nächstes mit Funktionalitätsüberprüfungen mittels Bindungsassay und Dot Blot getestet, bevor abschließend die Übertragung auf den Lateral Flow Assays erfolgte.

#### **4.3.2 Funktionalitätsüberprüfung der Konjugate**

Im vorigen Kapitel wurde die Konjugation für das Aptamer sowie cOligo optimiert. Eine erfolgreiche Konjugation gewährleistet aber nicht zwangsläufig die Funktionalität der

Konjugate. Daher werden die Konjugate in diesem Kapitel bezüglich Funktionalität für den späteren diagnostischen Einsatz überprüft. Mit einem Bindungsassay wird die Hybridisierungs- und die Kompetitionsfähigkeit überprüft und zuletzt mit dem Dot Blot eine Annäherung an den Lateral Flow Assays getestet.

#### 4.3.2.1 Bindungsassay

Die Entwicklung der funktionalisierten AuNP-Konjugate beinhaltetete wie zuvor beschrieben die Konjugation, Funktionalitätsüberprüfung und Lateral Flow Assays. Der folgende Bindungsassay wurde bei der Optimierung des Konjugats nach pH-Erniedrigung durchgeführt und diente als Anhaltspunkt, ob die resultierenden Konjugate funktional sind. Die Durchführung des Assays ist unter B.8 beschrieben und in Abbildung 32 dargestellt.

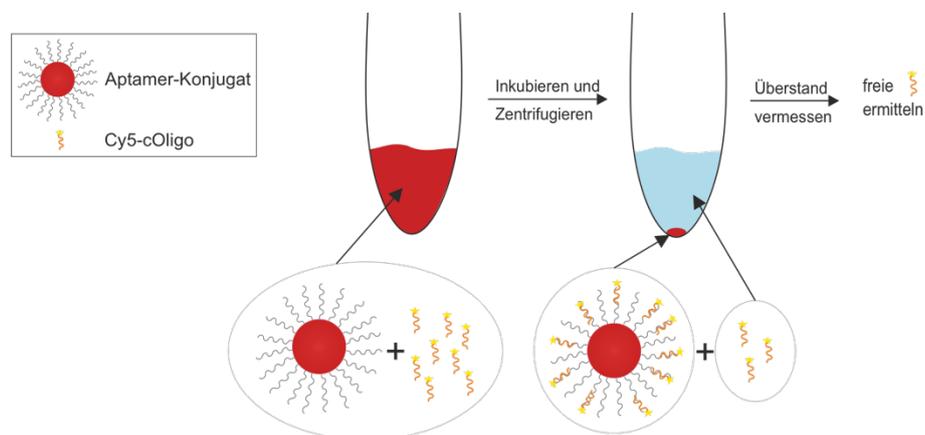
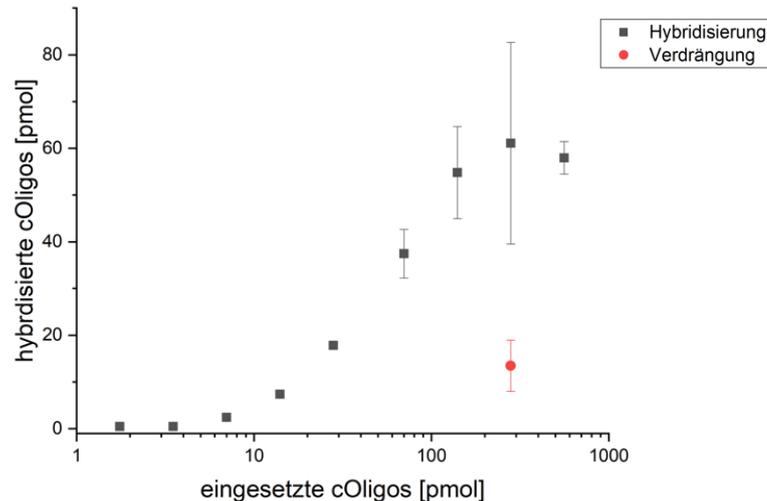


Abbildung 32: Prinzip des Bindungsassays mit Aptamer-AuNP und Cy5-markierten cOligos.

Aptamer-AuNP wurden zusammen mit Cy5-markierten cOligos in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und anschließend zentrifugiert. Danach befanden sich im roten „Pellet“ die AuNP mit hybridisierten Cy5-cOligos, die freien Cy5-cOligos verblieben im Überstand. Dieser wurde entnommen und anhand des gemessenen Fluoreszenz-Signals konnten die freie Menge und resultierend daraus die gebundene Menge an Cy5-cOligo ermittelt werden.

Zur Ermittlung der TID-Reaktion wurde in einer weiteren Ausführung einer Probe zusätzlich zum Cy5-cOligo das Target OTA zugegeben. Das Target bindet an die Aptamere des Konjugats und dadurch werden Bindestellen für das cOligo blockiert. Somit liegen hier mehr freie Cy5-cOligos vor und es wird ein höheres Fluoreszenzsignal ermittelt.

Das Cy5-cOligo wurde im Bereich 0,4 – 560 pmol eingesetzt. Eine TID-Reaktion wurde mit der zweithöchsten Konzentration (280 pmol, 20  $\mu$ M) durch einen Überschuss an OTA (560 pmol, 40  $\mu$ M) untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt.



**Abbildung 33:** Ergebnisse des Bindungsassays mit Aptamer-AuNP und Cy5-markierten cOligos, dargestellt ist die Menge hybridisierter cOligos [pmol] in Abhängigkeit der eingesetzten cOligos von 0,4 – 560 [pmol]. Messpunkte in grau zeigen die Hybridisierung, roter Messpunkt zeigt die kompetitive Verdrängung durch 560 pmol OTA bei 280 pmol eingesetzten cOligos. Logarithmische Auftragung der Messwerte.

Betrachtet man den Kurvenverlauf wird deutlich, dass ab 140 pmol des Cy5-cOligos (3. höchste Konzentration) eine Sättigung des Konjugats erreicht wurde. Zwar besitzen die Werte teilweise eine hohe Standardabweichung durch die Messmethode, jedoch zeigen die Werte insgesamt den Sättigungsverlauf. Der entstandene sigmoidale Kurvenverlauf ist bereits aus den MST-Experimenten bekannt. Erst ab einer Konzentration höher 3,5 pmol wurde ca. die Hälfte der eingesetzten cOligos an die konjugierten Aptamere hybridisiert, bis bei ca. 140 pmol eine Sättigung der Aptamere durch ca. 60 pmol cOligos erreicht wurde. Der Einsatz von 560 pmol OTA verminderte die Bindung des cOligos an die Aptamer-Konjugate um ca. 80 %, von ~ 61 auf 13 pmol.

Anhand dieses Bindungsassays konnte zum einen die Hybridisierungsfähigkeit der konjugierten Aptamere an freie cOligos gezeigt werden, sowie die erfolgreiche kompetitive Verdrängung der cOligos durch das OTA. Demnach wurden durch die Konjugation funktionale Konjugate erstellt, die sich für einen diagnostischen Einsatz eignen könnten. Aufgrund hoher Kosten des Assays (hoher Verbrauch an Thiol- sowie Cy5-markierten Oligonukleotiden) wurde er nach den aufgeführten Ergebnissen nicht für weitere Konjugate durchgeführt. Die Funktionalität der Konjugate in Lösung konnte gezeigt werden, mittels

Dot Blot sollte als nächstes die komplexere Reaktion von immobilisierten Bindungspartnern untersucht werden.

#### 4.3.2.2 Dot Blot

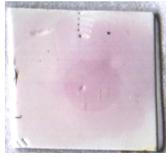
Der Dot Blot stellt ein zum LFA ähnliches Format dar, bei dem die Interaktion der Konjugate mit dem Target und dem immobilisierten komplementären Molekül untersucht werden kann [137]–[139]. Die komplementäre DNA wird auf einer Membran immobilisiert, hierbei eignen sich PVDF-[140] sowie Nitrozellulose-Membranen [138], [139]. Auf Microarrays hat sich bereits die erfolgreiche Kupplung von Oligonukleotiden mittels Streptavidin-Biotin auf Nitrozellulose gezeigt (siehe 4.1.3). Daher wurde diese Immobilisierungsart und ebenfalls das adsorptive Immobilisieren der Oligonukleotide getestet.

Bei der Durchführung des Dot Blots wurden Oligonukleotide auf der Membran immobilisiert und daraufhin für ca. 16 h mit den komplementären Konjugaten und ggf. OTA inkubiert.

Die Amino-modifizierten Oligonukleotide führten auf den Dot Blots zu keiner Reaktion mit den Konjugaten, zum einen könnte die Hybridisierungsfähigkeit aufgrund der Adsorption der Nukleotide auf der Nitrozellulose beeinträchtigt sein. Zum anderen könnten die Oligonukleotide durch die Hybridisierungsreaktion mit der komplementären DNA von der Nitrozellulose gelöst werden. In beiden Fällen kann keine Rotfärbung des Bindungsbereichs erfolgen. Bei der Immobilisierung mittels Streptavidin-Biotin-Kupplung konnten jedoch Rotfärbungen detektiert werden. Daher ist bei den folgenden Versuchen die Streptavidin-Biotin-Kupplung verwendet worden.

Nach Optimierungsschritten der Konjugation (unter 4.3.1) wurden Dot Blots durchgeführt, um die Hybridisierung der komplementären Oligonukleotide sowie die Verdrängung durch das Target OTA zu untersuchen. Die Hybridisierung konnte bei nahezu jedem Konjugat festgestellt werden, Abbildung 34 zeigt für die drei optimierten Konjugationsmethoden des A<sub>25</sub>-Aptamers Dot Blots zur Hybridisierung (Versuchsdurchführung unter B.10 beschrieben).

pH-Erniedrigung



Salt Aging [0,7 M]

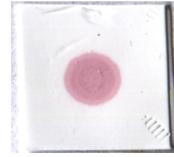
Einfrieren, 1  $\mu$ M, -80 °C

Abbildung 34: Dot Blot des  $A_{25}$ -A Konjugats nach verschiedenen Konjugationen. Auf Nitrozellulose wurde mittels Streptavidin-Biotin-Kupplung das cOligo immobilisiert.

Die roten Spots zeigten die Bindung des an AuNP konjugierten  $A_{25}$ -Aptamers an das Membran-gebundene cOligo. Die Nitrozellulose-Membran wurde vor Inkubation mit dem Konjugat mit Casein geblockt, dennoch trat beim Konjugat durch pH-Erniedrigung unspezifische Bindung auf bzw. wurde die Membran rötlich verfärbt. Diese unspezifische Reaktion war ebenfalls für das cOligo-Konjugat zu verzeichnen (nicht dargestellt). Bei den Konjugaten der anderen Konjugationsmethoden sind die Bindungsbereiche klar auf der Membran abgegrenzt. Die Konjugation mittels pH-Erniedrigung lieferte bei der UV-Vis- und DLS-Analyse ebenfalls die schlechtesten Ergebnisse. Daher wurden keine weiteren Dot Blot Analysen mit den Konjugaten der pH-Erniedrigung durchgeführt. Insgesamt sind jedoch alle 3 Konjugate funktional bzw. befähigt die komplementäre DNA zu binden, da rote Spots vorliegen.

Während des Optimierungsprozesses der Konjugation wurden stetig Dot Blots angefertigt, jedoch konnte meistens nur eine starke Hybridisierung und keine kompetitive Verdrängung durch OTA beobachtet werden. Die zugrunde liegende Problematik ist die Avidität der konjugierten AuNP. Für die Bindung eines konjugierten AuNP an die biotinylierte DNA wird lediglich ein DNA-Molekül pro AuNP benötigt, welches dann eine Rotfärbung hervorruft. Wenn also beim  $A_{25}$ -A Konjugat alle Aptamere OTA gebunden haben, außer bspw. nur eins, wird eine Hybridisierung ermöglicht, dieser Fall wird in Abbildung 35 dargestellt.

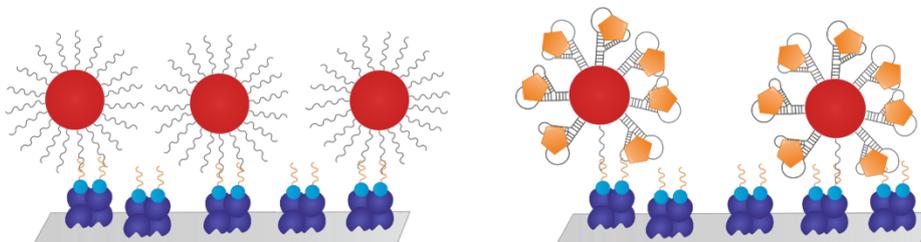
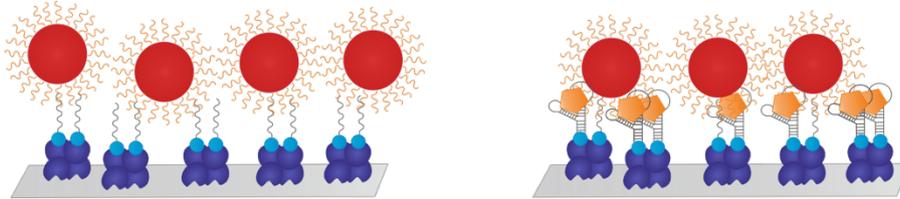


Abbildung 35: Mögliche Bindungen auf dem Dot Blot mit dem  $A_{25}$ -A Konjugat und immobilisierten cOligos (mittels Streptavidin-Biotin Kupplung). Links: Reaktionen auf dem Dot Blot ohne OTA, rechts: Reaktionen mit OTA-Zugabe (OTA: orangenes Pentagon).

Bei biotinylierten Aptameren ist es wahrscheinlich, dass aufgrund sterischer Gründe nicht an jedes Aptamer ein cOligo-AuNP hybridisieren kann. Da OTA im Vergleich zu den restlichen Molekülen sehr klein ist, könnte es an jedes freie Aptamer binden. Wenn dennoch gelegentlich ein cOligo gebunden wird, tritt weiterhin eine Rotfärbung auf (Abbildung 36).



**Abbildung 36:** Mögliche Bindungen auf dem Dot Blot mit dem A<sub>25</sub>-O Konjugat und immobilisierten Aptameren (mittels Streptavidin-Biotin Kupplung). Links: Reaktionen auf dem Dot Blot ohne OTA, rechts: Reaktionen mit OTA-Zugabe (OTA: orangenes Pentagon).

Zur Lösung des Problems sollte die DNA-Bedeckung der AuNP mit Oligonukleotiden verringert werden (siehe 4.3.1.2), damit insgesamt weniger Moleküle für eine Bindung bzw. Rotfärbung zur Verfügung stehen und ein sensitiverer Assay erzeugt werden kann.

Zur abschließenden Analyse der optimierten Konjugate von A<sub>25</sub>-A und A<sub>25</sub>-O des Salt Agings und des Einfrierens aus 4.3.1 wurden erneut Dot Blots durchgeführt. Ziel war es dabei die kompetitive Verdrängung zu optimieren, indem die Anzahl der Bindungen zwischen konjugierten AuNP und auf der Membran immobilisierten Oligonukleotiden verringert wurde. Dafür wurde die Dichte des immobilisierten Oligonukleotids reduziert. 4 verschiedene Dichte-Verhältnisse wurden durch Verminderung der Biotin-Oligonukleotid-Konzentration bei gleichbleibender Streptavidin-Konzentration getestet. Folgende molare Streptavidin-Biotin-DNA-Verhältnisse wurden eingesetzt: 1:2, 1:1, 10:1, 100:1. Für jedes Konjugat und Verhältnis wurde die reine Hybridisierung (H) mit der komplementären DNA getestet sowie durch Zugabe des Targets OTA (20 µM) die kompetitive Verdrängung (V). Das Dot Blot Format bzw. die Größe wurde zum vorherigen verändert, die genaue Versuchsdurchführung ist unter B.10 beschrieben und alle Dot Blots sind unter 7.5 zu finden.

Genügend sichtbare Spots waren bei allen Konjugaten der Bedingungen 1:2 sowie 1:1 zu verzeichnen, bei den restlichen Verhältnissen waren nur teilweise und sehr schwache Spots zu sehen, diese konnten mittels Bild-Auswertung nicht ausreichend ausgewertet werden und werden daher zunächst vernachlässigt. In Abbildung 37 sind die Dot Blots sowie die mittels ImageJ ausgewerteten Signale aller Konjugate für die Streptavidin-Biotin-DNA

Verhältnisse 1:2 und 1:1 dargestellt. Bei erfolgreichen Verdrängungsreaktionen sind Prozentangaben angegeben.

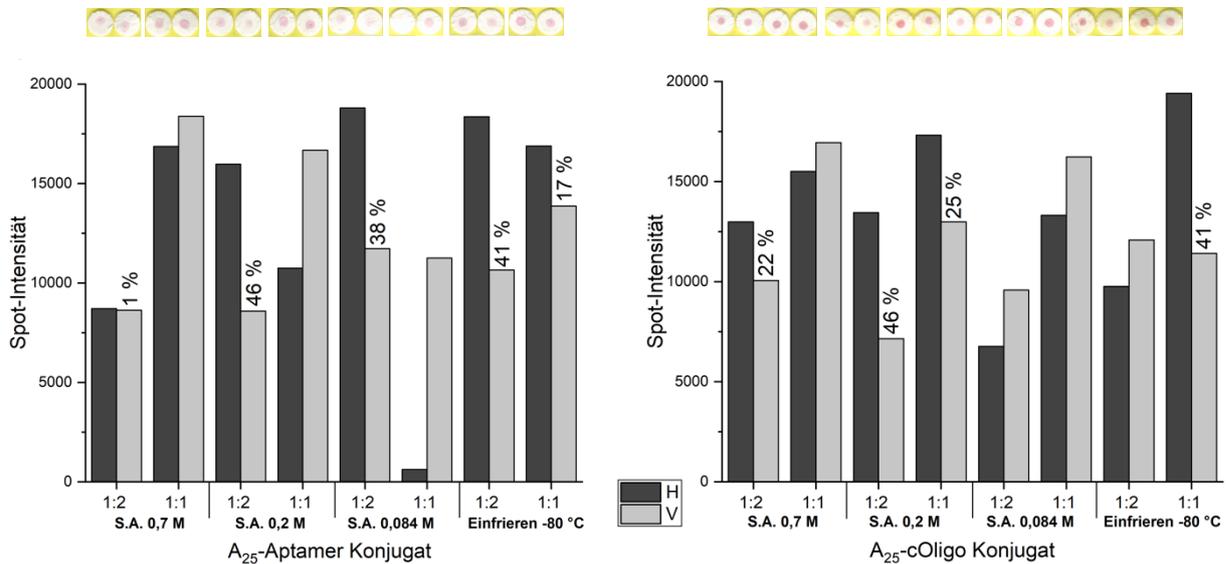


Abbildung 37: Dot Blots der A<sub>25</sub>-Aptamer und A<sub>25</sub>-cOligo Konjugate nach Salt Aging (0,7 M, 0,2 M oder 0,084 M) oder Einfrieren bei -80 °C. Auswertung mittels ImageJ zur Hybridisierung (H) und kompetitiven Verdrängung (V). Relevante Signalunterschiede zwischen H und V sind in Prozent angegeben.

Die Bild-Auswertung ist aufgrund folgender Faktoren fehlerbehaftet:

1. Die Oberflächen-Beschaffenheit der befestigten Dot Blots erschwerte den Vergleich der Signale.
2. Durch die manuelle Auftragung der Spots ergeben sich verschiedene Spot-Größen, die zu unterschiedlichen Dichten der aufgegebenen Komponente führen können. Dadurch werden die Signalintensität sowie die Verdrängbarkeit beeinflusst.

In den ausgewerteten Signalen nicht zu erkennen, jedoch eindeutig mit bloßem Auge, ist dass die A<sub>25</sub>-O Konjugate eine stärkere Rotfärbung hervorrufen als die A<sub>25</sub>-A Konjugate. Dies kann durch sterische Hinderungen erklärt werden. Wie bei Microarrays unter 4.1.3.1 können „freie“ cOligos (in diesem Fall an AuNP konjugiert) aufgrund der geringeren Größe einfacher an Membran-gebundene Aptamere binden als im umgekehrten Fall. Die größeren Aptamere haben mehr Ladungsabstoßungen untereinander beim Annähern an die Membran-gebundenen cOligos, sodass weniger Aptame-konjugierte AuNPs als cOligo-konjugierte AuNPs binden können. Dies führt zu einer verminderten Hybridisierung und geringeren Rotfärbung.

Als nächstes fällt auf, dass die Signale des Verhältnisses 1:1 sowohl ausgewertet als auch optisch sichtbar stets höher sind als die des Verhältnisses 1:2. Dieser Effekt entsteht vermutlich ebenfalls aufgrund sterischer Hinderungen und elektrostatischer Wechselwirkungen, da bei 1:2 jedes Streptavidin-Molekül theoretisch 2 biotinylierte DNA-Moleküle gebunden hat, gegenüber nur einem Molekül bei 1:1. Beim Streptavidin-Biotin-DNA Verhältnis von 1:2 sind die DNA-Moleküle zu nah aneinander, sodass durch Abstoßungen und DNA-Faltungen die komplementären Basen der biotinylierten Oligonukleotide nicht zugänglich sind für die Oligonukleotide auf den AuNP. Außerdem ist durch mehr DNA-Moleküle die Gesamtladung auf der Membran höher und diese führt zu zusätzlichen Ladungsabstoßungen. Daher können insgesamt mehr AuNP bei einer geringeren Anzahl an biotinylierten Oligonukleotiden gebunden werden und somit eine stärkere Rotfärbung hervorrufen. Betrachtet man jedoch die Ergebnisse der Verdrängungsreaktion durch OTA zeigt das Verhältnis 1:2 bessere Ergebnisse. Die Signaldifferenz zwischen Hybridisierung und Verdrängung ist in Prozent über der jeweiligen Säule angegeben. Für die  $A_{25}$ -A Konjugate wurden bei 1:2 Verdrängungen verzeichnet und der TID-Mechanismus zwischen Aptamer, cOligo und OTA nachgewiesen. Bei dem Verhältnis 1:1 wurde nur bei dem  $A_{25}$ -A Konjugat mittels Einfrieren eine Verdrängung erzielt. Bei einem späteren LFA der Endverbraucher wird das Ergebnis rein visuell ausgewertet, daher wurde auch hier die subjektive visuelle Wahrnehmung untersucht. Visuell konnte für die  $A_{25}$ -A Konjugate des 0,2 M Salt Aging (S.A.) sowie des 0,084 M S.A. für 1:2 eine Verdrängung bestätigt werden, jedoch mit geringerem Ausmaß als bildtechnisch ausgewertet. Für das Konjugat S.A. 0,7 M war keine Verdrängung ersichtlich, auch ausgewertet ist die Verdrängung nur mit 1 % angegeben. Visuell und ausgewertet wurde für das Konjugat mittels Einfrieren bei beiden Verhältnissen eine Verdrängung festgestellt.

Beim  $A_{25}$ -O Konjugat konnte bei den Salt Aging Konjugaten mit 0,7 M und 0,2 M NaCl Entfärbung durch OTA mittels ImageJ festgestellt werden. Visuell konnte die Verdrängungsreaktion von  $A_{25}$ -O nach S.A. 0,7 M jedoch nicht bestätigt werden, für S.A. 0,2 M hingegen schon. Durch eine geringere Oligonukleotid-Dichte auf den AuNP konnte eine niedrigere Avidität erreicht werden und eine bessere Verdrängbarkeit der konjugierten AuNP generiert werden. Auch hier lieferte das Verhältnis Streptavidin-Biotin-Aptamer 1:2 erneut die besseren Werte für die Verdrängung. Die Dot Blots vom S.A. 0,084 M wurden beim Einscannen stark belichtet und es konnte keine Verdrängung ermittelt werden, dies

wurde visuell gleich bewertet. Beim Konjugat mittels Einfrieren wurde nur bei 1:1 eine Verdrängung ausgewertet, durch die Oberflächen-Beschaffenheit wurde die Auswertung von 1:2 erschwert, visuell wurde hier eine deutliche Verdrängung festgestellt (Dot Blots erneut dargestellt in Abbildung 38).



Abbildung 38: Dot Blots mit dem  $A_{25}$ -O Konjugat mittels Einfrieren. Streptavidin-Biotin-Aptamer im Verhältnis 1:2. Links: Hybridisierung, rechts: kompetitive Verdrängungsreaktion mit OTA.

Bei diesem Konjugat ist die Verdrängung demnach für beide Verhältnisse Streptavidin zu Biotin-Aptamer erfolgreich gewesen.

