Industrielle Gemeinschaftsforschung

Schlussbericht vom 26.10.2023

zu IGF-Vorhaben Nr. 21043 N

Thema

Fluoreszenzquantifizierung bakterieller Endosporen mittels Apazympaaren und Molecular Beacons

Berichtszeitraum

01.08.2020 - 30.04.2023

Forschungsvereinigung

Europäische Forschungsgemeinschaft Reinigungs- und Hygienetechnologie e.V.

Forschungseinrichtung(en)

wfk - Cleaning Technology Institute e.V.

Gefördert durch:

Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Forschungsnetzwerk Mittelstand

Inhaltsverzeichnis

0	Kurzfassung der Ergebnisse	3
1	Forschungsziel und prinzipieller Lösungsweg	4
2	Gegenüberstellung von Zielen und erreichten Ergebnissen	6
2.1	Entwicklung einer Methode zur Aktivierung des Auskeimprozesses von Endosporen	6
2.1.1	Kultivierung, Sporulation und Auskeimung von *Clostridioides difficile*	6
2.1.2	Kultivierung, Sporulation und Auskeimung von *Bacillus cereus*	8
2.2	Entwicklung spezifischer Aptamere gegen die ausgewählten Zielmoleküle	10
2.2.1	Markierung hygienerelevanter Endosporen mit Aptameren	12
2.2.2	Bindung des Aptamers A1 an den Quencher BHQ-1	15
2.2.3	Selektion eines Aptamers gegen Dipicolinsäure	16
2.3	Charakterisierung von Nukleozymen und Design der Molecular Beacons	24
2.4	Entwicklung der Aptazyme bzw. Aptazympaare	29
2.4.1	Ligation eines Aptamers mit einem DNAzym	30
2.4.2	Charakterisierung des Aptazyms	33
2.5	Entwicklung eines speziell funktionalisierten Beprobungsmediums	36
2.6	Entwicklung des Verfahrens zur Fluoreszenzquantifizierung	37
2.7	Erprobung des Verfahrens unter praxisnahen Bedingungen	39
3	Verwendung der Zuwendung	40
4	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	40
5	Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft	41
5.1	Durchgeführte spezifische Transfermaßnahmen während der Projektlaufzeit	41
5.2	Geplante spezifische Transfermaßnahmen nach Ende der Projektlaufzeit	41
6	Zusammenfassende Diskussion und Folgerungen für die Praxis	42
7	Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihr innovativer Beitrag und ihre industriellen Anwendungsmöglichkeiten	49
8	Danksagung	50
9	Literaturverzeichnis	51
10	Anhang	63

0 Kurzfassung der Ergebnisse

Einige bakterielle Erreger können sehr widerstandsfähige Endosporen ausbilden, die sich bei routinemäßigen Reinigungs-/Desinfektionsmaßnahmen unter Einsatz bakterizid wirkender Desinfektionsmittel und -verfahren nicht mit ausreichender Sicherheit beseitigen lassen und bis zu mehreren Monaten auf Oberflächen oder Textilien überdauern können. Ziel war es daher, ein eigenständig, ohne Fachkenntnisse auswertbares Verfahren zu realisieren, das eine simultane Quantifizierung auskeimungsfähiger Endosporen (Gesamtsporenzahl anaerober bzw. aerober Bakterien) und auskeimungsfähiger Endosporen hygienerelevanter Bakterien (z. B. *C. difficile*, *B. cereus*) ermöglicht. Ein solches Verfahren würde Reinigungs- und textile Dienstleister erstmals befähigen, die Sporenbelastung von Oberflächen, Textilien und Prozesswässern im Rahmen innerbetrieblicher Eigenkontrollen eigenständig zu bewerten und somit den Erfolg von ihnen vorgenommener Dekontaminationsmaßnahmen zu überwachen.

Im Fokus der Forschungsarbeiten standen aus Nukleinsäuren (bevorzugt DNA) bestehende Moleküle, die in Gegenwart von Sporen durch Interaktion miteinander ein Fluoreszenzsignal generieren: Zum einen wurden sog. Aptamere identifiziert, die an spezifische Zielmoleküle auf der Sporenoberfläche hygienerelevanter Bakterien (*C. difficile*, *B. cereus*) bzw. an einen ausgewählten Quencher binden. Zur Quantifizierung von Endosporen (Gesamtsporenzahl anaerober bzw. aerober Bakterien) sowie zum Nachweis der Auskeimungsfähigkeit der Sporen wurde Dipicolinsäure als Zielmolekül ausgewählt; gegen Dipicolinsäure konnte aber auf Basis umfassender Literaturrecherchen kein Aptamer identifiziert werden. Daher wurde Dipicolinsäure auf magnetischen Beads immobilisiert und DNA-Stränge selektiert, die daran banden. Die Stränge wurden sequenziert. Die Sequenzierdaten wurden biostatistisch ausgewertet, um potentielle Aptamere zu identifizieren. Zum anderen wurden DNAzyme identifiziert, die über eine katalytische Aktivität verfügen und gemäß Literaturangaben eine hohe Wechselzahl aufweisen. Für die DNAzyme wurden fluorogene Substrate designt: Dabei handelte es sich u. a. um spezifische DNA-Stränge, die eine Stammschleifenstruktur ausbilden, in der der an dem einen Strangende gebundene Fluorophor und der an dem anderen Strangende gebundene Quencher in unmittelbarer Nähe zueinander vorliegen, sog. Molecular Beacons.

Zur Entwicklung von Aptazymen wurden exemplarisch das DNAzym DET22-18 und das Aptamer BacApt3, welches sich gegen Endosporen des Bakteriums *B. cereus* richtet, verwendet. Das Aptazym wurde sowohl durch enzymatische Ligation als auch durch bioinformatisches Design generiert. Die katalytische Aktivität des Aptazyms und des DNAzyms unterschieden sich nur geringfügig; folglich war das Aptazym nicht allosterisch kontrolliert.

Bei Charakterisierung von DNAzymen und Aptazym hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität war festzustellen, dass der Substratumsatz bzw. die Konzentration an gespaltenem Substrat deutlich unterhalb der Konzentration an DNAzym und Aptazym im Reaktionsansatz lag. Diese Beobachtung legte nahe, dass die Substratstränge nach der Spaltung durch das DNAzym bzw. Aptazym im hybridisierten Zustand verblieben und sich nicht bzw. nur mit sehr geringer Geschwindigkeit von ungespaltenen Substratsträngen verdrängen lassen. Wurden die Ansätze einer thermozyklischen Behandlung (mehrfaches Erwärmen und Abkühlen) unterzogen, konnte das Substrat, das im vierfachen Überschuss vorlag, nahezu vollständig gespalten werden; folglich war davon auszugehen, dass ein Substratwechsel erfolgte. Unter diesen Bedingungen ist eine Quantifizierung von Endosporen auf einem Beprobungsmedium als nicht praktikabel anzusehen.

Nach Bindung eines Aptazyms an die Oberfläche von Endosporen hygienerelevanter Bakterien und anschließender Inkubation mit Substrat war ein fluoreszenzmikroskopischer Nachweis möglich, eine Quantifizierung kann durch Auszählen der fluoreszierenden Sporen z. B. unter Verwendung eines Zählgitters erfolgen.

⇨ Das Ziel des Forschungsvorhabens wurde teilweise erreicht.

1 Forschungsziel und prinzipieller Lösungsweg

Ziel des Forschungsprojektes war ein eigenständig, ohne Fachkenntnisse auswertbares Verfahren, das eine simultane Quantifizierung auskeimungsfähiger Endosporen (Gesamtsporenzahl anaerober bzw. aerober Bakterien) und auskeimungsfähiger Endosporen hygienerelevanter Bakterien (z. B. *C. difficile*, *B. cereus*) ermöglicht.

Das Nachweisfahren basiert auf Nukleinsäuresträngen, die an spezifische Zielmoleküle binden, sog. **Aptameren** [1-6], und die ein spezifisches Substrat katalytisch spalten, sog. **Nukleozymen** [7-11]. Maßgeblich für die bindenden bzw. substratspaltenden Eigenschaften solcher Stränge ist die Abfolge der Nukleotide bzw. Basen, die sog. Sequenz. Ein spezifisches Substrat weist komplementäre Sequenzabschnitte zum jeweiligen Nukleozym auf, über die das Nukleozym sein Substrat bindet (Hybridisierung unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen). Liegen in solch einem Substrat ein Fluorophor und ein Quencher in unmittelbarer Nähe zueinander vor und werden diese bei der Substratspaltung voneinander getrennt (fluorogenes Substrat), entsteht ein Fluoreszenzsignal.

Ein Beispiel für solch ein Nukleozymsubstrat sind sog. **Molecular Beacons** [12-15], die aus einzelsträngiger DNA mit Stammschleifenstruktur bestehen und an deren 5'- und 3'-Ende sich ein Fluorophor bzw. ein Quencher befindet. Zueinander komplementäre Nukleinsäuresequenzen am 5'- und 3'-Ende formen den Stamm und bringen Fluorophor und Quencher in räumliche Nähe zueinander. Solange die Molecular Beacons in ihrer Stammschleifenstruktur vorliegen, wird die Fluoreszenz des Fluorophors (Donor) durch eine auf dem Förster-Resonanzenergietransfer basierende Energieübertragung auf den Quencher (Akzeptor) unterdrückt [16-20].

Nukleinsäurestränge, die sowohl an spezifische Zielmoleküle binden können als auch eine katalytische Aktivität aufweisen, werden als **Aptazyme** [21-24] bezeichnet. Ein Aptazymstrang enthält folglich zumindest die Sequenz eines Aptamers, eine sog. Aptamerdomäne, und eines Nukleozyms, eine sog. Nukleozymdomäne. Unter einem **Aptazympaar** werden im vorliegenden Schlussbericht zwei Aptazyme verstanden, die sich in ihrer Aptamerdomäne unterscheiden, aber die gleiche Nukleozymdomäne aufweisen. Dabei richtet sich die Aptamerdomäne des zweiten Aptazyms gegen ein Zielmolekül, das bei der Substratspaltung freigesetzt wird (induziertes Zielmolekül, z. B. der freigesetzte Quencher). Ziel war, das bei Bindung des ersten Aptazyms an das primäre Zielmolekül (z. B. Dipicolinsäure oder spezifische Struktur auf der Sporenoberfläche eines hygienerelevanten Bakteriums) generierte Fluoreszenzsignal zu verstärken.

Um visuell wahrnehmbare Spots um auskeimende Endosporen zu generieren, war eine **Beprobungsmedium** zu entwickeln, welches bei Substratspaltung freigesetzte Fluorophore unmittelbar am Ort ihrer Freisetzung band.

Der Lösungsweg umfasste folgende Arbeitsschritte:

1. Entwicklung einer Methode zur Aktivierung des Auskeimprozesses von Endosporen
2. Entwicklung spezifischer Aptamere gegen die ausgewählten Zielmoleküle
3. Charakterisierung von Nukleozymen und Design der Molecular Beacons
4. Entwicklung der Aptazyme bzw. Aptazympaare
5. Entwicklung eines speziell funktionalisierten Beprobungsmediums
6. Entwicklung des Verfahrens zur Fluoreszenzquantifizierung
7. Erprobung des Verfahrens unter praxisnahen Bedingungen
8. Dokumentation und Berichterstattung

2 Gegenüberstellung von Zielen und erreichten Ergebnissen

2.1 Entwicklung einer Methode zur Aktivierung des Auskeimprozesses von Endosporen

⇨ *Ziel des Arbeitsschrittes 1:*

Ziel des Arbeitsschrittes 1 war die Etablierung von Methoden zur Generierung von Endosporen und zur Aktivierung des Auskeimprozesses.

⇨ *Durchgeführte Arbeiten und erzielte Ergebnisse:*

Aufgrund ihrer klinischen Relevanz wurden Endosporen des Bakteriums *Clostridioides difficile* und zudem Endosporen des Bakteriums *Bacillus cereus* zur Entwicklung des Nachweisverfahrens ausgewählt: *C. difficile* ist der häufigste anaerobe Erreger nosokomialer Infektionen, der neben der *C. difficile*-assoziierten Diarrhoe (CDAD) schwerste Erkrankungen wie die pseudomembranöse Enterocolitis und das oft tödliche toxische Megacolon verursacht [25]. *C. difficile* nimmt eine wachsende klinische und epidemiologische Bedeutung ein [25]. *C.-difficile*-Infektionen (CDI) treten in Krankenhäusern zwei- bis viermal häufiger auf als Infektionen mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) [26,27,28]. *B. cereus* ist in der Lebensmittelindustrie hygienerelevant, da das aerobe, sporenbildende Bakterium lebensmittelbedingte Erkrankungen auslösen oder zu einem schnelleren Verderb der Lebensmittel führen kann [29,30]. Zudem konnten *B. cereus* auf aufbereiteten Textilien als Ursache für nosokomiale Infektionsausbrüche bzw. die Kolonisierung von Patienten identifiziert werden [31-41].

Die Forschungsarbeiten erfolgten unter Einsatz der folgenden Stämme:

- *Clostridioides difficile* CCUG 37780 (Ribotyp 060; entspr. ATCC 43593) [42-44]
- *Bacillus cereus* DSMZ 31 [45]

Für die Forschungsarbeiten wurde ein Stamm des Bakteriums *C. difficile* beschafft, der keine Endotoxine produzieren kann.

2.1.1 Kultivierung, Sporulation und Auskeimung von *Clostridioides difficile*

Da *C. difficile* ein obligat anaerob wachsendes Bakterium ist, erfolgten nahezu alle Arbeiten in einer Anaerobierkammer unter Argonatmosphäre. Nur die Inkubation von Flüssigkulturen erfolgte in (gas-)dicht verschlossenen Gefäßen unter Einsatz des Sauerstoffbindemittels Anaerocult A [46] im Schüttelinkubator außerhalb der Anaerobierkammer.

- Reaktivierung der gefriergetrockneten Kultur

Die gefriergetrockneten Bakterien wurden in 500 µl BHIS-Bouillon [47] suspendiert. Je 200 µl der Suspension wurden auf Columbia-Agarplatten (5% Schafblut-Agar [46b]) ausplattiert; die Platten wurden für 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 Kolonie in 10 ml BHIS-Bouillon versetzt mit L-Cystein [47] (Endkonz.: 0,03 Vol.-%) überführt und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

- Anlegen der Kryokulturen

Zum Anlegen von Kryokulturen wurden jeweils 500 µl Kultur (s. o.) in mehrere Kryoröhrchen pipettiert und je 500 µl 40 Vol.-% Glycerol zugefügt (Endkonz.: 20 Vol.-% Glycerol). Die Röhrchen wurden fest verschlossen und einige Male invertiert, bevor sie bei -80 °C eingefroren wurden.

- Generierung von Endosporen

Zur Generierung von Endosporen in Flüssigkultur wurde eine Einzelkolonie von einer Columbia-Agarplatte [46b] in 10 ml BHIS-Bouillon versetzt mit L-Cystein [47] überführt und die Kultur 7 Tage schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium durch Zentrifugation (15 min mit 12.225 g) abgetrennt und das Pellet durch zweimaliges Resuspendieren in 1 ml PBS (engl.: *phosphate-buffered saline* [48,49]) gewaschen. Um vegetative Zellen zu lysieren, wurde die Suspension über Nacht bei 4 °C gelagert und anschließend 20 min bei 70 °C inkubiert.

Zur Generierung von Endosporen auf Agarplatten wurde eine Einzelkolonie von einer Columbia-Agarplatte [47] mit einer Impföse entnommen und auf einer 70:30-Agarplatte [47,48] ausgestrichen; anschließend wurde die 70:30-Agarplatte [47,48] 3 Tage bei 37 °C inkubiert. Der Bakterienrasen wurde unter Zusatz von 3 ml PBS [48,49] mit einem Spatel von der Agarplatte gelöst. Anschließend wurde das PBS durch Zentrifugation (15 min mit 12.225 g) abgetrennt und das Pellet durch zweimaliges Resuspendieren in 1 ml PBS gewaschen. Um vegetative Zellen zu lysieren, wurde die Suspension über Nacht bei 4 °C gelagert und anschließend 20 min bei 70 °C inkubiert.

Die Sporulation wurde mikroskopisch im Phasenkontrast überprüft. Die Sporensuspensionen wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

- Auskeimung der Endosporen

Zur Aktivierung des Auskeimprozesses wurden 50-100 µl der Sporensuspensionen auf BHIS-TCA Agarplatten [48] (Endkonz. an TCA und L-Cystein je 1 Vol.-%) ausplattiert; die Platten wurden bei 37 °C inkubiert. TCA (Taurocholat bzw. Taurocholsäure) dient als Keimungsagenz und verhindert die Sporulation.

Zusammenfassend war festzustellen, dass sich Endosporen des Bakteriums *C. difficile* sowohl in Flüssigkultur als auch auf Agarplatten generieren ließen. Die Sporenbildung konnte mikroskopisch nachgewiesen werden; bei phasenkontrastmikroskopischer Betrachtung waren kreisförmige, helle Strukturen zu beobachten, die sich deutlich von den dunklen, stäbchenförmigen vegetativen Zellen abhoben [47]. Vegetative Zellen wurden durch Hitzebehandlung während der Sporenernte lysiert und somit abgetötet. Die Endosporen keimten bei Kultivierung auf BHIS-TCA Agarplatten [48] unter anaeroben Bedingungen wieder aus.

Da aus dem Arbeiten unter Argonatmosphäre ein deutlich höherer experimenteller Aufwand resultiert, wurden die im Folgenden durchzuführenden Experimente überwiegend unter Einsatz von Endosporen des Bakteriums *Bacillus cereus* durchgeführt.

2.1.2 Kultivierung, Sporulation und Auskeimung von *Bacillus cereus*

Sowohl die Anzucht von Kulturen des aeroben, sporenbildenden Bakteriums *B. cereus* als auch die Auskeimung von vegetativen Zellen aus den Endosporen erfolgte unter Einsatz eines nährstoffreichen CASO-Mediums (Casein-Soja-Pepton).

- Generierung von Endosporen

Zur Generierung von Endosporen in Flüssigkultur [50] wurde eine Einzelkolonie von einer CASO-Agarplatte in 20 ml CASO-Bouillon überführt und die Kultur 4 bis 7 Tage schüttelnd (120 rpm) bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert, um einen Nährstoffmangel herbeizuführen und die Bakterien dadurch zur Bildung von Endosporen anzuregen. Die Sporenbildung wurde ab dem 4. Tag lichtmikroskopisch, im Phasenkontrast bei 600facher Vergrößerung, überprüft. Endosporen heben sich im Phasenkontrast durch eine helle Färbung hervor und sind, im Vergleich zur stäbchenförmigen vegetativen Zelle, rund.

Zur Generierung von Endosporen auf Agarplatten wurde CASO-Agar versetzt mit $MgSO_4$ [45,51a] (Endkonz.: 0,0008 Gew.-%) verwendet. Zunächst wurden 10 ml CASO-Bouillon mit einer Einzelkolonie von *B. cereus* inokuliert und schüttelnd (125 rpm) bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h Inkubationszeit wurden je 100 µl der Kultur auf CASO-Agar versetzt mit $MgSO_4$ [45,51a] ausplattiert und die Platten für 7 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Rasenplatten wurden mit je 10 ml sterilem VE-Wasser abgeschwemmt und die Suspensionen in einem 50 ml Gefäß vereint. Das Suspensionsmedium wurde durch Zentrifugation (20 min mit 3.234 g) abgetrennt und das Pellet durch dreimaliges Resuspendieren in 50 ml sterilem VE-Wasser gewaschen. Das Pellet wurde in 5 ml sterilem VE- Wasser resuspendiert und aliquotiert (500 µl pro Reaktionsgefäß).

- Sporenernte [52]

Da sich Endosporen innerhalb von vegetativen Zellen bilden, erwies sich zur Sporenernte (abhängig vom Wachstumsstadium) eine Lyse als erforderlich. Die Aliquote der Suspensionen wurden über Nacht bei -20 °C gelagert, am nächsten Tag 30 min bei 65 °C inkubiert und anschließend 15 min auf Eis gekühlt. Dabei helfen die beim Gefrieren entstehenden Eiskristalle und die wechselnden Temperaturen, die Zellwände aufzubrechen. Zur enzymatischen Lyse wurden die Aliquote der Suspensionen zunächst mit je 2 µl Lysozymlösung (Endkonz.: 2 mg/ml) versetzt und anschließend für 60 min bei 37 °C auf einem Orbitalschüttler rotierend inkubiert. Darauffolgend wurden die Sporen-haltigen Suspensionen nach Zugabe von 1 µl Trypsinlösung (100 mg/ml) für weitere 60 min bei 37 °C inkubiert; ein anschließendes Erwärmen für 5 min auf 65 °C diente der Inaktivierung der Enzyme. Abschließend wurden die Sporen durch Zentrifugation (20 min mit 10.000 g) pelletiert, der Überstand verworfen und die Pellets in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert.

Die Sporulation wurde mikroskopisch im Phasenkontrast überprüft. Das Anfärben der Sporen erfolgte nach Rakette [53]; dabei wurde anstelle von Malachitgrün Brillantgrün verwendet. Die Sporensuspensionen wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in 70%iger ethanolischer Lösung gelagert. Bei der Lagerung der Sporen in VE-Wasser ließ sich ein Auskeimen nicht sicher verhindern.

Zusammenfassend war festzustellen, dass bei Sporengenerierung auf CASO-Agar unter Einsatz von Mangansulfat als Sporulationstrigger eine höhere Ausbeute an Endosporen erhalten wurde als durch Herbeiführen eines Nährstoffmangels in CASO-Bouillon. Zudem trat die Sporulation reproduzierbar nach siebentägiger Inkubation auf und das Auskeimen der Endosporen wurde bei Lagerung in ethanolischer Lösung sicher verhindert. Somit konnten ausreichend *B. cereus* Sporen für die nachfolgenden Arbeitsschritte generiert und bevorratet werden. Ein Auskeimen der Endosporen ließ sich durch Inkubation auf CASO-Agar bei 37 °C induzieren.

⇨ **Das Ziel des Arbeitsschrittes 1 wurde erreicht.**

2.2 Entwicklung spezifischer Aptamere gegen die ausgewählten Zielmoleküle

⇨ *Ziel des Arbeitsschrittes 2:*

Ziel des Arbeitsschrittes 2 war, Aptamere zu identifizieren, mit denen sich spezifische Zielmoleküle markieren lassen und die somit eine Quantifizierung auskeimungsfähiger Endosporen (Gesamtsporenzahl anaerober bzw. aerober Bakterien) und auskeimungsfähiger Endosporen hygienerelevanter Bakterien (z. B. *C. difficile*, *B. cereus*) ermöglichen.

⇨ *Durchgeführte Arbeiten und erzielte Ergebnisse:*

Zur Quantifizierung von Endosporen (Gesamtsporenzahl anaerober bzw. aerober Bakterien) wurde Dipicolinsäure als primäres Zielmolekül aufgrund des hohen Gehalts im Sporenkern (pro Endospore: 5-14 Gew.-% [54-57], ca.10^{-16} mol [54,58], ca. $6 \bullet 10^7$ Moleküle) und der schnellen Freisetzung zu Beginn des Auskeimprozesses ausgewählt: Beim Auskeimen einer Endospore (z. B. aktiviert durch Nährstoffe) erfolgt in der ersten Keimphase die Freisetzung von Kationen und Dipicolinsäure aus dem Kern und die teilweise Rehydrierung des Sporenkerns; die Freisetzung der Dipicolinsäure ist bereits nach wenigen Minuten (ca. 2 min [56,59]) abgeschlossen. In der zweiten Keimphase findet die Hydrolyse der Sporenrinde und die weitere Rehydrierung des Sporenkerns statt. Erst in der nachfolgenden Wachstumsphase nimmt die Zelle ihre Stoffwechselaktivität bzw. Biosynthese wieder auf, baut die sporenspezifischen kleinen säurelöslichen Proteine ab und stößt den Sporenmantel ab [55-57].