Zusammengefasst war bei den S.A. 0,7 M Konjugaten aufgrund hoher Avidität keine Verdrängung zu verzeichnen, ebenso bzw. nur sehr schwach für die Konjugate S.A. 0,084 M. Beim Konjugat S.A. 0,2 M kann ausgewertet sowie optisch eine Verdrängung bestätigt werden, jedoch nur in geringem Ausmaß. Eindeutig ist nur eine Verdrängung bei beiden Konjugate mittels Einfrieren ersichtlich, in einem optischen Ausmaß, das für diagnostische Zwecke überhaupt erst relevant ist. Aufgrund des positiven Effekts des Adenin-Spacers bei der Konjugation mittels Einfrieren gegenüber dem Salt Aging, kann davon ausgegangen werden, dass die Konjugation beim Einfrieren öfter gerichtet stattfindet. Beim Einfrieren liegen die Oligonukleotide weitgehend gestreckt vor [74], wodurch eine mittels Thiolgerichtete Immobilisierung durch den Adenin-Spacer zusätzlich erleichtert wird. Beim Aptamer-Konjugat wird durch eine gerichtete Konjugation die Targetbindung und somit eine TID-Reaktion erleichtert. Beim cOligo-Konjugat benötigen AuNP mit adsorptiv immobilisierten cOligos mehr Platz für eine Hybridisierungsreaktion mit dem Membran gebundenen Aptamer, durch die nötige Nähe zum Aptamer gegenüber „gestreckten“ (gerichtet immobilisierten) cOligos. Dadurch können weniger AuNP mit dem Aptamer interagieren und die TID-Reaktion wird im Vergleich zu gerichtet immobilisierten cOligo-Konjugaten durch die geringere Anzahl an Konjugaten erschwert. Dieses Phänomen (bessere TID-Ergebnisse bei mehr bindenden/ hybridisierenden Molekülen und Unterschiede bei adsorptiver und gerichtet immobilisierter DNA) war bereits bei TID-Reaktionen auf Microarrays beobachtet worden (4.1.3.2). Die Konjugate mittels Einfrieren sind demnach trotz etwas höherer DNA-Bedeckung aufgrund der DNA-Ausrichtung besser für Verdrängungsreaktionen geeignet als Konjugate des Salt Agings.

Betrachtet man die Konzentrationen und Verhältnisse der Komponenten, wird aber eine Problematik des Assays sichtbar: OTA wurde für die Verdrängung in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt, das entspricht 500 pmol. Beim Streptavidin-Biotin-DNA Verhältnis 1:2 wurde die biotinylierte DNA mit 5 pmol eingesetzt, bei den drei weiteren Verhältnissen demnach mit weniger Menge. Bei einem 100- oder mehrfachen Überschuss von OTA gegenüber dem biotinylierten cOligo konnte nur eine schwache Verdrängung beim Einsatz des A<sub>25</sub>-A Konjugats erreicht werden. Die Menge der eingesetzten konjugierten Aptamere liegt im Bereich von 7 – 53 pmol (Berechnungen unter 7.5). Beim Einsatz von 500 pmol OTA sollte daher die Bindung der Aptamere ans Target um ein Vielfaches gegenüber der Bindung ans cOligo überwiegen, anhand der jedoch nur geringen Abschwächung der Rotfärbung ist dies scheinbar nicht der Fall, da ein Großteil der konjugierten AuNP weiterhin an die biotinylierten cOligos binden. Die starke Avidität der Aptamer-konjugierten AuNP führt auch bei Vorhandensein von OTA zu Bindungen an die cOligos, dabei ist bspw. eine Aptamer-cOligo-Bindung pro AuNP ausreichend für eine Rotfärbung, die restlichen Aptamere könnten OTA gebunden haben. Beim umgekehrten Fall, dem Einsatz des A<sub>25</sub>-O Konjugats sind je nach Konjugat ca. 22 – 91 pmol cOligos eingesetzt worden, gegenüber den 5 pmol oder weniger biotinylierten Aptameren. Die 500 pmol OTA sollten auch hier aufgrund höherer Affinität die Bindestellen der Aptamere vollständig belegen und keine Rotfärbung ermöglichen. Zwar wird in diesem Fall eine stärkere Verdrängungsreaktion beobachtet, jedoch verglichen mit der hohen OTA-Konzentration keineswegs eine sensitive. Auch hier wirkt sich die Avidität der konjugierten AuNP als hinderlich aus und erschwert die Verdrängungsreaktion.

Durch die Verminderung der Oligonukleotid-Dichte der Konjugate (in 4.3.1) konnte insgesamt eine relevante Reduzierung der Avidität erfolgen und diese resultierte bei den Dot Blots in eine erfolgreiche Verdrängungsreaktion. Aufgrund der für eine Verdrängung notwendigen OTA-Konzentration sind die positiven Ergebnisse aber noch nicht für einen sensitiven diagnostischen Assay einsetzbar, zeigen jedoch die generelle Funktionalität des gewählten Assays.

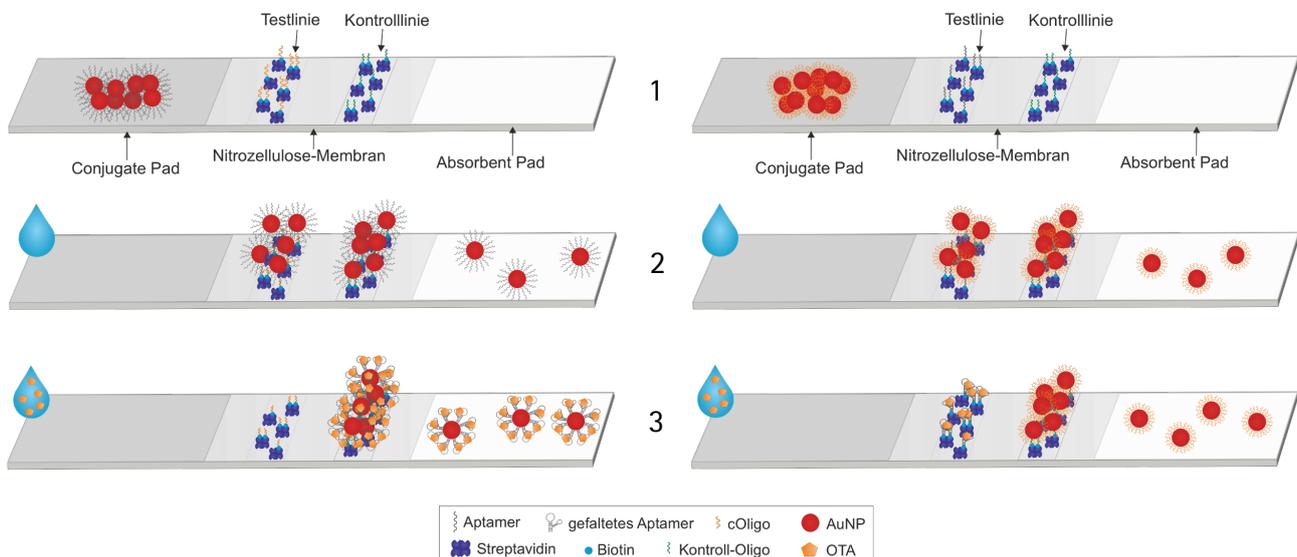
#### 4.3.3 Funktionalisierte Konjugate zum diagnostischen Einsatz beim Lateral Flow Assay

Nach ersten erfolgreichen Ergebnissen zur Konjugationsoptimierung und auf dem Dot Blot wurden ebenfalls Lateral Flow Assays durchgeführt. Ein LFA hat ein typisches Setup und

benötigt gepufferte Systeme. Der Aufbau und die Zusammensetzungen wurden in den folgenden Unterkapiteln untersucht und optimiert. Schließlich wurde die Funktionalität der Konjugate bezüglich Hybridisierung und Konkurrenz mit OTA untersucht.

#### 4.3.3.1 Aufbau des Lateral Flow Assays

Ein Lateral Flow Assay ist grundlegend aus 3 Teilen aufgebaut: Dem Conjugate Pad, auf welchem das Konjugat vorgelegt ist, der Nitrozellulose-Membran, auf der sich die Test- und Kontrollzonen des Testergebnisses befinden, und dem Absorbent Pad (AP) zur Aufrechterhaltung der Kapillarkräfte und der Aufnahme der Probenflüssigkeit. In Abbildung 39 ist der verwendete Aufbau des entwickelten LFAs dargestellt.



**Abbildung 39:** Aufbau und Funktionsprinzip des angestrebten LFAs. Links: mit Aptamer-Konjugat, rechts: mit cOligo-Konjugat. 1: Vor Probenaufgabe, 2: nach Durchführung mit einer Probe ohne OTA (negatives Testergebnis, rote Testlinie), 3: nach Durchführung mit einer Probe mit OTA (positives Testergebnis, keine rote Testlinie). (Vergrößerte Darstellung unter B.11 zu finden).

Dabei kann entweder Aptamer- oder cOligo-Konjugat verwendet werden. Bei beiden Konjugat-Varianten ist bei einem negativen Testergebnis eine rote Testlinie und bei einem positiven Testergebnis keine rote Testlinie zu verzeichnen. Das Ausbleiben der Testlinie beim positiven Testergebnis unterscheidet sich grundlegend von den meisten kommerziellen LFAs, da der angestrebte LFA zur Detektion von OTA auf einem kompetitiven Testaufbau und nicht auf einem Sandwich-Prinzip basiert.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Nitrozellulose-Membranen wurden spezifisch für LFAs entwickelt, getestet wurden die Typen CN 95, 140 und 180, alle mit Polyester-Backing. Die Membran-Typen besitzen mit aufsteigender Bezeichnungszahl eine kleinere Porengröße und höhere Kapillargeschwindigkeit [141]. Die Kapillargeschwindigkeit wirkt sich auch auf die Sensitivität aus, mit aufsteigender Bezeichnung nimmt die Sensitivität von „gut“ über „sehr gut“ zu „sehr hoch“ zu. Die Membran 180 eignet sich jedoch etwas schlechter für viskose Proben, als die Membranen 95 und 140 [142]. Bei der Entwicklung der LFAs in dieser Arbeit wurden alle Membranen getestet, die Membran 95 lieferte aufgrund der hohen Geschwindigkeit und resultierenden kürzeren Reaktionszeit keine so sensitiven Ergebnisse wie die restlichen Membranen, daher wurde sie nicht weiterverwendet. Die Membran 180 führte zu breiteren Testlinien, ansonsten konnte kein Unterschied zur Membran 140 festgestellt werden. Um bei zukünftigen Anwendungen auch viskose Proben untersuchen zu können, wurde weiter mit der Membran 140 gearbeitet. Wenn nicht weiter vermerkt, beziehen sich alle folgenden Ergebnisse auf LFAs mit dieser Membran.

Für einen erfolgreichen und sensitiven Assay werden unterschiedliche Pufferzusammensetzungen bei einem LFA verwendet, ihr Einsatz wurde im folgenden Kapitel untersucht. Dabei sind oftmals LFAs oder nur Ausschnitte gezeigt. Da der Assay vertikal durchgeführt wurde, sind die LFAs auch hier senkrecht dargestellt, in Laufrichtung der Probenflüssigkeit von unten nach oben.

#### **4.3.3.2 Zusammensetzung und Pufferoptimierungen des LFAs**

Auf dem Conjugate Pad (CP) ist das Konjugat vorgelegt, welches durch Zugabe der Probenflüssigkeit rehydriert wird und durch Kapillarkräfte über den Teststreifen wandert. Damit das Konjugat optimal aus dem CP gelöst wird und mit den Zielmolekülen reagieren kann, sind Zusätze im Laufpuffer entscheidend sowie eine Vorbehandlung des CP. Das CP besteht aus Glasfaser und aufgrund der Struktur werden Reagenzien zum Blockieren benötigt, ansonsten verweilen die Konjugate sehr lange im CP und die Kapillarkräfte reichen nicht für den Transport der Probenflüssigkeit aus. Weiterhin können durch die Vorbehandlung des CPs Zusätze vorgelegt werden, welche bspw. den pH-Wert der Probe anpassen und dem Konjugat Ionen zur optimalen Bindung ans Target liefern können. In Tabelle 12 werden die vorgenommenen Optimierungen des Conjugate Pads aufgeführt.

**Tabelle 12:** Optimierungen des Conjugate Pads. Die Anpassungen fanden nacheinander von oben nach unten statt, nur Änderungen zu den zuvor verwendeten Bedingungen wurden aufgeführt.

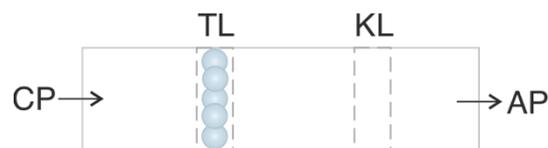
Anpassungen	Effekte	Verbleibende Problematik
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tris-HCl, pH 8</li> <li>• 1 % BSA</li> <li>• 0,05 % Tween 20</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rehydrieren des Konjugats</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rückstände des Konjugats im CP</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• OVA statt BSA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wechselwirkungen zwischen BSA und OTA werden unterbunden</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rückstände des Konjugats im CP</li> <li>• Mögliche Wechselwirkung von OVA und OTA muss überprüft werden</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• PBS statt Tris-HCl,</li> <li>• 2 % Sac.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nahezu komplettes Rehydrieren des Konjugats</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bindepuffer des Aptamers beinhaltet Tris-HCl, eventuell schwächere Bindung an OTA</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bindepuffer ohne CaCl<sub>2</sub> statt PBS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gutes Rehydrieren des Konjugats</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ca<sup>+</sup>-Ionen stabilisieren DNA-Faltungen, eventuelle Beeinträchtigungen der Aptamer-Faltung</li> <li>• Aber bei Zugabe von CaCl<sub>2</sub> weniger Konjugat-Stabilität vorhanden</li> </ul>

Zuerst wurden die in der Literatur standardmäßige Zusammensetzung zum Blockieren des CP getestet [141]. Die Verwendung von Tris-HCl, pH 8, 1 % BSA und 0,05 % Tween 20 führte zu erfolgreichen Hybridisierungen, jedoch nicht zu Entfärbungen durch die TID-Reaktion auf der Testlinie. Außerdem verblieben einige Rückstände des Konjugats auf dem CP. Da jedoch für das Rehydrieren auch der Laufpuffer und das Konjugat entscheidend sind, wurde dieser Faktor zunächst vernachlässigt. Recherchen ergaben, dass OTA eine starke Wechselwirkung mit BSA und generell Albuminen aufweist, im menschlichen Körper wird es an HSA gebunden transportiert [143]. Casein als alternatives Blocking-Reagenz stellte sich als ungeeignet heraus, da die Rehydrierung der Konjugate ineffizient war. Außerdem wurde Ovalbumin (OVA) getestet. Bei OVA handelt es sich ebenfalls um ein Albumin handelt, es wurde aber auch in anderen Studien mit OTA verwendet [144], [145]. Der Einsatz von OVA war erfolgreich und wurde daher für weitere Versuche zum Blocken eingesetzt. Es verblieben aber weiterhin Rückstände des Konjugats im CP.

Als weitere Puffervariante wurde eine Pufferzusammensetzung mit Phosphatsalzen anstelle von einer Tris-Base getestet, als Zusätze wurden wie zuvor OVA und Tween 20 verwendet und zusätzlich 2 % Saccharose [145]. Hiermit konnte eine fast vollständige Rehydrierung des Konjugats erreicht werden. Außerdem wurden erfolgreiche Hybridisierungen detektiert, jedoch keine Verdrängungsreaktionen durch OTA. Als weitere Anpassung wurde daher statt

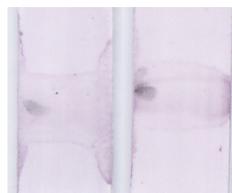
PBS der Bindepuffer des Aptamers (auf Tris-HCl Basis, pH 8,5) verwendet, um die dreidimensionale Aptamerfaltung zu gewährleisten. Hierbei wurde zu Beginn auf das  $\text{CaCl}_2$  im Puffer verzichtet, da sich die zweiwertigen Ionen negativ auf die Konjugat-Stabilität auswirken (siehe 4.3.1.1). Mit diesem Blocking-Puffer wurden ein gutes Rehydrieren der Konjugate sowie ein gutes Gesamtergebnis des LFAs erreicht.

Weiterhin wurde die Testlinie auf der Nitrozellulose-Membran optimiert. Industriell werden Test- und Kontrolllinien mit einer speziellen Apparatur auf die NZ-Membran aufgesprüht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Testlinien per Hand aus mehreren 0,1  $\mu\text{L}$  Tropfen erstellt, daher kommt es zu unterschiedlichen Ausführungen. Anfangs wurden 8 Tropfen aufgegeben, um die komplette Breite des LFAs abzudecken, jedoch konnte auch mit 5 Tropfen eine ausreichende „Linie“ erhalten werden. Das Aufgabeprinzip ist in Abbildung 40 dargestellt.



**Abbildung 40:** Aufgeben der Testlinie der LFAs. Vereinfachte Darstellung des LFA, sichtbar ist die Nitrozellulose-Membran mit Testlinie (TL) und Kontrolllinie (KL), das Conjugate Pad (CP) und das Absorbent Pad (AP) sind angelagert. Die Kontrolllinie wurde nicht aufgegeben, wäre aber an dieser Position zu finden. Die aufgegebenen Tropfen sind in hellblau dargestellt.

Als TL wurde die Kupplung mittels Streptavidin-Biotin verwendet. Die Testlinie führte zur erfolgreichen Hybridisierung, 2 Beispiele sind nachfolgend dargestellt.



**Abbildung 41:** Erfolgreiche Testlinien des LFAs. TL bestehen aus 0,8  $\mu\text{L}$  Streptavidin (17  $\mu\text{M}$ )-Biotin-cOligo (17  $\mu\text{M}$ ) in Bindepuffer, zur Hybridisierung wurde  $\text{A}_{25}$ -A Konjugat mittels pH-Erniedrigung verwendet. Der gräulichere Strich am Rand dient nur als Markierung.

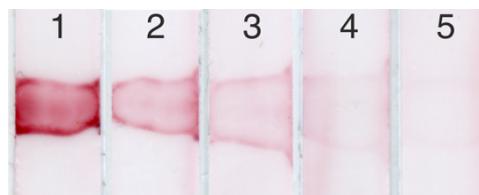
Wie in Abbildung 41 zu sehen, sind die Testlinien zwar erkennbar, jedoch sehr breit und wenig intensiv. Um die Testlinie schmaler und intensiver zu gestalten, wurde ein Zusatz von 2 % Trehalose getestet. Trehalose vermindert negative Trocknungseffekte von Molekülen [146], [147]. Der Zusatz führte zu geraden und schmalere Linien, die aber immer noch

intensitätsschwach waren. Für eine stärkere Bindung auf der Testlinie wurden die Konzentrationen von Streptavidin und der biotinylierten DNA erhöht und die DNA dabei doppelt so konzentriert eingesetzt. Dadurch wurde eine deutlichere TL erhalten (Abbildung 42).



**Abbildung 42:** Erfolgreiche Testlinien des LFAs. TL bestehen aus 0,8  $\mu\text{L}$  Streptavidin (25  $\mu\text{M}$ )-Biotin-cOligo (50  $\mu\text{M}$ ) in Bindepuffer, zur Hybridisierung wurde  $A_{25}$ -A Konjugat mittels pH-Erniedrigung verwendet.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurde die Testlinie aufgrund unzureichender Verdrängungsreaktionen erneut verändert. Dabei wurde die Konzentration von Streptavidin und biotinylierter DNA mehrmals um je die Hälfte reduziert. Für die DNA von 50 auf 25, 12,5, 6,25 und 3,125  $\mu\text{M}$ . Streptavidin wurde wie zuvor halb so konzentriert wie die DNA zugegeben. Die Ergebnisse zur Konzentrationsverminderung sind in Abbildung 43 dargestellt.

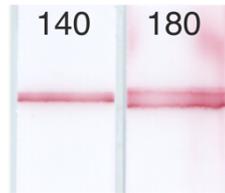


**Abbildung 43:** Erfolgreiche Testlinien von LFAs. TL bestehen aus 0,5  $\mu\text{L}$  Streptavidin-Biotin-Apamer im Verhältnis 1:2 mit 2 % Trehalose. Konzentrationen von Streptavidin und Biotin-DNA von links nach rechts (1 – 5), 25:50  $\mu\text{M}$ , 12,5:25  $\mu\text{M}$ , 6,25:12,5  $\mu\text{M}$ , 3,13:6,25  $\mu\text{M}$ , 1,6:3,13  $\mu\text{M}$ . Zur Hybridisierung wurde  $A_{25}$ -O Konjugat mittels Einfrieren bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  verwendet.

Die Rotfärbung nahm wie erwartet mit abnehmenden Konzentrationen von Streptavidin und Biotin-DNA ab. Für eine spätere visuelle Auswertung des Endverbrauchers wären die Testlinien von 4 und 5 zu schwach, 1 – 3 sind hingegen stark genug. Für weitere Versuche wurde das Konzentrationsverhältnis von 2 verwendet, da eine intensive TL wie von 1 die Verdrängbarkeit erschweren kann und Ergebnisse von 3 bei schwachen TL schwer zu detektieren wären.

Die manuell erstellten Testlinien unterscheiden sich in ihrer Form voneinander und für eine Verdrängungsreaktion wäre eine schmalere, geradlinige Testlinie wünschenswert. Daher

wurde mittels Nano-Plotter die Testlinie aufgegeben, die resultierenden TL sind in Abbildung 44 dargestellt.



**Abbildung 44:** Erfolgreiche Testlinien auf LFAs. Testlinien aufgegeben mit GeSiM Nano-Plotter. Auf CN 140 und CN 180 Membran.

Zum Vergleich der Sensitivität der CN 140 und CN 180 Membranen wurde auf beide Membranen die Testlinie aufgegeben. Auf beiden Membranen ist eine deutliche, gerade und rotgefärbte Testlinie sichtbar, die TL auf der 180er Membran ist jedoch ca. doppelt so breit, vermutlich da diese Membran eine geringere Porengröße hat. Die Breite könnte für eine spätere visuelle Auswertung vorteilhaft sein, jedoch ist sie dadurch insgesamt inhomogener gefärbt. Vor allem bei nur schwachen Verdrängungsergebnissen, wie auf den Dot Blots beobachtet, könnte die Auswertung dadurch erschwert sein. Weiterhin wurde die gesamte 180er Membran leicht rötlich verfärbt, die 140er Membran hingegen nicht bzw. schwächer. Die Auftragung der TL mittels Nanospotter war insgesamt erfolgreich. Durch die aufwendigere Auftragung wurde bei vielen folgenden Versuchen jedoch darauf verzichtet, da zunächst ein „ja“ oder „nein“ Ergebnis bezüglich einer roten Testlinie erreicht werden sollte.

Eine Kontrolllinie für den LFA konnte im Rahmen einer Abschlussarbeit<sup>6</sup> ebenfalls entwickelt werden. Diese basiert auf einer T<sub>25</sub>-Sequenz, die mittels Streptavidin-Biotin-Kupplung auf der NZ aufgebracht worden ist. Oligonukleotide, die mit einem A<sub>25</sub>-Spacer an die AuNP konjugiert wurden, können daran binden. Dabei ist die Bindung an die KL unabhängig von einer Targetbindung, da der komplementäre Bereich der Adenine nicht für die Targetbindung benötigt wird.

<sup>6</sup> „Entwicklung eines Aptamer-basierten Lateral Flow Assays zur Detektion von Ochratoxin A“, Corinna Brandt, 2019



**Abbildung 45:** Lateral Flow Assay mit einer Testlinie und einer Kontrolllinie. A<sub>25</sub>-A Konjugat, hergestellt mittels pH-Erniedrigung. Die Oligonukleotide der TL und KL sind mittels Streptavidin (25 µM)-Biotin (50 µM)-Kupplung immobilisiert. Als TL sind cOligo-Moleküle immobilisiert, als KL T<sub>25</sub>-Moleküle.

In Abbildung 45 ist neben der roten Testlinie ebenfalls eine rote Kontrolllinie zu sehen. Bei Verwendung von konjugierten Oligonukleotiden mit einem Adenin-Spacer konnte die Kontrolllinie auf Basis eines Thymin-Spacers erfolgreich eingesetzt werden.

Als letzte Komponente wurde der Laufpuffer der LFAs optimiert, die Anpassungen sind in Tabelle 13 aufgeführt. Dabei wurde zunächst nur die Hybridisierung betrachtet, d.h. die Rotfärbung der Testlinie durch Bindung von Aptamer und cOligo. Aufgrund der Verwendung eines neuen Scanners unterscheiden sich die Aufnahmen der LFAs voneinander.

**Tabelle 13:** Optimierungen des Laufpuffers des LFAs. Die Anpassungen fanden nacheinander von oben nach unten statt, nur Änderungen wurden aufgeführt.