Ferner eignen sich gemäß Recherchen der Forschungseinrichtung spezifische Strukturen auf der Sporenoberfläche (z. B. Proteine, Kohlenhydrate) als primäre Zielmoleküle, da diese zur selektiven Markierung der Endosporen unter Einsatz von Aptameren genutzt werden können: Aptamere sind DNA- oder RNA-Sequenzen (bestehend aus 20-100 Nukleotiden [1-3]), welche aufgrund ihrer sequenzabhängigen intramolekularen Faltung und der Ausbildung spezifischer Tertiärstrukturen analog zu Antikörpern in der Lage sind [60,61], mit hoher Spezifität verschiedene Zielmoleküle, z. B. organische Moleküle [62-70] (Farbstoffe, Antibiotika, Toxine, Kohlenhydrate, Proteine etc.), Bakterien, Parasiten, Viren, Prionen, Krebszellen [23,65,66,71-73] und Metallionen [68-70,74] zu binden. Die Bindung an die Zielmoleküle erfolgt üblicherweise über Wasserstoffbrücken und elektrostatische Wechselwirkungen [7]. Aptamere gegen Endosporen verschiedener *Bacillus* spp. (*B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*) [23,66,75-79] und *Alicyclobacillus* spp. [80,81] sowie *C. difficile* [82,83] wurden auf Basis umfangreicher Literaturrecherchen identifiziert. Ferner wurde ein weiteres Zielmolekül ausgewählt, das bei der Substratspaltung freigesetzt wird, im Folgenden als induziertes Zielmolekül bezeichnet, mit dem Ziel, dieses zur Signalverstärkung zu nutzen (s. Kap. 2.4). Als induziertes Zielmolekül kam prinzipiell Fluorophor oder Quencher des Nukleozymsubstrats (s. Kap. 2.3) in Betracht. Einige an Fluorophore und Quencher bindende Aptamere sind literaturbeschrieben [84-90]. Da sich bei Bindung eines Aptamers an einen Fluorophor dessen Fluoreszenzeigenschaften ändern können (z. B. Quenching durch Guanin) [17,91-93], wurde der

Quencher als induziertes Zielmolekül ausgewählt.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über identifizierte, literaturbeschriebene Aptamere, die sich gegen ausgewählte primäre und induzierte Zielmoleküle richten:

Tab. 1: Literaturbeschriebene Aptamere [1) 2)]

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Zielmolekül
CdeC_D1 [82,83]	**CCAGTGTAGACTACTCAATGC**CGTGGACTGGTCGGGTTTGGATTCGGCA GATGAATCAGTA**GTACTATCCACAGGTCAACC**	*Cde* *C. difficile*
CdeM_E2 [82,83]	**CCAGTGTAGACTACTCAATGC**CTTCCATTCACCTACCGAGCTAAGCGTT CGACTTAGGTCT**GTACTATCCACAGGTCAACC**	CdeM *C. difficile*
Chitinase_D7 [82,83]	**CCAGTGTAGACTACTCAATGC**GGACCGTTGCCTCGCCCGAGTAATCCG CCATCGCCTTTCC**GTACTATCCACAGGTCAACC**	*CotEC Chitinase* *C. difficile*
Chitinase_D10 [82,83]	**CCAGTGTAGACTACTCAATGC**CCTATTAGCTGTATCGATCCGTTTAGTCG CTCCTCCGATA**GTACTATCCACAGGTCAACC**	*CotEC Chitinase* *C. difficile*
Chitinase_D11 [82,83]	**CCAGTGTAGACTACTCAATGC**CTGGTAAATCGATGACCGCTGCCTCGCC TGAGTAATCATC**GTACTATCCACAGGTCAACC**	*CotEC Chitinase* *C. difficile*
Chitinase_D11 [82,83]	ATCGATGACCGCTGCCTCGCCTGAGTAATCATC**GTA**	CotEC Chitinase *C. difficile*
Chitinase_H11 [82,83]	**CCAGTGTAGACTACTCAATGC**CTTGTAAGAAGAACAATCGCCGCTTCGC CTGAATAGGTTC**GTACTATCCACAGGTCAACC**	*CotEC Chitinase* *C. difficile*
CotA_B1 [82,83]	**CCAGTGTAGACTACTCAATGC**TTAAGTTCTGGGGACACGTGATGAACGCA TTTAATGGGGC**GTACTATCCACAGGTCAACC**	*CotA* *C. difficile*
CotA_C1 [82,83]	**CCAGTGTAGACTACTCAATGC**CGTGGACTGGTCGGGTTTGGATTCGGC AGATGAATCACTA**GTACTATCCACAGGTCAACC**	*CotA* *C. difficile*
CotE_D2 [82,83]	**CCAGTGTAGACTACTCAATGC**TCGACATTTCCGCCCCGACGGCCCTCCT AGTGATGGGGAGA**GTACTATCCACAGGTCAACC**	CotE *C. difficile*
CotE_E2 [82,83]	**CCAGTGTAGACTACTCAATGC**GGTGTGGTGACCTTGACCTATGGAACCT GGTTGTA**GTACTATCCACAGGTCAACC**	CotE *C. difficile*
CotE_H2 [82,83]	**CCAGTGTAGACTACTCAATGC**GGCTGTGTGACTTGACCTTTGGAATGGG TGGGAGGGATGG**GTACTATCCACAGGTCAACC**	CotE *C. difficile*
CotE_H2 [82,83]	AGTGTAGACTACTCAATGCGGCTGGCCACAGGTCAACC	CotE
C. diff_E2 [82,83]	**CCAGTGTAGACTACTCAATGC**ACGGCCTGTTCGTAAGACCCTTACAGAC TAGTTTTTCCCT**GTACTATCCACAGGTCAACC**	unbekannt *C. difficile*-Sporen
C. diff_F1 [82,83]	**CCAGTGTAGACTACTCAATGC**TCTTACGATCCTCACCTGCTAGCACAC CCATATCCCATGC**GTACTATCCACAGGTCAACC**	unbekannt *C. difficile*-Sporen
C. diff_F1 [82,83]	CCATACTCAATGCTCTTACGATCCTCATCAACC	unbekannt *C. difficile*-Sporen
C. diff_G1 [82,83]	**CCAGTGTAGACTACTCAATGC**GGGTTGCGACATGGTGGTAAGAGCTCA GCCCGTTCCCATA**GTACTATCCACAGGTCAACC**	unbekannt *C. difficile*-Sporen
C. diff_G1 [82,83]	CCAGTGTAGACTACTCAATGCTCTTACGATCCTCATCAACC	unbekannt *C. difficile*-Sporen
CDBS-1 [94]	CACAGACACAACGTCTAAATGTCACATAAC	unbekannt *C. difficile*-Sporen

[1)] Fettgedruckte Basen geben Primersequenzen wieder.
[2)] Blau dargestellte Basen markieren identische Sequenzen in Aptameren, die sich gegen die gleiche Zielstruktur richten.

Tab. 1: Literaturbeschriebene Aptamere (fettgedruckte Basen geben Primersequenzen wieder) - Fortsetzung		
Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Zielmolekül
BacApt1 [79]	**CATCCGTCACACCTGCTC**GGTGCAGACCCATAGGGGGGGCGTGCGGATG TGCGGAGTAG**GGTGTTGGCTCCCGTATC**	Unbekannt *B. cereus*-Sporen
BacApt2 [79]	**CATCCGTCACACCTGCTC**CCCAATGAAGCGAGATGGACGCCTAGCACCCC CCGCGTCC**GGTGTTGGCTCCCGTATC**	Unbekannt *B. cereus*-Sporen
BacApt3 [79]	**CATCCGTCACACCTGCTC**GGTGCAGACCCATAGGGGGGGCGTGCGGATG TAGGAGTAG**GGTGTTGGCTCCCGTATC**	Unbekannt *B. cereus*-Sporen
BacApt4 [79]	**CATCCGTCACACCTGCTC**CCAGCGTGCGTCGACCCGGACCCCTGTCAGC CCCCTCGCG**GGTGTTGGCTCCCGTATC**	Unbekannt *B. cereus*-Sporen
BacApt5 [79]	**CATCCGTCACACCTGCTC**CAGGTGGGGGGGCGTATTACTGAGGCAGAGT AGTTGGCCG**GGTGTTGGCTCCCGTATC**	Unbekannt *B. cereus*-Sporen
BacApt6 [79]	**CATCCGTCACACCTGCTC**CATTGACGTTGTCAGGTAATGGTTTGGGAGGT CGTGGTGT**GGTGTTGGCTCCCGTATC**	Unbekannt *B. cereus*-Sporen
BacApt7 [79]	**CATCCGTCACACCTGCTC**GCCGGGAGAACGGTACTGGTGGGGGATGACA GCTCGGGGG**GGTGTTGGCTCCCGTATC**	Unbekannt *B. cereus*-Sporen
BacApt8 [79]	**CATCCGTCACACCTGCTC**CCGCCAGGCAATGCCTGCCGCGTCTCGAACAC GTACGGTC**GGTGTTGGCTCCCGTATC**	Unbekannt *B. cereus*-Sporen
BacApt9 [79]	**CATCCGTCACACCTGCTC**GCACGGGTGGTTGGTCACGCCTAGTCTCCAAT TGCGTTGC**GGTGTTGGCTCCCGTATC**	Unbekannt *B. cereus*-Sporen
A1 [90]	UAUGAUGCAUGAGCGCGGGUAGCGGUUAGCCCAGGCCAUGAUAAAUUC GGAGCCUGGGUG	Quencher: BHQ-1
A2 [90]	UUGCCCCUAGAUAAAUUCGGAGGGUAACCGGGUGUUGCGAAAAUUGGUG AAUGAGUUUAG	Quencher: BHQ-1
A3 [90]	ACGUAGUCCCUAGAUAAAUUCGGAGAGAGUGAUGUGGUAGAAUACGUUG GCUUUUGUUU	Quencher: BHQ-1
A4 [90]	UUUAUGUCCAGCCCUAGAUAAAGUCGGAGGUUGGUUCCUGUGCACUCAG CGAAAGUAUUA	Quencher: BHQ-1
[1] Fettgedruckte Basen geben Primersequenzen wieder. [2] Blau dargestellte Basen markieren identische Sequenzen in Aptameren, die sich gegen die gleiche Zielstruktur richten.		

Trotz umfangreicher Literaturrecherchen konnte kein Aptamer identifiziert werden, welches sich gegen das primäre Zielmolekül Dipicolinsäure richtet, so dass ein solches Aptamer mittels SELEX-Verfahren zu entwickeln war (s. Kap. 3.1.3).

2.2.1 Markierung hygienerelevanter Endosporen mit Aptameren

Zunächst wurde die Eignung literaturbeschriebener Aptamere zur Markierung von Endosporen der Bakterien *C. difficile* und *B. cereus* untersucht.

- *C. difficile*

In der Literatur beschriebene Aptamere richten sich nahezu ausschließlich gegen die Toxine (Toxin A, B und das binäre Toxin) [66,67,95-97] oder gegen andere intrazellulär gebildete Moleküle vegetativer Zellen des Bakteriums *C. difficile* (RNase H2, Sequenz, s. Tab. 2) [98]. Da die Bildung von Toxinen in der Wachstumsphase eine Kultivierung über mehrere Stunden erfordert, wurden derartige Aptamere nicht in die nachfolgenden Untersuchungen einbezogen. Zudem ist der ausgewählte Stamm *C. difficile* CCUG 37780 nicht zur Bildung von Endotoxinen fähig. Die Eignung

des Aptamers ARH1t6 [98] zur Markierung von vegetativen Zellen des Bakteriums *C. difficile* und Endosporen wurde exemplarisch untersucht.

Tab. 2: Sequenz eines literaturbeschriebenen Aptamer gegen die RNase H2 des Bakteriums *C. difficile*

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Zielmolekül
ARH1t6 [98]	TTACGTCAAGGTGTCACTCCGCCAGGTGTGCGACGGTCGT	RNase H2

Das Aptamer ARH1t6 wurde funktionalisiert mit dem Fluorophor ATTO 488 am 5'-Ende, im Folgenden als ATTO 488-ARH1t6 bezeichnet, bezogen [99]. Unmittelbar vor der Verwendung wurde eine 100 µM ATTO 488-ARH1t6-Lösung für 1 min im Heizblock auf 95 °C erhitzt und anschließend für 5 min auf Eis gekühlt, um Fehlfaltungen des Aptamers, d. h. die Funktionalität beeinträchtigende Sekundärstrukturen, zu vermeiden.

Um die Eignung des Aptamers ARH1t6 zur Markierung von vegetativen Zellen des Bakteriums *C. difficile* und Endosporen zu untersuchen, wurden Sporen (generiert in Bouillon und auf Agarplatten, s. Kap. 2.2.1) sowie in einer Übernachtkultur in Bouillon gezüchtete vegetative Zellen mit dem Aptamer ARH1t6 inkubiert: Zunächst wurden sowohl die Sporen als auch die vegetativen Zellen dreimal in 1 ml ARH1t6-Puffer [98] gewaschen (d. h. 5 min bei 12.225 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet resuspendiert); anschließend wurde das Pellet in 1,1 ml ARH1t6-Puffer resuspendiert. 498 µl der jeweiligen Suspension wurde mit 2 µl der ATTO 488-ARH1t6-Lösung (Endkonz.: 400 nM) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert; dabei wurden die Probengefäße mindestens alle 10 min mehrmals invertiert. Anschließend wurden die vegetativen Zellen bzw. Endosporen dreimal mit 1 ml ARH1t6-Puffer gewaschen (s. o.), um ungebundenes Aptamer zu entfernen. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Pellets in 200 µl sterilem VE-Wasser resuspendiert und 8 µl der jeweiligen Suspension auf einen separaten Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträger aufgebracht. Als Negativkontrollen dienten Suspensionen, die anstelle der Aptamerlösung mit sterilem VE-Wasser versetzt wurden. Die Präparate wurden fluoreszenz- und lichtmikroskopisch (im Phasenkontrast) analysiert; dabei zeigte sich, dass die mit ATTO 488-ARH1t6 inkubierten, vegetativen Zellen eine höhere Fluoreszenz aufwiesen als mit ATTO 488-ARH1t6 inkubierte Endosporen und die Negativkontrollen (mit sterilem VE-Wasser versetzte vegetative Zellen bzw. Sporen). Insgesamt betrachtet, war das Fluoreszenzsignal der mit ATTO 488-ARH1t6 markierten vegetativen Zellen nur schwach. Die geringe Intensität des Fluoreszenzsignals nach Inkubation vegetativer Zellen mit ATTO 488-ARH1t6 ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die RNase H2 (CDH2) intrazellulär vorlag und dass das Aptamer nicht oder nur in sehr geringer Konzentration in die Zellen eindringen konnte. Eine Bindung von ATTO 488-ARH1t6 an extrazelluläre, auf der Zelloberfläche vorliegende RNase H2, eine Bindung an Membranstrukturen mit ähnlichem Aufbau oder eine unspezifische Bindung an Membranstrukturen sind zudem nicht auszuschließen. In der publizierten

Studie erfolgte der Nachweis der Bindung von ARH1t6 an die RNase H2 in Zelllysaten [98]. Folglich konnte ausgeschlossen werden, dass sich dieses bereits literaturbeschriebene Aptamer zur Markierung von Endosporen des Bakteriums *C. difficile* eignet.

- *B. cereus*

Zur Markierung von Endosporen des Bakteriums *B. cereus* wurde das Aptamer BacApt3 [79] funktionalisiert mit dem Fluorophor ATTO 488 am 5'-Ende, im Folgenden als ATTO 488-BacApt3 bezeichnet, bezogen [99]. Unmittelbar vor der Verwendung wurde eine 4 µM ATTO 488-BacApt3-Lösung für 1 min im Heizblock auf 95 °C erhitzt und anschließend für 5 min auf Eis gekühlt, um Fehlfaltungen des Aptamers, d. h. die Funktionalität beeinträchtigende Sekundärstrukturen, zu vermeiden. Die aliquotierten Sporen (s. Kap. 2.1.2) wurden zur Abtrennung der ethanolischen Lösung zentrifugiert (1 min bei 10.000 g) und der Überstand verworfen; zudem wurden die Sporen durch Resuspendieren in 250 µl Reinstwasser und anschließendes Zentrifugieren gewaschen. Die pelletierten Sporen wurden in 500 µl ATTO 488-BacApt3-Lösung aufgenommen und für 1 h bei Raumtemperatur rotierend inkubiert; als Negativkontrolle dienten in 500 µl Reinstwasser aufgenommene Sporen. Um ungebundenes Aptamer zu entfernen, wurde die Sporen mehrfach gewaschen (d. h. 5 min bei 12.225 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet resuspendiert). Die Bindung des ATTO 488-BacApt3 an der Sporenoberfläche wurde fluoreszenzmikroskopisch sowie fluorimetrisch (im Platereader) nachgewiesen.

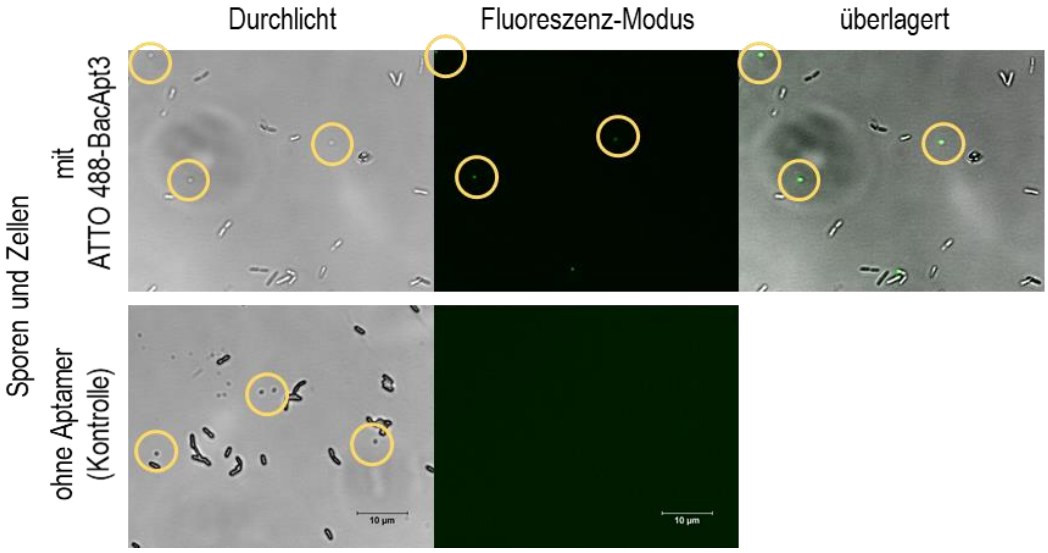


Abb. 1: Mikroskopische Aufnahmen von Endosporen und Zellen des Bakteriums *B. cereus* im Phasenkontrast (links) und im Fluoreszenzmodus (Mitte), gleicher Bildausschnitt, übereinandergelegtes Bild beider Aufnahmen (rechts)

Die Endosporen des Bakteriums *B. cereus* waren aufgrund ihrer runden Form im Phasenkontrast gut von den länglichen, vegetativen Zellen zu unterscheiden. Ferner ließen sich nur die in ATTO 488-BacApt3-Lösung inkubierten Endosporen fluoreszenzmikroskopisch visualisieren. Weder zwischen den Endosporen befindliche vegetative Zellen noch Endosporen, die nicht mit ATTO 488-BacApt3 inkubiert wurden, konnten fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden.

2.2.2 Bindung des Aptamers A1 an den Quencher BHQ-1

Um die Bindung des Aptamers A1 [90] an den Black Hole Quencher (BHQ-1) nachzuweisen, wurde der Quencher immobilisiert. Der BHQ-1-Quencher wurde als Succinimidylester [100] bezogen und über eine EDC-NHS-Kopplung [101a] an Amin-derivatisierte magnetische Beads [101b] kovalent gebunden: Dazu wurden etwa 10^8 Beads (entspr. 20 µl der Suspension) dreimal mit DMSO (Dimethylsulfoxid) gewaschen, indem die Beads magnetisch separiert, der Überstand dekantiert und die Beads wieder resuspendiert wurden. Danach wurden die Beads in 500 µl der Quencher-Lösung (960 µM) aufgenommen und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die mit dem Quencher gekoppelten Beads, im Folgenden als BHQ-1-Beads bezeichnet, wurden magnetisch separiert. Der Überstand und die Quencher-Lösung wurden photometrisch bei 534 nm vermessen. Anhand der Konzentrationsabnahme an Quencher in der Lösung konnte die Kopplung des Quenchers an die Beads nachgewiesen werden. Die BHQ-1-Beads wurden mehrfach gewaschen (zweimal mit 200 µl DMSO und dreimal mit 200 µl PBS [48,49]), indem die Beads magnetisch separiert und der Überstand dekantiert wurde. Zur Lagerung wurden die BHQ-1-Beads in 1 ml PBS resuspendiert und bei 4 °C aufbewahrt.

Das Aptamer A1 [90] wurde funktionalisiert mit dem Fluorophor ATTO 550 am 5'-Ende, im Folgenden als ATTO 550-A1 bezeichnet, bezogen [99]. Unmittelbar vor der Verwendung wurde eine 0,1 mM ATTO 550-A1-Lösung für 1 min im Heizblock auf 95 °C erhitzt und anschließend für 5 min auf Eis gekühlt, um Fehlfaltungen des Aptamers, d. h. die Funktionalität beeinträchtigende Sekundärstrukturen, zu vermeiden. Zur Bindung des Aptamers ATTO 550-A1 an den Quencher wurden die BHQ-1-Beads (5 µl, entspr. $5 \bullet 10^5$ Beads) zunächst mit 200 µl Aptamerbindepuffer [90] (einfach konzentriert) gewaschen; zur Abtrennung des Puffers wurden die BHQ-1-Beads magnetisch separiert und der Überstand verworfen. Die BHQ-1-Beads wurden mit 10 µl Aptamerbindepuffer [90] (doppelt konzentriert) und 10 µl Lösung des Aptamers ATTO 550-A1 (Endkonz.: 50 µM) versetzt, resuspendiert und für 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert; wobei der Ansatz alle 10 min gevortext wurde. Anschließend wurden die BHQ-1-Beads mit dem gebundenen Aptamer, im Folgenden als ATTO 550-A1-BHQ-1-Beads bezeichnet, magnetisch separiert. Der Überstand und die Aptamerlösung (50 µM) wurden photometrisch bei 564 nm vermessen. Anhand der Konzentrationsabnahme an ATTO 550-A1 in der Lösung konnte die Bindung des Aptamers an den Quencher nachgewiesen werden. Die ATTO 550-A1-BHQ-1-Beads wurden dreimal mit 200 µl PBS gewaschen, indem diese magnetisch separiert und der Puffer verworfen wurde; anschließend wurden die ATTO 550-A1-BHQ-1-Beads in 100 µl PBS resuspendiert. Der Ansatz wurde für 5 min bei 95 °C im Thermocycler erhitzt, um die Aptamere vom Quencher zu lösen. Durch kurzes Zentrifugieren wurde das Kondenswasser am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt. Nach magnetischer Separation der Beads wurde der Überstand fluorimetrisch (λ_{ex}: 550 nm; λ_{ex}: 580 nm) vermessen und das Aptamer ATTO 550-A1 im Überstand nachgewiesen. Um eine unspezifische

Bindung auszuschließen, wurden parallel Kontrollexperimente u. a. mit Amin-derivatisierten magnetischen Beads [101] durchgeführt.

2.2.3 Selektion eines Aptamers gegen Dipicolinsäure (DPA)

Aptamere gegen spezifische Zielmoleküle lassen sich durch ein *in vitro* Verfahren namens SELEX (engl. *Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*) selektieren [102-104]: Ausgehend von einer Zufallsbibliothek aus 10^{12}-10^{16} Einzelsträngen (ssDNA) mit einem randomisierten Sequenzabschnitt zwischen zwei flankierenden Sequenzen zur Primerbindung während der Amplifikation werden die Kandidaten selektiert, die eine für die Bindung an das Zielmolekül geeignete dreidimensionale Faltungsstruktur ausbilden können. In repetitiven Schritten werden diese Einzelstränge mit dem Zielmolekül inkubiert (Selektion), nicht bindende Sequenzen durch Waschen entfernt (Separation) und die bindenden Sequenzen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt (Amplifikation). Nach mehreren solcher Runden werden potentielle Aptamere, sog. Aptamerkandidaten, sequenziert, d. h. die Nukleotid- bzw. Basensequenz ermittelt [105].

Zur Selektion sich gegen DPA richtender Aptamere wurde das XELEX-Kit [108a] verwendet; das Herstellerprotokoll wurde für die Anwendung optimiert. Anschließend wurden potentielle Aptamere in 3 Runden selektiert.

- Herstellung magnetischer, mit Dipicolinsäure funktionalisierter Beads (DPA-Beads)

Um an DPA gebundene Stränge (potentielle Aptamere) separieren bzw. von nicht bindenden Sequenzen abtrennen zu können, wurde 4-Mercaptomethyl-dipicolinsäure (4-MMDPA) [106] an Maleimid-funktionalisierte magnetische Partikel [107] gebunden: Dazu wurden ca. $2{,}75 \bullet 10^6$ Beads (entspr. 55 µl der Suspension) dreimal mit PBS [48,49] und einmal mit Kopplungspuffer 1 (einfach konzentriert) [107] gewaschen, indem die Beads magnetisch separiert, der Überstand abpipettiert und die Beads wieder resuspendiert wurden; danach wurden die Beads in 1 ml einer Lösung bestehend aus Kopplungspuffer 1 (einfach konzentriert) [107] und 4-MMDPA (Endkonz.: 1 mM) für 2 h bei Raumtemperatur rotierend inkubiert. Anschließend wurden die mit DPA funktionalisierten Beads, im Folgenden als DPA-Beads bezeichnet, dreimal mit PBS gewaschen (s. o.) und in 1000 µl PBS resuspendiert bei 4 °C gelagert.

- Selektion potentieller Aptamere [108]

Die DPA-Beads (ca. $2{,}75 \bullet 10^6$ Beads) wurden einmal mit Reinstwasser gewaschen (s. o.); anschließend wurden die DPA-Beads in einer Lösung aus 50 µl der im XELEX-Kit [108a] enthaltenen ssDNA-Bibliothek (entspr. 25 µg ssDNA), 50 µl SELEX-Puffer (zehnfach konzentriert) und 400 µl Reinstwasser resuspendiert und für 120 min bei Raumtemperatur im Revolver rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Beads einmal in SELEX-Puffer (einfach konzentriert) gewaschen und abschließend in 50 µl Reinstwasser resuspendiert.

Um Aptamerkandidaten zu selektieren, die möglichst spezifisch an DPA binden, wurde die Inkubationszeit bei jeder nachfolgenden Selektionsrunde um 30 min verkürzt und die Anzahl der Waschschritte um einen erhöht. Zudem wurden in jeder weiteren Selektionsrunde mindestens 0,5 µg des aufgereinigten Emulsions-PCR Produktes aus der vorhergehenden Runde eingesetzt.

- Separation potentieller Aptamere [108]

Zur Separation an den DPA-Beads gebundener Stränge wurden die in Reinstwasser resuspendierten Beads für 3 min bei 94 °C erhitzt, die Beads umgehend magnetisch separiert und der Überstand mit den abgelösten Strängen abgetrennt. Dieser Überstand wird im Folgenden als Eluat bezeichnet.

- Amplifikation potentieller Aptamere [108]

Die von den DPA-Beads abgelösten Stränge wurden mittels Emulsions-PCR vervielfältigt. Zum Ansetzen der Ölphase wurden 220 µl der Emulsionskomponente 1, 20 µl der Emulsionskomponente 2 und 60 µl der Emulsionskomponente 3 durch Vortexen gut gemischt und bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt. Die wässrige Phase wurde wie folgt angesetzt:

Reagenz	Stockkonz.	Volumen [µl]	Endkonz.
PCR Buffer (mit $MgCl_2$)	10x	5	1x
BSA	1 mg/ml	0,5	0,01 mg/ml
Bank40-5'- Primer	100 µM	2	4 µM
Bank40-3'- Primer	100 µM	2	4 µM
dNTP Mix	5 mM	4	400 µM
EUR_X Taq DNA Polymerase	5U/µl	0,25	1,25 U
Template: Bead-Eluat	-	25	-
Reinstwasser	-	11,25	-

300 µl der Ölphase und 50 µl der wässrigen Phase wurden 5 min gevortext und einige Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurde der Ansatz in drei Aliquote, sog. technische Triplikate, aufgeteilt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Eluat.

Die PCR wurde nach dem folgenden Programm durchgeführt:

Zyklenzahl	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
1x	Initiale Denaturierung	95	120
20x	Denaturierung	95	20
	Annealing	55	60
	Elongation	72	180
1x	Finale Elongation	72	300

Nach der Vervielfältigung wurden die Triplikate vereinigt.

- Aufreinigung potentieller Aptamere [108]

Um die Emulsion aufzubrechen, wurde diese mit 1 ml 2-Butanol versetzt und gevortext. Danach wurden 250 µl Orange-SFB Puffer zugegeben und mit dem Ansatz vermischt. Durch Zentrifugation (2 min bei 16.000 g) wurden die Phasen separiert und die orange gefärbte organische Phase fast vollständig abpipettiert und verworfen. Die wässrige Phase wurde mit dem 1,2fachen Volumen an reinem Ethanol versetzt und durch Auf- und Abpipettieren gut vermischt.

Um die selektierten Stränge für die nächste Runde der SELEX verwenden zu können, wurden diese aufgereinigt. Dazu wurde eine Zentrifugationssäule [108d] mit 30 µl Aktivierungspuffer (SF) versetzt und die ethanolhaltige wässrige Phase aufgegeben. Nachfolgend wurde die Säule zentrifugiert (1 min bei 11.000 g) und der Durchfluss verworfen. Die adsorbierten Stränge wurde zweimal gewaschen, indem der Waschpuffer SFX (zuerst 600 µl, dann 350 µl) auf die Säule aufgegeben, durch Zentrifugation (1 min bei 11.000 g) getrennt und der Durchfluss verworfen wurde. Reste des Waschpuffers wurden durch Zentrifugation (2 min bei 11.000 g) entfernt. Anschließend wurden die Stränge von der Zentrifugationssäule eluiert, indem 100 µl auf 80 °C temperierter Elutionspuffer (SFX) aufgegeben und nach 2 min Inkubation bei Raumtemperatur durch Zentrifugation (1 min bei 11.000 g) abgetrennt wurde.

Das Eluat (5 µl) wurde gelelektrophoretisch (3%iges Agarosegel, 1 h bei 80 V) analysiert; zur Visualisierung der Amplifikate wurde Midori Green Advance [109] verwendet. Da nur eine sehr schwache Bande zu erkennen war, wurden die selektierten Stränge in einer weiteren Emulsions-PCR (*scale-up*-PCR) vervielfältigt, um eine ausreichende Menge an Strängen für die nächste Selektionsrunde zu erhalten. Die Quantifizierung der DNA erfolgte mit dem NanoDrop One C.

Mit der Illumina-Sequenzierung der selektierten Stränge wurde eine externe Firma [110] beauftragt. Zur Sequenzierung wurden die nach der Emulsions-PCR doppelsträngig vorliegenden potentiellen Aptamere am 3‘-Ende mit Adaptern (kurze DNA-Stränge bestimmter Sequenz) versehen und somit von beiden Enden her sequenziert. Folglich enthielten die Sequenzierdaten mit den Reads sowohl die 5‘-Sequenzen (vervielfältigte potentielle an DPA bindende Stränge der ursprünglichen ssDNA-Bibliothek) als auch deren komplementäre 3‘-Sequenzen.

- Bereinigung der Sequenzierdaten

Die Sequenzierdaten wurden zunächst einer Datenbereinigung (s. Tab. 3) mittels individueller in Python geschriebener Skripte zur Entfernung von möglichen Kontaminationen, Artefakten oder fehlerhaften Sequenzen (Einbau falscher Nukleotide durch die Polymerase während der Emulsions-PCR oder Sequenzierung, Strangbrüche) unterzogen. Die erwartete Gesamtlänge der potentiellen Aptamere betrug 76 Nukleotide (nt); dies entspricht den 40 nt der randomisierten ssDNA-Bibliothek [108a] inkl. jeweils 18 nt der flankierenden Sequenzen zur Primerbindung (forward und reverse Primer).

Tab. 3: Zusammenfassung der zur Bereinigung der Sequenz-Dateien durchgeführten Schritte	
1.	Entfernen aller Reads, in denen die Trimmsequenz (für die Sequenzierung angehängte Adaptersequenz) nicht vorhanden war sowie trimmen aller verbliebenen Reads ab Beginn der Trimmsequenz in Richtung 3‘-Ende.
2.	Entfernen aller Reads, die am 5‘-Ende nicht mit der Sequenz des forward Primers der ssDNA-Bibliothek (TGACACCGTACCTGCTCT) begannen und aller Reads unter 70 nt.
3.	Entfernen aller Reads, deren 3’-Ende nicht mit der ursprünglichen Sequenz der 3‘-Primerbindestelle (AAGCACGCCAGGGACTAT), einer überwiegend auftretenden Modifikation der Sequenz (zusätzliches Adenosin vermutlich durch einen Fehler der Polymerase in der 1. Selektionsrunde eingefügt: AAGCACGCCA**A**GGGACTA) sowie einer um ein, zwei oder drei Nukleotide verkürzten Sequenz beider zuvor aufgeführter Sequenzen übereinstimmte
4.	Trimmen der Sequenzen des forward Primers am 5‘-Ende der Reads und Trimmen der acht verschiedenen im vorherigen Schritt verwendeten 3‘-Primerbindestellen. Anschließend wurden alle Reads aus den Datensätzen entfernt, die kleiner oder größer als 40 nt waren.
5.	Entfernen aller Reads aus dem Datensatz von Runde 3, die nicht in Runde 1 vorhanden waren

Zum weiteren Ausschluss auf Kontaminationen zurückzuführender Sequenzen im Datensatz wurden die 85 häufigsten Varianten über den BLAST-Algorithmus (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) mit in der NCBI Datenbank [111] vorhandenen Sequenzen von Organismen verglichen. Da DNA-Aptamere nicht natürlich vorkommen, würde eine Übereinstimmung in der Datenbank zu einem Ausschluss der Variante führen. Die Varianten wurden mittels *blastn*-Algorithmus (*Search a nucleotide databases using a nucleotide sequence*) online mit dem megablast-Algorithmus für „*highly similar sequences“* untersucht [111,112]. Keine der Varianten wies signifikante Ähnlichkeiten zu den Sequenzen in der Datenbank auf.

- Analyse der Sequenzierdaten

Aufgrund von Fehlern der Polymerase während der Amplifikation und der Sequenzierung kommt der überwiegende Anteil an invarianten Sequenzen (Reads mit gleicher Sequenzabfolge; im Folgenden als Varianten bezeichnet) üblicherweise nur ein bis wenige Male in den Sequenzierdaten vor. Neben PCR- und Sequenzierfehlern können weitere Gründe für selten auftretende Varianten schlechte PCR-Amplifizierer, mit geringer Affinität an das Zielmolekül bindende Stränge (ssDNA) oder nicht ausreichend ausgewaschene, nicht bindende Stränge sein. Somit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei einer Variante um ein potentielles Aptamer handelt mit der Häufigkeit, mit der diese im Datensatz vorkommt, vor allem wenn eine sukzessive Anreicherung der Varianten über die Selektionsrunden stattfindet.

Nach der Datenbereinigung wurden die verbliebenen Reads aus der 3. Selektionsrunde miteinander abgeglichen (engl. *aligned*) und eine Häufigkeitsverteilung der invarianten Sequenzen erstellt. Von den ursprünglichen 15.396.830 Reads in dieser Runde waren nach der Datenbereinigung noch 1.924.481 Reads übrig, worunter sich 253.913 Varianten befanden. 97,6 % der Varianten kamen nur 1- bis 50-mal im Datensatz vor; lediglich 85 Varianten kamen mindestens 500-mal vor und 15 Varianten mehr als 1000-mal. Die 85 häufigsten Varianten aus der 3. Selektionsrunde kamen in der 1. Selektionsrunde nur 9- bis 72-mal vor und gehörten damit zu den

häufigsten Varianten in dieser Runde. Für folgende Analysen zur Auswahl und Charakterisierung eines spezifisch an DPA bindenden Aptamers stellen die 85 häufigsten Varianten aus der 3. Selektionsrunde daher einen vielsprechenden Ausgangspunkt dar; eine Übersicht über die Varianten ist in Tabelle A1 (s. Anhang) zusammengestellt; Tabelle 4 zeigt einen Auszug aus Tabelle A1 mit den relevantesten Varianten.

Tab. 4: Übersicht über die relevantes der 85 häufigsten Varianten potentieller Aptamere gegen Dipicolinsäure (DPA) aus der 3. Selektionsrunde

Variante	Sequenz (5' → 3')	MFE [1)] [kcal/mol]	Häufigkeit der Reads in SELEX-Runde 3
V2	GGGGGGAGGAAATGGCAACGAGCGGCCTACCACCGGCCCC	-4,7	2.563
V3	GGGGGCCGCAAAGCCTGCTGATATCAGGACGTCCCACCCC	-4,1	2.286
V4	GGGGCGGCAAACGACCCTGAATTCCCCGACGCGCTTCCCC	-4,9	1.804
V8	GGGGACGGCAGGTGCATGCAAGTTTGGACGCCTGTACCCC	-6,3	1.381
V9	GGGGGGCGGTCACTTTAATGAAAATCTGACGTCCGTCCCC	-7,7	1.324
V11	GGGGCACCTGGAGGGGACATGATCTTGAGGTGGCCTGCCC	-7,0	1.257
V13	GGGGACGGCGCATACATTCCTAGTTCGTCGGTACCACCCC	-1,9	1.147
V14	GGGGGCACAGGGGCTCAATAGGTCAGGTATTGCCCCCCCC	-7,5	1.070
V16	GGGCCACCGCACAGTACCAGTTCTAGAAGGTTTCGCCCCC	-1,0	985
V17	GGGGCGGGGAACCCAGACGGTGTCGCTCATGGGTCGCGCT	-7,6	974
V18	GGGGCGTAAGCAGCGACCGCTCCACGAGGCCAATGCCCCC	-6,5	930
V19	GGGGGGGGCCCGGTAGGCGAGTGGCACTAAGGGTCGTCCC	-7,5	929
V25	GGGGGGGCCCATGATGGGTATGTAATTGCCACCTGGCCCC	-6,4	833
V26	GGGGCGGCGAGGACTGTCGTTAGTTGTAGCTCCGAACCCC	-3,9	832
V27	GGGCACGGGGCAGGAAAGCGACCTCACCTCTCCTCCGGCC	-6,4	831
V32	GGGGGCCAGGCGGAACTCTGACTACCCAACTACCCCGTCC	-2,3	771
V34	GGGGGGGGTAGTCACGACCCAATTCCATTTCCACCTCGCC	-2,9	729
V35	GGGGCCGATAGGTTCAGTCCGTAGTACCGAAGGCCCGCCC	-4,9	693
V37	GGGGAGTGGATGTGAAGGTTACTAAACTTGGCTGCTCCCC	-5,2	680
V40	GGGGACCAGCAGGAGCGACTTTCCCACAATGCTGTACGCC	-3,5	656
V43	GGGCACACACAGGAATAATACTCAGTTACCATACCCGCCC	-0,5	648
V45	GGGGCCACGGGCGATCCAGATGGAGGGGTGTCTTGGGGCC	-3,7	641
V46	GGGGACCGGCACATTGGAATCAAGGCAATCCCGGCACCCC	-6,2	640
V47	GGGGCGGAACGAACAACGAAGATTGGGGACATGCTCCTCC	-1,9	629

[1)] MFE = *Minimum free energy* der thermodynamisch stabilsten Sekundärstruktur [113] (Faltungsvorhersagen s. Tab. 5) nach Matthews Modell 2004

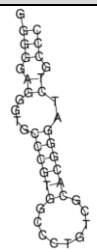
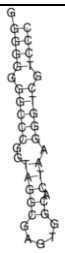
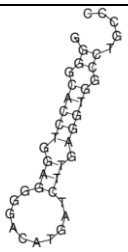
Tab. 4: Übersicht über die relevantes der 85 häufigsten Varianten potentieller Aptamere gegen Dipicolinsäure (DPA) aus der 3. Selektionsrunde – Fortsetzung

Variante	Sequenz (5' → 3')	MFE [1)] [kcal/mol]	Häufigkeit der Reads in SELEX-Runde 3
V50	GGGGGTGCGGACAGCAGGAATACTTACAATGGCGCCCCCC	-6,4	607
V54	GGGGGGAGCACCGACACGAAGACACATGCCAGCTGTTGCC	-0,8	588
V55	GGGGCAAGGGGATCTCAAGGCGCGCTGTATGTGGTACCCC	-1,9	586
V58	GGGCGCCACAGGAAGACCATCGGGCCCAAACACCGTCCCC	-4,9	580
V60	GGGGGGGCTGTATCGAGGGGGGTACGCACCCACCGTCTCC	-5,9	575
V61	GGGGGGCAGCATGCTAGAGCATCTTTCTCCGTCTTACGCC	-2,2	567
V62	GGGCAGCGATACGTTGCTTAGTGCACCTAATCGGTCCCCC	-4,0	562
V64	GGGGCGGGAACCAAGGCTGCGTACTGCTGTCCTAGCCGCT	-3,5	556
V65	GGGGACACGGAAGCTGCACCAACGTCTTGTCGTTAGCCCC	-2,7	550
V68	GGGGAGGCGGGGGTGGTTGATAACAACGGCACTATGGCCC	-4,7	546
V70	GGGGGCAGACCCGTAGGCCTGTTGTTTCTCGCCCTTTGCC	-3,5	544
V71	GGGCAGGAGGCCGGAGACTACAGCTCCCGCTGGCAACCCC	-5,5	542
V72	GGGGGCACAGAGTGACCAATGACACACGCCATGCAGTCCC	-3,7	542
V73	GGGGGCGGGGGTGCGCGTCAGAAGCCTTTCTCCTCTCGCC	-5,1	539
V70	GGGGGCAGACCCGTAGGCCTGTTGTTTCTCGCCCTTTGCC	-3,5	544
V71	GGGCAGGAGGCCGGAGACTACAGCTCCCGCTGGCAACCCC	-5,5	542
V72	GGGGGCACAGAGTGACCAATGACACACGCCATGCAGTCCC	-3,7	542
V73	GGGGGCGGGGGTGCGCGTCAGAAGCCTTTCTCCTCTCGCC	-5,1	539
V74	GGGGAGGACATCGATAGACTCGAAACGGCCTATACCGCCC	-4,1	537
V75	GGGGGAGGGTGCCCGTGGCCCTGTCGCACGGGATCTGCCC	-8,7	536
V78	GGGGGGACCATTCCGAACTGCTACTCCTATCACTCGTCCC	-1,5	529
V80	GGGCACATACCAACGCGGCTACCCCGTTTGCATTGGCCCC	-5,1	521
V81	GGGGACAGGTCAGGTCGGCGAAGACAGTTTCTCCATGGCC	-0,8	515
V84	GGGGAGGCCGTGCTACTGAGATTTTGATAAGTGTGCCGCC	-2,1	510
V85	GGGCAAACCGTGGATAACACGAATTCCGCACCCGGCCGCC	-5,7	501

[1)] MFE = *Minimum free energy* der thermodynamisch stabilsten Sekundärstruktur Sekundärstruktur [113] (Faltungsvorhersagen s. Tab. 5) nach Matthews Modell 2004

Von den 85 häufigsten Varianten wurden Faltungsvorhersagen zur Sekundärstruktur der Sequenzen erstellt. Dafür wurde die sog. MFE-Struktur (engl. *minimum free energy*) mittels des RNAfold WebServers [113] verwendet, die die optimale Faltung darstellt, in der die Struktur thermodynamisch am stabilsten ist. Je negativer dabei der Wert ist, desto stabiler und wahrscheinlicher ist die Struktur [114]. Alle Varianten besaßen eine negative MFE (s. Tab. A1), was bedeutet, dass eine selbstständige Faltung aller Varianten bei physiologischen Bedingungen (*default*: 37 °C) zu erwarten ist. Anschließend wurden die Sekundärstrukturen der 85 häufigsten Varianten anhand der Anzahl und Lage der Loops sowie der allgemeinen Form in 12 Kategorien eingeteilt (s. Tab. A2). Die am häufigsten auftretenden Strukturen sind S4, S7, S8 und S11, in denen 9, 13, 15 bzw. 8 Varianten vorkommen (s. Tab. 5). Diese vier Strukturkategorien sind relativ ähnlich; sie weisen eine i-Form auf mit 2 oder mehr geschlossenen Loops und ggf. einem zusätzlichen offenen Loop am Stammende. Aus diesen vier Kategorien sind die Varianten mit der niedrigsten MFE: V75 (S4; -8,7 kcal/mol), V14 (S7; -7,5 kcal/mol), V19 (S8; -7,5 kcal/mol) und V11 (S11; -7,0 kcal/mol).

Tab. 5: Übersicht über die relevantesten Sekundärstrukturen [113] der 85 häufigsten Varianten aus der 3. Selektionsrunde

Strukturkategorie	Beschreibung	Varianten	Beispiel
S4	2 geschlossene Loops mit Stamm, i-Form	V3, V8, V17, V39, V43, V50, V64, V75, V80	 V75
S7	2 geschlossene Loops + 1 offener Loop am Stammende, i-Form	V14, V25, V34, V35, V40, V47, V58, V60, V61, V70, V81, V84, V85	V14
S8	3 geschlossene Loops mit Stamm, i-Form	V2, V4, V18, V19, V27, V37, V45, V46, V54, V62, V65, V71, V72, V73, V78	 V19
S11	3 geschlossene Loops + 1 offener Loop am Stammende, i-Form	V11, V13, V16, V26, V32, V55, V68, V74	 V11

Das Erstellen einer Konsensus-Sequenz ist eine weitere Möglichkeit, um aus den 85 Varianten potentielle Aptamere gegen DPA zu identifizieren. Die Konsensus-Sequenz gibt die Abfolge von Nukleotiden wieder, die am häufigsten in den 85 Varianten auftreten. Solch eine Konsensus-Sequenz wurde mittels des Onlinetools „WebLogo“ [115] (Einstellung: „*Frequency Plot*“) erstellt; aus dem resultierenden Logo (Abb. 2) können vier Sequenzen mit den häufigsten Nukleotiden abgelesen werden (s. Tab. 6).

Abb. 2: Konsensus-Sequenzen der 85 häufigsten Varianten potentieller Aptamere gegen Dipicolinsäure (DPA) aus der 3. Selektionsrunde (erstellt mit „WebLogo“ [115])

Tab. 6: Die vier häufigsten Nukleotidabfolgen der Konsensus-Sequenzen aus Abbildung 2 mit zugehöriger *Minimum Free Energy* (MFE) der Sekundärstrukturen und Einteilung in die Strukturkategorien entsprechend Tabelle 5.

Variante	Sequenz (5' → 3')	Strukturkategorie	MFE [kcal/mol]
K1	GGGGGCGGGGAGGGAAGCCGGTAGCCCTCCTCCCCGCCCC	S4	-17,6
K2	GGGGAGCCCACACCGCCGGAAATATGGAAGCGGTGTCCCC	S1	-9,0
K3	GGGCCAAAACGCAATGAAACCGCCAATGTTGTTGTCGGCC	S8	-3,0
K4	GGGCCATTTTTTTTCTTTTTTCGTGTACGAAAAAAATTCC	S2	-5,4

Diese vier Sequenzen (K1 bis K4) weisen ebenfalls eine negative MFE auf (Faltungsvorhersagen mit RNAfold WebServer [113] erstellt); vor allem die Sequenz K1 mit einer MFE von -17,6 kcal/mol und strukturell der sehr häufig auftretenden Kategorie S4 zugehörig (s. Tab. 5) stellt ein potentielles Aptamer gegen DPA dar.

Zusammenfassend war es gelungen, durch intensive Literaturrecherchen Aptamere zu identifizieren, die sich gegen primäre Zielmoleküle auf der Oberfläche von Endosporen der Bakterien *C. difficile* und *B. cereus* bzw. gegen das induzierte Zielmolekül, den BHQ-1-Quencher, richten. Da durch Literaturrecherchen keine Aptamere identifiziert werden konnten, die sich gegen Dipicolinsäure richten, wurden potentielle Aptamere selektiert. Zudem wurden ausgewählte Aptamere gegen Endosporen des Bakteriums *B. cereus* und den BHQ-1-Quencher hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit charakterisiert. Somit konnte die Basis für die Entwicklung von Aptazymen (s. Kap. 2.4) zum Nachweis auskeimungsfähiger Endosporen (Gesamtsporenzahl anaerober bzw. aerober Bakterien) und auskeimungsfähiger Endosporen hygienerelevanter Bakterien (z. B. *C. difficile*, *B. cereus*) gelegt werden, welche sich durch Kopplung eines Aptamers mit einem Nukleozym (s. Kap. 2.3) generieren lassen.