Zusammensetzung	Effekte	Verbleibende Problematik	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bindepuffer</li> <li>• Mit 1 % BSA oder ohne BSA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erfolgreiche Testlinien</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mit BSA stärkere Testlinie, jedoch wird komplette Membran rötlich gefärbt</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bindepuffer</li> <li>• 1 % OVA statt BSA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erfolgreiche Testlinie</li> <li>• Keine rötlich verfärbte Membran</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Testlinie könnte deutlicher sein</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• PBS mit 2 % Tween 20, 1 % SDS, 5 mM MgSO<sub>4</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erfolgreiche Testlinie</li> <li>• Keine signifikante Verbesserung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Salz-Ionen des Bindepuffers könnten für Aptamer-OTA-Bindung entscheidend sein</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bindepuffer mit oder ohne CaCl<sub>2</sub></li> <li>• 2 % Sac.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erfolgreiche Testlinie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Roter Ränder oberhalb der TL, entstehen vermutlich jedoch beim Schneiden der LFA-Streifen, da auch unter anderen Bedingungen vorhanden</li> </ul>	

Zu Beginn wurde unverdünnter Aptamer-Bindepuffer (A.3) verwendet. Dem Laufpuffer wird oftmals auch ein Blocking-Reagenz [141], [148] zugesetzt, zunächst wurde 1 % BSA getestet. Es verstärkte zwar die Testlinie, verfärbte aber die Nitrozellulose-Membran rötlich. Die Verfärbung entstand vermutlich aufgrund der Interaktion von BSA und AuNP [149], [150]. BSA wurde zum Blockieren der Poren auf der NZ eingesetzt und an diese Moleküle haben dann AuNP gebunden, die vermutlich nur eine geringe Oligonukleotid-Dichte hatten, da BSA mit der freien (bzw. mit Citrat-Ionen bedeckten) Gold-Oberfläche interagiert. Nachdem beim CP BSA durch OVA ausgetauscht wurde, wurde auch im Laufpuffer OVA verwendet. Hierdurch wurden unerwünschte Rotfärbungen der NZ minimiert und darüber hinaus eine erfolgreiche Testlinie erhalten. Zum Vergleich eines weiteren Laufpuffers wurde ein Puffer auf PBS-Basis getestet [145]. Die Ergebnisse des PBS-Puffers waren vergleichbar mit denen des Bindepuffers, es konnte jedoch keine signifikante Verbesserung der Testlinien-Ausbildung erreicht werden. Damit die korrekte Aptamerfaltung gewährleistet werden konnte, wurde daher wieder der Bindepuffer verwendet. Als Zusatz wurde, wie zur Behandlung des CP, 2 % Saccharose zugesetzt, um das Lösen des Konjugats aus dem CP zu unterstützen [146], [151]. Der Einsatz oder Verzicht von  $\text{CaCl}_2$  hatte beim Laufpuffer keinen Einfluss auf die Hybridisierung an der Testlinie, vermutlich wurde das gesamte System des LFAs durch Zusätze zum Konjugat und den Puffern ausreichend stabilisiert. Die Testlinie mit dem optimierten Laufpuffer war zufriedenstellend rot, die NZ wurde bis auf die Ränder nicht rot verfärbt. Die Färbung der Ränder entsteht vermutlich durch die Schnittkanten und trat häufig auf, beeinträchtigte die Ergebnisse jedoch nicht [141].

Nachdem die Komponenten Conjugate Pad, Testlinie und Laufpuffer des LFAs optimiert wurden, sollte abschließend die Funktionalität des LFAs bezüglich Verdrängung durch das Target OTA untersucht werden.

#### 4.3.3.3 Detektion von Ochratoxin A

Mit den vorigen Methoden MST, Microarray, Bindungsassay und Dot Blot konnte die Hybridisierung des Aptamers mit dem cOligo sowie die Verdrängung durch OTA festgestellt werden. Die Hybridisierung auf dem Lateral Flow Assay wurde durch Pufferoptimierungen in diesem Kapitel ebenfalls erfolgreich etabliert. Die Verdrängungsreaktionen auf den Dot Blots haben gezeigt, dass lediglich eine Abschwächung der Rotfärbung durch OTA erreicht

wird, obwohl OTA im Überschuss vorlag und eine ausreichende Inkubationszeit (16 h) gegeben war. Auf LFAs beträgt die Reaktionszeit von Konjugat, OTA und Testlinie nur einige Sekunden bis Minuten, eine komplette Entfärbung der Testlinie ist daher vermutlich schwer zu erreichen. Die ersten Ergebnisse von Verdrängungsreaktionen zeigten keinerlei Abschwächung der Rotfärbung nach OTA Zugabe. Dabei wurden beide SetUps verwendet, also cOligo- oder Aptamer-Konjugat und das OTA mit hoher Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) in den Laufpuffer gegeben. Folgend sind alle Parameter dargestellt, die zum Erreichen einer Verdrängung getestet wurden.

**Tabelle 14:** Problemstellungen und Lösungsansätze en zur Etablierung einer Verdrängungsreaktion auf LFAs, alle genauen Angaben sind unter B.11.4 zu finden.

Problemstellung	Lösungsansatz
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Löslichkeit von OTA verbessern</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMSO / EtOH in Laufpuffer</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gleichgewicht auf Bindung von OTA verschieben</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Konzentration OTA vierfach erhöhen (40 <math>\mu\text{M}</math>)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• CP-Struktur und Zusätze stören</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kein CP, Konjugat in LP</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reaktionszeit verlängern</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Konjugat im LP vorinkubieren</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aptamer-Faltung auf Membran ermöglichen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• LFA mit LP vorinkubieren</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hybridisierung abschwächen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• LFAs / LP erwärmen</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aptamer-Faltung begünstigen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mehr KCl in LP</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aptamer / cOligo-Dichte verringern</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Co-Immobilisierung auf AuNP mit anderen Oligonukleotiden (siehe 7.5)</li> <li>• Salt Aging Konjugationen mit 0,2 M oder 0,084 M statt 0,7 M NaCl (4.3.1.2)</li> </ul>

Trotz aller Änderungen aus Tabelle 14 konnte keine Entfärbung der TL durch die TID-Reaktion erreicht werden. Aufgrund von hohen Materialkosten (Thiol-modifizierte DNA) konnte nicht mit jedem optimierten Konjugat jede Änderung zur Verdrängungsreaktion durchgeführt werden. Nur nach Optimierungserfolgen (durch analytische Daten zur Stabilität und Homogenität oder einer geringeren Oligonukleotid-Dichte) eines Konjugats wurden entsprechende LFAs durchgeführt.

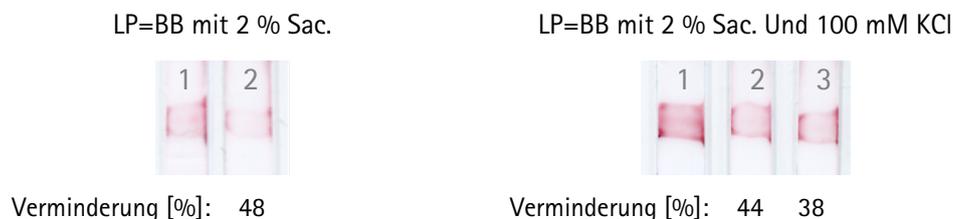
Um auszuschließen, dass eine Problematik mit OTA und den Materialien des LFAs vorliegt, wurden Hybridisierungs- und Verdrängungs-Teststreifen anschließend mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt, um die Verteilung von OTA aufgrund der Fluoreszenz im UV-Bereich sichtbar zu machen.



**Abbildung 46:** LFAs zur Hybridisierung (oben) und Verdrängung (unten) durch OTA (40 µM), bestrahlt mit UV-Licht (366 nm). CP=Conjugate Pad, TL= Testlinie, AP=Absorbent Pad. A<sub>25</sub>-O Konjugat mittels Einfrieren bei - 20 °C, CP vorbehandelt mit BB ohne CaCl<sub>2</sub>, 1 % OVA, 2 % Saccharose.

Das CP fluoresziert ebenfalls im UV-Bereich, dies konnte durch Bestrahlung eines ungetesteten LFA-Streifens bestätigt werden. Durch die UV-Bestrahlung der Streifen aus Abbildung 46 konnte festgestellt werden, dass OTA mit der Probenflüssigkeit durch den kompletten Streifen migriert und nicht z.B. im CP durch Wechselwirkungen zurückgehalten wird. Beeinträchtigungen der TID-Reaktion aufgrund des LFA SetUps konnten somit ausgeschlossen werden.

Als weiterer Lösungsansatz wurde die Aptamer-Testlinie zuvor mit OTA inkubiert. Denn beim Dot Blot mit Inkubationszeiten von mehreren Stunden konnten teilweise abgeschwächte Rotfärbungen erreicht werden. Lange Inkubationszeiten des Aptamer-Konjugats im Laufpuffer mit OTA hatten auf LFAs hingegen keinen Verdrängungs-Effekt. Die Streptavidin-Biotin-Aptamer Lösung wurde für 3 h mit OTA inkubiert und danach als TL aufgetragen. Anschließend wurde der Teststreifen mit cOligo-Konjugat getestet. Durch die Vorinkubation von Aptamer und OTA konnte eine signifikante Verminderung der Testlinie erreicht werden (Abbildung 47).



**Abbildung 47:** LFAs mit cOligo-Konjugat. Testlinien mit Biotin-Aptamer. 1=Hybridisierung, normale Testlinie (12,5 µM Streptavidin + 25 µM Biotin-Aptamer), 2=vorinkubierte Testlinie mit 50 µM OTA, 3=vorinkubierte Testlinie mit 50 µM OTA und zusätzlich 40 µM OTA im LP. Verwendet wurde A<sub>25</sub>-O Konjugat, hergestellt mittels Einfrieren-Konjugation.

Diese ist mit dem bloßen Auge ersichtlich und konnte auch mittels ImageJ ausgewertet werden; die Verminderung der Rotfärbung ist in Prozent unterhalb des Streifens angegeben. Der Einfluss von mehr Kalium-Ionen zur Stabilisierung des G-Quadruplex des Aptamers wurde ebenfalls untersucht. Es konnte jedoch keine Verbesserung der Verdrängungsreaktion beobachtet werden. Die unterschiedlich starken Rotfärbungen der Testlinien ohne bzw. mit mehr KCl ist auf unterschiedliche Chargen des cOligo-Konjugats zurückzuführen. Bei einem Teststreifen (Abbildung 47 (3)) wurde zusätzlich OTA in den Laufpuffer gegeben, dadurch konnte aber keine stärkere Verminderung erreicht werden.

Durch diesen Versuch konnte jedoch gezeigt werden, dass die biotinylierten Aptamere OTA binden können und dadurch das Hybridisieren vom cOligo-Konjugat reduziert werden kann. Betrachtet man die Größen der Moleküle und Partikel, ergibt sich eine Erklärung für die erfolgreiche Vorinkubation der Streptavidin-Biotin-Aptamer Lösung und OTA. Ein Streptavidin-Biotin Komplex ist wenige Nanometer groß (ca. 4 nm an der schmalen Seite und ca. 6 nm an der längeren Seite) [152], [153]. Das Aptamer (21 nm lang [4.3.1.1]) liegt optimalerweise aufgerichtet am Biotin vor. Der mit cOligos konjugierte AuNP ist ca. 40 – 80 nm groß (hydrodynamischer Durchmesser aus 4.3.1). Daher kann nicht an jedes Biotin-Aptamer ein konjugierter AuNP binden und die Hybridisierungs-Rotfärbung wird nur durch einen kleinen Teil der Biotin-Aptamere ermöglicht. Bei einer regulären LFA-Durchführung treffen Konjugat und Target zeitgleich auf die Testlinie. Hier binden aufgrund der hohen Affinität viele Aptamere OTA, jedoch gehen einige Aptamere aufgrund der starken Avidität der cOligo-AuNP eine Hybridisierungsreaktion ein. Binden bei der Vorinkubation der Streptavidin-Biotin-Aptamer Lösung mit OTA bspw. die Hälfte der Aptamere das Target, steht danach nur noch die andere Hälfte der Aptamere für eine Hybridisierung zur Verfügung. Aufgrund der Größe der konjugierten AuNP und weniger freien Möglichkeiten, können insgesamt weniger cOligo-AuNP binden und die Rotfärbung wird abgeschwächt. Im umgekehrten Fall, bei Aptamer-AuNP und Biotin-cOligos, wurde ebenfalls eine Vorinkubation der Aptamere mit OTA getestet. Wenn dort ebenfalls die Hälfte der Aptamere OTA gebunden haben, genügt die restliche Hälfte freier Aptamere aufgrund der starken Avidität dennoch für eine intensive Rotfärbung. Für eine Abschwächung der Rotfärbung müsste bei den Aptamer-AuNP die Aptamer-Dichte weiter reduziert werden.

Die vorliegenden Versuche haben jedoch eine grundsätzliche Kompetition (nach dem TID-Mechanismus) auf dem LFA mit cOligo-Konjugat und Membran-gebundenen Aptameren durch das Target OTA bestätigt.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Gold-Nanopartikel für diagnostische Anwendungen mit Aptameren funktionalisiert werden. Die Funktionalität eines kompetitiven Assays bestehend aus einem Aptamer, einem komplementären Oligonukleotid (cOligo) und dem Mykotoxin Ochratoxin A (OTA) als Zielmolekül wurde mit einem Lateral Flow Assay untersucht.

Zuerst wurde die Bindung von OTA an ein bereits selektiertes Aptamer charakterisiert. Mittels CD-Spektroskopie konnte festgestellt werden, dass sich die dreidimensionale Struktur des Aptamers durch Targetbindung etwas verändert, jedoch in beiden Fällen (mit und ohne OTA) eine G-Quadruplex Formation vorliegt.

Mithilfe der Microscale Thermophoresis wurde die  $K_d$  von Aptamer und Target von 33,5 nM bestimmt und damit eine sehr affine Bindung bestätigt. Aufgrund der geringen Größe des OTA sollte ein kompetitiver Assay nach dem TID-Mechanismus entwickelt werden. Als 3. Komponente wurde daher ein zum Aptamer komplementäres Oligonukleotid untersucht. Mit einer  $K_d$  von 119 nM wies das Aptamer eine deutlich schwächere Bindung zum cOligo als zum OTA ( $K_d = 33,5$  nM) auf. Aufgrund der geringeren Affinität des cOligos eignen sich die 3 Komponenten für den TID-Mechanismus. Die Verdrängung des cOligos vom Aptamer durch das Target OTA konnte ebenfalls mithilfe von MST-Messungen bestätigt werden. Um darauf aufbauend einen LFA entwickeln zu können, wurde die kompetitive Verdrängungsreaktion mit weiteren Methoden untersucht.

Bei einem LFA sind die Oligonukleotide auf einer Oberfläche immobilisiert, die Funktionalität von immobilisierten Oligonukleotiden wurde als nächstes mithilfe von Microarrays überprüft. Bei dieser Methode konnte ebenfalls die Hybridisierung des Aptamers und cOligos festgestellt werden, sowie eine Konkurrenz durch OTA. Es wurden sowohl die Immobilisierung von Amino-modifizierten Oligonukleotiden auf Nitrozellulose-Slides, als auch die Immobilisierung mittels Streptavidin-Biotin-Kupplung getestet. Beide Immobilisierungsformen konnten die Funktionalität für beide immobilisierten Oligonukleotide – Aptamer und cOligo – belegen. Die TID-Verdrängungsreaktion konnte bei der Streptavidin-Biotin-Kupplung ausgeprägter detektiert werden als bei der Immobilisierung mittels Amino-Gruppe.

Nachdem die Verwendung der Oligonukleotide und des OTA erfolgreich für einen TID-Assay etabliert werden konnte, wurden für einen diagnostischen Assay signalgebende Gold-

Nanopartikel (AuNP) hergestellt und analysiert. Zunächst wurden 2 Synthesemethoden verglichen. Die 13 nm großen Citrat-stabilisierten AuNP mit einer Edukt-Zugabe wiesen eine inhomogenere Größenverteilung und stärkere Agglomeratbildung auf als die ca. 17 nm großen AuNP nach dreimaliger Edukt-Zugabe. Aufgrund der Homogenität sowie der guten kolloidalen Stabilität wurden die 17 nm großen AuNP für weitere Versuche ausgewählt.

Zur Funktionalisierung der AuNP mit den Oligonukleotiden wurden 3 Konjugationsmethoden untersucht und optimiert. Es sollten sowohl Aptamer-Konjugat als auch cOligo-Konjugat getestet werden. Die Oligonukleotide wurden für eine gerichtete Konjugation mit einer Thiol-Gruppe am 5'-Terminus modifiziert und weiterhin wurde die Verwendung eines Adenin-Spacers (A<sub>25</sub>) getestet. Zuerst wurde eine Erniedrigung des pH-Werts auf 3 untersucht, damit die Oberfläche der AuNP durch Protonierung der Citrat-Anionen weniger stark negativ geladen war und somit eine Konjugation vereinfacht stattfinden kann. Hierbei hat sich herausgestellt, dass Puffersysteme mit zweiwertigen Ionen zur Agglomeration von AuNP führen können und Saccharose als Zusatz stabilisierende Effekte hat. Trotz Optimierung des verwendeten Puffers konnten mithilfe dieser Methode nur Konjugate in geringer Ausbeute und mit erhöhter Polydispersität erhalten werden.

Als 2. Methode wurde die Konjugation mittels Salt Aging getestet, bei der durch schrittweise Erhöhung der NaCl-Konzentration eine Konjugation der Oligonukleotide angestrebt wird. Bei einer finalen NaCl-Konzentration von 0,7 M konnten stabile Konjugate hergestellt werden. Dabei konnte eine höhere DNA-Bedeckung der Oligonukleotide als bei Verwendung der pH-Erniedrigung erzielt werden. Hierbei wirkte sich eine längere Oligonukleotid-Sequenz positiv bezüglich Stabilität und Homogenität der Konjugate aus, jedoch konnten mit kürzeren Sequenzen höhere Bedeckungen der AuNP erreicht werden. Ein Vorteil des Adenin-Spacers konnte anhand dieser Ergebnisse nicht beobachtet werden. Durch die hohen Oligonukleotid-Dichten auf den AuNP konnten zwar sehr stabile Konjugate erhalten werden, bei späteren Versuchen führte die hohe Zahl an Oligonukleotiden aber zu Sensitivitäts-Problemen. Mit reduzierten NaCl-Konzentrationen von 0,2 bzw. 0,084 M konnten bei vergleichbarer Ausbeute, Stabilität und Homogenität weitaus geringere DNA-Dichten auf den AuNP erreicht werden. Diese Konjugate eignen sich aufgrund der verringerten Avidität besser für einen sensitiven Assay.

Als 3. Konjugationsmethode wurde das Einfrieren der AuNP-Oligonukleotid-Dispersion verwendet. Durch die erzwungene Nähe der AuNP zu den Oligonukleotiden durch

Kristallbildung sowie durch die damit einhergehende Konzentrationserhöhung sollten die repulsiven Kräfte überwunden werden. Durch das Einfrieren bei  $-20\text{ °C}$  wurden recht stabile Konjugate erhalten, die jedoch eine hohe Polydispersität aufwiesen. Ein schnelleres Einfrieren durch eine niedrigere Temperatur von  $-80\text{ °C}$  lieferte Konjugate mit einer höheren Homogenität und guten Stabilität, obwohl eine geringere Bedeckung erzielt werden konnte. Beim Einfrieren erwiesen sich die Oligonukleotide mit  $A_{25}$ -Spacer als stabiler gegenüber Agglomeration. Die Affinität der zusätzlichen Adenine am 5'-Terminus des Oligonukleotids zur AuNP-Oberfläche führt beim Einfrieren somit zu einer stabileren Konjugation. Da bei dieser Konjugationsmethode keine zusätzlichen Reagenzien verwendet werden, ist die Sequenz und die resultierende Affinität der Oligonukleotide entscheidend. Ein Adenin-Spacer ist beim Einfrieren aufgrund seiner Affinität zur Oberfläche der AuNPs empfehlenswert. Die Sequenzlänge wirkte sich auf die Oligonukleotid-Dichte aus. Mit dem kürzeren cOligo wurden nämlich vielfach mehr Moleküle immobilisiert, auch wenn Stabilität und Polydispersität der Aptamer- und cOligo-Konjugate ähnlich waren.

Insgesamt unterscheiden sich die 3 Konjugationsmethoden in ihrer Effizienz und Ausbeute. Die Konjugation mittels pH-Erniedrigung erwies sich als problematisch, da inhomogene Konjugate mit geringerer Stabilität hergestellt wurden. Die Ergebnisse des Salt Agings sowie des Einfrierens sind für die Aptamer- und cOligo-Sequenzen mit  $A_{25}$ -Spacer vergleichbar. Durch Variation der finalen NaCl-Konzentration im Zuge des Salt Agings kann gezielt ein Bedeckungsgrad eingestellt werden. Das Konjugieren mittels Einfrieren ermöglicht eine Reagenzien-freie und sehr schnelle Konjugation. Mithilfe von unterschiedlich schnellem Einfrieren kann der Bedeckungsgrad ebenfalls eingestellt werden. Die Konjugation mittels Einfrieren ist Sequenz-abhängig, das Salt Aging hingegen nicht. Die Sequenzlänge der Oligonukleotide beeinflusst bei allen Konjugationsmethoden die DNA-Bedeckung. Mit zunehmender Sequenzlänge sinkt die Immobilisierungsrate der Oligonukleotide.

Nachdem die Konjugationen des Aptamers und cOligos optimiert wurden, konnte mit einem Bindungsassay in Lösung die Hybridisierung des Aptamer-Konjugats mit dem cOligo sowie der Konkurrenz durch OTA nachgewiesen werden.

Bei der Funktionalitätsüberprüfung mittels Dot Blot konnte die sehr gute Hybridisierungsfähigkeit aller hergestellten Konjugate bestätigt werden. Die Verdrängungsreaktion war hingegen nur für wenige Konjugate erfolgreich. Mit den

Konjugaten mit geringen DNA-Bedeckungen konnte sowohl für Aptamer-Konjugate als auch für cOligo-Konjugate eine kompetitive Verdrängung des cOligos durch OTA erreicht werden.

Zuletzt wurde der Versuchsaufbau auf einen Lateral Flow Assay übertragen. Durch Optimierungen der Blocking-Lösung des Conjugate Pads, des Laufpuffers sowie der Testlinie konnten erwünschte rote Testlinien auf dem LFA erzeugt werden. Hierbei zeigten die bereits bei der Konjugation verwendeten stabilisierenden Reagenzien Tween 20 und Saccharose einen positiven Effekt.

Für die kompetitive Verdrängung des cOligos durch OTA wurden zahlreiche Versuchsaufbauten, Puffersysteme sowie verschiedene Konjugate untersucht. Dennoch konnte keine geschwächte Rotfärbung der Testlinie erreicht werden. Zuvor hatten die Dot Blots gezeigt, dass auch bei einem starken Überschuss des Targets OTA eine Konkurrenz auf Grundlage des TID-Mechanismus mit immobilisierten Oligonukleotiden unvollständig verläuft. Für eine Signal-Verminderung ist es bei Aptamer-Konjugaten nötig, dass OTA-Moleküle an möglichst viele Aptamere eines AuNP gebunden sind. Nur dann können die Konjugate nicht an die Testlinie binden, sondern migrieren weiter bis ins Absorbent Pad. Beim Einsatz von cOligo-Konjugat muss OTA zur Abschwächung der Testlinie an die biotinylierten Aptamere binden, damit das Konjugat keine Testlinie generiert. Der Dot Blot hat gegenüber den LFAs eine längere Inkubationszeit (Stunden gegenüber Minuten) der Komponenten, sodass sich das Gleichgewicht nur langsam zugunsten der Verdrängung durch OTA verschieben kann. Das Aptamer benötigt zur Targetbindung die G-Quadruplex Struktur, welche durch bestimmte Ionen stabilisiert wird. Solange die komplementäre Region nicht abgeschirmt vorliegt, kann die Hybridisierung mit dem cOligo jedoch auch in einem anderen Faltungsmotiv des Aptamers eine Bindung des cOligos erfolgen. Dadurch ist diese Bindung gegenüber der ungefähr 3-fach stärkeren Aptamer-OTA Bindung unter nicht-idealen Bedingungen begünstigt. Aufgrund der aufgeführten Punkte und der starken Avidität der konjugierten AuNP kann die Aptamer-OTA Bindung nur bei starkem OTA Überschuss und langer Inkubationszeit (wie auf Dot Blots) deutlich überwiegen.

Funktionalisierte Nanopartikel werden aufgrund ihrer starken Avidität für diagnostische Zwecke eingesetzt. Dadurch kann die schwache Affinität eines einzelnen Aptamers durch dessen Immobilisierung auf einem Nanopartikel in eine starke Avidität des mit Aptameren-funktionalisierten, signalgebenden Nanopartikels umgewandelt werden. Bei dem

untersuchten Lateral Flow Assay besteht eine hohe Affinität des Aptamers zum OTA. Aufgrund der nur etwas schwächeren Affinität des Aptamers zum cOligo und der zusätzlich starken Avidität der Konjugate konnte eine Verdrängungsreaktion durch das OTA unter den beschriebenen Parametern nicht vollständig erreicht werden. Durch die Verringerung der DNA-Bedeckung der AuNP konnte zumindest die Avidität der Konjugate verringert werden. Dies ermöglichte auf Dot Blots eine deutliche Verminderung des Signals.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Komponenten Aptamer, cOligo und Target eignen sich bisher jedoch nicht für einen kompetitiven LFA mit TID-Mechanismus, bei dem nach sehr kurzer Inkubationszeit das Signal erzeugt wird.