⇨ **Das Ziel des Arbeitsschrittes 2 wurde teilweise erreicht.**

2.3 Charakterisierung von Nukleozymen und Design der Molecular Beacons

⇨ *Ziel des Arbeitsschrittes 3:*

Ziel des Arbeitsschrittes 3 war, Nukleozyme mit hoher Wechselzahl zu identifizieren und diese hinsichtlich ihrer Substratumsetzung zu charakterisieren. Dazu waren geeignete fluorogene Substrate, bevorzugt Molecular Beacons, zu designen.

⇨ *Durchgeführte Arbeiten und erzielte Ergebnisse:*

Nukleozyme sind DNA- oder RNA-Sequenzen, die eine katalytische Wirkung auf spezifische chemische Reaktionen (z. B. DNA- bzw. RNA-Spaltung durch Umesterung oder Hydrolyse, Ligation, Phosphory-, Adeny- oder Deglykosylierung [7-11]) haben. Nukleozyme aus DNA werden als Desoxyribozyme (DNAzyme) bezeichnet; Ribozyme sind Nukleozyme aus RNA. Im Gegensatz zu Ribozymen kommen DNAzyme nicht natürlich vor [10,116]. DNAzyme werden künstlich mittels *in vitro* Selektions-Verfahren [11,21,116,117] (s. Kap. 2.2) hergestellt, d. h. die Nukleotidsequenzen sind bekannt. Nukleozyme sind dauerhaft aktiv, allerdings benötigen sie häufig Cofaktoren (z. B. zweiwertige Ionen wie Magnesium- oder Calciumionen).

Zunächst wurden DNAzyme identifiziert, die gemäß Literaturangaben eine hohe Wechselzahl aufweisen (s. Tab. 7), da angenommen wurde, dass die Spaltung des fluorogenen Substrats der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Signalgenerierung ist. Unter fluorogenen Substraten werden dabei üblicherweise Substrate verstanden, die selber nicht fluoreszieren, bei deren Spaltung aber eine fluoreszierende Komponente entsteht.

Tab. 7: Übersicht über literaturbeschriebene, *trans*-agierende DNAzyme (katalytisch aktive Domäne)

Bezeichnung	Sequenz [1] (5' → 3')	Cofaktor	Wechselzahl [min^{-1}]
13PD1 [118]	TATACCGGGCAACTATTGCCTCGTCATCGCTATTTTCTGC	Mn^{2+}, Zn^{2+}	1,2
9NL27 [119] [1]	CGATAGATAAGTGGGAGCCTTTGCCATAGTTGTCCCTCAA	Mn^{2+}, Zn^{2+}	0,02
7YK35 [120]	CCCCCGCAAAGAGAAGCAAGGGGGACCGCTTTGAATACGG	Mn^{2+}, Eu^{3+}	0,024
10MD5 [121]	CGCTAGATAAGTGGGTGCGTTTGCTATAGCTGTCCCTCAA	Mn^{2+}, Zn^{2+}	0,045
6YR25 [118]	CCCCCAGACCCATTGAGGGTTTTACTTACGCTGTTCCGAA	Mn^{2+}, Zn^{2+}	0,016
RadDz6 [122]	TAAGATAAACACACCGGCCGTCACGCTGCCTCAGACGGTGAGTGACCCTA AAATAAGGGGATAACCCAAGGCCGATATCCCAATTTGAGATGGTCGGGGA	Mn^{2+}, Zn^{2+}	0,016
I-R3 (Class I) [123] - bimolecular	AGTCAGAAAGATAATCTAGTTGAGCTGTCTGCATCACGAGCTCGTGAT-GCAGACGTTGAAGGATTATCTTTCTGACT	Zn^{2+}	1,0
D-Zyme [124]	AGTCAGAAAGATAATCTAGTTGAGCTGTCTGCATCACGAG	Zn^{2+}	0,57
[1] mutierte Variante des DNAzyms 10MD5 mit breiterer pH-Toleranz			

Da RNA weniger stabil ist als DNA, wurden nur DNAzyme in Tabelle 6 berücksichtigt, welche ssDNA schneiden. Ferner wurde bei Auswahl der DNAzyme darauf geachtet, dass die DNAzyme keine toxischen Cofaktoren benötigen, die deren Anwendung in einem Nachweisverfahren einschränken. Auch DNAzyme, deren Substrate eine Ribonukleotidschnittstelle (z. B. ein einzelnes

Ribonukleotid im DNA-Strang) aufweisen müssen, wurden nicht berücksichtigt, da diese Substrate aufwendig zu synthetisieren und damit kostspielig sind.

Zur Ermittlung der katalytischen Aktivität wurden die ausgewählten DNAzyme 13PD1 [118] und 9NL27 [119] modifiziert (s. Tab. 8) und Molecular Beacons [12-15] als Substrate designt (s. Tab. 9). Die Modifikation der DNAzyme diente der Optimierung der Substratbindung. Das DNAzym D-Zyme [124] wurde nicht modifiziert eingesetzt. DNAzyme und Substrate wurden unter Angabe der Sequenz und gewünschten Modifikation bezogen [99].

Tab. 8: modifizierte DNAzyme (aus Tab. 7)

Bezeichnung	Sequenz [1] (5' → 3')
9NL27	TCCGCGCTAGACGATAGATAAGTGGGAGCCTTTGCCATAGTTGTCCCTCAATAAGTACATGAGACTTT
13PD1	AGTGTTCCTATACCGGGCAACTATTGCCTCGTCATCGCTATTTTCTGCGGATCGGC

[1] modifizierte Sequenzen sind grün hervorgehoben

Die designten Molecular Beacons (s. Tab. 9) stellen ein Beispiel für ein fluorogenes Substrat dar, sie verfügen über komplementäre Bindungsstellen zu dem jeweiligen DNAzym, eine Erkennungssequenz für die hydrolytische Spaltung durch das DNAzym sowie ein Fluorophor am 5'-Ende und einen Quencher am 3'-Ende, die durch Hybridisierung komplementärer Basen in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Folglich liegen Molecular Beacons in einer Stammschleifenstruktur vor. Solange die Molecular Beacons in ihrer Stammschleifenstruktur vorliegen, wird die Fluoreszenz des Fluorophors (Donor) durch eine auf dem Förster-Resonanzenergietransfer basierende Energieübertragung auf den Quencher (Akzeptor) unterdrückt [16-20]. Solche Molecular Beacons wurden bereits in der Grundlagenforschung als Nukleozymsubstrate verwendet [12-14].

Tab. 9: für die DNAzyme designte, fluorogene Substrate (*trans*)

Bezeichnung	Sequenz [1] (5' → 3')	Form
9NL27-MB	[ATTO 488]-GCTTCCTCTCATGTACTTATATGTTCTAGCGCGGAAGC-[BHQ-1]	Molecular Beacon
13PD1-MB	[ATTO 488]-CCAAGGGCCGATCCTACTGCTGGGAACACTCCTTGG-[BHQ-1]	Molecular Beacon
D-Zyme-MB	[ATTO 488]-GCTCCCTCGTGATGCAGACGTTGAAGGATTATCTTTCTGACTGGAGC-[BHQ-1]	Molecular Beacon
D-Zyme-LS	CTCGTGATGCAGACGTTG[Fluorescein]AA[Dabcyl]GGATTATCTTTCTGACT	Lineares Substrat

[1] Rot dargestellte Basen markieren die Schnittstelle; grün markierte Basen bilden den Stamm

Die Faltung der DNAzyme und der Substrate wurde mit RNAfold WebServer [113] vorhergesagt. Die Sekundärstrukturen sind in Abbildung 3 dargestellt.

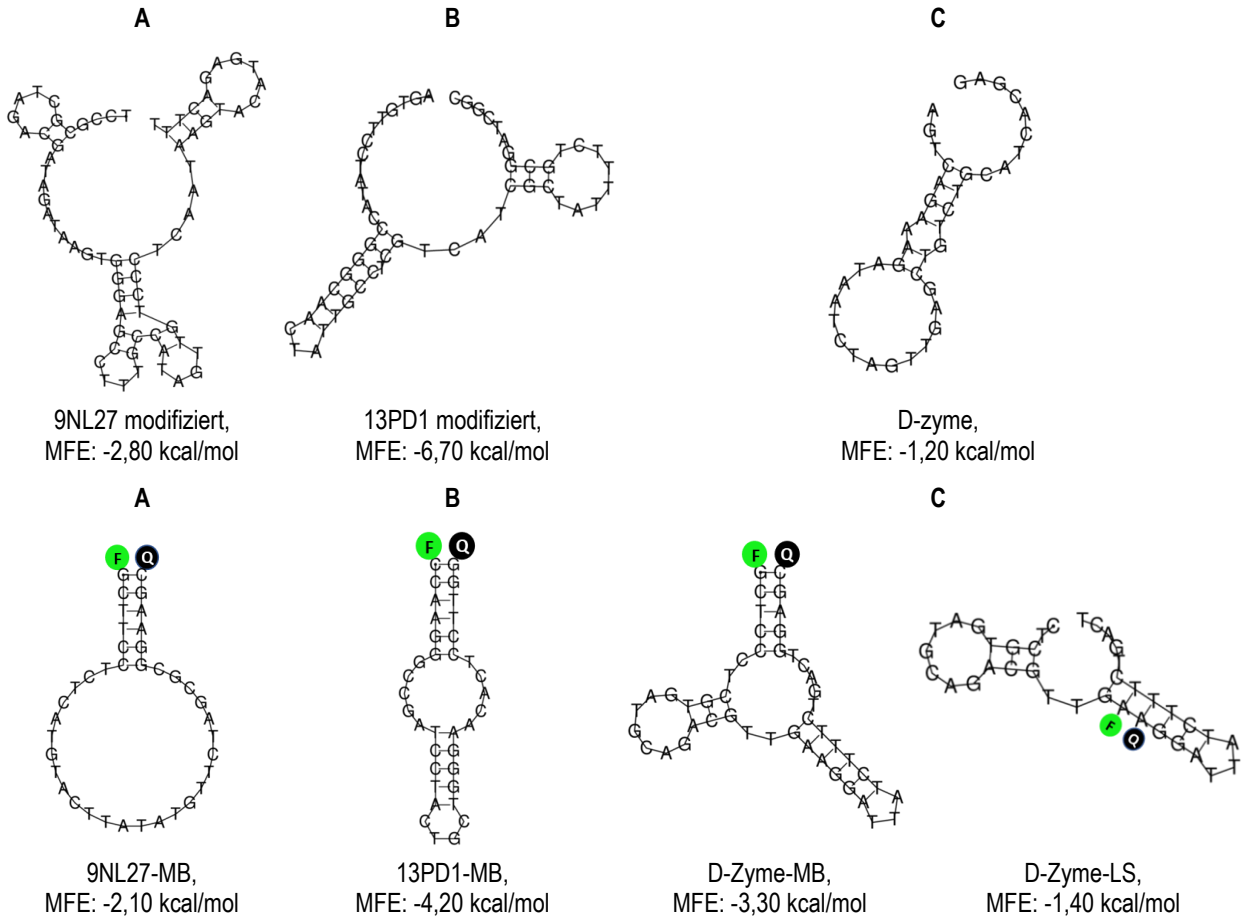


Abb. 3: Sekundärstruktur [113] der DNAzyme 9NL27 modifiziert (A), 13PD1 modifiziert (B) und D-zyme (C) oben, sowie der designten Substrate 9NL27-MB (A), 13PD1-MB (B) sowie D-zyme-MB und D-zyme-MB (C) unten; mittels RNAfold vorhergesagte Faltung und Ermittlung der MFE mit dem Matthews Modell

- Kalibrierung

Die Ermittlung der Wechselzahl der ausgewählten DNAzyme erfolgte fluorimetrisch (zumeist im Platereader: λ_{ex}: 485 nm; λ_{em}: 535 nm). Um den Substratumsatz berechnen zu können, wurde eine Kalibiergerade unter Einsatz des Fluorophors ATTO 488 erstellt. In einem Konzentrationsbereich von 0,2 bis 20 nM ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Fluoreszenzintensität; die Nachweisgrenze betrug 0,13 nM. Zur Ermittlung der Fluoreszenzintensität wurden je dreimal 200 µl der jeweiligen Kalibrierlösung in untereinanderliegende Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert (Dreifachbestimmung).

- Messung des Substratumsatzes im Platereader

Der Annealing Puffer [118,119,124,125], der sowohl das DNAzym als auch das dazugehörige Substrat enthielt, wurde zunächst für 1 min auf 95 °C erhitzt, dann für 5 min auf Eis gekühlt und anschließend 2 min auf die jeweilige Reaktionstemperatur erwärmt. Zeitgleich wurde der Reaktionspuffer [118,119,124,125], der die notwendigen Cofaktoren enthält, temperiert. 100 µl Annealing Puffer wurden in einem Well einer Mikrotiterplatte (Black Bottom) und mit 100 µl Reaktionspuffer versetzt. Die Fluoreszenzintensität wurde zeitabhängig ermittelt (bis zu 1 h mit einminütigen Messinterval-

len). Die Anregung des ATTO 488 erfolgte bei 485 nm; die Emission wurde bei 535 nm gemessen. Als Blank wurden 100 µl Annealing Puffer (ohne DNAzym) und 100 µl Reaktionspuffer zusammen pipettiert.

Der Substratumsatz wurde abhängig von der Konzentration an DNAzym, dem Verhältnis von DNAzym zu Substrat, der Konzentration an Cofaktor und der Reaktionstemperatur (25 °C, 37 °C oder 42 °C) ermittelt und die Wechselzahl bestimmt.

- Charakterisierung des DNAzyms 9NL27 [119]

Für das DNAzym 9NL27 [119] wurde bei einer äquimolaren Konzentration von DNAzym zu Substrat von 200 nM und einer Konzentration des Cofaktors von 1 mM Zn^{2+} bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C die höchste Wechselzahl von $2{,}9*10^{-3}$ min^{-1} bestimmt. Dieser Wert liegt deutlich unter dem in der Literatur angegebenem Wert von 1,2 min^{-1} [119] (s. auch Tab. 7). Bei einer Reaktionstemperatur von 42 °C wurde nur eine geringfügig niedrigere Wechselzahl bestimmt, während bei Reaktionstemperatur von 25 °C die ermittelte Wechselzahl deutlich geringer war. Auch durch Steigerung der Substratkonzentration konnte keine Erhöhung der Wechselzahl bzw. keine Beschleunigung des Substratumsatzes erzielt werden.

- Charakterisierung des DNAzyms 13PD1 [118]

Für das DNAzym 13PD1 [118] wurde bei einer äquimolaren Konzentration von DNAzym zu Substrat von 200 nM und einer Konzentration des Cofaktors von 1 mM Zn^{2+} bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C die höchste Wechselzahl von $2{,}01*10^{-3}$ min^{-1} bestimmt. Dieser Wert liegt etwa um einen Faktor 10 unter dem in der Literatur angegebenem Wert für dieses DNAzym [119] (s. auch Tab. 7). Bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C und 42 °C wurde unter ansonsten gleichen Bedingungen eine geringere Wechselzahl ermittelt. Sowohl die Reduktion als auch die Erhöhung der Reaktionstemperatur führte demzufolge zu einem verminderten Substratumsatz. Auch durch eine Steigerung der Cofaktorkonzentration konnte keine Erhöhung der Wechselzahl erreicht werden.

- Charakterisierung des DNAzyms D-Zyme [124]

Für das DNAzym D-Zyme [124] wurde abhängig von den Versuchsbedingungen eine Wechselzahl zwischen $9{,}9*10^{-3}$ min^{-2} und $1{,}5*10^{-2}$ min^{-2} bestimmt; auch bei diesem DNAzym lag der ermittelte Wert deutlich unter dem in der Literatur angegebenen Wert von 0,57 min^{-1} [124] (s. auch Tab. 7). Den größten Einfluss auf die zu ermittelnde Wechselzahl hatte dabei die Konzentration von Cofaktor (10 nM, 20 nM und 30 nM) und NaCl (50 nM, 100 nM und 200 nM) im Reaktionspuffer. Ferner wurde bei einer Konzentration von 200 nM DNAzym und 400 nM Substrat eine geringfügig höhere Wechselzahl ermittelt als bei einer äquimolaren Konzentration von 200 nM. Die Reaktionstemperatur (25 °C und 37 °C) hat ebenfalls nur einen geringen Einfluss auf die ermittelte Wechselzahl.

Zusammenfassend war festzustellen, dass obwohl in der Literatur für einige der untersuchten DNAzyme Wechselzahlen von ≥ 1 angegeben sind, solch hohe Wechselzahlen auch nach Optimierung der Reaktionsbedingungen nicht erreicht werden konnten. Zu bedenken war, dass bei Verwendung von Molecular Beacons das Fluoreszenzsignal bereits bei Hybridisierung des Substrats mit dem DNAzym entsteht und somit die Substratspaltung nur nachgewiesen werden kann, wenn die Konzentration an gespaltenem Substrat signifikant höher ist als die Konzentration an DNAzym im Ansatz. Die experimentell gewonnenen Daten lassen sich wie folgt interpretieren:

1. Die Substratstränge verbleiben nach der Spaltung durch das DNAzym im hybridisierten Zustand und lassen sich nicht bzw. nur mit sehr geringer Geschwindigkeit von nicht gespaltenen Substratsträngen verdrängen.
2. Die gespaltenen Substratstränge hybridisieren miteinander, da keine Fängeroligonukleotide (s. Kap. 2.5) zugegen waren, mit denen die am Fluorophor gebundenen Substratteilstränge hybridisieren können.
3. Das DNAzym spaltet die Substratstränge nicht.

Am wahrscheinlichsten ist jedoch, dass die Schmelztemperatur durch die Substratspaltung nicht weit genug herabgesetzt wurde, um die Hybridisierung der Substratstrangteile mit dem DNAzym aufzuheben. Als Schmelztemperatur wird die Temperatur bezeichnet, bei der 50 % der Stränge hybridisiert und 50 % als Einzelstränge vorliegen. Im Rahmen der Entwicklung eines Verfahrens zur Fluoreszenzquantifizierung von Endosporen (s. Kap. 2.6) wurde daher untersucht, ob sich durch Erwärmung ein Substratwechsel erzwingen lässt.

Um eine Fluoreszenzlöschung durch Hybridisierung der gespaltenen Substratstrangteile auszuschließen und um die Substratspaltung direkt nachweisen zu können, wurde in weiteren Untersuchungen (s. Kap. 2.4) das DNAzym DET22-18 [125] und das dazugehörige lineare Substrat DET22-18-LS, welches eine Ribonukleotidschnittstelle enthält, verwendet; dieses DNAzym wurde in vorhergehenden Arbeiten [51b] der Forschungseinrichtung umfassend charakterisiert. Dabei ließen sich bei Verwendung von Mn^{2+}-Ionen als Cofaktor unter optimierten Reaktionsbedingungen Wechselzahlen von $2*10^{-2}$ min^{-1} erreichen; ein Fluoreszenzsignal wird zudem nur bei Spaltung des linearen Substrats generiert.

⇨ **Das Ziel des Arbeitsschrittes 3 wurde teilweise erreicht.**

2.4 Entwicklung der Aptazyme bzw. Aptazympaare

⇨ *Ziel des Arbeitsschrittes 4:*

Ziel des Arbeitsschrittes 4 war, Aptazyme zu entwickeln, die allosterisch kontrolliert sind, indem Aptamere (s. Kap. 2.2) mit Nukleozymen (s. Kap. 2.3) gekoppelt wurden.

⇨ *Durchgeführte Arbeiten und erzielte Ergebnisse:*

Aptazyme können Liganden binden und katalytisch wirken [21]. Bei allosterisch kontrollierten Aptazymen führen Konformationsänderungen in der das Zielmolekül bindenden Region (Aptamerdomäne) bei Bindung des Zielmoleküls zu einer Änderung in der katalytischen Region (Nukleozymdomäne), die sich auf die katalytische Aktivität auswirkt.

Zur Entwicklung von Aptazymen wurden exemplarisch das DNAzym DET22-18 [125] und das Aptamer BacApt3 [79], welches sich gegen Endosporen des Bakteriums *B. cereus* richtet, verwendet. Zum Nachweis der katalytischen Aktivität wurde das lineare Substrat DET22-18-LS [125] eingesetzt, welches eine Ribonukleotidschnittstelle enthält (s. Tab. 10).

Tab. 10: Sequenzen des ausgewählten Aptamers, des ausgewählten *trans*-agierenden DNAzyms und des aus der Koppelung resultierenden Aptazyms sowie des linearen Substrats

Bezeichnung	Sequenz [1] (5' → 3')	Cofaktor	Wechselzahl [min^{-1}]
BacApt3 [79]	**CATCCGTCACACCTGCTC**GGTGCAGAC-CCATAGGGGGGGCGTGCGGATGTAGGAG-TAG**GGTGTTGGCTCCCGTATC**	---	
DET22-18 [125] [2]	AAGAATCGTTGTCATTGGCACACGGAGGTTTACTGAGTGGTAACCA-CGTTGCATGGAA	Co^{2+}, Mn^{2+}	7,2
BacApt3-DET22-18 [3]	CATCCGTCACACCTGCTCGGTGCAGAC-CCATAGGGGGGGCGTGCGGATGTAGGAG-TAGGGTGTTGGCTCCCGTATCAAGAATCGTTGTCATTGGCACACGG AGGTTTACTGAGTGGTAACCACGTTGCATGGAA	Mn^{2+}	---
DET22-18-LS [125]	GATGTGTCCGTGC[Fluorescein]a[Dabcyl]GGTTCGATTCTTGTGACT	---	

[1] Fettgedruckte Basen geben Primersequenzen wieder. [2] DET22-18 schneidet einen DNA-Strang mit Ribonukleotidschnittstelle (Substrat mit einem einzelnen Ribonukleotid im Strang), die in der Literatur angegebene Wechselzahl wurde bei Verwendung von Co^{2+} als Cofaktor bestimmt, [3] ausgewählter Cofaktor, [4] Schnittstelle bzw. Ribonukleotid rot dargestellt

Die Faltung der DNAzyme und der Substrate wurde mit RNAfold WebServer [113] vorhergesagt. Die Sekundärstruktur des DNAzym DET22-18 [125] und des lineares Substrates DET22-18-LS [125] wurden mit RNAfold WebServer [113] vorhergesagt (s. Abb. 4).

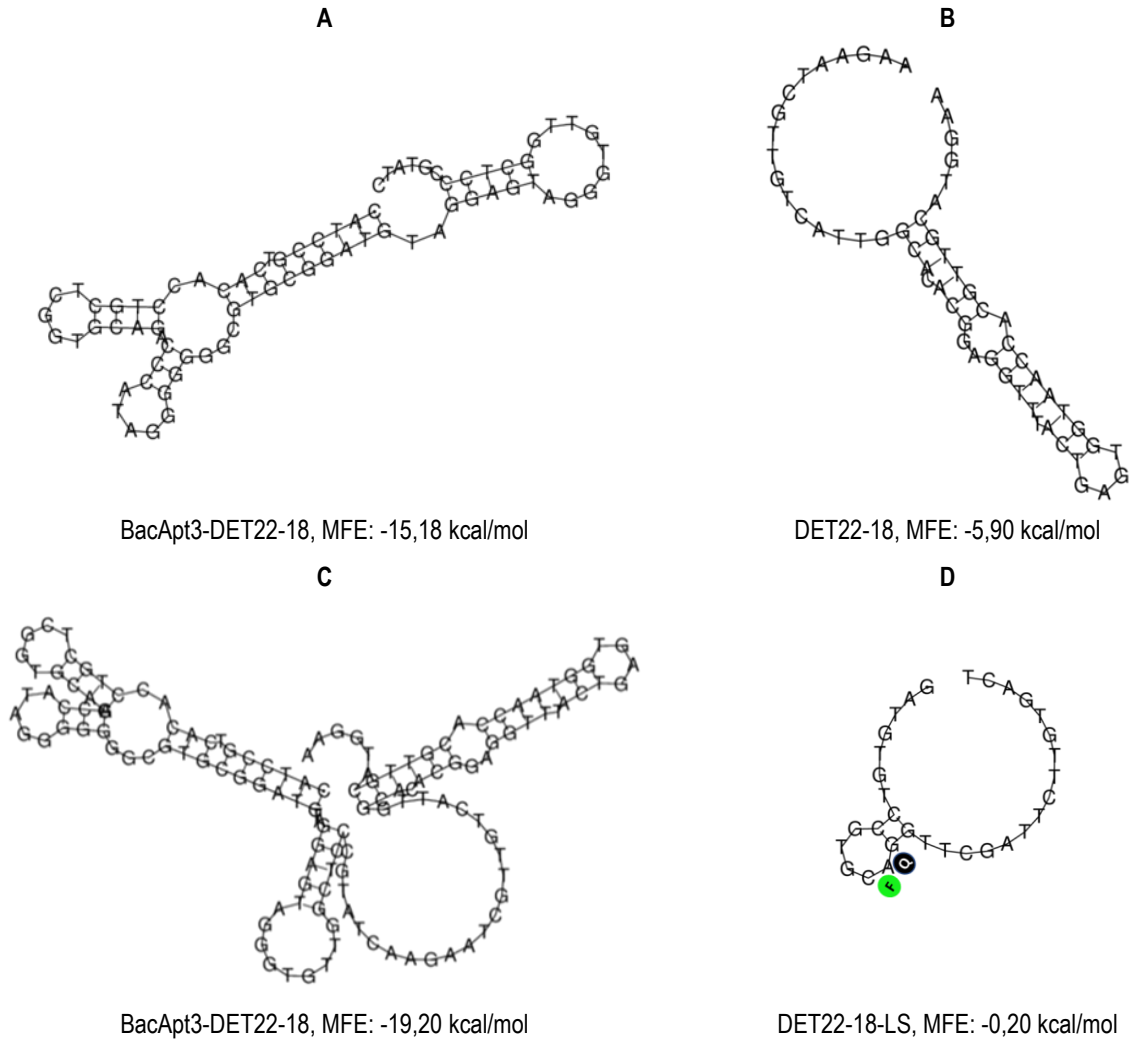


Abb. 4: Sekundärstruktur des Aptazyms BacApt3-DET22-18 (A), des DNAzyms DET22-18 (B), des Aptazyms BacApt3-DET22-18 (C) und des Substrats DET22-18-LS (D); mittels RNAfold [113] vorhergesagte Faltung und Ermittlung der MFE mit dem Matthews Modell

2.4.1 Ligation eines Aptamers mit einem DNAzym

Zunächst wurde eine Methode zur enzymatischen Ligation eines Aptamers mit einem DNAzym zu einem Aptazym etabliert. Dazu wurde das Aptamer BacApt3 (s. Kap. 2.2), das sich gegen Endosporen des Bakteriums *B. cereus* richtet und das DNAzym DET22-18 (s. Kap. 2.3) ausgewählt. Die Ligation erfolgte in zwei Schritten: Das DNAzym DET22-18 wurde an beiden Enden phosphoryliert bezogen [99], um die Entstehung von ketten- oder ringförmigen Molekülen durch Bindung der adenylierten Enden an freie 3'-OH-Enden während der Ligation zu vermeiden. Im ersten Schritt wurde das DET22-18 an dessen phosphoryliertem 5‘-Ende mittels 5‘-DNA Adenylation Kit [126a] adenyliert. Im zweiten Schritt wurde das BacApt3 mittels Thermostable 5‘-App-DNA/RNA Ligase Kit [126b] an das adenylierte Ende des DNAzyms ligiert.

- Adenylierung des DNAzyms (1. Schritt)

Die Adenylierungsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Reagenz	Ausgangskonz.	Volumen	Endkonz.
p-DET22-18-p (DNAzym)	100 µM	2,5 µl	5 µM
5´ DNA Adenylation Reaction Buffer	10x	5,0 µl	1x
ATP-Lösung	1 mM	5,0 µl	100 µM
Mth RNA Ligase	50 µM	5,0 µl	5 µM
Nuclease-free Water	-	*ad* 50,0 µl	-

Da das in der Adenylierungsreaktion enthaltene ATP die anschließende Ligation inhibieren kann, war eine Aufreinigung erforderlich. Um ausreichend Adenylierungsprodukt für die Aufreinigung zu erhalten, wurde die Adenylierungsreaktion mit zwei Ansätzen durchgeführt. Die beiden Ansätze wurden 1 h bei 65 °C im Thermocycler inkubiert (Deckeltemperatur: 65 °C); anschließend wurde die Ligase für 5 min bei 85 °C hitzeinaktiviert und die Ansätze bis zum weiteren Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Die Aufreinigung der Adenylierungsprodukte erfolgte unter Einsatz des Monarch® PCR & DNA Cleanup Kits [126c] nach Herstellerangaben; die aufgereinigten Produkte wurden gepoolt. Die Konzentration an DNA wurde mit dem NanoDrop bestimmt. Anhand der ermittelten DNA-Konzentration wurde die einzusetzende Menge für die nachfolgende Ligationsreaktion berechnet.

- Ligation des adenylierten DNAzyms mit dem Aptamer (2. Schritt)

Die Ligationsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Reagenz	Ausgangskonz.	Volumen	Endkonz.
Aptamer BacApt3	1 µM	5 µl	0,25 µM
5´ App DET22-18-p [1)]	[2)]	[2)]	2,5 µM
NEBuffer 1	10x	2 µl	1x
$MnCl_2$	50 mM	2 µl	5 mM
Thermostable 5´ App DNA/RNA Ligase	20 µM	1 µl	1 µM
Nuklease-freies Wasser	-	*ad* 20 µl	-
[1)] aufgereinigtes Adenylierungsprodukt [2)] Eingesetzte Menge wurde anhand der NanoDrop Messergebnisse berechnet.			

Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 65 °C im Thermocycler inkubiert (Deckeltemperatur: 65 °C); anschließend wurde die Ligase für 3 min bei 90 °C hitzeinaktiviert und die Ansätze bis zum weiteren Gebrauch bei 4 °C gelagert.

- Überprüfung des Ligationserfolgs

Um das Ligationsprodukt gelelektrophoretisch nachweisen zu können, musste dieses zunächst mittels PCR vervielfältigt werden. Zur Amplifikation des Aptazyms BacApt3-DET22-18 wurden spezifische Primer designt.

Die PCR-Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Komponente	Ausgangskonz.	Volumen	Endkonz.
ThermoPol Reaction Buffer	10x	2,5 µl	1x
dNTP Mix	10 mM	0,5 µl	200 µM
BacDetF (forward Primer)	10 µM	0,5 µl	0,2 µM
BacDetR (reverse Primer)	10 µM	0,5 µl	0,2 µM
Taq DNA Polymerase	5U/µl	0,25 µl	1,25 U
Nuclease-freies Wasser	-	*ad* 24 µl	-

Dem PCR-Ansatz wurden 1 µl des inkubierten Ligationsansatzes (s. o.) zugesetzt. Als Kontrollen dienten mit 1 µl BacApt3-DET22-18 (1 µM, Positivkontrolle) bzw. 1 µl Nuclease-freiem Wasser (Negativkontrolle) versetzte Ansätze.

Die PCR erfolgte nach dem folgenden Programm:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	300	1x
Denaturierung	95	30	35x
Annealing	58	30	
Elongation	68	15	
Finale Elongation	68	300	1x
Lagerung	12	∞	---

Um das Ligationsprodukt gelelektrophoretisch nachzuweisen (s. Abb. 5), wurden im Anschluss an die PCR 10 µl des jeweiligen Ansatzes in die Taschen eines 3%igen Agarosegels (versetzt mit Midori Green Advance [109]) pipettiert; die Auftrennung erfolgte 1 h bei 80 V.

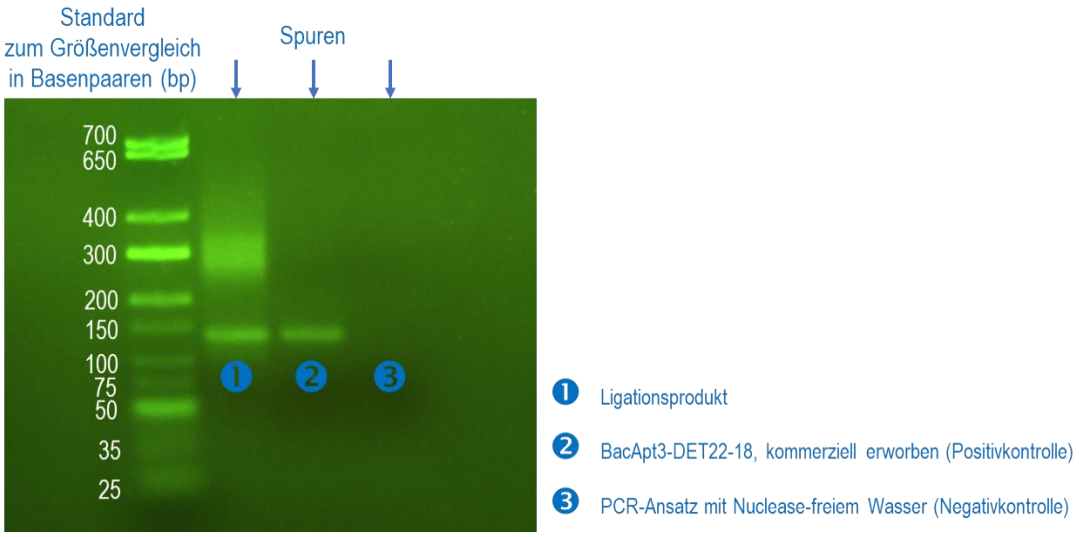


Abb. 5: Das Ligationsprodukt ist als Bande in erwarteter Höhe von 134 bp in Spur 1 sichtbar; zum Vergleich ist kommerziell bezogenes BacApt3-DET22-18 in Spur 2 dargestellt (Positivkontrolle), keine Bande in der Negativkontrolle sichtbar

Das Ligationsprodukt ist als deutliche Bande in erwarteter Höhe von 134 bp (Spur 1) sichtbar. Allerdings war die Ausbeute an Ligationsprodukt gering.

Neben der enzymatischen Ligation kann ein Aptazym auch durch bioinformatisches Design (*in silico*) generiert und anschließend kommerziell bezogen werden. Dabei können unter Verwendung spezieller Software (z. B. RNAfold WebServers [113]) Sequenzen eines Aptamers und eines DNAzyms beliebig miteinander verknüpft und deren Faltung bzw. intramolekulare Hybridisierung vorhergesagt werden. Schmelztemperaturen können berechnet und Sequenzhomologien können erkannt werden; anhand der dargestellten Sekundärstrukturen können indirekt Rückschlüsse auf die Bindungsfähigkeit der Aptamerdomäne an ihrer Zielstruktur und auf die katalytische Aktivität der DNAzymdomäne gezogen werden. Aufgrund dieser Vorteile ist das computergestützte Aptazymdesign der enzymatischen Ligation vorzuziehen.

2.4.2 Charakterisierung des Aptazyms

Das exemplarisch generierte Aptazym BacApt3-DET22-18 wurde hinsichtlich seiner katalytischen Aktivität und Bindungsfähigkeit an Endosporen des Bakteriums *B. cereus* charakterisiert.

- Ermittlung der katalytischen Aktivität des Aptazyms

Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität wurden die Aptazym- bzw. DNAzymlösung und die Substratlösung für 1 min auf 95 °C erhitzt und dann für 5 min auf Eis gekühlt. 198 µl DP15-Puffer [51b] wurden in einem Well einer Mikrotiterplatte (Black Bottom) vorgelegt und mit 1,6 µl Substratlösung und 0,4 µl Aptazym- bzw. DNAzymlösung versetzt. Die Fluoreszenzintensität wurde zeitabhängig ermittelt (bis zu 6 h). Die Anregung des Fluoresceins erfolgte bei 488 nm; die Emission wurde bei 530 nm gemessen (Gain = 40 %).

Der Substratumsatz wurde bei einer Konzentration von 800 nM DET22-18-LS [125] und 200 nM BacApt3-DET22-18 (Aptazym) oder 200 nM DET22-18 [125] gemessen (s. Abb. 6, s. Tab. 10). Als Kontrollen dienten der DP15-Puffer [51b] und 800 nM DET22-18LS [125] gelöst in DP15-Puffer.

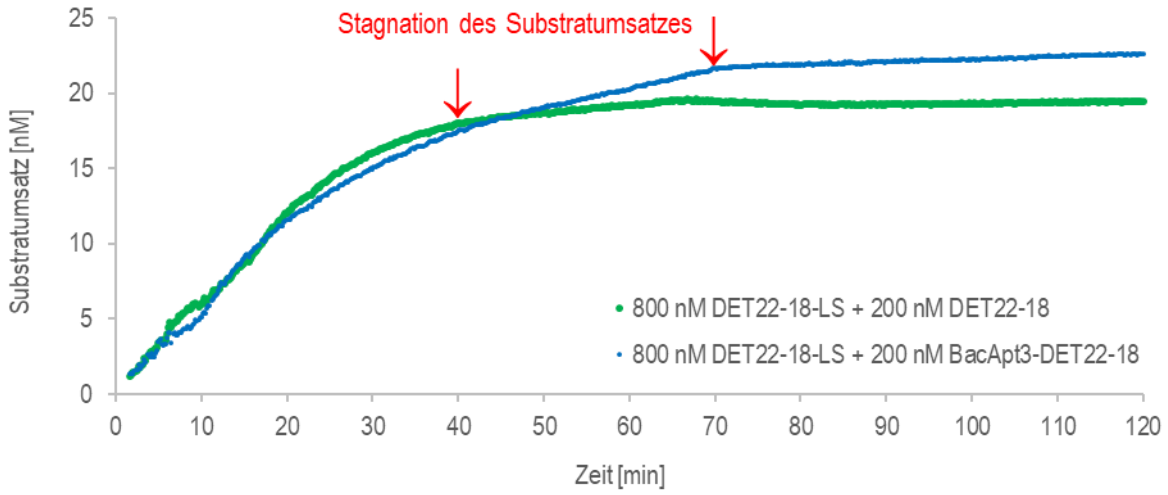


Abb. 6: Vergleichend dargestellt ist der Substratumsatz bei einer Konzentration von 200 nM BacApt3-DET22-18 (Aptazym, blau) bzw. 200 nM DET22-18 (DNAzym, grün) und 800 nM DET22-18-LS (Substrat) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, gemessen im Platereader (Gain = 40 %)

Sowohl das Aptazym BacApt3-DET22-18 als auch das DNAzym DET22-18 [125] konnten das lineare Substrat DET22-18-LS [125] spalten. Der Substratumsatz stagnierte nach einer Inkubationszeit von etwa 70 min bzw. 40 min; bis zu diesem Zeitpunkt wurde nur ein geringer Anteil des Substrats gespalten. Die für das Aptazym und das DNAzym ermittelte Wechselzahl lag bei $2{,}8*10^{-3}$ min^{-1}. Das DET22-18-LS (Substrat) war über die Messdauer stabil.

- Nachweis der katalytischen Aktivität des an Sporen gebundenen Aptazyms

Ferner wurde die katalytische Aktivität des Aptazyms BacApt3-DET22-18 nach Bindung an Endosporen des Bakteriums *B. cereus* untersucht. Die Endosporen (s. Kap. 2.1.2) wurden zweimal in sterilem VE-Wasser gewaschen, indem die Sporen zentrifugiert (für 5 min bei 10.000 g), der Überstand verworfen und die Sporen wieder resuspendiert wurden; anschließend wurde das Pellet in MSB-Puffer [79] aufgenommen. 20 µl der Sporensuspension wurde mit 180 µl MSB-Puffer verdünnt; danach wurde die Sporensuspension mit 1 µl BacApt3-DET22-18 (1 µM) versetzt und 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Um ungebundenes Aptazym zu entfernen, wurden die Sporen pelletiert (durch Zentrifugation 5 min bei 10.000 g) und in DP15-Puffer [51b] wieder aufgenommen.

Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität des an Endosporen gebundenen Aptazyms wurden 198,4 µl der Sporensuspension (entspr. 10^6 Sporen, s. o.) in einem Well einer Mikrotiterplatte (Black Bottom) vorgelegt und mit 1,6 µl Substratlösung (DET22-18-LS [125]) versetzt. Die Fluoreszenzintensität wurde zeitabhängig ermittelt (bis zu 6 h). Die Anregung des Fluoresceins erfolgte bei 488 nm; die Emission wurde bei 530 nm gemessen (Gain = 40 %). Als Kontrolle diente 800 nM -DET22-18-LS [125] gelöst in DP15-Puffer.

Das Aptazym wies auch nach Bindung an Endosporen eine katalytische Aktivität auf. Zudem wurde die Bindung des Aptazyms an die Endosporen mikroskopisch visualisiert (s. Abb. 7).

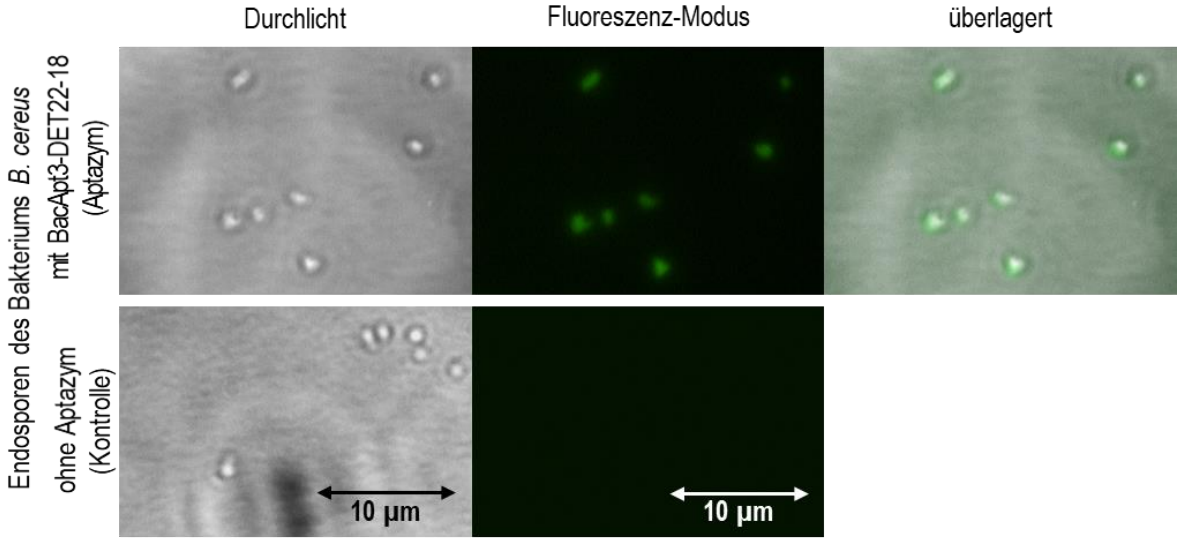


Abb. 7: Mikroskopische Aufnahmen von Endosporen des Bakteriums *B. cereus* nach der Inkubation mit dem Aptazym des BacApt3-DET22-18 (oben) und vor der Inkubation (unten) im Phasenkontrast (links) und im Fluoreszenzmodus (Mitte), gleicher Bildausschnitt, übereinandergelegtes Bild beider Aufnahmen (rechts)

Zusammenfassend war festzustellen, dass eine enzymatische Ligation von Aptamer und DNAzym zu einem Aptazym möglich ist, die zu erzielenden Ausbeuten an Ligationsprodukt waren sehr gering. Das bioinformatische Design ist daher der enzymatischen Ligation vorzuziehen, zumal dabei u. a. auch Informationen über die Sekundärstruktur des Aptazyms (Faltung) gewonnen werden. Sowohl das Aptazym BacApt3-DET22-18 als auch das DNAzym DET22-18 [125] waren in der Lage, das lineare Substrat DET22-18-LS [125] zu spalten. Die katalytische Aktivität des Aptazyms und des DNAzyms unterschieden sich nur geringfügig; folglich war das Aptazym nicht allosterisch kontrolliert. Die Bindung des BacApt3-DET22-18 an Endosporen des Bakteriums *B. cereus* konnte nachgewiesen werden; das gebundene Aptazym war katalytisch aktiv.

Diese Ergebnisse stützen die zuvor aufgestellte Hypothese (s. Kap. 2.3), dass die Substratstränge nach der Spaltung durch das DNAzym im hybridisierten Zustand verbleiben und sich nicht bzw. nur mit sehr geringer Geschwindigkeit von ungespaltenen Substratsträngen verdrängen lassen. Bei linearen Substraten entsteht das Fluoreszenzsignal nur bei Substratspaltung; ferner ist eine Hybridisierung der gespaltenen Substrate aufgrund deren Sequenz nicht zu erwarten.

Ein fluoreszenzmikroskopischer Nachweis hygienerelevanter Endosporen unter Einsatz eines Aptazyms ist somit möglich; eine Quantifizierung kann durch Auszählen der fluoreszierenden Sporen z. B. unter Verwendung eines Zählgitters erfolgen.

⇨ **Das Ziel des Arbeitsschrittes 4 wurde teilweise erreicht.**

2.5 Entwicklung eines speziell funktionalisierten Beprobungsmediums

⇨ *Ziel des Arbeitsschrittes 5:*

Ziel des Arbeitsschrittes 5 war, ein Beprobungsmedium zu entwickeln, mit dem sich Endosporen analog zu herkömmlichen Abklatschplatten (basierend auf Agar) von Oberflächen abnehmen lassen und das es zudem ermöglicht, die bei Substratspaltung freigesetzten Fluorophore unmittelbar am Ort ihrer Freisetzung zu binden.

⇨ *Durchgeführte Arbeiten und erzielte Ergebnisse:*

Um die nach Bindung der Aptazyme an die Zielmoleküle freigesetzten, fluoreszenzmarkierten Substratstrangteile durch Hybridisierung am Ort der Substratspaltung zu binden, wurden komplementäre Stränge, im Folgenden als Fängeroligonukleotide bezeichnet, in das Medium eingebracht. Dazu wurden 10 ml CASO Boullion mit 100 mg Low Melt Agarose versetzt, in der Mikrowelle erhitzt und 5 min abkühlen gelassen. 498 µl des noch flüssigen Agars wurden mit 2 µl des fluoreszenzmarkierten Fängeroligonukleotids (Endkonz.: 400 nM, Fluorophor: TAMRA) versetzt und als dünner Film auf einem Glasobjektträger aushärten gelassen. Die Pads wurden mit einer Lösung eines fluoreszenzmarkierten, zum Fängeroligonukleotid komplementären Strangs (Fluorophor: ATTO 488), im Folgenden als Zielsequenz bezeichnet, überschichtet und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Nach Abspülen der Medienoberfläche mit VE-Wasser zur Entfernung ungebundener Zielsequenzen wurden die Pads fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Nach Einbringen der mit dem Fluorophor TAMRA markierten Fängeroligonukleotide in die Agarpads wiesen diese im Vergleich zur Kontrolle (natives Agarmedium) eine starke Fluoreszenz im Bereich von 607 nm bis 682 nm auf. Nach Inkubation der Agarpads mit den zu immobilisierenden Zielsequenzen, die mit dem Fluorophor ATTO 488 markiert waren, wiesen die Agarpads, die Fängeroligonukleotide enthielten, eine starke Fluoreszenz bei 520 nm im Vergleich zur Kontrolle auf. Daraus folgt, dass die Fängeroligonukleotide im Agarmedium immobilisiert vorlagen und dass die Fängeroligonukleotide die Zielsequenzen abfangen bzw. binden konnten.

Zur Immobilisierung der Fängeroligonukleotide auf Membranen (z. B. aus Nylon- oder Polyester) sind kommerziell erhältliche Produkte verfügbar [127-129]. Dies kann erforderlich sein, um einen Nachweis von Endosporen in Prozesswässern zu ermöglichen, da in diesem Fall eine Konzentrierung der Sporen durch Filtration notwendig ist.

Zusammenfassend war festzustellen, dass durch Einbringen von Fängeroligonukleotiden mit komplementärer Sequenz zu dem Substratstrangteil, an dem das Fluorophor gebunden ist, in ein Agarmedium eine Immobilisierung der bei Substratspaltung freigesetzten Fluorophore am Ort ihrer Freisetzung möglich ist.

⇨ **Das Ziel des Arbeitsschrittes 5 wurde erreicht.**

2.6 Entwicklung des Verfahrens zur Fluoreszenzquantifizierung

⇨ *Ziel des Arbeitsschrittes 6:*

Ziel des Arbeitsschrittes 6 war es, Endosporen unter Einsatz von Aptazymen bzw. Aptazympaaren nachzuweisen bzw. durch Auszählen um die Sporen gebildeter fluoreszierender Spots zu quantifizieren.