Um mit den 3 erwähnten Komponenten einen funktionalen LFA zu etablieren, sollte die DNA-Bedeckung der AuNP weiter minimiert werden. Im Idealfall wäre pro AuNP nur ein funktionales Aptamer/ cOligo konjugiert. Die Stabilität dieser AuNP könnte durch Konjugation von PEG, Tween 20 oder einem anderen Oligonukleotid erhöht werden. Auch bei geringer Affinität der Oligonukleotide kommt es aufgrund der starken Avidität der Partikel zu zahlreichen Bindungen, die zu Signalen führen. Bei der Wahl eines zusätzlichen Oligonukleotids sollte zielgerichtet eine Sequenz ausgewählt werden, welche keine Basenpaarungen mit dem Aptamer und cOligo eingehen kann. Alternativ könnte die Affinität von Aptamer und cOligo durch kürzere komplementäre Bereiche verringert werden. Es wäre denkbar, die bisherige Anzahl von 10 auf 5 – 8 Nukleotide zu verkürzen.

Darüber hinaus sollten die Komponenten des LFAs tiefgründiger untersucht werden. Bei der Testlinie sollten ideale Konzentrationen von Streptavidin und biotinylierter DNA für die neuen Konjugate gefunden werden, um sensitive Signale zu erhalten.

Die in dieser Arbeit optimierten Konjugationsmethoden ermöglichen die Immobilisierung von Oligonukleotid-Sequenzen unterschiedlicher Länge, in hoher Ausbeute und Stabilität der Konjugate. Trotz funktionaler Konjugate und zahlreichen Optimierungsschritten konnte kein sensitiver Lateral Flow Assay zur Detektion von Ochratoxin A erreicht werden. Die im letzten Absatz beschriebenen Optimierungen können in Zukunft dazu beitragen, einen kompetitiven Assay aufzubauen. Dadurch wird ein Zugang zur Detektion von Targets ermöglicht, die mit bisherigen kommerziellen Methoden auf diese Weise nicht nachgewiesen werden können.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] D. Wang *et al.*, "Rapid lateral flow immunoassay for the fluorescence detection of SARS-CoV-2 RNA," *Nat. Biomed. Eng.*, vol. 4, no. 7, 2020.
- [2] B. Ragnesola, D. Jin, C. C. Lamb, B. H. Shaz, C. D. Hillyer, and L. L. Luchsinger, "COVID19 antibody detection using lateral flow assay tests in a cohort of convalescent plasma donors," *BMC Res. Notes*, vol. 13, no. 1, pp. 1–7, 2020.
- [3] A. Chen and S. Yang, "Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 71, pp. 230–242, Sep. 2015.
- [4] A. C. Gray, S. S. Sidhu, P. C. Chandrasekera, C. F. M. Hendriksen, and C. A. K. Borrebaeck, "Animal-Friendly Affinity Reagents: Replacing the Needless in the Haystack," *Trends Biotechnol.*, vol. 34, no. 12, pp. 960–969, 2016.
- [5] T. Schüling, A. Eilers, T. Scheper, and J. Walter, "Aptamer-based lateral flow assays," *AIMS Bioeng.*, vol. 5, no. 2, pp. 78–102, 2018.
- [6] B. Liu and J. Liu, "Methods for preparing DNA-functionalized gold nanoparticles, a key reagent of bioanalytical chemistry," *Analytical Methods*, vol. 9, no. 18. The Royal Society of Chemistry, pp. 2633–2643, 11-May-2017.
- [7] C. Tuerk and L. Gold, "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase," *Science (80-. )*, vol. 249, no. 4968, pp. 505–510, Aug. 1990.
- [8] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, and J. J. Toole, "Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin," *Nature*, vol. 355, no. 6360, pp. 564–566, Feb. 1992.
- [9] K. M. You, S. H. Lee, A. Im, and S. B. Lee, "Aptamers as functional nucleic acids: In vitro selection and biotechnological applications," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 8, no. 2, pp. 64–75, 2003.
- [10] S. D. Jayasena, "Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics," *Clin. Chem.*, vol. 45, no. 9, pp. 1628–1650, 1999.
- [11] S. Gao, X. Zheng, B. Jiao, and L. Wang, "Post-SELEX optimization of aptamers," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, no. 17, pp. 4567–4573, Jul. 2016.
- [12] X. Zhang and V. K. Yadavalli, "Surface immobilization of DNA aptamers for biosensing and protein interaction analysis," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 7, pp. 3142–3147, Mar. 2011.
- [13] S. Ni *et al.*, "Chemical modifications of nucleic acid aptamers for therapeutic purposes," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 8, 2017.
- [14] K. E. Maier and M. Levy, "From selection hits to clinical leads: progress in aptamer discovery," *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.*, vol. 3, no. November 2015, p. 16014, 2016.
- [15] A. Ozer, J. M. Pagano, and J. T. Lis, "New technologies provide quantum changes in the scale, speed, and success of SELEX methods and aptamer characterization," *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, vol. 3, no. 8. American Society of Gene & Cell Therapy, p. e183, 05-Aug-2014.
- [16] H. Y. Kong and J. Byun, "Nucleic acid aptamers: New methods for selection, stabilization, and application in biomedical science," *Biomol. Ther.*, vol. 21, no. 6, pp. 423–434, 2013.
- [17] R. Stoltenburg, N. Nikolaus, and B. Strehlitz, "Capture-SELEX: Selection of DNA aptamers for

- aminoglycoside antibiotics," *J. Anal. Methods Chem.*, vol. 1, no. 1, 2012.
- [18] E. Kowalska, F. Bartnicki, K. Pels, and W. Strzalka, "The impact of immobilized metal affinity chromatography (IMAC) resins on DNA aptamer selection," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, no. 22, pp. 5495–5499, 2014.
- [19] R. White *et al.*, "Generation of species cross-reactive aptamers using 'toggle' SELEX," *Mol. Ther.*, vol. 4, no. 6, pp. 567–573, 2001.
- [20] A. M. Mustoe, C. L. Brooks III, and H. M. Al-Hashimi, "Hierarchy of RNA Functional Dynamics," *Bone*, vol. 83, no. 1, pp. 441–466, 2014.
- [21] E. Westhof and D. J. Patel, "Nucleic acids from self-assembly to induced-fit recognition. Editorial overview," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 7, no. 3, pp. 305–309, 1997.
- [22] S. E. Butcher and A. M. Pyle, "The molecular interactions that stabilize RNA tertiary structure: RNA motifs, patterns, and networks," *Acc. Chem. Res.*, vol. 44, no. 12, pp. 1302–1311, 2011.
- [23] M. A. Read and S. Neidle, "Structural characterization of a guanine-quadruplex ligand complex," *Biochemistry*, vol. 39, no. 44, pp. 13422–13432, 2000.
- [24] A. N. Lane, J. B. Chaires, R. D. Gray, and J. O. Trent, "Stability and kinetics of G-quadruplex structures," *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. 17, pp. 5482–5515, 2008.
- [25] C. Platella, C. Riccardi, D. Montesarchio, G. N. Roviello, and D. Musumeci, "G-quadruplex-based aptamers against protein targets in therapy and diagnostics," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1861, no. 5, pp. 1429–1447, 2017.
- [26] D. E. Koshland, "Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 44, no. 2, pp. 98–104, 1958.
- [27] D. E. Koshland, "The Key-Lock Theory and the Induced Fit Theory," *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 33, no. 23–24, pp. 2375–2378, 1995.
- [28] J. Feigon, T. Dieckmann, and F. W. Smith, "Aptamer structures from A to ζ," *Chem. Biol.*, vol. 3, no. 8, pp. 611–617, 1996.
- [29] J.-G. Walter, A. Heilkenbrinker, J. Austerjost, S. Timur, F. Stahl, and T. Scheper, "Aptasensors for Small Molecule Detection," *Z. Naturforsch.*, vol. 67, pp. 976–986, 2012.
- [30] A. D. Keefe, S. Pai, and A. Ellington, "Aptamers as therapeutics," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 9, no. 7, pp. 537–550, 01-Jul-2010.
- [31] W. Zhou, P.-J. J. Huang, J. Ding, and J. Liu, "Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics," 2014.
- [32] P. Hong, W. Li, and J. Li, "Applications of aptasensors in clinical diagnostics," *Sensors*, vol. 12, no. 2, pp. 1181–1193, 2012.
- [33] E. W. M. Ng, D. T. Shima, P. Calias, E. T. Cunningham, D. R. Guyer, and A. P. Adamis, "Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 5, no. 2, pp. 123–132, 2006.
- [34] R. Zhang, X. Sun, and B. Niu, "The importance of pegaptanib sodium treatment for patients with vascular active vitreoretinopathy," *Exp. Ther. Med.*, vol. 14, no. 6, pp. 6002–6006, 2017.
- [35] P. S. J. TURKEVICH, "A STUDY OF THE NUCLEATION AND GROWTH PROCESSES I N THE SYNTHESIS OF,"

- J. Homepage*, vol. 55, no. c, p. 132, 1951.
- [36] N. G. Bastús, J. Comenge, and V. Puntès, "Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: Size focusing versus ostwald ripening," *Langmuir*, vol. 27, no. 17, pp. 11098–11105, 2011.
- [37] Z. Farka, T. Juřík, D. Kovář, L. Trnková, and P. Skládal, "Nanoparticle-Based Immunochemical Biosensors and Assays: Recent Advances and Challenges," *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 15, pp. 9973–10042, Aug. 2017.
- [38] G. Han, P. Ghosh, and V. M. Rotello, *Advances in experimental medicine and biology... reszta informacjji do poprawy*. 2007.
- [39] A. Ambrosi, F. Airò, and A. Merkoçi, "Enhanced gold nanoparticle based ELISA for a breast cancer biomarker," *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 3, pp. 1151–1156, 2010.
- [40] T. Emami, R. Madani, S. M. Rezayat, F. Golchinfar, and S. Sarkar, "Applying of gold nanoparticle to avoid diffusion of the conserved peptide of avian influenza nonstructural protein from membrane in Western blot," *J. Appl. Poult. Res.*, vol. 21, no. 3, pp. 563–566, 2012.
- [41] P. Ciaurriz, F. Fernández, E. Tellechea, J. F. Moran, and A. C. Asensio, "Comparison of four functionalization methods of gold nanoparticles for enhancing the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 8, no. 1, pp. 244–253, 2017.
- [42] J. Zhou, J. Ralston, R. Sedev, and D. A. Beattie, "Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 331, no. 2, pp. 251–262, 2009.
- [43] S. Eustis and M. A. El-Sayed, "Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 35, no. 3, pp. 209–217, 2006.
- [44] P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, "Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 14, pp. 7238–7248, 2006.
- [45] V. Amendola, R. Pilot, M. Frasconi, O. M. Maragò, and M. A. Iati, "Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review," *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 29, no. 20, 2017.
- [46] X. Huang and M. A. El-Sayed, "Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy," *J. Adv. Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 13–28, 2010.
- [47] Y. Yi-Cheun, B. Creran, and V. Rotello, "Gold Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications in Bionanotechnology," *NIH Public Acces*, vol. 4, no. 6, pp. 1871–1880, 2014.
- [48] F. Mafuné, J. Y. Kohno, Y. Takeda, T. Kondow, and H. Sawabe, "Formation of gold nanoparticles by laser ablation in aqueous solution of surfactant," *J. Phys. Chem. B*, vol. 105, no. 22, pp. 5114–5120, 2001.
- [49] F. Correard *et al.*, "Gold nanoparticles prepared by laser ablation in aqueous biocompatible solutions: Assessment of safety and biological identity for nanomedicine applications," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, no. 1, pp. 5415–5430, 2014.
- [50] V. Amendola, G. A. Rizzi, S. Polizzi, and M. Meneghetti, "Synthesis of Gold Nanoparticles by Laser Ablation in Toluene: Quenching and Recovery of the Surface Plasmon Absorption," 2005.

- [51] J. G. Walter, S. Petersen, F. Stahl, T. Scheper, and S. Barcikowski, "Laser ablation-based one-step generation and bio-functionalization of gold nanoparticles conjugated with aptamers," *J. Nanobiotechnology*, vol. 8, 2010.
- [52] C. Rehbock *et al.*, "Current state of laser synthesis of metal and alloy nanoparticles as ligand-free reference materials for nano-toxicological assays," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 5, no. 1, pp. 1523–1541, 2014.
- [53] V. K. Lamer and R. H. Dinegar, "Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 72, no. 11, pp. 4847–4854, 1950.
- [54] D. Mahl, "Synthese, Löslichkeit und Stabilität von Gold- Nanopartikeln in biologischen Medien," 2011.
- [55] B. Derjaguin, "A theory of interaction of particles in presence of electric double layers and the stability of lyophobic colloids and disperse systems," *Prog. Surf. Sci.*, vol. 43, no. 1–4, pp. 1–14, 1939.
- [56] B. Derjaguin and L. D. Landau, "Theory of the Stability of Strongly Charged Lyophobic Sols and of the Adhesion of Strongly Charged Particles in Solutions of Electrolytes," *Acta Physicochim. U.R.S.S.*, vol. 14, no. 1–4, pp. 633–662, 1941.
- [57] E. J. W. Verwey and J. T. G. Overbeek, "Theory of the stability of lyophobic colloids," *Journal of Colloid Science*, vol. 10, no. 2, pp. 224–225, 1948.
- [58] K. Aslan and V. H. Pérez-Luna, "Surface modification of colloidal gold by chemisorption of alkanethiols in the presence of a nonionic surfactant," *Langmuir*, vol. 18, no. 16, pp. 6059–6065, 2002.
- [59] M. R. Hormozi-Nezhad, P. Karami, and H. Robotjazi, "A simple shape-controlled synthesis of gold nanoparticles using nonionic surfactants," *RSC Adv.*, vol. 3, no. 21, pp. 7726–7732, 2013.
- [60] H. Jo, J. Her, and C. Ban, "Dual aptamer-functionalized silica nanoparticles for the highly sensitive detection of breast cancer," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 71, pp. 129–136, Sep. 2015.
- [61] S. Giorgi-Coll, M. J. Marín, O. Sule, P. J. Hutchinson, and K. L. H. Carpenter, "Aptamer-modified gold nanoparticles for rapid aggregation-based detection of inflammation: an optical assay for interleukin-6," *Microchim. Acta*, vol. 187, no. 1, 2020.
- [62] X. Zhang, M. R. Servos, and J. Liu, "Surface science of DNA adsorption onto citrate-capped gold nanoparticles," *Langmuir*, vol. 28, no. 8, pp. 3896–3902, Feb. 2012.
- [63] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, and J. J. Storhoff, "A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials," *Nature*, vol. 382, no. 6592, pp. 607–609, Aug. 1996.
- [64] A. Barchanski, N. Hashimoto, S. Petersen, C. L. Sajti, and S. Barcikowski, "Impact of spacer and strand length on oligonucleotide conjugation to the surface of ligand-free laser-generated gold nanoparticles," *Bioconjug. Chem.*, vol. 23, no. 5, pp. 908–915, 2012.
- [65] K. M. Koo, A. A. I. Sina, L. G. Carrascosa, M. J. A. Shiddiky, and M. Trau, "DNA-bare gold affinity interactions: Mechanism and applications in biosensing," *Anal. Methods*, vol. 7, no. 17, pp. 7042–7054, 2015.
- [66] J. J. Storhoff, R. Elghanian, C. A. Mirkin, and R. L. Letsinger, "Sequence-dependent stability of DNA-modified gold nanoparticles," *Langmuir*, vol. 18, no. 17, pp. 6666–6670, 2002.
- [67] H. Kimura-Suda, D. Y. Petrovykh, M. J. Tarlov, and L. J. Whitman, "Base-dependent competitive

- adsorption of single-stranded DNA on gold," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 30, pp. 9014–9015, 2003.
- [68] C. D. Bain, E. B. Troughton, Y. T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, and R. G. Nuzzo, "Formation of Monolayer Films by the Spontaneous Assembly of Organic Thiols from Solution onto Gold," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 111, no. 1, pp. 321–335, 1989.
- [69] T. Bürgi, "Properties of the gold-sulphur interface: from self-assembled monolayers to clusters," *Nanoscale*, vol. 7, no. 38, pp. 15553–15567, 2015.
- [70] X. Zhang, M. R. Servos, and J. Liu, "Sup.Info: Instantaneous and quantitative functionalization of gold nanoparticles with thiolated DNA using a pH-assisted and surfactant-free route," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 17, pp. 7266–7269, 2012.
- [71] A. Ap *et al.*, "Organization Of Nanocrystal Molecules Using DNA," *Nature*, vol. 382, no. 6592, pp. 609–611, 1996.
- [72] S. J. Hurst, A. K. R. R. Lytton-Jean, and C. A. Mirkin, "Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 24, pp. 8313–8318, Dec. 2006.
- [73] B. Liu and J. Liu, "Freezing Directed Construction of Bio/Nano Interfaces: Reagentless Conjugation, Denser Spherical Nucleic Acids, and Better Nanoflakes," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 139, no. 28, pp. 9471–9474, 2017.
- [74] B. Liu and J. Liu, "Freezing-Driven DNA Adsorption on Gold Nanoparticles: Tolerating Extremely Low Salt Concentration but Requiring High DNA Concentration," *Langmuir*, vol. 35, no. 19, pp. 6476–6482, 2019.
- [75] M. Cordeiro, F. F. Carlos, P. Pedrosa, A. Lopez, and P. V. Baptista, "Gold nanoparticles for diagnostics: Advances towards points of care," *Diagnostics*, vol. 6, no. 4, 2016.
- [76] Q. Zhu *et al.*, "Colorimetric detection of cholic acid based on an aptamer adsorbed gold nanoprobe," *RSC Adv.*, vol. 7, no. 31, pp. 19250–19256, Mar. 2017.
- [77] J. L. Chávez, J. A. Hagen, and N. Kelley-Loughnane, "Fast and selective plasmonic serotonin detection with Aptamer-gold nanoparticle conjugates," *Sensors (Switzerland)*, vol. 17, no. 4, 2017.
- [78] J. Liu, W. Bai, S. Niu, C. Zhu, S. Yang, and A. Chen, "Highly sensitive colorimetric detection of 17 $\beta$ -estradiol using split DNA aptamers immobilized on unmodified gold nanoparticles," 2014.
- [79] J. L. J. L. Vaitukaitis, G. D. G. D. Braunstein, and G. T. G. T. Ross, "A radioimmunoassay which specifically measures human chorionic gonadotropin in the presence of human luteinizing hormone," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 113, no. 6, pp. 751–758, 1972.
- [80] R. Ignatius *et al.*, "Accurate detection of Helicobacter pylori antigen in human stool specimens by two novel immunoassays," *Eur. J. Microbiol. Immunol.*, vol. 9, no. 2, pp. 29–31, 2019.
- [81] J. Kaplon *et al.*, "DIAGNOSTIC PERFORMANCE OF TRIPLEX NOROVIRUS / ROTAVIRUS / ADENOVIRUS ICG TESTS," 2019, p. 2019.
- [82] E. Frohnmeyer *et al.*, "Aptamer lateral flow assays for rapid and sensitive detection of cholera toxin  $\dagger$ ," *Cite this Anal.*, vol. 144, p. 1840, 2019.
- [83] J. Liu, J. Zeng, Y. Tian, and N. Zhou, "An aptamer and functionalized nanoparticle-based strip biosensor for on-site detection of kanamycin in food samples  $\dagger$ ," *Cite this Anal.*, vol. 143, p. 182, 2018.
- [84] S. Wu, L. Liu, N. Duan, Q. Li, Y. Zhou, and Z. Wang, "Aptamer-Based Lateral Flow Test Strip for Rapid

- Detection of Zearalenone in Corn Samples," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 66, no. 8, pp. 1949–1954, Feb. 2018.
- [85] M. J. Raeisossadati *et al.*, "Lateral flow based immunobiosensors for detection of food contaminants," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 86, pp. 235–246, Dec. 2016.
- [86] Innova Biosciences, "A Guide to Lateral flow immunoassays, Components, process, assay formats and nanoparticles."
- [87] K. M. Koczula and A. Gallotta, "Lateral flow assays," *Essays Biochem.*, vol. 60, no. 1, pp. 111–120, 2016.
- [88] H. Modh, T. Scheper, and J. G. Walter, "Detection of ochratoxin A by aptamer-assisted real-time PCR-based assay (Apta-qPCR)," *Eng. Life Sci.*, vol. 17, no. 8, pp. 923–930, 2017.
- [89] M. Prante, T. Schuling, B. Roth, K. Bremer, and J. Walter, "Characterization of an aptamer directed against 25-hydroxyvitamin D for the development of a competitive aptamer-based assay," *Biosensors*, vol. 9, no. 4, 2019.
- [90] B. Bundesinstitut für Risikobewertung, "BgVV empfiehlt Höchstmengen für Ochratoxin in Lebensmitteln," 1997. [Online]. Available: [https://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/1997/15/bgvv\\_empfiehl\\_t\\_hoehcstmengen\\_fuer\\_ochratoxin\\_in\\_lebensmitteln-818.html](https://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/1997/15/bgvv_empfiehl_t_hoehcstmengen_fuer_ochratoxin_in_lebensmitteln-818.html). [Accessed: 27-May-2020].
- [91] A. E. el Khoury and A. Atoui, "Ochratoxin a: General overview and actual molecular status," *Toxins (Basel)*, vol. 2, no. 4, pp. 461–493, 2010.
- [92] T. Kőszegi and M. Poór, "Ochratoxin a: Molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level," *Toxins (Basel)*, vol. 8, no. 4, 2016.
- [93] J. A. Cruz-Aguado and G. Penner, "Determination of ochratoxin A with a DNA aptamer," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 22, pp. 10456–10461, Nov. 2008.
- [94] K. L. Fadock and R. A. Manderville, "DNA Aptamer-Target Binding Motif Revealed Using a Fluorescent Guanine Probe: Implications for Food Toxin Detection," *ACS Omega*, vol. 2, no. 8, pp. 4955–4963, 2017.
- [95] K. Wu, C. Ma, H. Zhao, H. He, and H. Chen, "Label-free G-quadruplex aptamer fluorescence assay for Ochratoxin A using a thioflavin T probe," *Toxins (Basel)*, vol. 10, no. 5, p. 198, May 2018.
- [96] C. Yang, Y. Wang, J.-L. L. Marty, and X. Yang, "Aptamer-based colorimetric biosensing of Ochratoxin A using unmodified gold nanoparticles indicator," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 5, pp. 2724–2727, Jan. 2011.
- [97] A. I. S. Holm, B. Kohler, S. V. Hoffmann, and S. B. Nielsen, "Synchrotron radiation circular dichroism of various G-quadruplex structures," *Biopolymers*, vol. 93, no. 5, pp. 429–433, 2010.
- [98] G. N. Parkinson, "Fundamentals of Quadruplex Structures," *Quadruplex Nucleic Acids*, pp. 1–30, 2007.
- [99] M. Schmid, "Conformational dynamics of G- quadruplex DNA probed by time- resolved circular dichroism," Universite Paris Saclay, 2017.
- [100] S. Masiero *et al.*, "A non-empirical chromophoric interpretation of CD spectra of DNA G-quadruplex structures," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 8, no. 12, pp. 2683–2692, 2010.
- [101] M. Jerabek-Willemsen, C. J. Wienken, D. Braun, P. Baaske, and S. Duhr, *Molecular interaction studies*