⇨ *Durchgeführte Arbeiten und erzielte Ergebnisse:*

Um ein visuell wahrnehmbares Fluoreszenzsignal (Spot) auf dem Beprobungsmedium zu erhalten, müssen die durch Bindung an das jeweilige Zielmolekül aktivierten Aptazyme eine Vielzahl von Substratsträngen schneiden. Die zuvor erzielten Ergebnisse legten jedoch nahe, dass sich die gespaltenen Substratstrangteile nicht mehr vom DNAzymstrang bzw. der DNAzymdomäne des Aptazyms lösen, sondern im hybridisierten Zustand verbleiben. Um den Substratwechsel zu erzwingen, wurden Ansätze mit Aptazym und Substrat einer thermozyklischen Behandlung (mehrfaches Erwärmen und wieder Abkühlen in einem qPCR Thermocycler) unterzogen.

Die thermozyklische Behandlung erfolgte nach dem folgenden Programm:

Schritt	Temperatur [C]	Zeit [s]	1. Zyklus	2. Zyklus
1. Initiale Denaturierung	90	10		
2. Denaturierung	90	180		
3. Annealing	25	60	7x	5x
4. Elongation	25	120		
5. Elongation	25	120		
FLUORESZENZMESSUNG				
6. Kühlung	4 °C	∞		

Bei thermozyklischer Behandlung konnte nahezu das gesamte im Ansatz vorhandene Substrat von dem Aptazym gespalten werden (s. Abb. 8).

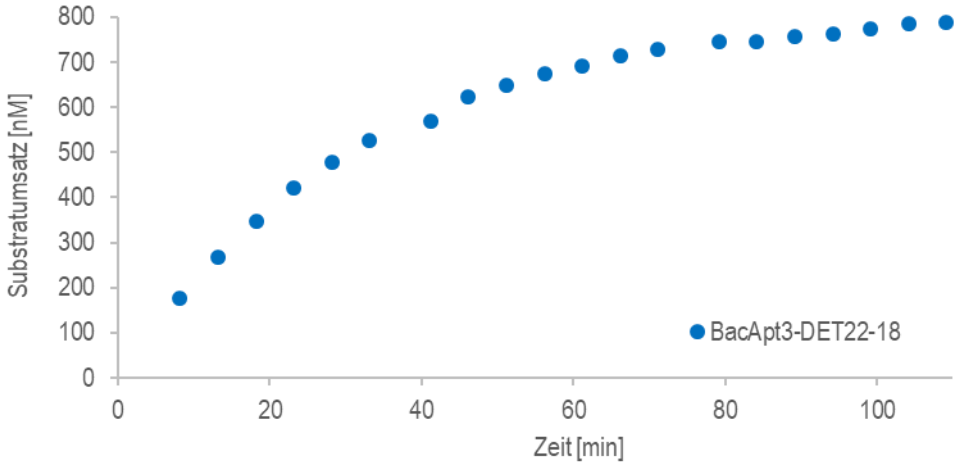


Abb. 8: Substratumsatz bei einer Konzentration von 200 nM BacApt3-DET22-18 (Aptazym) und 800 nM DET22-18-LS (Substrat) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei thermozyklischer Behandlung (20 Zyklen)

Da das Substrat im vierfachen Überschuss vorlag, muss demzufolge ein Substratwechsel stattgefunden haben. Das DET22-18-LS (Substrat) war über die Messdauer stabil. Da die zu erzielende Wechselzahl auch von der Zyklusdauer abhing, war diese unter den vorliegenden Versuchsbedingungen nicht aussagekräftig.

Zusammenfassend war festzustellen, dass bei thermozyklischer Behandlung nahezu das gesamte im Ansatz vorhandene Substrat von dem Aptazym gespalten werden konnte. Da das Substrat im vierfachen Überschuss vorlag, war davon auszugehen, dass ein Substratwechsel erfolgt ist. Eine thermozyklische Behandlung des mit einer Lösung aus Aptazymen bzw. Aptazympaaren und Substrat überschichteten Beprobungsmediums ist aufgrund der zu erwärmenden und abzukühlenden Masse (ca. 20 ml Medium) mit einem hohen Zeitbedarf verbunden. Ferner konnte im Rahmen des Forschungsprojektes kein allosterisch kontrolliertes Aptazym generiert werden: Bei dauerhaft aktiven Aptazymen ist es nicht möglich, wie in der Arbeitshypothese postuliert, das Fluoreszenzsignal zu verstärken, indem der bei Substratspaltung freisetzte Quencher (induziertes Zielmolekül), dazu verwendet wird, das zweite Aptazym des Aptazympaares zu aktivieren. Vor diesem Hintergrund war davon auszugehen, dass sich auf dem Beprobungsmedium keine visuell wahrnehmbaren Spots um die nachzuweisenden Sporen generieren lassen und somit eine Fluoreszenzquantifizierung von Endosporen durch Auszählen fluoreszierender Spots nicht möglich ist.

⇨ **Das Ziel des Arbeitsschrittes 6 wurde nicht erreicht.**

2.7 Erprobung des Verfahrens unter praxisnahen Bedingungen

⇨ *Ziel des Arbeitsschrittes 7:*

Ziel des Arbeitsschrittes 7 war, das entwickelte Verfahren zu erproben und hinsichtlich seiner Handhabung zu bewerten.

⇨ *Durchgeführte Arbeiten und erzielte Ergebnisse:*

Das Nachweisprinzip, die erzielten Ergebnisse sowie die sich bei der Projektbearbeitung ergebenden Herausforderungen wurden mit den Mitgliedern des Projektbegleitenden Ausschusses und weiteren Experten, insbesondere Herstellern von molekularbiologischen Nachweisagenzien, intensiv diskutiert.

Da aus den Projektergebnissen zu schließen ist, dass sich die in der Arbeitshypothese der Beschreibung zum Forschungsantrag postulierte Signalverstärkung durch Aktivierung des zweiten Aptazyms bei Bindung an das induzierte Zielmolekül, den bei Substratspaltung durch das erste Aptazym freigesetzten Quencher, ohne eine thermozyklische Behandlung nicht realisieren lässt, muss davon ausgegangen werden, dass auf einem Beprobungsmedium keine visuell wahrnehmbaren Spots um die nachzuweisenden Sporen entstehen. Da eine thermozyklische Behandlung des mit einer Lösung aus Aptazymen und Substrat überschichteten Beprobungsmediums aufgrund der zu erwärmenden und abzukühlenden Masse (ca. 20 ml Medium) u. a. mit einem hohen Zeitbedarf verbunden ist, wurde dieses Vorgehen als nicht praktikabel angesehen. Zudem besteht die Gefahr, dass die Erwärmung nicht nur zu einer Ablösung der gespaltenen Substratstränge von der DNAzymdomäne des Aptazyms führt, sondern auch zu einer Ablösung der Aptamerdomäne von der Zielstruktur und somit von der Sporenoberfläche. Das Ablösen der Aptazyme von der Zielstruktur führt bei allosterisch kontrollierten Aptazymen zu deren Inaktivierung bzw. dem Verlust der katalytischen Aktivität.

Da jedoch gezeigt werden konnte, dass Endosporen eines hygienerelevanten Bakteriums mit Aptazymen belegt und somit markiert werden können und eine Substratspaltung an der Sporenoberfläche erfolgt, empfiehlt es sich, im Rahmen eines weiteren Projektes einen anderen Mechanismus zur Signalverstärkung zu entwickeln (s. auch Kap. 6).

⇨ **Das Ziel des Arbeitsschrittes 7 wurde teilweise erreicht.**

3 Verwendung der Zuwendung

Die Durchführung der unten beschriebenen Untersuchungen erfolgte im Berichtszeitraum durch wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans) im Umfang von insgesamt 18,2 Personenmonaten.

Zur Sequenzierung gegen die ausgewählten Zielmoleküle entwickelter Aptamere (s. Kap. 2.2) waren ursprünglich Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplanes, Eurofins Genomics GmbH, 3.627,12 €) beantragt. Im Rahmen der Projektbearbeitung zeigte sich jedoch, dass sowohl Aptamere, die sich gegen primäre Zielmoleküle auf der Sporenoberfläche von *C. difficile* und *B. cereus* richten, als auch ein Aptamer, das sich gegen das induzierte Zielmolekül, den BHQ-1-Quencher, richtet, durch Literaturrecherchen identifiziert werden konnten und die Sequenzen somit bekannt waren; daher wurden die beantragten Leistungen Dritter nicht benötigt.

4 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Ausgaben während der Projektlaufzeit waren für die Durchführung der geleisteten Arbeit notwendig und angemessen. Die im Berichtszeitraum durchgeführten Arbeiten stellen die Umsetzung der im Forschungsantrag vorgesehenen Arbeitsschritte dar und sind für die Erreichung des Forschungsziels wichtig. Die geleisteten Arbeiten waren zur Bearbeitung der genannten Arbeitspakete erforderlich.

5 Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

5.1 Durchgeführte spezifische Transfermaßnahmen während der Projektlaufzeit

Maßnahme	Ziel	Ort/Rahmen	Datum/Zeitraum
wfk-Homepage	Verbreitung Forschungsthema	Vorstellung des Projektes	September 2020
FRT Activities	Schnelle und umfassende Verbreitung der Ergebnisse	Vorstellung des Projektes bzw. der Ergebnisse	November 2020 November 2021 November 2022
wfk-Activity Report	Schnelle und umfassende Verbreitung der Ergebnisse	Vorstellung des Projektes bzw. der Ergebnisse	April 2021 April 2022
Wissenschaftlicher Beirat wfk	Transfer in die Branche der textilen Dienstleister	Vorstellung der Ergebnisse und Diskussion des weiteren Vorgehens	23.06.2021 22.06.2022
Forschungsbeirat FRT	Transfer in die Wirtschaft	Vorstellung des Projektes und wesentliche Ergebnisse	24.06.2021 30.06.2022
Publikation „FRT Information“	Transfer in die Wirtschaft	Vorstellung des Projektes	März 2021
Zeitschrift „Rationell Reinigen“	Ergebnistransfer in die Branche der Reinigungsdienstleister	Vorstellung der Ergebnisse	Juni 2021
Zeitschrift „wfk-news“	Transfer in die Wirtschaft	Vorstellung ausgewählte Ergebnisse	Dezember 2021 April 2022
Projektbegleitender Ausschuss (PA)	Die Ergebnisse werden kontinuierlich im PA diskutiert.	Vorstellung des Projektes und Diskussion der geplanten Arbeiten Vorstellung der Ergebnisse und Diskussion des weiteren Vorgehens Abschlusspräsentation und Diskussion aller erzielten Ergebnisse	25.11.2020 26.10.2021 14.06.2022 13.02.2022

5.2 Geplante spezifische Transfermaßnahmen nach Ende der Projektlaufzeit

Maßnahme	Ziel	Ort/Rahmen	Datum/Zeitraum
wfk-Homepage	Transfer in die Wirtschaft	Zusammenfassung der Ergebnisse	Mai 2023
Forschungsbeirat FRT	Transfer in die Wirtschaft	Zusammenfassung der Ergebnisse	Juni 2023
Wissenschaftlicher Beirat wfk	Transfer in die Wirtschaft	Zusammenfassung der Ergebnisse	Juni 2023
FRT Activities	Transfer in die Wirtschaft	Zusammenfassung der Ergebnisse	November 2023
Publikation „FRT Information“	Transfer in die Wirtschaft	Vorstellung der Projektergebnisse	4. Quartal 2023
Zeitschrift „Rationell Reinigen“	Schnelle und umfassende Verbreitung in der Branche	Vorstellung der Projektergebnisse	1. Quartal 2024
Zeitschrift „wfk-news“	Ergebnistransfer in die Branche der textilen Dienstleister	Zusammenfassung der Ergebnisse	1. Quartal 2024
wfk-Activity Report	Transfer in die Wirtschaft	Zusammenfassung der Ergebnisse	April 2024
International Detergency Conference (IDC)	Transfer in die Wirtschaft	Vorstellung des Projektes und wesentlicher Ergebnisse	April 2025

Die Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzepts wird als sehr gut eingeschätzt. Die dargestellten Transfermaßnahmen führen zu einer Verbreitung der erzielten Projektergebnisse bei Reinigungsdienstleistern, textilen Dienstleistern, Textil-, Chemikalien- und Maschinenherstellern sowie Herstellern von Hygieneschnelltests. Über das Projekt hinaus bestehen Kontakte zu Herstellern von molekularbiologischen Agenzien insbesondere von funktionalen Oligonukleotiden und Spezialchemikalien.

6 Zusammenfassende Diskussion und Folgerungen für die Praxis

Endosporen sind bakterielle Dauerformen, die eine hohe Tenazität (Widerstandsfähigkeit) gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen (Temperatur, verschiedenen Strahlungsarten, Austrocknung, Bioziden, pH-Werten etc.) aufweisen [130,131]. Als wichtigste Vertreter sporenbildender Bakterien sind Bakterien der Gattung *Clostridioides* (obligat anaerob) und *Bacillus* (vorwiegend aerob, einige Arten fakultativ anaerob) anzusehen [26,132,133]. Hygienerelevante Arten sind z. B. *C. difficile* (Erreger schwerer Durchfallerkrankungen), *C. perfringens*, *C. histolyticum* (Gasbranderreger), *C. botulinum* (Erreger des Botulismus), *C. tetani* (Tetanus-Erreger) und *B. cereus* (Erreger von Erbrechen und Durchfallerkrankungen) [26,132,133].

Infolge ihrer hohen Tenazität können Endosporen monatelang in der Umgebung persistieren [134-140]. Durch routinemäßig in Einrichtungen des Gesundheitswesens und textilen Dienstleistungsbetrieben durchgeführte Reinigungs-/Desinfektionsmaßnahmen unter Einsatz bakterizid (inkl. tuberkulozid und mykobakterizid), levurozid/fungizid sowie ggf. auch viruzid wirkender Desinfektionsmittel und -verfahren sind Endosporen nicht mit ausreichender Sicherheit zu beseitigen [134,137-142]. Daher sind beim Auftreten bzw. beim Nachweis von Endosporen hygienerelevanter Arten gezielte Reinigungs-/Desinfektionsmaßnahmen notwendig, wie die Verwendung sporizid wirkender Desinfektionsmittel [26,137-141] bzw. der Einsatz optimierter Waschverfahren, z. B. unter Erhöhung des Flottenverhältnisses, Intensivierung des Spülprozesses, zusätzlicher Vorwäsche, Optimierung der Prozesswasseraufbereitung [31].

In Einrichtungen des Gesundheitswesens [143] ist *C. difficile* der häufigste anaerobe Erreger nosokomialer Infektionen, der neben der *C. difficile* assoziierten Diarrhoe (CDAD) schwerste Erkrankungen wie die pseudomembranöse Enterocolitis und das oft tödliche toxische Megacolon verursacht [25]. Laut den Referenzdaten des KISS-Moduls CDAD-KISS des Nationalen Referenzzentrums für Surveillance von nosokomialen Infektionen betrug die Gesamtprävalenz an *C.-difficile*-Infektionen (CDI) pro 100 Patienten 0,42 im Jahr 2016 [144]. Bei 56,1 % der CDAD-Fälle [25] handelte es sich um nosokomiale Infektionen. Die Letalität von CDI wird auf ca. 2 % geschätzt, kann jedoch bei älteren Patienten mit Komorbiditäten (anderen Erkrankungen) auch deutlich höher sein [27,142,146-150]. Ferner hat die Häufigkeit und die Mortalität von CDI in den Nachbarländern Deutschlands rasant zugenommen [25]. *C. difficile* nimmt eine wachsende klinische und epidemiologische Bedeutung ein, obwohl das Risiko für Patienten, eine noso-komiale Infektion zu erwerben, einem Abwärtstrend folgt [25]. CDI tritt in Krankenhäusern zwei- bis viermal häufiger auf als Infektionen mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) [26,27,28].

CDI sind eine enorme wirtschaftliche Belastung für das Gesundheitswesen [27,150-152]: Die stationären Behandlungskosten eines Patienten mit CDI liegen bei über 5.000 € [27,151-153], welche u. a. aus einer verlängerten stationären Behandlungsdauer und dem erheblichen Mehraufwand des Hygienemanagements resultieren [153,154]. Bei einem Patienten mit CDI-Rezidiv (Rückfall: 9,0-

26,9 % der Fälle [134,154]) und Wiederaufnahme ins gleiche Krankenhaus können sogar Kosten von mehr als 20.000 € anfallen [27,148].

Bei der Übertragung von *C. difficile* auf andere Patienten spielt neben den Händen des Personals die unbelebte Patientenumgebung (Oberflächen der Ausstattung, medizinische Instrumente) [138] eine entscheidende Rolle [134,138-141,156]. Bei CDI-Ausbrüchen sind bis zu 30 % der unbelebten Oberflächen kontaminiert [141]. Der Dekontamination der unbelebten Patientenumgebung kommt daher aus infektionsprophylaktischen Gründen [26,134,137,141,156] ein hoher Stellenwert zu, der effektiver Kontrollmaßnahmen im Rahmen des Hygienemanagements bedarf [130,157-159]. In Untersuchungen nosokomialer CDI-Ausbrüche konnte nachgewiesen werden, dass eine Flächendekontamination unter Einsatz sporizid wirkender Desinfektionsmittel wesentlich dazu beitragen kann, die Neuerkrankungsrate signifikant zu senken [141].

Vor dem Hintergrund des zunehmenden Fachkräftemangels (ca. 22.000 unbesetzte Stellen alleine in Krankenhäusern) [160] und des steigenden Bedarfs an Pflegekräften [161] stellt das Outsourcing personalintensiver Reinigungs-/Desinfektionsmaßnahmen eine Entlastung des Pflegepersonals dar, das sich auf seine Kernkompetenz, die Patientenpflege, konzentrieren kann. Derzeit werden 46 % der Einrichtungen im Gesundheitswesen [114] von externen Dienstleistern gereinigt [162,163]. Reinigungsdienstleister (vorwiegend KMU, über 30.000 Betriebe, Umsatz über 26 Mrd. €/a [164]) erwirtschaften ca. 16 % ihres Umsatzes allein durch Krankenhausreinigung [165]. Hierzu zählen auch Reinigungs-/Desinfektionsmaßnahmen (inkl. Schlussdesinfektion) in Isolierzimmern [158], z. B. von CDAD-Patienten [130,138,140,141,151,152]. Ferner erwirtschaften textile Dienstleistungsbetriebe (vorwiegend KMU, 2.300 Betriebe, Umsatz über 4,3 Mrd. €/a [166,167]) ca. 22 % ihres Umsatzes allein mit der desinfizierenden Aufbereitung von Textilien aus dem Gesundheits- und Sozialwesen. Der Erfolg von Reinigungs-/Desinfektionsmaßnahmen im Gesundheitswesen ist aufgrund verschiedener Vorschriften und Normen [168-172], die Qualitätsmanagement-Systeme fordern, kontinuierlich zu überwachen, z. B. durch routinemäßige Endproduktkontrollen [173-175].

Auch mikrobiell kontaminierte Textilien können zur Verbreitung von Mikroorganismen und Infektionskrankheiten beitragen [32,176-180]: So konnte die Ursache für nosokomiale Infektionsausbrüche bzw. die Kolonisierung von Patienten mit dem aeroben, sporenbildenden Bakterium *B. cereus* auf aufbereitete Textilien zurückgeführt werden [31,33-41]. Daher ist auch die Abwesenheit von *B. cereus* auf desinfizierend aufbereiteten Textilien durch routinemäßige Endproduktkontrollen in textilen Dienstleistungsbetrieben zu überprüfen [40,181]; bei unzureichender Entfernung in desinfizierenden Waschverfahren ist davon auszugehen, dass Endosporen auf den Textilien vorliegen. Ferner können sich Endosporen in Prozesswasserkreisläufen inkl. Waschmaschinen anreichern, da sie auch desinfizierende Waschverfahren [182,183] überstehen können. Hohe Konzentrationen an aeroben, sporenbildenden Bakterien in Prozesswasserkreisläufen können dazu führen, dass Grenzwerte für die Keimbelastung der Prozesswässer (100 KBE/ml [181,184,185]) und aufbereiteter

Textilien (20 KBE/dm^2 bzw. 50 KBE/dm^2 auf trockenen Textilien aus dem Gesundheitswesen bzw. aus der Lebensmittelindustrie [168,184,186,187]) nicht mehr eingehalten werden können [188,189].

Des Weiteren sind einige sporenbildende Bakterien (z. B. *B. cereus*, *C. perfringens*, *C. botulinum*, *C. sporogenes, B. subtilis*, *B. coagulans* [190,191]) in der Lebensmittelindustrie hygienerelevant, da sie lebensmittelbedingte Erkrankungen auslösen können oder zu einem schnelleren Verderb der Lebensmittel führen. Reinigungsdienstleister erwirtschaften ca. 11 % ihres Umsatzes mit der Industriereinigung, worunter auch die Reinigung von Gebäuden und Maschinen in der Lebensmittelindustrie fällt [192]. Textile Dienstleister erzielen ca. 4 % ihres Umsatzes mit der desinfizierenden Aufbereitung von Textilien aus der Lebensmittelindustrie [193]. Auch in der Lebensmittelindustrie ist der Erfolg von Reinigungs-/Desinfektionsmaßnahmen aufgrund verschiedener Vorschriften und Normen [171,194-196], die Qualitätsmanagement-Systeme fordern, kontinuierlich zu überwachen, z. B. durch routinemäßige Endproduktkontrollen.

Die routinemäßige Durchführung innerbetrieblicher Eigenkontrollen im Rahmen von Qualitätsmanagement-Systemen ist derzeit für externe Dienstleister (Reinigungsdienstleister, textile Dienstleistungsbetriebe) mit hohen Kosten verbunden, da diese externe Fachlabore mit der Kultivierung bzw. Auswertung von Endprodukt- bzw. Prozesswasserkontrollen beauftragen müssen. Ferner führt die lange Untersuchungsdauer (mind. 2 Tage) kultureller Verfahren dazu, dass ggf. erforderliche (Korrektur-)Maßnahmen nur verzögert erfolgen können.

Ziel des Forschungsprojektes war es daher, ein eigenständig ohne Fachkenntnisse auswertbares Verfahren zu realisieren, das eine simultane Quantifizierung auskeimungsfähiger Endosporen (Gesamtsporenzahl anaerober bzw. aerober Bakterien) und auskeimungsfähiger Endosporen hygienerelevanter Bakterien (z. B. *C. difficile*, *B. cereus*) ermöglicht: Dazu waren Aptazyme bzw. Aptazympaare zu entwickeln und spezielle Substrate für diese Aptazyme, sog. Molecular Beacons, zu designen. Das Nachweisprinzip beruht auf der Bindung der Aptamerdomäne der entwickelten Aptazyme an primäre Zielmoleküle, z. B. auf der Oberfläche von Endosporen hygienerelevanter Bakterien, und der nachfolgenden katalytischen Spaltung speziell designter fluorogener Substrate durch die DNAzymdomäne. Bei den Substraten handelt es sich z. B. um spezifische DNA-Stränge, die z. B. eine Stammschleifenstruktur ausbilden, in der das an dem einen Strangende gebundene Fluorophor und der an dem anderen Strangende gebundene Quencher in unmittelbarer Nähe zueinander vorliegen; solche Moleküle werden als Molecular Beacons bezeichnet. Um das bei Substratspaltung generierte Fluoreszenzsignal zu verstärken, war vorgesehen, dass die Aptamerdomäne eines zweiten Aptazyms, welches die gleiche DNAzymdomäne aufweist wie das erste Aptazym, an ein induziertes Zielmolekül bindet. Unter einem induzierten Zielmolekül wurde dabei ein Zielmolekül verstanden, dass bei der Substratspaltung freigesetzt wird. Aptazyme mit gleicher DNAzymdomäne aber unterschiedlicher Aptamerdomäne wurden als Aptazympaar bezeichnet. Demzufolge war davon auszugehen, dass das bei Bindung des ersten

Aptazyms eines Paares an sein Zielmoleküle durch Substratspaltung generierte Fluoreszenzsignal proportional zur Sporenzahl ist und mit zunehmender Inkubationszeit linear ansteigt. Wird zusätzlich ein bei Substratspaltung induziertes Zielmolekül zur Aktivierung der katalytischen Aktivität des zweiten Aptazyms durch Bindung an der Aptamerdomäne verwendet, verdoppelt sich die Anzahl aktivierter Aptazyme und somit auch die Anzahl an induzierten Zielmolekülen bei jeder Substratspaltung. Infolge des exponentiellen Anstiegs der Anzahl induzierter Zielmoleküle und freigesetzter Fluorophore war von einer exponentiellen Zunahme der Fluoreszenzintensität mit der Inkubationszeit und somit von einer hohen Empfindlichkeit des Verfahrens zur Fluoreszenzquantifizierung von Endosporen auszugehen.

Basierend auf umfangreichen Literaturrecherchen wurden zunächst geeignete Aptamere identifiziert, die sich gegen spezifische Strukturen (z. B. Proteine, Kohlenhydrate) auf der Sporenoberfläche der hygienerelevanten Bakterien *C. difficile* und *B. cereus* richten (s. Kap. 2.2, Tab. 1). Als induziertes Zielmolekül kam prinzipiell Fluorophor oder Quencher des Substrats (s. Kap. 2.3) in Betracht. Einige an Fluorophore und Quencher bindende Aptamere sind literaturbeschrieben [84-90]. Da sich bei Bindung eines Aptamers an einen Fluorophor dessen Fluoreszenzeigenschaften ändern können (z. B. Quenching durch Guanin) [17,91-93], wurde der Quencher als induziertes Zielmolekül ausgewählt. Exemplarisch wurde die Bindung des Aptamers BacApt3 an Endosporen des Bakteriums *B. cereus* und des Aptamers A1 an den BHQ-1-Quencher nachgewiesen. Da davon auszugehen ist, dass zukünftig Aptamere gegen Endosporen des Bakteriums *C. difficile* kommerziell erhältlich sind [82,83], wurden diese in weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt. Zur Quantifizierung von Endosporen (Gesamtsporenzahl anaerober bzw. aerober Bakterien) sowie zum Nachweis der Auskeimungsfähigkeit der Sporen wurde Dipicolinsäure als primäres Zielmolekül aufgrund des hohen Gehalts im Sporenkern (pro Endospore: 5-14 Gew.-% [54-57], ca. 10^{-16} mol [54,58], ca. $6 \bullet 10^{7}$ Moleküle) und der schnellen Freisetzung zu Beginn des Auskeimprozesses ausgewählt: Beim Auskeimen einer Endospore (z. B. aktiviert durch Nährstoffe) erfolgt in der ersten Keimphase die Freisetzung von Kationen und Dipicolinsäure aus dem Kern und die teilweise Rehydrierung des Sporenkerns; die Freisetzung der Dipicolinsäure ist bereits nach wenigen Minuten (ca. 2 min [56,59]) abgeschlossen. Da durch Literaturrecherchen keine Aptamere identifiziert werden konnten, die sich gegen Dipicolinsäure richteten, wurden potentielle Aptamere selektiert. Dazu wurde 4-Mercaptomethyl-dipicolinsäure (4-MMDPA) [106] an Maleimid-funktionalisierte magnetische Partikel [107] gebunden und anschließend eine SELEX [102-104] über drei Runden unter Einsatz eines kommerziell erhältlichen Kits [108a] durchgeführt. Die dabei selektierten und mittels PCR vervielfältigten DNA-Stränge wurden extern sequenziert [110], d. h. die Nukleotid- bzw. Basensequenz (Reads) bestimmt. Die Sequenzierdaten wurden biostatistisch ausgewertet. Hierzu wurden zunächst die Rohdaten bereinigt, d. h. Artefakte und fehlerhafte Reads aus den Datensätzen der einzelnen Runden entfernt. Von den im Datensatz der 3. Selektionsrunde verbliebenen 1.924.481 Reads stellen 253.913 invariante Sequenzen dar. Von diesen Varianten kamen 85 mehr als 500-mal im Datensatz vor. Um potentielle Aptamere zu identifizieren, wurden

die 85 Varianten in zwölf Strukturkategorien eingeteilt. Unter den vier am häufigsten vorkommenden Strukturkategorien (S4, S7, S8, S11) wurde je eine Variante identifiziert (V11, V14, V19, V75, V77), die die höchste thermodynamische Stabilität der Sekundärstrukturen (niedrigste *Minimum Free Energy*) aufwies (s. Kap. 2.3, s. Tab. 5). Zudem wurde eine Konsensus-Sequenz erstellt, die die Abfolge von Nukleotiden wiedergibt, die am häufigsten in den 85 Varianten auftreten (s. Kap. 2.3, s. Tab. 5). Von den vier dabei ermittelten Sequenzen war die Sequenz mit der niedrigsten *Minimum Free Energy* der strukturell sehr häufig auftretenden Kategorie S4 zugehörig (s. Tab. 5). Da die identifizierten potentiellen Aptamere gegen auf Maleimid-funktionalisierten magnetischen Partikeln [107] immobilisierte 4-Mercaptomethyl-dipicolinsäure [106] selektiert wurden, ist deren Spezifität gegen Dipicolinsäure bzw. den bei der Auskeimung von Endosporen freigesetzten Calciumdipicolinat-Komplex zu prüfen.

Ferner wurden basierend auf umfangreichen Literaturrecherchen DNAzyme identifiziert, die gemäß Literaturangaben eine hohe Wechselzahl aufweisen (s. Kap. 2.3, s. Tab. 7), da angenommen wurde, dass die Spaltung des fluorogenen Substrats der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Signalgenerierung ist. Ferner wurde bei Auswahl der DNAzyme darauf geachtet, dass diese toxikologisch unbedenkliche Cofaktoren benötigen und dass deren optimale Reaktionstemperatur bei etwa 37 °C liegt (entspr. der optimalen Wachstumstemperatur von *C. difficile* und *B. cereus*). Zur Ermittlung der katalytischen Aktivität wurden die ausgewählten DNAzyme 13PD1 [118] und 9NL27 [119] modifiziert (s. Kap. 2.3, s. Tab. 8) und Molecular Beacons [12-15] als Substrate designt (s. Kap. 2.3, s. Tab. 9). Die Modifikation der DNAzyme diente der Optimierung der Substratbindung. Das DNAzym D-Zyme [124] wurde nicht modifiziert eingesetzt. Die experimentell ermittelten Wechselzahlen der ausgewählten DNAzyme 9NL27 [119], 13PD1 [118] und D-zyme [124] lagen jedoch deutlich unter den in der Literatur angegebenen Werten, obwohl umfangreiche Untersuchungen zur Optimierung der Reaktionsbedingungen durchgeführt wurden. Die bei Charakterisierung der ausgewählten DNAzyme erlangten Erkenntnisse legten nahe, dass die Substratstränge nach der Spaltung durch das DNAzym im hybridisierten Zustand verblieben und sich nicht bzw. nur mit sehr geringer Geschwindigkeit von ungespaltenen Substratsträngen verdrängen ließen. Zudem war zu bedenken, dass bei Verwendung von Molecular Beacons das Fluoreszenzsignal bereits bei Hybridisierung des Substrats mit dem DNAzym entsteht und dass es zu einer Hybridisierung der gespaltenen Substratstränge kommen kann, die zur Fluoreszenzauslöschung führt, wenn keine Fängeroligonukleotide (s. Kap. 2.5) zugegen sind, mit dem der am Fluorophor gebundene Strang hybridisieren kann.

Um eine Fluoreszenzlöschung durch Hybridisierung der gespaltenen Substratstrangteile auszuschließen und um die Substratspaltung direkt nachweisen zu können, wurde in weiteren Untersuchungen (s. Kap. 2.4) das DNAzym DET22-18 [125] und das dazugehörige lineare Substrat DET22-18-LS, welches eine Ribonukleotidschnittstelle enthält, verwendet; dieses DNAzym

wurde in vorhergehenden Arbeiten [51b] der Forschungseinrichtung umfassend charakterisiert. Dabei ließen sich bei Verwendung von Mn^{2+}-Ionen als Cofaktor unter optimierten Reaktionsbedingungen Wechselzahlen von $2*10^{-2}$ min^{-1} erreichen; ein Fluoreszenzsignal wird zudem nur bei Spaltung des linearen Substrats generiert.

Zur Entwicklung von Aptazymen (s. Kap. 2.4) wurde exemplarisch das DNAzym DET22-18 [125] und das Aptamer BacApt3 [79], welches sich gegen Endosporen des Bakteriums *B. cereus* richtet, verwendet. Eine enzymatische Ligation von Aptamer und DNAzym zu einem Aptazym wurde unter Einsatz kommerziell erhältlicher Kits [126] vorgenommen: Zunächst wurde das an beiden Enden phosphorylierte DNAzym DET22-18 am 5‘-Ende adenyliert und anschließend das Aptamer an das adenylierte Ende des DNAzyms ligiert. Nach Vervielfältigung durch PCR konnte das Ligationsprodukt gelelektrophoretisch nachgewiesen werden. Aufgrund der üblicherweise geringen zu erzielenden Ausbeute [197], ist das bioinformatische Design der Aptazyme der enzymatischen Ligation vorzuziehen, zumal dabei u. a. auch Informationen über die Sekundärstruktur des Aptazyms (Faltung) gewonnen werden. Sowohl das Aptazym BacApt3-DET22-18 als auch das DNAzym DET22-18 [125] waren in der Lage, das lineare Substrat DET22-18-LS [125] zu spalten. Die katalytische Aktivität des Aptazyms und des DNAzyms unterschieden sich nur geringfügig; folglich war das Aptazym nicht allosterisch kontrolliert. Die Bindung des Aptazyms BacApt3-DET22-18 an Endosporen des Bakteriums *B. cereus* konnte nachgewiesen werden; das gebundene Aptazym war katalytisch aktiv.

Ein fluoreszenzmikroskopischer Nachweis hygienerelevanter Endosporen unter Einsatz eines Aptazyms ist somit möglich; eine Quantifizierung kann durch Auszählen der fluoreszierenden Sporen z. B. unter Verwendung eines Zählgitters erfolgen.

Ferner wurde ein spezielles Beprobungsmedium entwickelt, mit dem sich die Fluorophore am Ort der Substratspaltung durch Hybridisierung des am Fluorophor gebundenen Substratstrangteils mit in das Agarmedium eingebrachten komplementären Strängen (Fängeroligonukleotide) immobilisieren lassen, so dass prinzipiell fluoreszierende Spots um Endosporen generiert werden können.

Bei Charakterisierung von DNAzymen und Aptazym hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität war festzustellen, dass der Substratumsatz bzw. die Konzentration an gespaltenem Substrat deutlich unterhalb der Konzentration an DNAzym und Aptazym im Reaktionsansatz lag. Diese Beobachtung stützte die Hypothese, dass die Substratstränge nach der Spaltung durch das DNAzym bzw. Aptazym im hybridisierten Zustand verblieben und sich nicht bzw. nur mit sehr geringer Geschwindigkeit von ungespaltenen Substratsträngen verdrängen lassen.

Um einen Substratwechsel zu erzwingen, wurde Ansätze mit Aptazym und Substrat einer thermozyklischen Behandlung (mehrfaches Erwärmen und wieder Abkühlen in einem qPCR Thermocycler) unterzogen. Dabei war festzustellen, dass nahezu das gesamte, im Ansatz vorhandene

Substrat von dem Aptazym gespalten werden konnte. Da das Substrat im vierfachen Überschuss vorlag, war davon auszugehen, dass ein Substratwechsel erfolgte. Eine thermozyklische Behandlung des mit einer Lösung aus Aptazymen bzw. Aptazympaaren und Substrat überschichteten Beprobungsmediums ist aufgrund der zu erwärmenden und abzukühlenden Masse (ca. 20 ml Medium) mit einem hohen Zeitbedarf verbunden und daher nicht praktikabel (s. Kap. 2.7).

Da jedoch gezeigt werden konnte, dass Endosporen eines hygienerelevanten Bakteriums mit Aptazymen belegt und somit markiert werden können und eine Substratspaltung an der Sporenoberfläche erfolgt, ist es prinzipiell möglich, einen anderen Mechanismus zur Signalverstärkung zu entwickeln: So werden derzeit in einem IGF-Forschungsprojekt [51c] netzwerkbildende Magneto-Dendronen (selbstorganisierende dendritische Nukleinsäurestrukturen, in die magnetische Partikel eingebunden sind) auf Zelloberflächen generiert, um Zellen durch magnetisch induzierte Thermographie [51d] auf einem Beprobungsmedium zu visualisieren. Die Magneto-Dendronen entstehen durch eine Hybridisierungskettenreaktion, in der sich verschiedene, speziell designte Oligonukleotide mit Haarnadelstruktur zu einem dreidimensionalen Netzwerk zusammenlagern. Diese Hybridisierungskettenreaktion wird durch an die Zelloberfläche gebundene Aptazyme initiiert.

7 Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihr innovativer Beitrag und ihre industriellen Anwendungsmöglichkeiten

Die wissenschaftlich-technischen Ergebnisse bestehen in einem innovativen Verfahren zur Fluoreszenzquantifizierung von Endosporen hygienerelevanter Bakterien (z. B. *C. difficile* und *B. cereus)* auf Basis von Aptazymen und fluorogenen Substraten.

Dabei lag die Innovation im funktionsbestimmten Design der Aptazyme und der fluorogenen Substrate, d. h. der Identifikation von Nukleinsäuren (DNA- und RNA-Stränge) mit geeigneter Nukleotidabfolge (Sequenz) sowie deren Funktionalisierung mit Fluorophoren und Quenchern. Die Synthese unter Angabe der Nukleotidabfolge und der gewünschten Funktionalisierung ist Stand der Technik, so dass derartige Nukleinsäuren (Aptazyme und fluorogene Substrate) kommerziell erhältlich sind.

Es ist davon auszugehen, dass nach weiterführenden Forschungsarbeiten Hersteller von Schnelltestsystemen innerhalb der nächsten Jahre innovative Nachweisreagenzien auf Basis von Aptazymen und dazugehörigen fluorogenen Substraten anbieten können. Nach diesen auf den Projektergebnissen basierenden weiterführenden Entwicklungsarbeiten ist zu erwarten, dass für Reinigungsdienstleister (vorwiegend KMU, über 30.000 Betriebe, Umsatz über 26 Mrd. €/a [165]) und für textile Dienstleistungsbetriebe (vorwiegend KMU, 2.300 Betriebe, Umsatz über 4,3 Mrd. €/a [166,167]) ein entsprechendes Nachweisverfahren zur Fluoreszenzquantifizierung von Endosporen verfügbar ist. Ein solches Verfahren würde Reinigungs- und Textil-Dienstleister erstmals befähigen, die Sporenbelastung von Oberflächen, Textilien und Prozesswässern im Rahmen innerbetrieblicher Eigenkontrollen eigenständig zu bewerten und somit den Erfolg von ihnen vorgenommener Dekontaminationsmaßnahmen zu überwachen. Dadurch können beim Auftreten bzw. beim Nachweis von Endosporen hygienerelevanter Bakterien umgehend für die Sporendekontamination geeignete Verfahren angewandt und die Hygienesicherheit weiter optimiert werden.

Sporenbildende Bakterien sind insbesondere im Gesundheitswesen, aber auch in der Lebensmittelindustrie hygienerelevant: Derzeit werden 46 % der Einrichtungen im Gesundheitswesen [114] von externen Dienstleistern gereinigt [162,163]. Reinigungsdienstleister erwirtschaften ca. 16 % ihres Umsatzes durch Krankenhausreinigung [165]. Hierzu zählen auch Reinigungs-/Desinfektionsmaßnahmen (inkl. Schlussdesinfektion) in Isolierzimmern [158], z. B. von CDAD-Patienten [130,138,140,141,151,152]. Zudem erwirtschaften Reinigungsdienstleister ca. 11 % ihres Umsatzes mit der Industriereinigung, worunter auch die Reinigung von Gebäuden und Maschinen in der Lebensmittelindustrie fällt [192].

Textile Dienstleistungsbetriebe erzielen ca. 22 % ihres Umsatzes mit der desinfizierenden Aufbereitung von Textilien aus dem Gesundheits- und Sozialwesen und ca. 4 % ihres Umsatzes mit der desinfizierenden Aufbereitung von Textilien aus der Lebensmittelindustrie [193].

Der Erfolg von Reinigungs-/Desinfektionsmaßnahmen ist im Gesundheitswesen und der Lebensmittelindustrie aufgrund verschiedener Vorschriften und Normen [168-172,194-196], die Qualitätsmanagement-Systeme fordern, kontinuierlich zu überwachen, z. B. durch routinemäßige Endproduktkontrollen [173-175]. Die routinemäßige Durchführung innerbetrieblicher Eigenkontrollen ist derzeit für externe Dienstleister mit hohen Kosten verbunden, da diese externe Fachlabore mit der Kultivierung bzw. Auswertung von Endprodukt- bzw. Prozesswasserkontrollen beauftragen müssen. Ferner führt die lange Untersuchungsdauer (mind. 2 Tage) kultureller Verfahren dazu, dass ggf. erforderliche (Korrektur-)Maßnahmen nur verzögert erfolgen können (s. Kap. 6).

Vor dem Hintergrund des zunehmenden Fachkräftemangels (ca. 22.000 unbesetzte Stellen alleine in Krankenhäusern) [160] und des steigenden Bedarfs an Pflegekräften [161] ist davon auszugehen, dass externe Dienstleister ihre Marktanteile im Gesundheitswesen ausbauen können, da das Outsourcing personalintensiver Reinigungs-/Desinfektionsmaßnahmen eine Entlastung des Pflegepersonals darstellt, das sich auf seine Kernkompetenz, die Patientenpflege, konzentrieren kann.

8 Danksagung

Das IGF-Vorhaben 21043 N der Forschungsvereinigung Europäischen Forschungsgemeinschaft Reinigungs- und Hygienetechnologie e.V., Campus Fichtenhain 11, 47807 Krefeld, wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Gefördert durch:

Bundesministerium
für Wirtschaft
und Klimaschutz

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Ferner danken wir zahlreichen Unternehmen für die Bereitstellung von Versuchsmaterialien sowie für die Begleitung der Arbeiten mit Beratung und Hilfe beim Transfer.

9 Literaturverzeichnis

[1] Röthlisberger, P.; Gasse, C.; Hollenstein, M. (2017): Nucleic acid aptamers: Emerging applications in medical imaging, nanotechnology, neurosciences, and drug delivery. *Int. J. Mol. Sci.* 18(11) 2430: 1-39

[2] Yu, Y. et al. (2016): Molecular selection, modification and development of therapeutic oligonucleotide aptamers. *Int. J. Mol. Sci.* 17(3) 358: 1-19

[3] Thiel, W.H. (2016): Galaxy workflows for web-based bioinformatics analysis of aptamer high-throughput sequencing data. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 5(8) e345: 1-5

[4] Zhang, H.-L. et al. (2023): Analysis of aptamer-target binding and molecular mechanisms by thermofluorimetric analysis and molecular dynamics simulation. *Front. Chem.* 11 (e1144347): 1-12

[5] Morozov, D. et al. (2021): The role of SAXS and molecular simulations in 3D structure elucidation of a DNA aptamer against lung cancer. *Ther. Nucleic Acids* 25: 316-327

[6] Shigdar, S. (2019): Aptamer-based diagnostics and therapeutics. *Pharmaceuticals* 12(6): 1-3

[7] Silverman, S.K. (2004): Deoxyribozymes: DNA catalysts for bioorganic chemistry. *Org. Biomol. Chem.* 2(19): 2701-2706

[8] Wyszko, E. et al. (2014): Spiegelzymes® Mirror-image hammerhead ribozymes and mirror-image DNAzymes, an alternative to siRNAs. and microRNAs to Cleave mRNAs In Vivo? *PLoS ONE* 9(1) e86673: 1-10

[9] Babunageswararoa, K. et al. (2011): DNAzymes as novel therapeutics. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 2(4): 161-173

[10] Dicke, T.A. (2009): Charakterisierung GATA-3-spezifischer DNAzyme und Analyse der the-rapeutischen Wirksamkeit in experimentellen Modellen des allergischen Asthma bronchiale. Dissertation an der Philipps-Universität Marburg

[11] Balke, D. (2016): Entwicklung von Hairpinribozymvarianten zur ortsspezifischen RNA-Sequenzveränderung. Dissertation an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

[12] Zhang, X.-B. et al. (2010): Catalytic and molecular beacons for amplified detection of metal ions and organic molecules with high sensitivity. *Anal. Chem.* 82(12): 5005-5011

[13] Huang, J. et al. (2014): Split aptazyme-based catalytic molecular beacons for amplified detection of adenosine. *Analyst* 139: 2994-2997

[14] Zhao, X.-H. et al. (2013): Versatile DNAzyme-based amplified biosensing platforms for nu-cleic acid, protein, and enzyme activity detection. *Anal. Chem.* 85(7): 3614-3620

[15] Oi, L. et al. (2012): Amplified fluorescence detection of mercury(II)ions (Hg^{2+}) using target-induced DNAzyme cascade with catalytic and molecular beacons. *Analyst* 137: 2799-2805

[16] Tyagi, S.; Kramer, F.R. (1996): Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* 14(3): 303-308

[17] Venkatesan, N.; Seo, Y.J.; Kim, B.H. (2008): Quencher-free molecular beacons: a new strategy in fluorescence based nucleic acid analysis. *Chem. Soc. Rev.* 37(4): 648-663

[18] Goel, G. et al. (2005): Molecular beacon: a multi-task probe. *J. Appl. Microbiol.* 99(3): 435-442

[19] Wang, K. et al. (2009): Molecular engineering of DNA: Molecular beacons. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 48(5): 856-870

[20] Zheng, J. et al. (2015): Rationally designed molecular beacons for bioanalytical and biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* 44(10): 3036-3055

[21] Reuter, A. (2007): DNA-basierte molekulare Maschinen und Aktuatoren. Dissertation an der Ludwig–Maximilians–Universität München

[22] Famulok, M., Hartig, J.S.; Mayer, G. (2007): Functional aptamers and aptazymes in biotech-nology, diagnostics, and therapy. *Chem. Rev.* 107(9): 3715-3743

[23] Huang, P.-J.J.; Liu, M.; Liu, J. (2013): Functional nucleic acids for detecting bacteria. *Rev. Anal. Chem.* 32(1): 77-89

[24] Liu, J.; Cao, C.; Lu, Y. (2009): Functional nucleic acid sensors, *Chem. Rev.*109(5): 1948-1998

[25] Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen am Institut für Hygiene und Umweltmedizin Charité - Universitätsmedizin Berlin, Website zuletzt abgerufen am 06.10.2023:

a) CDAD-KISS Surveillance von *Clostridium difficile* assoziierter Diarrhoe in Krankenhäusern, Stand 2019, https://www.nrz-hygiene.de/files/Protokolle/CDAD%20Protokolle/CDAD_Protokoll_2019.pdf
b) , Abschlussbericht, https://www.nrz-hygiene.de/files/Projekte/PPS%202016/PPS_2016_Abschluss-bericht_20.07.2017.pdf
c) Modul CDAD-KISS Referenzdaten, Berechnungszeitraum: 1. Januar 2016 bis 31. Dezember 2016. https://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/module/cdad/CDAD_Referenzdaten_2016_DE.pdf

[26] Käberich, A.; v. Rheinbaben, F. (2006): *Clostridium difficile* – ein weiterer ernst zu nehmender nosokomialer Erreger. *aseptica* 12(3): 3-5

[27] N.N. (2015): Experten fordern Maßnahmen gegen Clostridium difficile-Infektionen (CDI). Management & Krankenhaus 5:11

[28] Allerberger, F. et al. (2014): Clostridium difficile-Infektionen. Österreichische Ärztezeitung 5: 20-29

[29] Bundesinstitut für Risikobewertung: *Bacillus cereus*-Bakterien in Lebensmitteln können Magen-Darm-Erkrankungen verursachen, Aktualisierte Stellungnahme Nr. 048/2020 des BfR vom 30. Oktober 2020, https://www.bfr.bund.de/cm/343/bacillus-cereus-bakterien-in-lebensmitteln-koennen-magen-darm-erkrankungen-verursachen.pdf, zuletzt abgerufen am 06.10.2023

[30] Hammon, A. (2008): Untersuchungen zum Vorkommen und zur Toxizität von *Bacillus cereus* in Gewürzen. Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig - Maximilians - Universität München

[31] Höfer, D.; Gerhardts, A. (2014): Internationaler Stand zu *B. cereus* Infektionen durch Kran-kenhauswäsche. Jahrestagung der Gütegemeinschaft sachgemäße Wäschepflege e.V., http://www.waescherei-en.de/media/waeschereien/pdf_1/jahrestagung/2014/B_cereus_Infektionen_Hoefer_Gerhardts_.pdf, zuletzt abgerufen am 08.10.2018

[32] Hügging, D. (2017): Infektionsketten unterbinden. rhw praxis 1: 40-42

[33] Heintz, M. (2014): NVK RABC Seminar Oslo. http://vaskeritilsynet.no/files/2014-04-01_rabc_seminar_presentasjon.pdf, zuletzt abgerufen am 12.10.2018

[34] Balm, M.N.D. et al. (2012): Hot and steamy: outbreak of *Bacillus cereus* in Singapore associated with construction work and laundry practices. J*. Hosp. Infect.* 81(4): 224-230

[35] Barrie, D. et al. (1994): Contamination of hospital linen by *Bacillus cereus*. *Epidemiol. Infect.* 113(2): 297-306

[36] Cheng, V.C.C. et al. (2017): Seasonal outbreak of Bacillus bacteremia associated with contaminated linen in Hong Kong. *Clin. Infect. Dis.* 64(suppl_2): S91-S97

[37] Hosein, I.K. et al. (2013): Summertime *Bacillus cereus* colonization of hospital newborns traced to contaminated, laundered linen. *J. Hosp. Infect.* 85(2): 149-154

[38] Dohmae, S. et al. (2008): Bacillus cereus nosocomial infection from reused towels in Japan. *J. Hosp. Infect.* 69(4): 361-367

[39] Sasahara, T. et al. (2011): *Bacillus cereus* bacteremia outbreak due to contaminated hospital linens. Eur. *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30(2): 219-226.