- using microscale thermophoresis*, vol. 9, no. 4. Mary Ann Liebert, Inc., 2011, pp. 342–353.
- [102] M. Jerabek-Willemsen *et al.*, "MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond," *J. Mol. Struct.*, 2014.
- [103] C. Entzian and T. Schubert, "Mapping the binding site of an aptamer on ATP using microscale thermophoresis," *J. Vis. Exp.*, vol. 2017, no. 119, pp. 1–9, 2017.
- [104] D. Pattono, P. F. Gallo, and T. Civera, "Detection and quantification of Ochratoxin A in milk produced in organic farms," *Food Chem.*, vol. 127, no. 1, pp. 374–377, 2011.
- [105] H. Boudra, J. Barnouin, S. Dragacci, and D. P. Morgavi, "Aflatoxin M1 and ochratoxin a in raw bulk milk from french dairy herds," *J. Dairy Sci.*, vol. 90, no. 7, pp. 3197–3201, 2007.
- [106] J. Chen, Z. Fang, J. Liu, and L. Zeng, "A simple and rapid biosensor for ochratoxin A based on a structure-switching signaling aptamer," *Food Control*, vol. 25, no. 2, pp. 555–560, Jun. 2012.
- [107] C. A. Holstein *et al.*, "Immobilizing affinity proteins to nitrocellulose: A toolbox for paper-based assay developers," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, no. 5, pp. 1335–1346, 2016.
- [108] J. J. Leary, D. J. Brigati, and D. C. Ward, "Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 80, no. 13, pp. 4045–4049, 1983.
- [109] L. Chaiet and F. J. Wolf, "The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by *Streptomyces*," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 106, no. C, pp. 1–5, 1964.
- [110] S. B. Nimse, K. Song, M. D. Sonawane, D. R. Sayyed, and T. Kim, "Immobilization techniques for microarray: Challenges and applications," *Sensors*, vol. 14, no. 12. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, pp. 22208–22229, 25–Nov-2014.
- [111] W. Haiss *et al.*, "Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra," *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 11, pp. 4215–4221, 2007.
- [112] K. Aslan, C. C. Luhrs, and V. H. Pérez-Luna, "Controlled and reversible aggregation of biotinylated gold nanoparticles with streptavidin," *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, no. 40, pp. 15631–15639, 2004.
- [113] D. V. Leff, P. C. Ohara, J. R. Heath, and W. M. Gelbart, "Thermodynamic control of gold nanocrystal size: Experiment and theory," *J. Phys. Chem.*, vol. 99, no. 18, pp. 7036–7041, 1995.
- [114] T. Mori and T. Hegmann, "Determining the composition of gold nanoparticles: a compilation of shapes, sizes, and calculations using geometric considerations," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 18, no. 10, pp. 1–36, 2016.
- [115] Q. Xu, X. Lou, L. Wang, X. Ding, H. Yu, and Y. Xiao, "Rapid, Surfactant-Free, and Quantitative Functionalization of Gold Nanoparticles with Thiolated DNA under Physiological pH and Its Application in Molecular Beacon-Based Biosensor," 2016.
- [116] Z. Huang, B. Liu, and J. Liu, "Parallel Polyadenine Duplex Formation at Low pH Facilitates DNA Conjugation onto Gold Nanoparticles," *Langmuir*, vol. 32, no. 45, pp. 11986–11992, Nov. 2016.
- [117] S. S. Hinman, K. S. McKeating, and Q. Cheng, "DNA Linkers and Diluents for Ultrastable Gold Nanoparticle Bioconjugates in Multiplexed Assay Development," *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 7, pp. 4272–4279, Apr. 2017.
- [118] L. Zhang, P. Li, D. Li, S. Guo, and E. Wang, "Effect of freeze-thawing on lipid bilayer-protected gold

- nanoparticles," *Langmuir*, vol. 24, no. 7, pp. 3407–3411, 2008.
- [119] D. Bhattacharyya, G. M. Arachchilage, and S. Basu, "Metal cations in G-quadruplex folding and stability," *Front. Chem.*, vol. 4, no. SEP, pp. 1–14, 2016.
- [120] G. E. Cano, "Entwicklung funktionaler Aptamer-Goldnanopartikel- Konjugate für diagnostische Tests - vorläufig," *Masterarbeit*, 2020.
- [121] K. Saha, S. S. Agasti, C. Kim, X. Li, and V. M. Rotello, "Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing," *Chem. Rev.*, vol. 112, no. 5, pp. 2739–2779, May 2012.
- [122] G. B. Kim, K. H. Kim, Y. H. Park, S. Ko, and Y.-P. P. Kim, "Colorimetric assay of matrix metalloproteinase activity based on metal-induced self-assembly of carboxy gold nanoparticles," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 41, no. 1, pp. 833–839, Mar. 2013.
- [123] K. N. Clayton, J. W. Salameh, S. T. Wereley, and T. L. Kinzer-Ursem, "Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry," *Biomicrofluidics*, vol. 10, no. 5, pp. 1–14, 2016.
- [124] T. Zheng, P. Cherubin, L. Cilenti, K. Teter, and Q. Huo, "A simple and fast method to study the hydrodynamic size difference of protein disulfide isomerase in oxidized and reduced form using gold nanoparticles and dynamic light scattering," *Analyst*, vol. 141, no. 3, pp. 934–938, 2016.
- [125] H. Liu, N. Pierre-Pierre, and Q. Huo, "Dynamic light scattering for gold nanorod size characterization and study of nanorod-protein interactions," *Gold Bull.*, vol. 45, no. 4, pp. 187–195, 2012.
- [126] C. Rehbock, V. Merk, L. Gamrad, R. Streubel, and S. Barcikowski, "Size control of laser-fabricated surfactant-free gold nanoparticles with highly diluted electrolytes and their subsequent bioconjugation," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, no. 9, pp. 3057–3067, 2013.
- [127] B. J. D. Watson, A. Berry, and A. R. Marks, "DNA : The Secret of Life," no. 7, p. 41546, 2003.
- [128] W. Man *et al.*, "Experiments on random packings of ellipsoids," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 94, no. 19, pp. 1–4, 2005.
- [129] B. Liu and J. Liu, "Interface-Driven Hybrid Materials Based on DNA-Functionalized Gold Nanoparticles," *Matter*, vol. 1, no. 4. Elsevier BV, pp. 825–847, Oct-2019.
- [130] K. Urmann, J. Modrejewski, T. Scheper, and J.-G. Walter, "Aptamer-modified nanomaterials: principles and applications," *BioNanoMaterials*, vol. 18, no. 1–2, pp. 1–17, Jan. 2017.
- [131] Y. Lu, J. R. Peterson, E. Luais, J. J. Gooding, and N. A. Lee, "Effects of surface epitope coverage on the sensitivity of displacement assays that employ modified nanoparticles: Using bisphenol a as a model analyte," *Biosensors*, vol. 6, no. 3, 2016.
- [132] B. Liu, T. Wu, Z. Huang, Y. Liu, and J. Liu, "Freezing-directed Stretching and Alignment of DNA Oligonucleotides," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 58, no. 7, pp. 2109–2113, 2019.
- [133] W. J. Parak, T. Pellegrino, C. M. Micheel, D. Gerion, S. C. Williams, and A. P. Alivisatos, "Conformation of oligonucleotides attached to gold nanocrystals probed by gel electrophoresis," *Nano Lett.*, vol. 3, no. 1, pp. 33–36, 2003.
- [134] P. Sandström, M. Boncheva, and B. Åkerman, "Nonspecific and thiol-specific binding of DNA to gold nanoparticles," *Langmuir*, vol. 19, no. 18, pp. 7537–7543, 2003.
- [135] F. N. Gür, F. W. Schwarz, J. Ye, S. Diez, and T. L. Schmidt, "Toward Self-Assembled Plasmonic Devices:

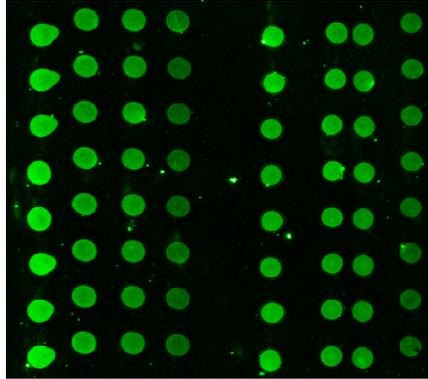
- High-Yield Arrangement of Gold Nanoparticles on DNA Origami Templates," *ACS Nano*, vol. 10, no. 5, pp. 5374–5382, 2016.
- [136] T. Pellegrino, R. A. Sperling, A. P. Alivisatos, and W. J. Parak, "Gel electrophoresis of gold-DNA nanoconjugates," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2007, p. 26796, 2007.
- [137] S. Smiley, M. Derosa, and B. Blais, "Immobilization of DNA aptamers on polyester cloth for antigen detection by dot blot immunoenzymatic assay (aptablot)," *J. Nucleic Acids*, vol. 2013, p. 936542, 2013.
- [138] Y. Wang, D. Li, W. Ren, Z. Liu, S. Dong, and E. Wang, "Ultrasensitive colorimetric detection of protein by aptamer-Au nanoparticles conjugates based on a dot-blot assay," *Chem. Commun.*, no. 22, pp. 2520–2522, 2008.
- [139] C. Wang, D. Liu, and Z. Wang, "Gold nanoparticle based dot-blot immunoassay for sensitively detecting Alzheimer's disease related  $\beta$ -amyloid peptide," *Chem. Commun.*, vol. 48, no. 67, pp. 8392–8394, 2012.
- [140] F. Xie, K. Drozdowicz-Tomsia, T. Shtoyko, and E. M. Goldys, "Silver and gold nanoparticle coated membranes applied to protein dot blots," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 13, no. 2, pp. 613–624, 2011.
- [141] Sartorius-Stedim-Biotech GmbH, "UniSart<sup>®</sup> nitrocellulose membranes in lateral flow immunoassay," 2016.
- [142] Sartorius, "UniSart<sup>®</sup> Nitrocellulose Membranes - The Substrate of Choice for Protein Assays Sartorius Stedim Biotech." [Online]. Available: <https://www.sartorius.com/download/89574/6/broch-unisart-nitro-sl-1536-e-1--data.pdf>.
- [143] F. S. Chu, "Interaction of ochratoxin A with bovine serum albumin," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 147, no. 2, pp. 359–366, 1971.
- [144] A. Laura, D. Gilda, B. Claudio, G. Cristina, and G. Gianfranco, "A lateral flow immunoassay for measuring ochratoxin A: Development of a single system for maize, wheat and durum wheat," *Food Control*, vol. 22, no. 12, pp. 1965–1970, 2011.
- [145] W. Zhou, W. Kong, X. Dou, M. Zhao, Z. Ouyang, and M. Yang, "An aptamer based lateral flow strip for on-site rapid detection of ochratoxin A in *Astragalus membranaceus*," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1022, pp. 102–108, Jun. 2016.
- [146] S. B. Leslie, E. Israeli, B. Lighthart, J. H. Crowe, and L. M. Crowe, "Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, no. 10, pp. 3592–3597, 1995.
- [147] Y. Gong *et al.*, "Improved LFAs for highly sensitive detection of BNP at point-of-care.," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, pp. 4455–4466, 2017.
- [148] L. Kaiser, J. Weisser, M. Kohl, and H.-P. P. Deigner, "Small molecule detection with aptamer based lateral flow assays: Applying aptamer-C-reactive protein cross-recognition for ampicillin detection," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 5628, Dec. 2018.
- [149] O. A. Alsager, S. Kumar, and J. M. Hodgkiss, "Lateral Flow Aptasensor for Small Molecule Targets Exploiting Adsorption and Desorption Interactions on Gold Nanoparticles," *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 14, pp. 7416–7424, Jul. 2017.
- [150] S. H. Brewer, W. R. Glomm, M. C. Johnson, M. K. Knag, and S. Franzen, "Probing BSA binding to citrate-

- coated gold nanoparticles and surfaces," *Langmuir*, vol. 21, no. 20, pp. 9303–9307, 2005.
- [151] S. (BBI S. Phillips, "Reagent Chemistries and Labels of Choice for Lateral Flow," 2015.
- [152] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, and F. R. Salemme, "Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin," *Science (80-. )*, vol. 243, no. 4887, pp. 85–88, 1989.
- [153] Y. Li and H. Zhang, "Binding of streptavidin to surface-attached biotin with different spacer thicknesses," *J. Wuhan Univ. Technol. Mater. Sci. Ed.*, vol. 30, no. 6, pp. 1304–1309, 2015.
- [154] J. Schrammel, "Entwicklung Aptamer-basierter Microarrays zur Detektion von Ochratoxin A zur Erlangung des Grades," *Bachelorarbeit*, 2018.
- [155] J. Irwan, "Synthese und Modifikation von Nanopartikeln," 2018.
- [156] C. Brandt, "Entwicklung eines Aptamer-basierten Lateral Flow Assays zur Detektion von Ochratoxin A zur Erlangung des Grades," 2019.

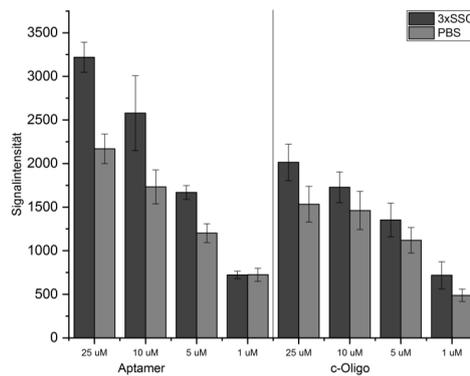
## 7 Zusätzliche experimentelle Daten

### 7.1 SYBR-Färbung zur Immobilisierung von Oligonukleotiden

zu 4.1.3



**Abbildung 48:** Microarray Block NH<sub>2</sub>-modifizierter Aptamere und cOligos, immobilisiert auf einer 3D-Aldehyd-Oberfläche. Gespottet in 3xSSC: Reihen von links nach rechts: Aptamer 25µM, 10µM, 5µM, 1µM, cOligo 25µM, 10µM, 5µM, 1µM. Angefärbt mit SYBR Green. Anregung 532nm, 33% Laserpower, PMT500.



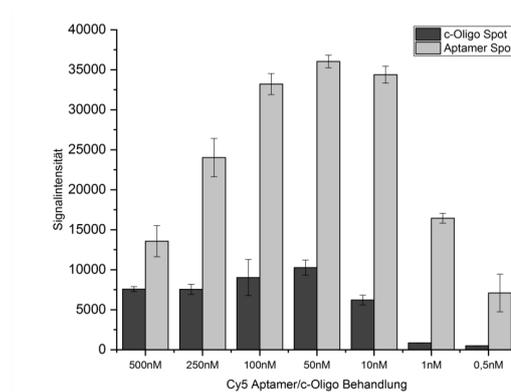
**Abbildung 49:** Mittelwerte der Signalintensitäten der Immobilisierung auf 3D-Aldehyd. Gespottete Konzentrationen Aptamer/c-Oligo: 25µM, 10µM, 5µM, 1µM in PBS und 3xSSC. Gefärbt mit SYBR Green.

Diese Ergebnisse sind im Rahmen der Bachelorarbeit von Jasper Schrammel [154] erhalten worden.

## 7.2 Hybridisierung von Oligonukleotiden auf einer 3D-Aldehyd-Oberfläche

zu 4.1.3.1

Diese Ergebnisse sind im Rahmen der Bachelorarbeit von Jasper Schrammel [154] erhalten worden.



**Abbildung 50:** Mittelwerte der Signalintensitäten der Hybridisierung auf einer 3D-Aldehyd-Oberfläche. Gespottete Konzentration Aptamer/cOligo: 25  $\mu$ M. Aptamer-Spots behandelt mit 500, 250, 100, 50, 10, 1, 0,5 nM Cy5-cOligo. cOligo Spots behandelt mit 500, 250, 100, 50, 10, 1, 0,5 nM Cy5-Aptamer.

## 7.3 Inkubationszeiten vor und nach Zugabe des Natriumcitratpuffers

zu 4.3.1.1 c

Die Inkubationszeiten der Konjugation mittels pH-Erniedrigung wurden variiert. Nach Zugabe der Oligonukleotide zu den AuNP erfolgt normalerweise eine Inkubationszeit von 16 h, diese wurde auf 20 min bzw. 1 h verkürzt. Die Inkubationszeit nach Zugabe des Natriumcitratpuffers beträgt normalerweise 20 min, diese wurde auf 3 min verkürzt oder auf 24 h verlängert. Zur Konjugation wurde das A<sub>25</sub>-A verwendet. Die resultierenden analytischen Daten sind folgend dargestellt.

1. Inkubationszeit	2. Inkubationszeit	SPR-Max [nm]	$A_{\max}$	$\emptyset$ [nm]	PDI
20 min	3 min				
20 min	20 min	527		103	25,9
20 min	24 h	526	0,108	46,9	20,2
1 h	3 min	525	0,188	108,6	22,7
1 h	20 min	526	0,054	103,1	27,6
1 h	24 h	526	0,086	50,4	27
16 h	3 min	526		137,95	20
16 h	20 min	527	0,075	115,6	16,3
16 h	24 h	526	0,242	61,4	26,8

#### 7.4 Einfrierdauer und -temperatur bei der Konjugation mittels Einfrieren

zu 4.3.1.3 b.

In Tabelle 15 sind die analytischen Daten des A-Konjugats dargestellt.

Tabelle 15: Analytische Daten des A-Konjugats nach verschiedenen Konjugationen mittels Einfrieren

	A		
	- 20 °C	- 80 °C	- 80 °C, 2 $\mu$ M
SPR Maximum [nm]	527	527	527
$A_{\max}$	0,26	0,32	1,36
PPI ( $A_{380}/A_{800}$ )	2,5	1,5	6,1
$\emptyset$ [nm]	488	535	134
PDI [%]	28,5	27,2	26

#### 7.5 zu 4.3.2.2 Dot Blots

- Zum Vergleich zur Immobilisierung der Oligonukleotide auf der Membran mittels Strptavidin-Biotin-Kupplung wurden auch Amino-modifizierte Oligonukleotide getestet. In Abbildung 51 sind 2 Dot Blots dargestellt, bei denen das Amino-modifizierte Aptamer (50  $\mu$ M) auf die Nitrozellulose-Membran (CN 140) aufgegeben wurde. Links sollte eine Hybridisierung mit dem  $A_{25}$ -O Konjugat stattfinden und rechts eine kompetitive Verdrängungsreaktion mit zusätzlich 100 nM OTA.



Abbildung 51: Dot Blots mit Amino-modifizierten Aptameren und A<sub>25</sub>-O Konjugat mittels Einfrieren bei - 20 °C

Es konnten keine bzw. nur sehr schwache rote Spots beobachtet werden, die Immobilisierung mittels Streptavidin-Biotin-Kupplung lieferte weitaus bessere Ergebnisse und wurde daher stets weiterverwendet.

- Die durchgeführten und ausgewerteten Dot Blots der optimierten Konjugate sind folgend dargestellt (Abbildung 52), dabei ist das Konjugat angegeben (auf NZ wurde das komplementäre Oligonukleotid immobilisiert). Für jedes Konjugat liegen 8 Dot Blots vor, da 4 Verhältnisse von Streptavidin und Biotin-DNA getestet wurden. Von links nach rechts sind 1:2 Hybridisierung (H) und kompetitive Verdrängung (V), 1:1 H und V, 10:1 H und V und 100:1 H und V dargestellt.

immobilisierte cOligos, mit reinen AuNP inkubiert	
immobilisierte Aptamere, mit reinen AuNP inkubiert	
A <sub>25</sub> -A, Salt Aging 0,7 M	
A <sub>25</sub> -A, Salt Aging 0,2 M	
A <sub>25</sub> -A, Salt Aging 0,084 M	
A <sub>25</sub> -A, Einfrieren	
A <sub>25</sub> -O, Salt Aging 0,7 M	
A <sub>25</sub> -O, Salt Aging 0,2 M	
A <sub>25</sub> -O, Salt Aging 0,084 M	
A <sub>25</sub> -O, Einfrieren	

Abbildung 52: Dot Blots mit optimierten Konjugaten

- Berechnungen der Aptamer- und cOligo-Mengen auf den Dot Blots:

	eingesetzte Konzentration	Volumen [ $\mu$ L]	Menge [pmol]
OTA	10 $\mu$ M	in 50	500
Biotin-DNA	25 $\mu$ M	0,2	5
	12,5 $\mu$ M	0,2	2,5
	1,25 $\mu$ M	0,2	0,25
	0,125 $\mu$ M	0,2	0,025
AuNP	5,85 nM	1 in 50 $\mu$ L	0,293
	<b>Oligos/AuNP</b>	<b>x AuNP-Menge</b>	<b>Menge Oligos [pmol]</b>
<b>A<sub>25</sub>-A Konjugat</b>			
- S.A. 0,7 M	179		52,3
- S.A. 0,2 M	28		8,2
- S.A. 0,084 M	27		7,8
- Einfrieren, -80°C	42		12,2
<b>A<sub>25</sub>-O Konjugat</b>			
- S.A. 0,7 M	311		90,9
- S.A. 0,2 M	87		25,4
- S.A. 0,084 M	74		21,6
- Einfrieren, -80°C	167		48,9

## 7.6 Co-Immobilisierung auf AuNP mit anderen Oligonukleotiden

zu 4.3.3.3

Die Thiol-modifizierten Oligonukleotide A<sub>25</sub>-A, A sowie A<sub>25</sub>-O wurden zusammen mit einem Oligonukleotid (X) im Verhältnis von 30 zu 70 % mittels Einfrieren bei - 20 °C, 1  $\mu$ M DNA konjugiert. Das Oligonukleotid X war ebenfalls Thiol-modifiziert und hat folgende Sequenz:



Aufgrund einiger aufeinander folgenden komplementärer Basen kann es zu Basenpaarungen kommen, diese sind jedoch maximal 3 Basen lang. Somit sollte eine geringe Affinität zwischen den Oligonukleotiden bestehen und nur geringfügig Selbst-Hybridisierung zweier Sequenzen auf demselben AuNP vorkommen.

Von den resultierenden Konjugaten wurden keine analytischen Daten aufgenommen, sondern sie wurden direkt auf dem Lateral Flow Assay getestet. Das Konjugat mit dem A<sub>25</sub>-O war jedoch am intensivsten rot gefärbt.

Als Laufpuffer wurde 100 % Bindepuffer mit 2 % Saccharose verwendet, zur kompetitiven Verdrängungsreaktion wurden 40  $\mu\text{M}$  OTA in den Laufpuffer gegeben. Das Conjugate Pad war zuvor mit 100 % Bindepuffer, 2 % Saccharose, 1 % OVA sowie 0,25 % Tween 20 behandelt worden. Es wurden 2  $\mu\text{L}$  Konjugat pro LFA verwendet. Die resultierenden Testlinien sind in Abbildung 53 dargestellt.

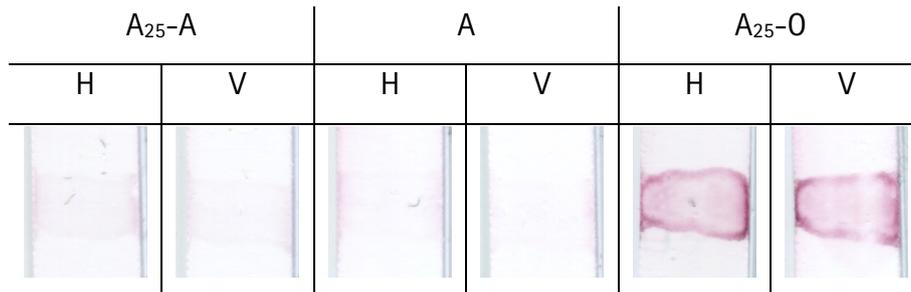


Abbildung 53: Testlinien der Co-Immobilisierung verschiedener Oligonukleotide.

Außerdem wurden das Konjugat sowie der Laufpuffer einzeln auf ca. 40 °C erwärmt, bevor der LFA durchgeführt wurde. Die resultierenden Testlinien sind in Abbildung 54 dargestellt.

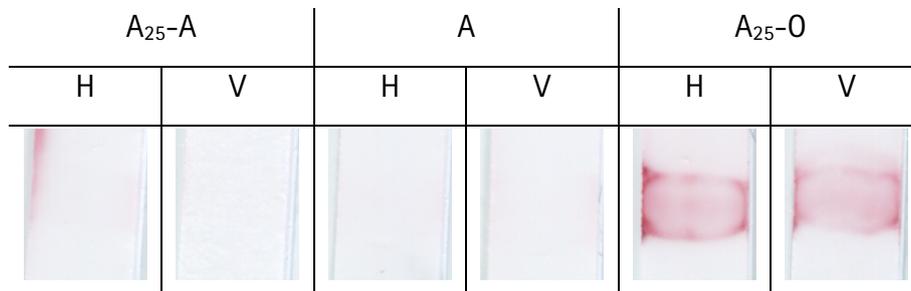


Abbildung 54: Testlinien der Co-Immobilisierung verschiedener Oligonukleotide mit zuvor erwärmtem Konjugat sowie Laufpuffer.

Für die Aptamer-Konjugate konnten nur sehr schwache Testlinien beobachtet werden. Beim A<sub>25</sub>-O Konjugat entstanden stärkere Testlinien, jedoch konnte hier keine wesentliche Verdrängungsreaktion durch OTA festgestellt werden.

## A Material

Für doppelt-deionisiertes Wasser wird die Bezeichnung ddH<sub>2</sub>O verwendet. Dieses stammt aus dem Reinstwassersystem arium® 611.

Die pH-Werte der Lösungen und Puffer wurde bei Raumtemperatur eingestellt.

### A.1 Geräte und Software

Tabelle 16: Verwendete Laborgeräte.

Laborgeräte	Hersteller
Epoch Mikroplatten-Spektralphotometer	BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA
Feinwaage (Pioneer™)	Ohaus Corp., Parsippany, USA
GenePix 4000B Microarray-Scanner	Axon Instruments, Foster City, CA, USA
J-815 Circular Dichroism Spectrometer	JASCO
Litesizer™ 500	Anton Paar GmbH, Graz, Österreich
Magnetrührer mit Temperaturkontrolle (MR Hei-Mix L)	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
Mikrowellenherd	GoldStar, Südkorea
Monolith NT. 115	Nanotemper Technology, München, DE
Mupid™-One Electrophoresis System	NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren, DE
NanoDrop-ND1000	PeEQLAB Biotechnologie GmbH, VWR International GmbH, Darmstadt, DE
NanoSight LM 10	Malvern Panalytical
Nano-Plotter™	GeSiM mbH, Radeberg, DE
pH-Meter HI 110	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen, DE
Pipetten (0,5-10 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Schüttler	IKA Vibrax VXR Basic
Take3-Mikrovolumenplatte	BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf
Ultraschallbad Sonorex Super R4 510 H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin DE

Vortex Mischer	VWR
Zentrifugen:	
-Micro Star 17R	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
- Mini-Zentrifuge ROTILABO®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D

Tabelle 17: Verwendete Software.

Anwendung	Software	Hersteller
Bildauswertung	ImageJ	
Datenanalyse	MS Excel (Office 365)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Datenanalyse	OriginPro®	OriginLap Corporation, Northampton, USA
Microscale Thermophoresis Auswertung	MO-Control und NTAffinity Analysis	Nanotemper Technology, München, DE
Litesizer™ 500 Analyse	Kalliope™	Anton Paar GmbH, Graz, Österreich
Literaturverwaltung	Mendeley	Mendeley, London, Vereinigtes Königreich

## A.2 Verwendete Chemikalien

Tabelle 18: Verwendete Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
5X Green GoTaq® Reaction Buffer	Promega
Agarose Standard	Carl Roth
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	Fluka Analytical
Caseinhydrolysat	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich
DNA (Aptamer/c-Oligo)	Integrated DNA Technologies (IDT) / IBA

Ethanol (EtOH)	Carl Roth
Konzentrierte Essigsäure (CH <sub>3</sub> COOH)	Carl Roth
EDTA	Sigma-Aldrich
Gold(III)-chlorid-Hydrat (AuCl <sub>3</sub> · H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O)	Fluka Analytical
Milchpulver	Carl Roth
Natriumchlorid (NaCl)	VWR
Natriumacetat (CH <sub>3</sub> COONa)	Carl Roth
Natriumborhydrid (NaBH <sub>4</sub> )	Merck Millipore
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth
Nuclease-Free Water for Molecular Biology	Sigma-Aldrich
Ochratoxin A (OTA)	Sigma-Aldrich
Konzentrierte Salpetersäure (HNO <sub>3</sub> )	Fluka Analytical
Konzentrierte Salzsäure (HCl)	Carl Roth
ROTI®GelStain	Carl Roth
Saccharose	Sigma-Aldrich
Streptavidin	IBA
TRIS	Sigma-Aldrich
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich
Tween® 20	AppliChem PanReac

### A.3 Puffer und weitere Lösungen

Tabelle 19: Verwendete Lösungen.

Reagenzien	Zusammensetzung	Menge
	3 M NaCl	8,77 g

20x SCC (Stocklösung, 50 mL, pH=7)	300 mM Tri - Natriumcitrat-Dihydrat 1 M HCl	4,41 g  Bis pH 7
OTA-Aptamer-Bindepuffer (pH=8,5)	10 mM TRIS 120 mM NaCl 20 mM CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O 5 mM KCl 1 M HCl	1,21 g/L 7,01 g/L 2,94 g/L 0,37 g/L Bis pH 8,5
Citrat-Puffer (45 mL, pH=5)	Tri-Natriumcitrat- Dihydrat 1 M HCl	7,35 g  Bis pH 5
NaCl-Lösung (2 M, 100 mL)	NaCl ddH <sub>2</sub> O	11,69 g 100 mL
1x PBS (pH=7,4)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,00 g/L 0,20 g/L 1,78 g/L 0,27 g/L
NaBH <sub>4</sub> -Lösung (zum Blockieren des Microarray- Chips, 40 mL) NaBH <sub>4</sub> -Lösung (zum Blockieren des Microarray- Chips, 40 mL)	NaBH <sub>4</sub> 1xPBS  EtOH	0,1 30 mL  10 mL
Königswasser (zum Reinigen von Glasgefäßen)	Konzentrierte (37 %ige) HCl und konzentrierte (65 %ige) HNO <sub>3</sub> im Verhältnis 3:1	
50x TAE-Puffer (Stocklösung, pH=8)	2 M TRIS 50 mM EDTA Konz. Essigsäure	242 g/L 100 mL/L Bis pH=8
PBTS-Lösung	1x PBS 5 % Casein	10 mL 500 µL

(zum Blockieren der NC-Membran, 10 mL)	0,05 % Tween 20	5 $\mu$ L
--	-----------------	-----------

#### A.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 20: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
3D-Aldehyd-Objektträger	PolyAn
96-Well-Platte	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Inkubationskammer	SCHOTT NEXTERION®
Glasschale	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Microarray-Kammer	Schott
Standard-MST-Kapillaren	Nanotemper Technology
Nitrocellulose (NC)-Membran	Sartorius, Göttingen, DE
Pipettenspitzen (1 $\mu$ L, 10 $\mu$ L, 200 $\mu$ L und 1000 $\mu$ L)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Gefaltete Einweg-Kapillarzelle	Malvern Panalytical GmbH, Kassel, DE
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 mL)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
100 mL-Zweihalskolben	Lenz, Pfeuffer

#### A.5 Oligonukleotide

Die Sequenzen des verwendeten Aptamers sowie des entsprechenden komplementären Oligonukleotids (cOligo) und weiteren Oligonukleotiden sind in der Tabelle 21 aufgeführt. Für die verschiedenen Experimente wurden einige Oligonukleotide mit je einer funktionalen Gruppen modifiziert: dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanin 5 (Cy5), einer terminalen Aminogruppe, einer Thiolgruppe, einem Poly-A-Linker oder einem Biotin.

Tabelle 21: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Hersteller
Aptamer	TGG TGG CTG TAG GTC AGC ATC TGA TCG GGT GTG GGT GGC GTA AAG GGA GCA TCG GAC AAC G	Integrated DNA Technologies (IDT) / IBA
gekürztes Aptamer	GAT CGG GTG TGG GTG GCG TAA AGG GAG CAT CGG ACA	
cOligo	TAT GTC CGA TGC	
X	GGT TGC GGT TCT TCC GAT CT	

## B Methoden

### B.1 Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden

Die Konzentration von Oligonukleotiden wurde unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Gleichung 2) ermittelt.

$$A_{260 \text{ nm}} = \epsilon_{260 \text{ nm}} \cdot c \cdot d \quad \Leftrightarrow \quad c = \frac{A_{260 \text{ nm}}}{\epsilon_{260 \text{ nm}} \cdot d} \cdot V \quad (2)$$

Benötigte und gegebene Daten sind:  $A_{260 \text{ nm}}$  = Absorption des Oligonukleotids bei 260 nm,  $\epsilon_{260 \text{ nm}}$  = Extinktionskoeffizient des Oligonukleotids,  $d$  = durchstrahlte Schichtdicke = 1 cm und  $V$  = Verdünnungsfaktor.

In ddH<sub>2</sub>O (Nuclease-Free Water for Molecular Biology, Sigma-Aldrich) aufgenommene Oligonukleotide wurde an einem NanoDrop-ND1000 (PeqLab) photometrisch vermessen, um die Absorbanz bei 260 nm zu ermitteln und mithilfe von Gleichung (2) die resultierende Konzentration zu berechnen.

### B.2 Untersuchung der strukturellen Eigenschaften der Aptamere mittels CD-Spektroskopie

Sekundärstrukturen von Aptameren und die Konformationsänderung der Aptamere bei Targetbindungen können mittels CD-Spektroskopie analysiert werden. Die Fähigkeit, Elliptizität, der chiralen Probe linear polarisiertes Licht in elliptisch polarisiertes Licht umzuwandeln wird üblicherweise in Milligrad (engl. *millidegree*, mdeg) angegeben [97], [99].

Zur Analyse der Oligonukleotide wurden diese auf eine Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  verdünnt und kurz bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Target OTA in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  zugegeben und die Aptamer-Target-Lösungen (Gesamtvolumen: 250  $\mu\text{M}$ , Endkonzentration des Aptamers bzw. des Targets: 10  $\mu\text{M}$ ) über Nacht bei RT und unter Lichtausschluss inkubiert. Die CD-Spektroskopie Messungen wurden mit einem JASCO J-860-Spektrophotometer (JASCO, Tokio, Japan) und einer Quarzküvette (optische Weglänge = 10 mm) durchgeführt. Es wurde im Wellenlängenbereich von 190 nm - 320 nm

gemessen und die Scangeschwindigkeit auf 50 nm/min eingestellt. Es erfolgten drei Messungen, die gemittelt wurden.

### **B.3 Untersuchung der Bindungseigenschaften der Aptamere mittels MST**

Die MST-Experimente wurden mit einem Monolith NT. 115 (Nanotemper) durchgeführt. Bei Verwendung der Cy5-Markierung wurde die rote Leuchtdiode (LED) als Anregungsquelle ausgewählt. Die Oligonukleotide und Targets wurden über 16 Konzentrationen im Bindepuffer verdünnt, es wurde Tween 20 zugesetzt, um unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen an den Wänden der Glaskapillaren zu verringern. Zur Datenanalyse wurden die Signale mit der zugehörigen Software ausgewertet und ein sigmoidaler Fit der in Origin 2018b (OriginLab Corporation, USA) vorgenommen.

Durch einen IR-Laser wird ein Temperaturgradienten in einem kreisförmigen Bereich erzeugt, der für vorliegende Moleküle zur Diffusion außerhalb des erwärmten Bereichs in umliegende kältere Bereiche führt (Thermophorese). Die Diffusion der Moleküle wird mittels Fluoreszenz-Markierung verfolgt, da parallel zum IR-Laser die Fluoreszenz der Probe untersucht wird. Durch Bindung von Molekülen verändert sich aufgrund der erhöhten Größe die Geschwindigkeit der Thermophorese, diese kann mittels Fluoreszenz untersucht werden und durch Analyse der 16 Konzentrationen kann die Bindungsaffinität ermittelt werden. Zu Beginn eines MST-Experiments wird ein Kapillarscan durchgeführt. Hierdurch werden Proben, die eine Fluoreszenz-Abweichung > 10 % haben von der späteren Analyse ausgeschlossen. Weiterhin können über die Form des Fluoreszenz-Peaks unerwünschte Adsorptionseffekte festgestellt bzw. ausgeschlossen werden.

#### **B.3.1 MST-Bindungsexperimente mit dem OTA-Aptamer**

##### **B.3.1.1 Bindung des Aptamers an das Target OTA**

Das Cy5-markierte FL-Aptamer wurde mit einer Konzentration von 50 nM zu einer Verdünnungsreihe von OTA (Anfangskonzentration: 10 µM) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei RT und unter Lichtausschluss wurden die Proben (finale Aptamer-Konzentration: 25 nM, finaler Konzentrationsbereich von OTA 153 pM - 5 µM, Verdünnungsfaktor 1:2) in Standard-Kapillaren überführt und anschließend mit dem

Monolith NT.115 analysiert. Die resultierende MST-Bindungskurve wurde zum Zeitpunkt  $t=15$  s ausgewertet.

Für die Versuche mit dem komplexen Medium Kuhmilch wurde der Bindepuffer zum gewünschten Anteil mit Milchpulver verdünnt.

#### **B.3.1.2 Bindung des OTA-Aptamers an das komplementäre Oligonukleotide**

Hierbei wurde das Aptamer in einer Verdünnungsreihe (Startkonzentration  $20 \mu\text{M}$ ) vorgelegt und das Cy5-cOligo ( $50 \text{ nM}$ ) zugegeben. Die Proben (finale Cy5-cOligo-Konzentration:  $25 \text{ nM}$ , Aptamers:  $306 \text{ pM} - 10 \mu\text{M}$ , Verdünnungsfaktor: 1:1) wurden  $20 \text{ min}$  bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Die Messung erfolgte wie zuvor und die resultierende MST-Bindungskurve wurde zum Zeitpunkt  $t=15$  s ausgewertet.

#### **B.3.1.3 OTA-induzierte Dissoziation des komplementären Oligonukleotides (TID)**

Für dieses MST-Experiment wurde das Aptamer mit einer konstanten Konzentration von  $100 \text{ nM}$  zu einer OTA-Verdünnungsreihe (Anfangskonzentration:  $40 \mu\text{M}$ ) gegeben und nach  $5 \text{ min}$  Inkubationszeit wurde außerdem Cy5-cOligo (Anfangskonzentration:  $100 \text{ nM}$ ) zugegeben. Anschließend wurden die Proben (Aptamer- bzw. Cy5-cOligo-Konzentration:  $25 \text{ nM}$ , OTA  $153 \text{ pM} - 25 \mu\text{M}$ , Verdünnungsfaktor: 1:1)  $20 \text{ min}$  bei RT und unter Lichtausschluss inkubiert. Die Messung erfolgte wie zuvor und die resultierende MST-Kurve wurde zum Zeitpunkt  $t=15$  s ausgewertet.

### **B.4 Microarray-Experimente**

#### **B.4.1 Immobilisierung der Oligonukleotide auf 3D-Aldehyd-Oberflächen**

Für Microarray-Experimente wurden verschiedene Konzentrationen der  $\text{NH}_2$ -modifizierten Oligonukleotide (mit  $3\times\text{SSC}$  Puffer verdünnt) erstellt und mit dem GeSiM-Nano-Plotter als Spots in einer Reihe von links nach rechts in absteigender Konzentration auf einen Microarray-Slide aufgetragen. Für jede Oligonukleotid-Konzentration wurden acht Tropfen pro Spot abgegeben. Der Microarray-Slide wurde so entworfen, dass er  $16$  identische Blöcke mit acht Wiederholungen für jede Konzentration des OTA-Aptamers bzw. des cOligos

enthält. Nach dem Bedrucken wurde der Slide in einer feuchten Kammer mit einem Reservoir gesättigter NaCl-Lösung (358 g/L) über Nacht gelagert.

#### B.4.2 Hybridisierung und kompetitive Verdrängung (TID) auf dem Microarray

Am darauffolgenden Tag wurde der Slide zum Blockieren, dem Inaktivieren der nicht reagierten Aldehyd-Gruppen, in einer Glasschale mit einer NaBH<sub>4</sub>-Lösung (0,1 g NaBH<sub>4</sub> auf 30 mL 1x PBS und 10 mL Ethanol) für 1 h inkubiert. Danach wurde der Slide dreimal für 5 min mit 30 mL Aptamer-Bindepuffer gewaschen und für korrektes Falten der Aptamere für 1 h unter Schütteln im Bindepuffer inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde der Slide in eine Inkubationskammer mit 16 Vertiefungen eingespannt, die eine separate Behandlung jedes Blocks ermöglichen. Zur Analyse der Hybridisierung wurden jeweils 100 µL der Cy5-markierten Aptamer- und cOligo-Lösungen (Konzentrationen: 0,5 nM, 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM,) in eine Kammer gegeben. Als Negativkontrolle wurden je 100 µL einer 1 µM OTA-Lösung in eine Kammer gegeben.

Zur TID-Testung wurden in je 75 µL OTA-Lösungen (Konzentrationen 20nM, 200 nM und 2000 nM) zu 75 µL 10 nM Cy5-markierter Aptamer- bzw. cOligo-Lösung gegeben (Verdünnungsfaktor 1:1). Anschließend wurde die Inkubationskammer des Slides mit Klebefolie versiegelt, in eine Glasschale gelegt, mit Aluminiumfolie bedeckt und für 1 h auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Inkubationslösungen entnommen und die 16 Blöcke einzeln mit jeweils 150 µL OTA-Bindepuffer gewaschen. Um Antrocknen der Flüssigkeit auf dem Chip zu verhindern, wurde zügig mit einer Mehrkanalpipette gearbeitet. Das Waschen wurde insgesamt dreimal für jeweils 5 Minuten auf dem Schüttler durchgeführt. Im Anschluss wurde die Inkubationskammer entfernt und der Slice in einer Glasschale drei weitere Male mit jeweils 40 mL Bindepuffer für 5 Minuten mit einem lichtundurchlässigen Deckel auf dem Schüttler gewaschen. Nach Trocknen mit Druckluft wurde der Microarray mit einem GenePix 4000B-Gerät bei einer Wellenlänge von 635 nm und Laserstärke von 33 % sowie einem PMT-Gain (engl. *PhotoMultiplier Tube-Gain*) von 400 gescannt. Das PMT-Gain wurde erhöht, bis gesättigte Pixel zu erkennen waren. Die Analyse und Auswertung des aufgenommenen Bildes erfolgte mit der Software GenePix Pro 7. Für jede Oligonukleotid-Konzentration wurden die durchschnittliche

Fluoreszenzintensität sowie Standardabweichung pro Spot der zehn Replikate bestimmt und in Origin 2018b als Säulendiagramm dargestellt.

## B.5 Goldnanopartikel-Synthese

### B.5.1 Synthese Citrat-stabilisierter AuNP nach Turkevich *et al.*

Für die Synthese von AuNP sind rückstandslos saubere Gefäße erforderlich. Daher wurden die Glasgefäße, der Rührfisch und die benötigte Glaspipetten mit Königswasser gereinigt und anschließend mehrmals mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Herstellung der AuNP wurden 49 mL ddH<sub>2</sub>O und 1 mL HAuCl<sub>4</sub> (50 mM) unter Rühren bis zum Rückfluss erhitzt. Dann wurden zügig 5 mL Natriumcitrat (38,8 mM) zugegeben. Die Dispersion wurde 20 min weiter unter Rühren erhitzt, nach einigen Minuten trat der charakteristische Farbumschlag von farblos zu rot auf. Die Dispersion wurde anschließend unter Rühren abgekühlt und unter Lichtausschluss in einem Glasgefäß gelagert.

### B.5.2 Synthese Citrat-stabilisierter AuNP mit wiederholter Zugabe der Edukte

Vor Synthese wurden ebenfalls die benötigten Gegenstände ebenfalls mit Königswasser gesäubert. Die verwendete Methode zur Herstellung der Citrat-stabilisierten AuNPs basiert auf der Forschungsarbeit von *Bastús et al.*

2,8 mL Natriumcitrat (38,8 mM) und 47,2 mL ddH<sub>2</sub>O wurden in einem 100 mL Zweihalskolben vorgelegt, der mit einem Luftkühler sowie Thermometer ausgestattet war (Abbildung 55).



Abbildung 55: Aufbau zur AuNP-Synthese.

Nach Erhitzen (unter Rühren) bis zum Rückfluss wurden 333  $\mu\text{L}$   $\text{HAuCl}_4$  (25 mM) zugegeben und die Dispersion für 30 min gerührt. Innerhalb der ersten 5 min trat der Farbumschlag von farblos zu rot auf. Nach Ablauf der 30 min wurde die Temperatur auf ca. 90 °C gesenkt und dann der 1. Wachstums-Zyklus begonnen. Hierfür wurden 500  $\mu\text{L}$  Natriumcitrat (38,8 mM) zum Syntheseansatz gegeben und 2 min später wurden 333  $\mu\text{L}$   $\text{HAuCl}_4$  zwei Minuten zugegeben. Die Dispersion wurde für weitere 30 min bei 90 °C gerührt und die Synthese durch 2 weitere Wachstums-Zyklen erweitert. Die Dispersion verfärbte sich nach jedem Zyklus dunkler rot. Nach der letzten Zugabe der Edukte wurde die AuNP-Dispersion für 20 min unter Rühren abgekühlt und anschließend in einem Glasgefäß unter Lichtausschluss gelagert.

### B.5.3 Charakterisierung der synthetisierten AuNP und AuNP-Konjugate

#### B.5.3.1 UV-Vis-Spektroskopie

Zur Analyse mittels UV-Vis-Spektroskopie wurden 2  $\mu\text{L}$  der AuNP auf einen Take3-Einsatz des Epoch Mikroplatten-Spektralphotometer gegeben. Die Aufnahme des Absorptionsspektrums erfolgte in 1 nm Schritten im Wellenlängenbereich von 380 bis 810 nm. Die Bestimmung erfolgte in Dreifachmessung.

Zur weiteren Analyse der Größe und Konzentration wurde das Verhältnis vom Absorptionsmaximum zum lokalen Minimum bei 450 nm ermittelt, dafür wurden Werte aus Tabelle 22 (von Haiss *et al.* [111]) verwendet.

**Tabelle 22:** Ermittelte Werte aus den Berechnungen von Haiss *et al.*, die zur Größenbestimmung der AuNP aus den UV/Vis-Spektren verwendet werden können (d=Durchmesser eines AuNP). Zitiert und bearbeitet nach [111].

$A_{\max} / A_{450}$	d [nm]	$A_{\max} / A_{450}$	d [nm]	$A_{\max} / A_{450}$	d [nm]
1,10	3	1,46	9	1,73	20
1,19	4	1,50	10	1,80	25
1,27	5	1,56	12	1,86	30
1,33	6	1,61	14	1,92	35
1,38	7	1,65	16	1,96	40
1,42	8	1,69	18	2,00	45

Zur Berechnung der Konzentration der AuNP-Dispersion wurden die Extinktionskoeffizienten aus Tabelle 23 verwendet.

**Tabelle 23:** Werte der Extinktionskoeffizienten bei 450 nm, die zur Ermittlung der Konzentration der AuNP-Dispersion eingesetzt werden können. (d=Durchmesser eines AuNP). Zitiert und bearbeitet nach [111].

d [nm]	$\epsilon_{450 \text{ nm}} [\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$	d [nm]	$\epsilon_{450 \text{ nm}} [\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$
11	$8,27 \cdot 10^7$	16	$2,67 \cdot 10^8$
12	$1,09 \cdot 10^8$	17	$3,24 \cdot 10^8$
13	$1,39 \cdot 10^8$	18	$3,87 \cdot 10^8$
14	$1,76 \cdot 10^8$	19	$4,60 \cdot 10^8$
15	$2,18 \cdot 10^8$	20	$5,41 \cdot 10^8$

Die UV-Vis-Analyse der AuNP-Konjugate erfolgte ebenfalls mit dem Epoch Mikroplatten-Spektrometer im gleichen Wellenlängen-Bereich. Hierfür wurde das Konjugat für geringeren Materialverbrauch im gleichen Verhältnis mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt (je 1  $\mu\text{L}$ ).

### B.5.3.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Der hydrodynamische Durchmesser der AuNP wurde mit dem Partikel-Analysegerät Litesizer™ 500 (Anton Paar) unter Verwendung der Kalliope™-Software ermittelt. Die AuNP-Dispersion wurde im Verhältnis 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt (Gesamtvolumen 350 µL). Für die AuNP-Konjugate reichte aufgrund der höheren Konzentration eine Verdünnung im Verhältnis 1:100 aus. Die Messung der Partikelgröße erfolgte in einer Einwegküvette. In Tabelle 24 sind Parameter der Messung des hydrodynamischen Durchmessers zusammengefasst.

Tabelle 24: Verwendete Parameter zur Messung des hydrodynamischen Durchmessers mit dem Litesizer™ 500.

Messwinkel	Automatisch
Temperatur des Targets	20 °C
Equilibrierungszeit	1 min
Analysemodell	Allgemein
Kumulationsmodell	ISO 22412
Qualität, Filter, Fokus	Automatisch
Material	Au Brechungsindex : 0,1426 Absorption: 3,62821
Lösungsmittel	Wasser Brechungsindex : 1,33 Viskosität: 0,001 Pa·s

### B.5.3.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Eine 5-fach verdünnte AuNP-Dispersion wurde auf eine vorbereitete Graphitoberfläche aufgegeben und über Nacht getrocknet. Die Aufnahmen wurden von Alahmad Abdalrahim am JEOL JSM-6700 F (Feldemissions-REM der Physikalischen Chemie, AG Caro/ Feldhoff) durchgeführt. Die Partikelgröße anhand der Aufnahmen mittels ImageJ ermittelt. Die Analyse der AuNP mittels REM wurde mit einer 150000x bzw. 200000x Auflösung durchgeführt. Für die Darstellung in der Arbeit wurde die Skalierung angepasst.

## B.6 Konjugation der AuNP mit Oligonukleotiden

Die Konjugation der AuNP wurde für 3 Methoden untersucht und optimiert, diese werden nachfolgend beschrieben.

### B.6.1 Konjugation mittels pH-Erniedrigung

Bei der Konjugation mittels pH-Erniedrigung wird ein Natriumcitratpuffer mit dem pH-Wert von 3 verwendet, um die negativen Ladungen der DNA auszugleichen und eine Konjugation zu ermöglichen. Dazu wurden AuNP in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß vorgelegt und 1  $\mu\text{M}$  (ggf. auch eine andere Konzentration) Thiol-modifiziertes Oligonukleotid in den Deckel des Gefäßes zugegeben. Nach Schließen des geschlossenen Gefäßes erfolgte eine sofortige Durchmischung, um eine homogene Mischung zu gewährleisten. Die Dispersion wurde über Nacht (ca. 16 h) unter Lichtausschluss und Rühren inkubiert. Nach der Inkubation wurden pro 1 mL Konjugationsansatz 20  $\mu\text{L}$  Citrat-Puffer (pH=3, 500 mM, finale Konzentration: 9,8 mM) zügig zugegeben und erneut sofort durchmischt. Der Konjugationsansatz wurde für 20 min weiter unter Rühren inkubiert und anschließend für 30 min bei 12500 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde fast vollständig abgenommen und für spätere Messungen abgewogen. Das verbleibende Konjugat-„Pellet“ wurde im Resuspensionspuffer aufgenommen und zwei weitere Male nach gleicher Methodik zentrifugiert. Das Pellet nach der 3. Zentrifugation wurde nicht resuspendiert und stellt das finale Konjugat dar. Das Konjugat wurde lichtgeschützt und gekühlt (4 °C) gelagert.

### B.6.2 Konjugation mittels Salt aging

Beim Salt Aging wird durch mehrfache Zugaben der Salz-Konzentration eine langsame Annäherung der AuNP und Oligonukleotide ermöglicht und eine über Thiol-Modifizierung eine gerichtete Konjugation erreicht. Wie bei der pH-Erniedrigung wurden über Nacht AuNP und Oligonukleotid inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die schrittweise Zugabe von NaCl. Eine NaCl-Lösung (2 M, 0,05 % Tween 20) wurde zum Konjugationsansatz zugegeben, der Ansatz für 10 s im Ultraschallbad inkubiert und für 10 min inkubiert. Die Volumina der Zugaben sowie die Anzahl der Zugaben wurde für 3 finale Salz-Konzentrationen, die Parameter sind in Tabelle 25 aufgeführt. Nach der letzten Inkubationszeit wurde der Konjugationsansatz über Nacht unter Rühren und lichtgeschützt weiter inkubiert. Am

darauffolgenden Tag erfolgte Aufbereitung des Konjugats wie bei der Methodik der pH-Erniedrigung durch Zentrifugieren und Resuspendieren.

**Tabelle 25:** Konjugation mittels Salt Aging. Volumina und Zugabe-Anzahl bei verschiedenen finalen NaCl-Konzentrationen. Die Angaben beziehen sich auf 1 mL Konjugationsansatz (AuNP + Oligonukleotid)

Finale NaCl-Konzentration [M]	0,7	0,2	0,084
Anzahl Zugaben der 2 M NaCl-Stammlösung	11	4	8
1. Zugabe [ $\mu$ L]	25,6	25,6	5,5
2. Zugabe [ $\mu$ L]	27	27	5,5
3. Zugabe [ $\mu$ L]	58,5	58,5	5,5
4. Zugabe [ $\mu$ L]	65,4	65,4	5,5
5. Zugabe [ $\mu$ L]	73,5		5,5
6. Zugabe [ $\mu$ L]	83,3		5,5
7. Zugabe [ $\mu$ L]	95,2		5,5
8. Zugabe [ $\mu$ L]	109,9		5,5

Das Salt aging wurde ebenfalls mit einer  $MgCl_2$  statt NaCl durchgeführt. Hierfür wurden nach Inkubationszeit von AuNP und Oligonukleotid zuerst 10  $\mu$ L 1 mM  $MgCl_2$  Lösung zugegeben, daraufhin 9  $\mu$ L 10 mM  $MgCl_2$ -Lösung und zuletzt 10  $\mu$ L 10 mM  $MgCl_2$  Lösung<sup>7</sup>. Zwischen den Zugaben wurden die gleichen Inkubationszeiten wie bei Verwendung von NaCl eingehalten und das Konjugat wurde gleich aufbereitet.

### B.6.3 Konjugation mittels Einfrieren

Beim Einfrieren von AuNP und Oligonukleotiden wird durch Eiskristall-Bildung eine Annäherung der Moleküle erzwungen, bis eine kritische Distanz überwunden wird und Oligonukleotide auf der AuNP-Oberfläche immobilisiert werden. Hierfür wurde, wie bei den anderen Konjugationsmethoden, Oligonukleotid zügig zu einer AuNP-Dispersion zugegeben und der Konjugationsansatz dann für 2 h bei eingefroren. Schließlich wird der Ansatz aufgetaut und durch Zentrifugieren und Resuspendieren das finale Konjugat erhalten. Das

<sup>7</sup> Dieses Protokoll wurde im Rahmen eines ZIM-Projekts vom Kooperationspartner Universität Duisburg-Essen (Arbeitsgruppe Prof. Barcikowski) erarbeitet.

Einfrieren wurde für 2 Temperaturen untersucht: bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 2 h sowie bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 30 min.

### B.7 Bestimmung der gebundenen Oligonukleotide auf AuNP

Zur Berechnung der gebundenen Oligonukleotide pro AuNP wurden die Überstände der Konjugate mittels UV/Vis-Spektroskopie analysiert. Zum Abschließen der Konjugation werden die Konjugate 3-mal zentrifugiert und der Überstand entnommen und das Konjugat resuspendiert. Das Volumen der Überstände wurde abgewogen und die Absorption vermessen. Die Messungen erfolgten mit dem NanoDrop-ND1000-Spektralphotometer mit  $2\text{ }\mu\text{L}$  Probenvolumen. Die Extinktion wurde bei  $260\text{ nm}$  gemessen, da dies dem Absorptionsmaximum von DNA entspricht. Vor der Probenmessung wurde eine Blindprobe (Blank) mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  durchgeführt. Anhand der Kalibrationsgeraden in Abbildung 56, den erhaltenen Absorptionssignalen und den eingesetzten Volumina konnte schließlich die Menge ungebundener Oligonukleotide berechnet werden. Alle Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung.

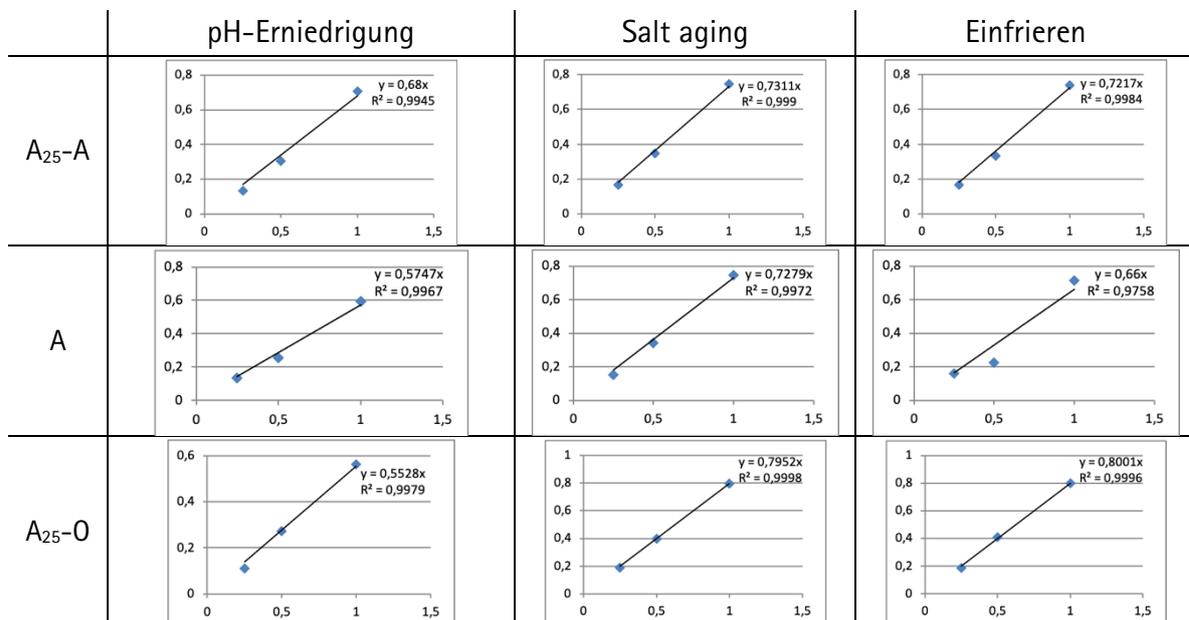


Abbildung 56: Kalibrationsgeraden verschiedener Oligonukleotide. Bei jeder Konjugationsmethodik wurde eine Kontrollprobe durchgeführt, die kein Oligonukleotid enthält. Der Überstand dieser Proben wurde zum Ansetzen der Oligonukleotide für die Bestimmung der Kalibrationsgeraden verwendet, um eine gleiche Ionen-Zusammensetzung wie bei den untersuchten Oligonukleotiden in den Überständen der Konjugation zu erreichen.

Durch Division der errechneten gebundenen Oligonukleotid-Konzentration und der AuNP-Konzentration aus 4.2.2.3 kann für jedes Konjugat die Menge gebundener Oligonukleotide pro AuNP berechnet werden.

## B.8 Überprüfung der Konjugat-Funktionalität mittels Bindungsassay

Der Bindungsassay diente als Überprüfung der Funktionalität der Aptamer-Konjugate zur Hybridisierung sowie Bindung des Targets OTA an die konjugierten Aptamere. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe des Cy5-cOligos im Bereich von 80  $\mu$ M – 62,5 nM angesetzt (11 Proben, Verminderung der Konzentration um je die Hälfte pro Probe) mit einem Volumen von 7  $\mu$ L. Zum Verdünnen wurde auf 5,5 % verdünnter Bindepuffer verwendet. Zusätzlich wurde eine Probe mit 40  $\mu$ M Cy5-cOligo sowie 80  $\mu$ M OTA angesetzt. Als nächstes wurden zu jeder Probe 7  $\mu$ L Aptamer-Konjugat gegeben und die Proben für 1,5 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben für 20min bei 12.500 rpm und RT zentrifugiert. Der klare bzw. bläuliche Überstand wurde daraufhin entnommen und die Fluoreszenz der Proben in Mehrfachbestimmung bestimmt. Anhand der Kalibrationsgeraden aus Abbildung 57 konnte die freie Menge an Cy5-cOligo und resultierend die an den Aptameren-gebundene Menge berechnet werden.

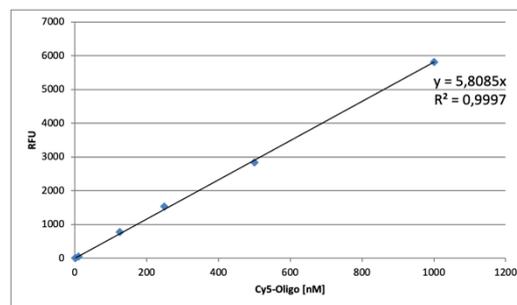


Abbildung 57: Kalibrationsgerade der Cy5-cOligos

## B.9 Charakterisierung der Konjugate mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten verwendet. Die DNA wird im Agarosegel aufgrund ihrer Ladung durch ein elektrisches Feld von – nach + geleitet, mithilfe einer Marker-Bande kann schließlich die Größe bestimmt werden. Die Gelelektrophorese von den in dieser Arbeit erstellten Konjugaten soll Aufschluss über die Stabilität und Homogenität der Konjugate geben. Anhand der negativen Ladung

der konjugierten DNA werden die Konjugate durch das elektrische Feld bewegt. Dabei ist die Migrationsstrecke abhängig von der Größe der DNA sowie der Menge der konjugierten DNA. Eine Größenbestimmung ist aufgrund der gegensätzlichen Effekte von Größe und Menge nicht möglich. Stattdessen liefert die Bandenbildung der Konjugate Informationen über die Konjugatbeschaffenheit. 2 %ige Agarose-Gele wurden durch Aufkochen von 2 g Agarose in 100 mL 1x TAE-Puffer hergestellt. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C wurden unter Rühren 5 µL des Fluoreszenzfarbstoffs ROTI®GelStain zugegeben. Die Gellösung wurde anschließend blasenfrei in eine horizontale Elektrophoresekammer gegossen, die mit einem Kamm für 26 Proben ausgestattet war. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit 1x TAE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Pro Tasche wurden 12 µL Konjugat und 3 µL 5X Green GoTaq® Reaction Buffer aufgegeben. Die Proben wurden bei einer angelegten Spannung von 100 V für 25 min aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurde ein Foto des Gels aufgenommen. Eine zusätzliche Beleuchtung mit UV-Licht wurde durchgeführt, aufgrund der geringen DNA-Konzentrationen und des Quenchingeffekts der AuNP konnten jedoch keine weiteren Informationen gewonnen werden.

#### **B.10 Funktionalitätsüberprüfung der Konjugate mittels Dot Blot**

Die Funktionalität der Konjugate wurde mittels Dot Blot überprüft. Amino-modifizierte Oligonukleotide (Konzentration 10 µM) waren nicht erfolgreich, daher wurde eine Immobilisierung der Oligonukleotide mittels Streptavidin-Biotin verwendet. Biotin-modifizierte Oligonukleotide wurden mit einer Streptavidin-Lösung für 2 h unter Rühren inkubiert. Bei quadratischen Dot Blots (ca. 1 cm<sup>2</sup>) wurden 0,8 µL der inkubierten Lösungen aufgegeben, bei runden Dot Blots (Durchmesser ca. 0,5 cm) wurden 0,2 µL aufgegeben. Die Dot Blots wurden anschließend für 1 h getrocknet. Bei den quadratischen Dot Blots wurde ein Biotin-Streptavidin Verhältnis von 2:1 eingesetzt (25 µM Biotin-DNA und 12,5 µM Streptavidin). Bei den runden Dot Blots wurden die Verhältnisse 2:1, 1:1, 1:10 sowie 1:100 getestet, die Streptavidin-Konzentration betrug dabei immer 12,5 µM, die Biotin-DNA-Konzentration 25 µM, 12,5 µM, 1,25 µM oder 0,125 µM. Die Streptavidin-Biotin-DNA Lösung enthielt final 2 % Trehalose zur besseren Spot-Bildung. Nach der Trocknungszeit der Dot Blots wurden diese mit 300 µL bzw. 80 µL PBST-Lösung für 1 h unter Schütteln behandelt. Danach wurden sie 3-mal je 5 min mit 300 µL bzw. 80 µL OTA-Bindepuffer (ohne CaCl<sub>2</sub>, mit 2 % Saccharose) „gewaschen“ und anschließend für 30 min im gleichen OTA-

Bindepuffer inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Probelösungen auf die Dot Blots gegeben, hierfür wurden in 300  $\mu\text{L}$  OTA-Bindepuffer 5  $\mu\text{L}$  Konjugat gegeben bzw. in 50  $\mu\text{L}$  1  $\mu\text{L}$ . Bei den Kontrollen mit reinen AuNP wurden 50  $\mu\text{L}$  bzw. 10  $\mu\text{L}$  AuNP statt Konjugat eingesetzt. Für die Konkurrenz mit OTA wurden einigen Probelösungen 10  $\mu\text{M}$  OTA zugesetzt. Die Dot Blots wurden für ca. 16 h mit der Probelösung inkubiert. Danach wurden die Dot Blots 3-mal je 5 min und 3-mal je 10 min mit OTA-Bindepuffer (ohne  $\text{CaCl}_2$ , mit 2 % Saccharose) gewaschen und getrocknet. Die Auswertung der Spots erfolgte anhand von Fotoaufnahmen. Die Intensität der Punkte wurde mit ImageJ analysiert und ausgewertet, die ausgewerteten Bereiche sind beispielhaft in Abbildung 58 dargestellt.

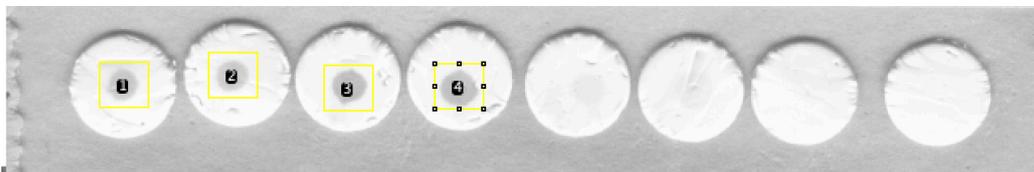
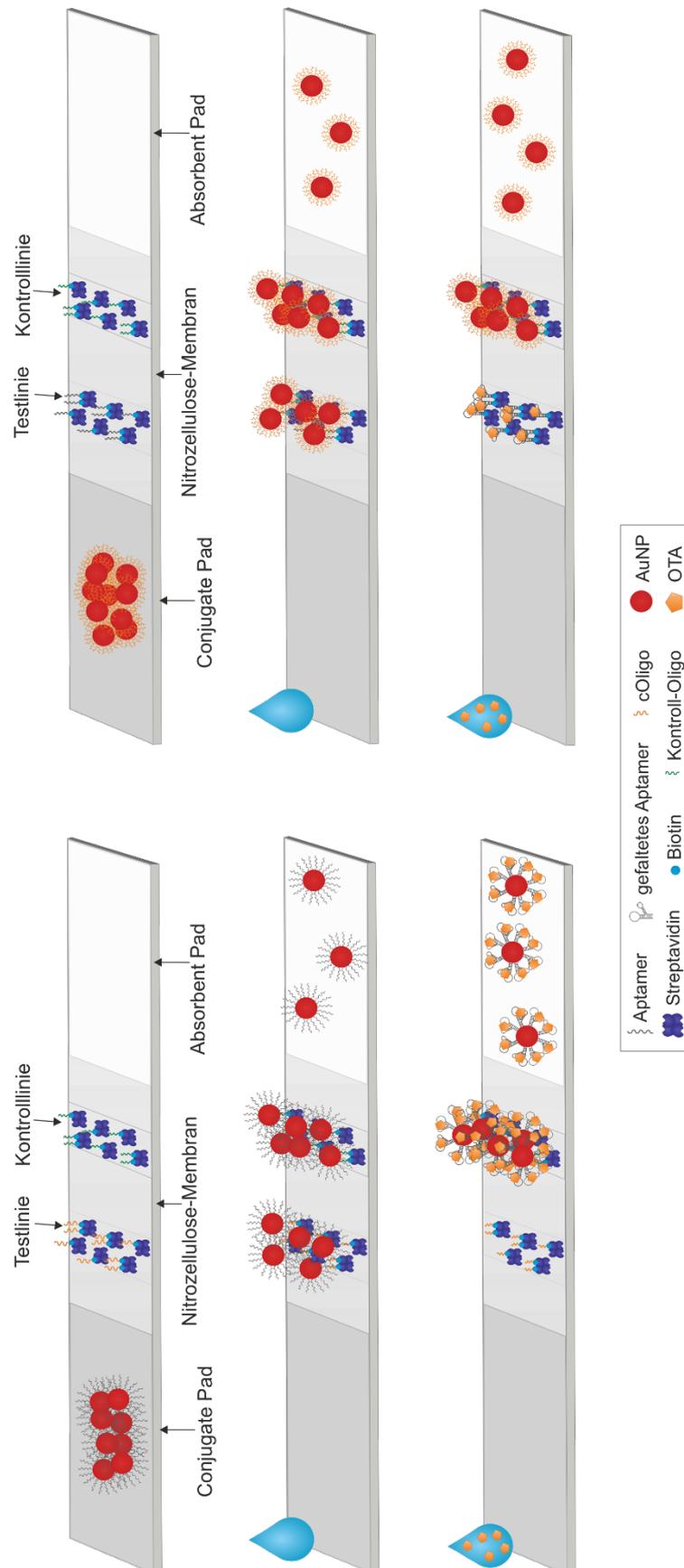


Abbildung 58: Auswertung mittels ImageJ von Dot Blots

Zur Auswertung wurde für jeden Dot Blot ein gleich großer Bereich ausgewertet, der mittig über den Spot positioniert wurde. Die Fläche unterhalb des resultierenden Signalpeaks wurde ausgewertet. Bei den Streptavidin-Biotin-DNA Verhältnissen 1:10 und 1:100 konnten die schwachen Signale aufgrund der vielen Unreinheiten der Membran nicht ausreichend analysiert werden.

B.11 Lateral Flow Assays



### **B.11.1 Vorbehandlung der Conjugate Pads**

Die Conjugate Pads wurden für optimale Konjugataufnahme und Probendurchfluss für 2 h in einer Pufferlösung inkubiert und anschließend getrocknet. Die Pufferlösung wurde optimiert auf den Bindepuffer ohne CaCl<sub>2</sub>, 2 % Saccharose, 1 % OVA und 0,05 % Tween 20. Nach der Inkubationszeit wurden die Conjugate Pads über Nacht getrocknet.

### **B.11.2 Herstellung der Teststreifen**

Auf einer selbstklebenden Backing Karte wurde zuerst mittig die Nitrozellulose (CN 95, 140 oder CN 180) verklebt, dann unten leicht überlappend das vorbehandelte Conjugate Pad und oben ebenfalls überlappend das Absorbent Pad. Anschließend wurden Streifen von 4 mm Breite daraus geschnitten.

### **B.11.3 Auftragen der Testlinie**

Als Testlinie wurden Amino-modifizierte Oligonukleotide (10 µM) untersucht, diese lieferten jedoch nur schwache Signale. Stattdessen wurde wie bei den Dot Blots die Immobilisierung mittels Streptavidin-Biotin vorgenommen. Die finale Streptavidin-Biotin-DNA Lösung enthielt 2 % Trehalose und wurde für ca. 2 h vorinkubiert. Die Endkonzentration des Streptavidins betrug meistens 25 µM, die Konzentration der Biotin-DNA 50 µM. Die Konzentrationen wurden teilweise verringert, dies ist bei den jeweiligen Versuchen vermerkt.

Beim manuellen Auftragen wurden 5 – 8 mal 0,1 µL der Lösung in einzelnen Tropfen zu einer Linie aufgegeben und für mind. 1 h getrocknet. Zum Auftragen wurde der Teststreifen auf eine Vorrichtung gelegt, die eine Markierung für die Position der TL und KL hat, damit diese immer in der gleichen Höhe aufgetragen werden. Die Markierung für die TL befindet sich 3 cm über dem CP, die der KL bei 5 cm.

Zum automatisierten Auftragen der Linien wurde der Nanospotter verwendet. Dafür wurde das Spotting-Layout so verändert, dass die normalerweise verwendeten 16 Blöcke ineinander übergehen. Es wurden 6 Tropfen pro Replikat aufgegeben.

#### B.11.4 Durchführung des Lateral Flow Assays

Der Laufpuffer wurde mit einem Volumen von 100  $\mu\text{L}$  in eine 96-Well-Platte vorgelegt. Das Konjugat wurde mittig auf das CP gegeben (3  $\mu\text{L}$ , wenn nicht anders angegeben) und der Teststreifen vertikal in den Laufpuffer gestellt. Nach ca. 15 min war fast das gesamte Volumen im Absorbent Pad und der Teststreifen wurde aus der Platte genommen. Der Streifen wurde anschließend eingescannt.

##### B.11.4.1 Änderungen zum Erreichen einer kompetitiven Verdrängungsreaktion

Folgend sind die Änderungen aus Tabelle 14 beschrieben.

- DMSO / EtOH in Laufpuffer  $\rightarrow$  das DMSO oder Ethanol wurden mit einer Konzentration von 5 % in den Laufpuffer gegeben.
- Konzentration OTA vierfach erhöhen (40  $\mu\text{M}$ )  $\rightarrow$  statt 10  $\mu\text{M}$  OTA wurden die Konzentrationen 20  $\mu\text{M}$  sowie 40  $\mu\text{M}$  im Laufpuffer getestet.
- Kein CP, Konjugat in LP  $\rightarrow$  der fertige LFA-Streifen wurde oberhalb des CPs geschnitten und der verbleibende Streifen in den Laufpuffer gestellt.
- Konjugat im LP vorinkubieren  $\rightarrow$  das Konjugat wurde in den Laufpuffer gegeben und für 10 min – 1,5 h inkubiert.
- LFAs / LP erwärmen  $\rightarrow$  Die LFA-Streifen sowie der Laufpuffer wurden auf ca. 40 °C erwärmt und anschließend erfolgte direkt die Versuchsdurchführung
- Mehr KCl in LP  $\rightarrow$  statt den vorhandenen 5 mM KCl wurden 100 mM KCl im Laufpuffer verwendet.
- Co-Immobilisierung auf AuNP mit anderen Oligonukleotiden (7.6)

## 8 Publikationsliste

Torsten Schüling, Alina Eilers (20 %), Thomas Scheper, and Johanna Walter, Aptamer-based lateral flow assays, *AIMS Bioeng.*, vol. 5, no. 2, pp. 78–102, 2018.

Alina Eilers (50 %), Sandra Witt, Johanna-Gabriela Walter, Aptamer-Modified Nanoparticles in Medical Applications. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 163–193, 2020

Johanna-Gabriela Walter, Alina Eilers (20 %), Lourdes Shanika Malindi Alwis, Bernhard Wilhelm Roth, Kort Bremer, SPR Biosensor Based on Polymer Multi-Mode Optical Waveguide and Nanoparticle Signal Enhancement, *Sensors (Switzerland)*, vol. 20, no. 10, pp. 1–11, 2020.

## 9 Betreute Abschlussarbeiten

### Bachelorarbeit von Jenny Irwan

Titel: Synthese und Modifikation von Gold-Nanopartikeln

Jahr: 2018

### Bachelorarbeit von Jasper Schrammel

Titel: Entwicklung Aptamer-basierter Microarrays zur Detektion von Ochratoxin A

Jahr: 2018

### Bachelorarbeit von Corinna Brandt

Titel: Entwicklung eines Aptamer-basierten Lateral Flow Assays zur Detektion von Ochratoxin A

Jahr: 2019

### Masterarbeit von Giamper Escobar Cano

Titel: Entwicklung funktionaler Aptamer-Goldnanopartikel-Konjugate für diagnostische Tests

Jahr: 2019-2020

## 10 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Strukturelle Darstellung eines G-Quadruplex, intramolekularer G4-Komplex. .....	5
<b>Abbildung 2:</b> Darstellung der Keimbildung nach LaMer bei der AuNP-Synthese. Im Diagramm werden die drei Phasen der Synthese nanoskopischer Metallpartikel dargestellt. .....	8
<b>Abbildung 3:</b> Konjugation mittels Salt Aging. Durch positive Natrium-Ionen werden die Ladungen der DNA ausgeglichen und eine Annäherung der AuNP und DNA ermöglicht. Nach zunächst adsorptiven Bindungen erfolgt durch eine Thiol-Gruppe der DNA (nicht gesondert dargestellt) eine gerichtete Immobilisierung der DNA.....	11
<b>Abbildung 4:</b> Konjugation mittels pH-Erniedrigung. Durch positive Natrium-Ionen und starke Erniedrigung des pH-Werts werden die Ladungen der DNA ausgeglichen. Durch eine Thiol-Gruppe der DNA (nicht gesondert dargestellt) kann eine gerichtete Immobilisierung der DNA erfolgen.....	12
<b>Abbildung 5:</b> Konjugation mittels Einfrieren. Durch eine erzwungene Distanzverminderung bei Kristallbildung des umgebenen Wassers, nähern sich AuNP und DNA nah genug an, sodass die DNA gerichtet (über Thiol-Gruppen) oder adsorptiv immobilisiert werden kann. Die AuNP-Dispersion beinhaltet auch positive Natrium-Ionen, die durch Ladungsausgleich der DNA zusätzlich die Konjugation erleichtern.....	13
<b>Abbildung 6:</b> Kolorimetrische Assays mit AuNP. A: Assay mit adsorptiv gebundenen Aptameren und Salz-induzierter Agglomeration, B: Sandwich-Assay mit Aptamer-AuNP Konjugaten.....	14
<b>Abbildung 7:</b> Schematischer Aufbau eines Lateral Flow Assay (LFA). Eine Probe kann auf das Sample Pad aufgegeben werden, Aptamer-AuNP Konjugate sind auf dem Conjugate Pad vorgelegt, Test- und Kontrolllinie bestehen im gezeigten Beispiel aus an Streptavidin immobilisierten Biotin-modifizierten Oligonukleotiden auf einer Nitrozellulose-Membran, ein Absorbent Pad ist zur Aufrechterhaltung der Kapillarkräfte aufgebracht. ....	15
<b>Abbildung 8:</b> Lateral Flow Assay mit einem Sandwich-Format. Oben: Teststreifen vor Durchführung. Mitte: Teststreifen nach Probendurchlauf ohne Target. Unten: Teststreifen nach Probendurchlauf mit Target. ....	16

---

<b>Abbildung 9:</b> Lateral Flow Assay mit einem TID-Mechanismus und Aptamer-AuNP. Oben: Teststreifen vor Durchführung. Mitte: Teststreifen nach Probendurchlauf ohne Target. Unten: Teststreifen nach Probendurchlauf mit Target.....	17
<b>Abbildung 10:</b> Strukturformel von Ochratoxin A. ....	19
<b>Abbildung 11:</b> CD-Spektren des Aptamers (schwarz), des gekürzten Aptamers (rot) und des gekürzten Aptamers-OTA-Komplexes (blau).....	21
<b>Abbildung 12:</b> A: MST-Traces des Experiments, B: Bindungskurve vom Cy5-Apt (25 nM) und OTA im Bereich von 5 $\mu$ M – 153 pM (logarithmische Auftragung). Dargestellt ist die normierte Fluoreszenz ( $F_{norm}$ [%]) in Abhängigkeit von der Aptamer-Konzentration [nM]. Ausgewertet mittels MO.Control von NanoTemper, sigmoidaler Fit in Origin erstellt. ....	23
<b>Abbildung 13:</b> Bindungskurven des Cy5-Apt (25 nM) und OTA im Bereich von 10 $\mu$ M – 153 pM mit verschiedenen Milch-Konzentrationen, ermittelt durch MST-Messungen. Dargestellt ist der Anteil gebundener Aptamere in Abhängigkeit von der OTA-Konzentration [nM]. Ausgewertet mittels MO.Control von NanoTemper, sigmoidaler Fit mittels Origin erstellt. ....	25
<b>Abbildung 14:</b> Sequenzen von Aptamer und cOligo. Der Bereich der G-Quadruplex Struktur des Aptamers grau hinterlegt, die Basenpaarungen der Oligonukleotide sind durch Verbindungslinien dargestellt.....	26
<b>Abbildung 15:</b> Bindungskurve vom Cy5-cOligo (25 nM) und Apt im Bereich von 10 $\mu$ M – 306 pM. Auswertung der Fluoreszenz-Signale nach 15s Thermophorese. Dargestellt ist die normierte Fluoreszenz ( $F_{norm}$ [%]) in Abhängigkeit von der Aptamer-Konzentration [nM]. Ausgewertet mittels MO.Control von NanoTemper, Sigmoidaler Fit in Origin erstellt.....	26
<b>Abbildung 16:</b> Bindungskurve des TID-Assays mit 25 nM Cy5-cOligo, 25 nM Apt und OTA im Bereich von 5 $\mu$ M – 153 pM. Dargestellt ist die normierte Fluoreszenz ( $F_{norm}$ [%]) in Abhängigkeit von der Aptamer-Konzentration [nM]. Ausgewertet mittels MO.Control von NanoTemper, sigmoidaler Fit in Origin erstellt.....	27
<b>Abbildung 17:</b> Hybridisierung von Aptamer (Apt) und cOligo auf Nitrozellulose-Slides. Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenz-Signalintensitäten. Aufgegebene Konzentrationen des $NH_2$ -Aptamers/ -cOligos: 25 $\mu$ M. Cy5-DNA wurde in den Konzentrationen 0,5 – 500 nM zugegeben.....	30
<b>Abbildung 18:</b> Hybridisierung mittels Streptavidin-Biotin-Kupplung auf Nitrozellulose-Slides. Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenz-Signalintensitäten. Aufgegebene	

wurden 10 $\mu\text{M}$ Streptavidin und mit 10 $\mu\text{M}$ Biotin-Aptamer (Apt)/ -cOligo inkubiert. Cy5-DNA wurde in den Konzentrationen 0,5 – 500 nM zugegeben.....	31
<b>Abbildung 19:</b> Kompetitions-Assay auf Nitrozellulose-Slides. Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenz-Signalintensitäten. A: Gespottete Konzentrationen des $\text{NH}_2$ -Aptamers (Apt)/ cOligos: 25 $\mu\text{M}$ , behandelt mit 5 nM Cy5-DNA und 0,01 – 1000 nM OTA. B: Gespottet wurden 10 $\mu\text{M}$ Streptavidin, inkubiert mit 10 $\mu\text{M}$ Biotin-Aptamer/ -cOligo und 0,01 – 1000 nM OTA.....	32
<b>Abbildung 20:</b> UV-Vis Spektrum von Citrat-stabilisierten AuNP nach <i>Turkevich et al.</i> .....	35
<b>Abbildung 21:</b> UV-Vis Spektrum von Citrat-stabilisierten AuNP mit dreimaliger Zugabe der Edukte.....	36
<b>Abbildung 22:</b> REM-Aufnahmen von AuNP. A: Citrat-stabilisierte AuNP mit einer Edukt-Zugabe nach <i>Turkevich et al.</i> , B: Citrat-stabilisierte AuNP mit dreimaliger Edukt-Zugabe.	37
<b>Abbildung 23:</b> Prozess zur Entwicklung eines Lateral Flow Assays. Beginn bei Konjugation, anschließende Funktionalitätsüberprüfung und Übertragung auf den Lateral Flow Assay. Aufgrund unzureichender Ergebnisse bei der Funktionalitätsüberprüfung und des Lateral Flow Assays, wurde die Konjugation weiter untersucht und optimiert. ....	41
<b>Abbildung 24:</b> Konjugate nach pH-Erniedrigung. Nach 1. Zentrifugation resuspendiert in Bindepuffer ohne $\text{CaCl}_2$ mit 2 % Saccharose (siehe A.3). ....	46
<b>Abbildung 25:</b> Anzahl der gebundenen Oligonukleotide pro AuNP für die Konjugate A, $\text{A}_{25}$ -A und $\text{A}_{25}$ -O nach pH-Erniedrigung. Bei der Konjugation wurde jedes Oligonukleotid in einer Konzentration von 1 $\mu\text{M}$ eingesetzt, was einem Vielfachen der immobilisierten Menge entspricht. ....	50
<b>Abbildung 26:</b> Anzahl gebundener Oligonukleotide pro AuNP nach Konjugation mittels Salt Aging. ....	54
<b>Abbildung 27:</b> Anzahl gebundener Oligonukleotide ( $\text{A}_{25}$ -A) pro AuNP nach Konjugation mittels Salt Aging. Jeweils für Salt Aging mit 0,7 M, 0,2 M und 0,084 M NaCl.....	56
<b>Abbildung 28:</b> Anzahl gebundener Oligonukleotide ( $\text{A}_{25}$ -O) pro AuNP nach Konjugation mittels Salt Aging. Jeweils für Salt Aging mit 0,7 M, 0,2 M und 0,084 M NaCl.....	58
<b>Abbildung 29:</b> $\text{A}_{25}$ -A und $\text{A}_{25}$ -O Konjugate mit je 0,5, 1 oder 3 $\mu\text{M}$ Oligonukleotiden nach Abschluss der Konjugation mittels Einfrieren. Als Kontrolle wurden AuNP ohne Oligonukleotide eingesetzt.....	59

<b>Abbildung 30:</b> Anzahl gebundener Oligonukleotide pro AuNP nach Konjugation mittels Einfrieren. Es wurden die Oligonukleotide A <sub>25</sub> -A und A <sub>25</sub> -O verwendet. Zum Einfrieren wurden die Temperaturen -20 °C und - 80 °C mit je 1 µM DNA getestet, sowie - 80 °C mit 2 µM DNA. ....	62
<b>Abbildung 31:</b> Agarose-Gelelektrophorese von Konjugaten verschiedener Methoden. 2 % Agarose, 100 V, 25 min. ....	65
<b>Abbildung 32:</b> Prinzip des Bindungsassays mit Aptamer-AuNP und Cy5-markierten cOligos. ....	67
<b>Abbildung 33:</b> Ergebnisse des Bindungsassays mit Aptamer-AuNP und Cy5-markierten cOligos, dargestellt ist die Menge hybridisierter cOligos [pmol] in Abhängigkeit der eingesetzten cOligos von 0,4 – 560 [pmol]. Messpunkte in grau zeigen die Hybridisierung, roter Messpunkt zeigt die kompetitive Verdrängung durch 560 pmol OTA bei 280 pmol eingesetzten cOligos. Logarithmische Auftragung der Messwerte. ....	68
<b>Abbildung 34:</b> Dot Blot des A <sub>25</sub> -A Konjugats nach verschiedenen Konjugationen. Auf Nitrozellulose wurde mittels Streptavidin-Biotin-Kupplung das cOligo immobilisiert. ....	70
<b>Abbildung 35:</b> Mögliche Bindungen auf dem Dot Blot mit dem A <sub>25</sub> -A Konjugat und immobilisierten cOligos (mittels Streptavidin-Biotin Kupplung). Links: Reaktionen auf dem Dot Blot ohne OTA, rechts: Reaktionen mit OTA-Zugabe (OTA: orangenes Pentagon). ....	70
<b>Abbildung 36:</b> Mögliche Bindungen auf dem Dot Blot mit dem A <sub>25</sub> -O Konjugat und immobilisierten Aptameren (mittels Streptavidin-Biotin Kupplung). Links: Reaktionen auf dem Dot Blot ohne OTA, rechts: Reaktionen mit OTA-Zugabe (OTA: orangenes Pentagon). ....	71
<b>Abbildung 37:</b> Dot Blots der A <sub>25</sub> -Aptamer und A <sub>25</sub> -cOligo Konjugate nach Salt Aging (0,7 M, 0,2 M oder 0,084 M) oder Einfrieren bei - 80 °C. Auswertung mittels ImageJ zur Hybridisierung (H) und kompetitiven Verdrängung (V). Relevante Signalunterschiede zwischen H und V sind in Prozent angegeben. ....	72
<b>Abbildung 38:</b> Dot Blots mit dem A <sub>25</sub> -O Konjugat mittels Einfrieren. Streptavidin-Biotin-Aptamer im Verhältnis 1:2. Links: Hybridisierung, rechts: kompetitive Verdrängungsreaktion mit OTA. ....	74
<b>Abbildung 39:</b> Aufbau und Funktionsprinzip des angestrebten LFAs. Links: mit Aptamer-Konjugat, rechts: mit cOligo-Konjugat. 1: Vor Probenaufgabe, 2: nach Durchführung mit	

einer Probe ohne OTA (negatives Testergebnis, rote Testlinie), 3: nach Durchführung mit einer Probe mit OTA (positives Testergebnis, keine rote Testlinie). .....	76
<b>Abbildung 40:</b> Aufgeben der Testlinie der LFAs. Vereinfachte Darstellung des LFA, sichtbar ist die Nitrozellulose-Membran mit Testlinie (TL) und Kontrolllinie (KL), das Conjugate Pad (CP) und das Absorbent Pad (AP) sind angelagert. Die Kontrolllinie wurde nicht aufgegeben, wäre aber an dieser Position zu finden. Die aufgegebenen Tropfen sind in hellblau dargestellt. ....	79
<b>Abbildung 41:</b> Erfolgreiche Testlinien des LFAs. TL bestehen aus 0,8 µL Streptavidin (17 µM)-Biotin-cOligo (17 µM) in Bindepuffer, zur Hybridisierung wurde A <sub>25</sub> -A Konjugat mittels pH-Erniedrigung verwendet. Der gräulichere Strich am Rand dient nur als Markierung.....	79
<b>Abbildung 42:</b> Erfolgreiche Testlinien des LFAs. TL bestehen aus 0,8 µL Streptavidin (25 µM)-Biotin-cOligo (50 µM) in Bindepuffer, zur Hybridisierung wurde A <sub>25</sub> -A Konjugat mittels pH-Erniedrigung verwendet. ....	80
<b>Abbildung 43:</b> Erfolgreiche Testlinien von LFAs. TL bestehen aus 0,5 µL Streptavidin-Biotin-Apamer im Verhältnis 1:2 mit 2 % Trehalose. Konzentrationen von Streptavidin und Biotin-DNA von links nach rechts (1 – 5), 25:50 µM, 12,5:25 µM, 6,25:12,5 µM, 3,13:6,25 µM, 1,6:3,13 µM. Zur Hybridisierung wurde A <sub>25</sub> -O Konjugat mittels Einfrieren bei – 20 °C verwendet.....	80
<b>Abbildung 44:</b> Erfolgreiche Testlinien auf LFAs. Testlinien aufgegeben mit GeSiM Nano-Plotter. Auf CN 140 und CN 180 Membran. ....	81
<b>Abbildung 45:</b> Lateral Flow Assay mit einer Testlinie und einer Kontrolllinie. A <sub>25</sub> -A Konjugat, hergestellt mittels pH-Erniedrigung. Die Oligonukleotide der TL und KL sind mittels Streptavidin (25 µM)-Biotin (50 µM)-Kupplung immobilisiert. Als TL sind cOligo-Moleküle immobilisiert, als KL T <sub>25</sub> -Moleküle. ....	82
<b>Abbildung 46:</b> LFAs zur Hybridisierung (oben) und Verdrängung (unten) durch OTA (40 µM), bestrahlt mit UV-Licht (366 nm). CP=Conjugate Pad, TL= Testlinie, AP=Absorbent Pad. A <sub>25</sub> -O Konjugat mittels Einfrieren bei – 20 °C, CP vorbehandelt mit BB ohne CaCl <sub>2</sub> , 1 % OVA, 2 % Saccharose.....	85
<b>Abbildung 47:</b> LFAs mit cOligo-Konjugat. Testlinien mit Biotin-Aptamer. 1=Hybridisierung, normale Testlinie (12,5 µM Streptavidin + 25 µM Biotin-Aptamer), 2=vorinkubierte Testlinie	

mit 50 $\mu\text{M}$ OTA, 3=vorinkubierte Testlinie mit 50 $\mu\text{M}$ OTA und zusätzlich 40 $\mu\text{M}$ OTA im LP. Verwendet wurde A <sub>25</sub> -O Konjugat, hergestellt mittels Einfrieren-Konjugation.....	85
<b>Abbildung 48:</b> Microarray Block NH <sub>2</sub> -modifizierter Aptamere und cOligos, immobilisiert auf einer 3D-Aldehyd-Oberfläche. Gespottet in 3xSSC: Reihen von links nach rechts: Aptamer 25 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 5 $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{M}$ , cOligo 25 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 5 $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{M}$ . Angefärbt mit SYBR Green. Anregung 532nm, 33% Laserpower, PMT500.....	103
<b>Abbildung 49:</b> Mittelwerte der Signalintensitäten der Immobilisierung auf 3D-Aldehyd. Gespottete Konzentrationen Aptamer/c-Oligo: 25 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 5 $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{M}$ in PBS und 3xSSC. Gefärbt mit SYBR Green.....	103
<b>Abbildung 50:</b> Mittelwerte der Signalintensitäten der Hybridisierung auf einer 3D-Aldehyd-Oberfläche. Gespottete Konzentration Aptamer/cOligo: 25 $\mu\text{M}$ . Aptamer-Spots behandelt mit 500, 250, 100, 50, 10, 1, 0,5 nM Cy5-cOligo. cOligo Spots behandelt mit 500, 250, 100, 50, 10, 1, 0,5 nM Cy5-Aptamer.....	104
<b>Abbildung 51:</b> Dot Blots mit Amino-modifizierten Aptameren und A <sub>25</sub> -O Konjugat mittels Einfrieren bei - 20 °C.....	106
<b>Abbildung 52:</b> Dot Blots mit optimierten Konjugaten.....	106
<b>Abbildung 53:</b> Testlinien der Co-Immobilisierung verschiedener Oligonukleotide. ....	108
<b>Abbildung 54:</b> Testlinien der Co-Immobilisierung verschiedener Oligonukleotide mit zuvor erwärmtem Konjugat sowie Laufpuffer.....	108
<b>Abbildung 55:</b> Aufbau zur AuNP-Synthese.....	120
<b>Abbildung 56:</b> Kalibrationsgeraden verschiedener Oligonukleotide. Bei jeder Konjugationsmethodik wurde eine Kontrollprobe durchgeführt, die kein Oligonukleotid enthielt. Der Überstand dieser Proben wurde zum Ansetzen der Oligonukleotide für die Bestimmung der Kalibrationsgeraden verwendet, um eine gleiche Ionen-Zusammensetzung wie bei den untersuchten Oligonukleotiden in den Überständen der Konjugation zu erreichen.....	125
<b>Abbildung 57:</b> Kalibrationsgerade der Cy5-cOligos.....	126
<b>Abbildung 58:</b> Auswertung mittels ImageJ von Dot Blots.....	128

## 11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: UV-Vis Charakteristika von Citrat-stabilisierten AuNP. ....	39
Tabelle 2: Berechnung der AuNP-Zusammensetzung für beide Synthesarten.....	40
Tabelle 3: Berechnete Durchmesser von Konjugaten bei unterschiedlichen Oligonukleotiden. Die verwendeten AuNP sind 17,4 nm groß. ....	47
Tabelle 4: Analytik der Konjugate nach pH-Erniedrigung. Konjugate A, A <sub>25</sub> -A und A <sub>25</sub> -O. Analytische Daten von AuNP sind ebenfalls aufgeführt.....	47
Tabelle 5: Ablauf des Salt Aging Prozesses. Die angegebenen Zugabe-Volumen der 2 M NaCl-Lösung beziehen sich auf ein Startvolumen des Konjugationsansatzes von 1 mL. Durch die 11 Zugaben wird ein finales Volumen von 2 mL erreicht. Nach jeder Zugabe erfolgt eine Behandlung des Konjugationsansatzes im Ultraschallbad für 10 s und eine 10-minütige Inkubationszeit. ....	53
Tabelle 6: Analytik der Konjugate A, A <sub>25</sub> -A und A <sub>25</sub> -O nach 0,7 M Salt Aging.....	53
Tabelle 7: Variierte Parameter beim Salt Aging zur Verringerung der DNA-Bedeckung der AuNP.....	56
Tabelle 8: Analytik der A <sub>25</sub> -A Konjugate nach variiertem Salt Aging. ....	56
Tabelle 9: Analytik der A <sub>25</sub> -O Konjugate nach variiertem Salt Aging .....	57
Tabelle 10: UV-Vis Daten der A <sub>25</sub> -A und A <sub>25</sub> -O Konjugate mit je 0,5, 1 oder 3 µM Oligonukleotiden nach der Konjugation mittels Einfrieren. * Es handelt sich hierbei um eine andere AuNP-Charge als zuvor.....	60
Tabelle 11: Konjugation von A <sub>25</sub> -A und A <sub>25</sub> -O mittels Einfrieren, bei – 20 sowie – 80 °C. Wenn nicht anders angegeben, wurde 1 µM des Oligonukleotids zur Konjugation eingesetzt. .....	62
Tabelle 12: Optimierungen des Conjugate Pads. Die Anpassungen fanden nacheinander von oben nach unten statt, nur Änderungen zu den zuvor verwendeten Bedingungen wurden aufgeführt. ....	78
Tabelle 13: Optimierungen des Laufpuffers des LFAs. Die Anpassungen fanden nacheinander von oben nach unten statt, nur Änderungen wurden aufgeführt. ....	82
Tabelle 14: Problemstellungen und Lösungsansätze en zur Etablierung einer Verdrängungsreaktion auf LFAs, alle genauen Angaben sind unter B.11.4 zu finden. ....	84

**Tabelle 15:** Analytische Daten des A-Konjugats nach verschiedenen Konjugationen mittels Einfrieren .....105

**Tabelle 16:** Verwendete Laborgeräte..... 109

**Tabelle 17:** Verwendete Software. ....110

**Tabelle 18:** Verwendete Chemikalien.....110

**Tabelle 19:** Verwendete Lösungen. ....111

**Tabelle 20:** Verwendete Verbrauchsmaterialien.....113

**Tabelle 21:** Verwendete Oligonukleotide .....114

**Tabelle 22:** Ermittelte Werte aus den Berechnungen von Haiss *et al.*, die zur Größenbestimmung der AuNP aus den UV/Vis-Spektren verwendet werden können (d=Durchmesser eines AuNP). Zitiert und bearbeitet nach [111].....121

**Tabelle 23:** Werte der Extinktionskoeffizienten bei 450 nm, die zur Ermittlung der Konzentration der AuNP-Dispersion eingesetzt werden können. (d=Durchmesser eines AuNP). Zitiert und bearbeitet nach[111]. ....121

**Tabelle 24:** Verwendete Parameter zur Messung des hydrodynamischen Durchmessers mit dem Litesizer™ 500.....122

**Tabelle 25:** Konjugation mittels Salt Aging. Volumina und Zugabe-Anzahl bei verschiedenen finalen NaCl-Konzentrationen. Die Angaben beziehen sich auf 1 mL Konjugationsansatz (AuNP + Oligonukleotid).....124

## 12 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Alina Eilers  
Geburtsdatum/ -ort 20.07.1993, Aurich

### Beruflicher Werdegang

10/2017 – 03/2021 Wissenschaftliche Mitarbeiterin  
03 – 09/2016 Internationales Forschungspraktikum, Northeastern University, Boston, USA

### Akademischer Werdegang

10/2017 – 04/2021 Promotion im Fach Chemie: Institut für Technische Chemie LUH, Hannover, Deutschland  
10/2014 – 10/2017 Masterstudium, M. Sc. Im Fach Life Science, LUH, Hannover  
Thema der Masterarbeit: Etablierung von *in vitro* Testsystemen für die Anwendung photokatalytisch aktiver Nanopartikel in der Krebstherapie  
10/2011 – 11/2014 Bachelorstudium, B. Sc. Im Fach Life Science, LUH, Hannover  
Thema der Bachelorarbeit: Entwicklung eines transienten Transformationssystems für *Nicotiana benthamiana* und *Lactuca sativa* mithilfe von *gfp*- und *mCherry*-Konstrukten  
2004 – 2011 Allgemeine Hochschulreife, Niedersächsisches Internatsgymnasium Esens, Esens