[40] Hamm, H.; Kiesel, M.; Holz, H. (2016): Nosokomiale Infektionen auf der Neonatologie durch Krankenhauswäsche. *aseptica* 22(4): 17-19

[41] Panknin, H-T.; Trautmann, M. (2013): Ausbruch einer *Bacillus cereus*-Kolonisierung bei Frühgeborenen durch frische Krankenhauswäsche. Hygiene & Medizin 38(12): 553-555

[42] CCUG 37780 - *Clostridium difficile*, https://www.ccug.se/strain?id=37780, zuletzt abgerufen am 09.10.2023

[43] Clostridioides difficile (Prevot) Lawson et al. 43593 ™, https://www.atcc.org/products/43593, zuletzt abgerufen am 09.10.2023

[44] Delmee, M. et al. (1985): Serogrouping of *Clostridium difficile* strains by slide agglutination. *J. Clin. Microbiol.* 21: 323-327

[45] *Bacillus cereus* DSM 31, https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-31, zuletzt abgerufen am 09.10.2023

[46] VWR International LLC, Websites zuletzt abgerufen am 09.10.2023

a) Anaerocult® A for microbiology, reagent for the generation of an anaerobic medium in an anaerobic jar, Katalog-Nr. 10 1.32381.0001, https://de.vwr.com/store/product/804854/null

b) Columbia-Schafblut-Agar, Katalog-Nr. 100253ZF, https://de.vwr.com/store/catalog/product.jsp?catalog_number=100253ZF

[47] Edwards, A.N.; Suárez, J.M.; McBride, S.M. (2013): Culturing and maintaining *Clostridium difficile* in an anaerobic environment. *J. Vis. Exp.* 79 (e50787): 1-8

[48] Edwards, A.N.; McBride S.M. (2016): Isolating and purifying *Clostridium difficile* spores. In: Roberts, A.; Mullany, P. (eds): *Clostridium difficile*. Methods Mol. Biol.:117-128

[49] Sambrook, J.; Russel, D. (2001): Molecular cloning - A laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press

[50] Ryu, J.H; Beuchat, L.R. (2005): Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. J. *Food. Prot.* 68: 2614-2622

[51] wfk - Cleaning Technology Institute, Website mit abgeschlossenen und laufenden Forschungsprojekten:

a) DNA-Aggregations-Displays zur Prüfung der Dry Penetration an OP-Textilien, IGF-Forschungsprojekt 21187 N, Schlussbericht 2023
b) Katalytische Aptazym-Reportersysteme zum Pilzsporennachweis, IGF-Forschungsprojekt 19702 N, Schlussbericht 2020
c) Aptazym-initiierte Generierung netzwerkbildender Magneto-Dendronen auf Zelloberflächen zum Nachweis mikrobieller Kontaminationen mittels magnetisch induzierter Thermographie, laufendes IGF-Forschungsprojekt 21938 N
d) Magnetisch induzierte Thermographie zum Nachweis mikrobieller Kontaminationen, IGF-Forschungsprojekt IGF 18612 N, Schlussbericht 2019

[52] Ghosh, S.; Setlow, P. (2010): The preparation, germination properties and stability of superdormant spores of *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.*108: 582-590

[53] Merck KGa, Microbiology Manual, 12 th Edition, http://www.laboquimia.es/pdf_catalogo/MERCK_Manual_de_microbiologia_12a_edicion.pdf, zuletzt abgerufen am 09.10.2023

[54] Fichtel, J. et al. (2007): Spore dipicolinic acid contents used for estimating the number of endospores in sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61(3): 522-532

[55] Setlow, P. (2003): Spore germination. *Curr. Opin. Microbiol.* 6(6): 550-556

[56] Setlow, P. (2013): Summer meeting 2013 – when the sleepers wake: The germination of spores of Bacillus species. *J. Appl. Microbiol.* 115(6): 1251-1268

[57] Setlow, P. (2014): Germination of spores of Bacillus species: What we know and do not know. *J. Bacteriol.* 196(7): 1297-1305

[58] Huang, S.-S. et al. (2007): Levels of Ca^{2+}-dipicolinic acid in individual Bacillus spores de-termined using microfluidic raman tweezer. *J. Bacteriol.* 189(13): 4681-4687

[59] Kong, L. et al. (2011): Characterization of bacterial spore germination using phase-contrast and fluorescence microscopy, Raman spectroscopy and optical tweezers. *Nat. Protoc.* 6(5): 625-639

[60] Kong, H.Y.; Byun, J. (2013): Nucleic acid aptamers: New methods for selec-tion,sStabilization, and application in biomedical science. *Biomol. Ther.* 21(6): 423-434

[61] Bock, L.C. et al. (1992). Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* 355(6360): 564-566

[62] Famulok, M. (1999): Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9(3): 324-329

[63] Jäschke, A.; Frauendorf, C.; Hausch, F. (1999): In vitro selected oligonucleotides as tools in organic chemistry. *Synlett* 1999(6): 825-833

[64] Zhang, Q.; Liu, X.; Liu, Y. (2012): Aptamers as Recognition Elements for Analysis of Small Molecules. *Asian J. Chem.* 24(1): 1-6

[65] Chandola, C. et al. (2016): Application of aptamers in diagnostics, drug-delivery and imaging. *J. Biosci.* 41(3): 535-561

[66] Hong, K.L.; Soocter, L.J. (2015): Single-stranded DNA aptamers against pathogens and tox-ins: Identification and biosensing applications. *Biomed Res. Int.* 2015(419318): 1-31

[67] Hong, K.L. et al. (2015): *In vitro* selection of a single-stranded DNA molecular recognition element against Clostridium difficile toxin B and sensitive detection in human fecal matter. J*. Nucleic Acids* 2015(808495): 1-12

[68] Ruscito, A.; DeRosa, M.C. (2016): Small-molecule binding aptamers: Selection strategies, characterization, and applications. *Front. Chem.* 4(14): 1-14

[69] Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B. (2007): SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol. Eng.* 24(4): 381-403

[70] Zhang, W. et al. (2018): Practical application of aptamer-based bio-sensors in detection of low molecular weight pollutants in water sources. *Molecules* 23(2) e344: 1-25

[71] Davydova, A. et al. (2016): Aptamers against pathogenic microorganisms. *Crit. Rev. Microbiol.* 42(6): 847-865

[72] Proske, D. et al. (2002): Prion-protein-specific aptamer reduces PrPSc formation. *ChemBio-Chem* 3(8): 717-725

[73] Macedo, B.; Cordeiro, Y. (2017): Unraveling prion protein interactions with aptamers and other PrP-binding nucleic acids. *Int. J. Mol. Sci.* 18(1023): 1-22

[74] McKeague, M.; Giamberardino, A.; DeRosa, M. C. (2011): Advances in aptamer-based biosensors for food safety. Somerset, V. (eds), InTech, https://www.intechopen.com/chapters/16446, zuletzt abgerufen am 10.10.2023

[75] Bruno, J.G.; Carrillo, M.P. (2012): Development of aptamer beacons for rapid presumptive detection of Bacillus spores. *J. Fluoresc.* 22(3): 915-924

[76] Bruno, J.G.; Kiel, J.L. (1999): *In vitro* selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection. *Biosens. Bioelectron.* 14(5): 457-464

[77] Ikanovic, M. et al. (2007): Fluorescence assay based on aptamer-quantum dot binding to *Bacillus thuringiensis* spores. *J. Fluoresc.* 17(2): 193-199

[78] Fan, M. et al. (2008): Aptamer selection express: A novel method for rapid single-step selection and sensing of aptamers. J*. Biomol. Tech.* 9(5): 311-321

[79] Fischer, C. et al. (2015): Food sensing: Aptamer-based trapping of Bacillus cereus spores with specific detection via real time PCR in milk. *J. Agric. Food. Chem.* 63(36): 8050-8057

[80] Hünniger, T. et al. (2015): Food sensing: Selection and characterization of DNA aptamers to Alicyclobacillus spores for trapping and detection from orange juice. *J. Agric. Food. Chem.* 63(8): 2189-2197

[81] Hünniger, T. et al. (2015): Food targeting: A real-time PCR assay targeting 16S rDNA for direct quantification of Alicyclobacillus spp. spores after aptamer-based enrichment. *J. Agric. Food. Chem.* 63(17): 4291-4296

[82] Shannon, R.J. et al. (2021): Aptamers against *Clostridium difficile*, United States, Patent No.: US 11104905 B2, Status: Active

[83] Shannon, R.J. et al. (2022): Aptamers against *Clostridium difficile*, European Patent Office, EP 3980553 A1, Status: Pending

[84] Arora, A.; Sunbul, M.; Jäschke, A. (2015): Dual-colour imaging of RNAs using quencher- and fluorophore-binding aptamers. *Nucleic Acids Res.* 43(21) e144: 1-9

[85] Sunbul, M.; Jäschke, A. (2013): Contact-mediated quenching for RNA Imaging in bacteria with a fluorophore-binding aptamer. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52: 13401–13404

[86] Holeman, L.A. et al. (1998): Isolation and characterization of fluorophore-binding RNA aptamers. *Fold. Des*. 3(6): 423-431

[87] Wilson, C. Szostak, J.W. (1998): Isolation of a fluorophore-specific DNA aptamer with weak redox activity. *Chem. Biol.* 5(11): 609-17

[88] Zhang, J. (2021): Development of genetically encoded near-infrared fuorescent light-up aptamers for live-cell RNA Iimaging, Dissertation an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

[89] Tormann, A. (2022): Biochemical characterization of fluorophore-binding nucleic acids. Master thesis at University of Waterloo

[90] Murata, A. et al. (2011): Small-molecule fluorescent probes for specific RNA targets. *Chem. Commun.* 47: 4712-4714

[91] Reichwein, J.; Zander, C. (2003): GenePins: Molekulare Spürhunde mit der Lizenz zur Fluoreszenz, BIOspektrum, Sonderausgabe, 9. Jahrgang, Postgenomics – vom Molekül zur Funktion: 534-535

[92] Wang, W. et al. (2008): Aptamer biosensor for protein detection based on guanine-quenching. *Sens. Actuators B Chem.* 129(1): 211-217

[93] Yang, C. et al. (2022): Design of a quencher-free fluorescent aptasensor for ochratoxin A detection in red wine based on the guanine-quenching ability. Biosensors 12(5) e297: 1-12

[94] Hernández Cifuentes, J.S. (2023): Caracterización bioquímica y espectroscópica de la interacción del aptámero con componentes de la espora de clostridium difficile y la superficie de óxido de grafeno, Masterarbeit an der Universität von Costa Rica

[95] Ochsner, U.A.; Katilius, E.; Janjic, N. (2013): Detection of Clostridium difficile toxins A, B and binary toxin with slow off-rate modified aptamers. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 76(3): 278-285

[96] Ochsner, U.A. et al (2014): Systematic selection of modified ap-tamer pairs for diagnostic sandwich assays. *BioTechniques* 56(3): 125-133

[97] Luo, P.; Liu, Y.; Xia, Y.; Xu, H.; Xie, G. (2014): Aptamer biosensor for sensitive detection of toxin A of Clostridium difficile using gold nanoparticles synthesized by *Bacillus stearothermophilus*. *Biosens Bioelectron.* 54: 217-221

[98] Li, J. et al. (2021): A highly specific DNA aptamer for RNase H2 from *Clostridium difficile*. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 13(8): 9464-9471

[99] metabion international AG, https://www.metabion.com/products?prod_products_en-DE%5Bhierarchical-Menu%5D%5BproductCategory.lvl0%5D%5B0%5D=Custom%20DNA%20oligos, zuletzt abgerufen am 17.10.2023

[100] BioCat GmbH, BHQ-1 Quencher Carboxylic Acid, Succinimidyl Ester, https://www.biocat.com/products/BHQ-1000S-5-BS, zuletzt abgerufen am 12.10.2023

[101] Thermo Fisher Scientific Inc., Websites zuletzt abgerufen am 12.10.2023

a) Crosslinking Technical Handbook, Stand 2012. http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602163-Crosslinking-Reagents-Handbook.pdf,
b) MagnaBind™ Amine Derivatized Beads, Katalog-Nr.: 21352, https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21352

[102] Ellington, A.D.; Szostak J.W. (1990): *Invitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature 346(6287): 818-822

[103] Tuerk, C.; Gold, L. (1990): Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. Science 249(4968): 505-510

[104] Robertson, D-L.; Joyce, G.F. (1990): Selection *invitro* of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded-DNA. Nature 344(6265): 467-468

[105] Xing, H. et al. (2022): Polyclonal selex aptamer library directly allows specific labelling of the human gut bacterium *Blautia producta* without isolating individual aptamers. Molecules 27(17) e5693: 1-12

[106] Santa Cruz Biotechnology, Inc., 4-Mercaptomethyl Dipicolinic Acid, https://www.scbt.com/fr/p/4-mercaptomethyl-dipicolinic-acid-1040401-18-0, Website zuletzt abgerufen am 15.10.2023

[107] Cube Biotech GmbH, Website zuletzt abgerufen am 15.10.2023

a) PureCube Maleimide Activated MagBeads, https://cube-biotech.com/products/protein-purification-products/activated-resins-magbeads/maleimide-activated/purecube-maleimide-activated-magbeads/51201
b) Datasheet: PureCube Maleimide Activated MagBeads, https://cube-biotech.com/media/ed/17/57/1667826028/51201%20Maleimide%20Activated%20MagBeads.pdf
c) Maleimide MagBead Coupling Protocol, https://cube-biotech.com/media/80/00/e8/1667826072/Maleimide%20MagBeads%20Coupling%20Protocol.pdf

[108] Roboklon GmbH, Website zuletzt abgerufen am 16.10.2023

a) XELEX DNA Core Kit - Complete Set, https://roboklon.com/index.php?prodid=240
b) XELEX DNA SELEX CORE KIT, https://roboklon.com/pdf/240_de.pdf

c) XELEX DNA Core Kit, Modular SELEX Kit – Core Component, Stand 2019, https://roboklon.com/pdf/240_det_en.pdf
d) Micellula DNA Emulsion & Purification Kit, https://www.roboklon.com/index.php?prodid=196

[109] NIPPON Genetics GmbH, Midori Green Advance, https://www.nippongenetics.eu/produkte/elektrophorese-dna-rna/dnarna-farbstoffe/midori-green-advance-2/, zuletzt abgerufen am 16.10.2023

[110] StarSEQ GmbH, Next Generation Sequencing, https://www.starseq.com/life-science/next-generation-sequencing/, zuletzt abgerufen am 16.10.2023

[111] Datenbank des National Center for Biotechnology Information, Website zuletzt abgerufen am 17.10.2023

a) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
b) blastn (Search a nucleotide databases using a nucleotide sequence), https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch

[112] Morgulis, A. et al. (2008): Database indexing for production MegaBLAST searches. Bioinformatics. 24(16): 1757.1764

[113] RNAfold WebServer vom Institut für Theoretische Chemie der Universität Wien, http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi, zuletzt abgerufen am 17.10.2023

[114] Santa Lucia, J., Hicks, D. (2004): The thermodynamics of DNA structural motifs. Annu. Rev. Bioph. Biom. 33: 415-440

[115] WebLogo, Universität von Kalifornien, https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi, zuletzt abgerufen am 17.10.2023

[116] Haselbach, D. (2008): Detektion einzelsträngiger DNA mit der Hilfe von DNAzymen, Ba-chelorarbeit erstellt am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin

[117] He, S. et al. (2014): Highly specific recognition of breast tumors by an RNA-cleaving fluoro-genic DNAzyme probe. *Anal. Chem.* 87(1): 569-577

[118] Xiao, Y. et al. (2012): Establishing broad generality of DNA catalysts for site-specific hydrolysis of single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* 40(4): 1778-1786

[119] Xiao, Y.; Chandra, M.; Silverman, S.K. (2010): Functional compromises among pH tolerance, site specificity, and sequence tolerance for a DNA-hydrolyzing deoxyribozyme. *Biochemistry* 49: 9630-9637

[120] Dokukin, V.; Silverman, S.K. (2012): Lanthanide ions as required cofactors for DNA catalysts. *Chem. Sci.* 3(5): 1707-1714

[121] Chandra, M.; Sachdeva, A.; Silverman, S.K. (2009): DNA-catalyzed sequence-specific hydrolysis of DNA. *Nat Chem Biol.* 5: 718-720

[122] Lee, Y. et al. (2017): DNA-catalyzed DNA cleavage by a radical pathway with well-defined products. *J. Am. Chem. Soc.* 139(1): 255-261

[123] Gu, H. et al. (2013): Small, highly active DNAs that hydrolyze DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 135(24): 9121-9129

[124] Guillen, D. et al. (2020): A simple and affordable kinetic assay of nucleic acids with SYBR Gold gel staining. *PLoS ONE* 15(3) e 0229527:1-16

[125] Mei, S.H.J. et al. (2003): An efficient RNA-cleaving DNA enzyme that synchronizes catalysis with fluorescence signaling, *J. Am. Chem. Soc.* 125(2): 412-420

[126] New England Biolabs GmbH, Websites zuletzt abgerufen am 18.10.2023

a) 5´ DNA Adenylation Kit, https://www.neb.com/en/products/e2610-5-dna-adenylation-kit#Product%20Information
b) Thermostable 5´ App DNA/RNA Ligase, https://www.neb.com/en/products/m0319-thermostable-5-app-dna-rna-ligase#Product%20Information
c) Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit, https://www.neb.com/en/products/t1030-monarch-pcr-dna-cleanup-kit-5-ug#Product%20Information
d) Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit, Protocol, https://www.neb.com/en/products/t1030-monarch-pcr-dna-cleanup-kit-5-ug#Product%20Information

[127] Merck KGaA, Websites zuletzt abgerufen am 18.10.2023

a) DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I, https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/215/904/11745832910.pdf
b) DIG Application Manual for Filter Hybridization, https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/199/985/dig-application-manual-for-filter-hybridisation-iris.pdf

[128] Bio-Rad Laboratories GmbH, GS Gene Linker®, https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1655031D.pdf, zuletzt abgerufen am 18.10.2023

[129] LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Websites zuletzt abgerufen am 18.10.2023

a) UV-Crosslinker Bio-Link, https://www.labortechnik.com/sites/default/files/ue_006_d_bio-link-crosslinker_0.pdf
b) UV-Crosslinker CL-Serie, https://www.labortechnik.com/sites/default/files/ue_017_d_uv-crosslinker-cl-serie.pdf

[130] Fritsche, O. (2016): Mikrobiologie. Springer-Verlag: 29

[131] Buselmaier, W.; Haussig, J. (2018): Biologie für Mediziner. Springer-Verlag GmbH: 363

[132] Rodloff, A.C. (1999): Obligat anaerobe sporenbildende Stäbchen (Clostridien). In: Hahn, H. et al. (eds). Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer-Verlag: 356-365

[133] Vogt, K.; Hahn, H. (1999): *Bacillus*. In: Hahn H. et al. (eds) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer-Verlag: 350-256

[134] von Müller, L. (2018): Prävention von Infektionen mit *Clostridium difficile*, Neue europäische Leitlinie. *Trillium Diagnostik* 16(1): 10-12

[135] Panknin, H.-T. (2017): Nosokomiale Infektionen gestern und heute. Führende Infektionskrankheit – schicksalhaft? *MTA Dialog* 18(1): 18-31

[136] Panknin, H.-T. (2008): Verbreitung von *Clostridium difficile*: Welche Rolle spielt die Kontamination der Haut? Hygiene & Medizin 33(9): 383-384

[137] Exner, M.; Gebel, J. (2017): Empfehlung zur Auswahl sporizider Desinfektionsmittel bei Clostridium difficile-Infektionen im humanmedizinischen Bereich. *Hygiene & Medizin* 42(3): 38

[138] Exner, M.; Popp, W. (2012): Empfehlung der Sektion „Hygiene in der ambulanten und stationären Kranken- und Altenpflege/Rehabilitation“ der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene, Maßnahmenplan bei Patienten mit einer Clostridium difficile-Infektion in Pflegeeinrichtungen, Ambulanter Pflege und Reha-Einrichtungen. *Hygiene & Medizin* 37(4): 137-139

[130] Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. (2013): Guide to Preventing Clostridium difficile Infections. https://oeps.wv.gov/cdiff/Documents/hcp/APIC-2013-CDiff-Guidelines.pdf, zuletzt abgerufen am 19.10.2013

[140] Kampf, G. (2008): *Clostridium difficile* – was ist für eine effektive Desinfektion zu beachten? *Hygiene & Medizin* 33(4): 153-159

[141] Kampf, G. (2007): Reinigung und Desinfektion von Flächen. In: AGES – Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Prävention und Kontrolle von *Clostridium difficile* in Krankenhäusern und Einrichtungen der stationären Pflege: 100-108

[142] Ross, B.; Popp, W.; Zastrow, K.D. (2015): Hygiene-Tipp: Clostridium difficile - ein Proble-merreger mit zunehmendem Potential. *Passion Chirurgie* 5(04): Artikel 03_01

[143] Gesundheitsberichterstattung des Bundes – Gemeinsam getragen von RKI und DESTATIS, Einrichtungen. http://www.gbe-bund.de/glossar/Einrichtungen.html, zuletzt abgerufen am 19.10.2023

[144] Robert Koch-Institut (2018): Ausbruchsuntersuchungen bei *Clostridium (Clostridioides) difficile*. *Epidemiologische Bulletin* 14: 137-142

[145] Destatis (2017): 19,5 Millionen Patienten im Jahr 2016 stationär im Krankenhaus behandelt. Statistisches Bundesamt. Statistisches Bundesamt Pressemitteilung vom 14. August 2017, https://www.dkgev.de/media/file/24460.Anlage1_Krankenhausstatistik_2015_-_vorlaeufige_Ergebnisse.pdf, zuletzt abgerufen am 04.10.2018

[146] Robert Koch-Institut (2016): *Clostridium difficile*, RKI-Ratgeber. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Clostridium.html, zuletzt abgerufen am 04.10.2018

[147] Bauer, M.P. et al. (2011): *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet* 377(9759): 63-73

[148] Fath, R. (2017): Prophylaxe. Mit zwei Joghurt am Tag gegen Clostridium-Infektion. *Ärzte Zeitung* 16.06.2017, https://www.aerztezeitung.de/medizin/krankheiten/infektionskrankheiten/magen-darminfekte/article/937904/prophylaxe-zwei-joghurt-tag-schwere-durchfaelle.html, zuletzt abgerufen am 19.10.2013

[149] Astellas Pharma Europe Ltd (2012): Größte jemals durchgeführte Studie über *Clostridium difficile*-Infektion soll Klarheit über die tatsächliche Verbreitung der Krankheit schaffen. https://www.presseportal.de/pm/61801/2375124, zuletzt abgerufen am 04.10.2018

[150] Wolf, E. (2016): Infektion mit *Clostridium difficile*. Vancomycin als Standard. pta Forum On-line 8, https://ptaforum.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=8696; zuletzt abgerufen am 19.10.2023

[151] Hübner, C. (2015): Cost analysis of hospitalized *Clostridium difficile*-associated diarrhea (CDAD). *GMS Hygiene and Infection Control* 10: 1-8

[152] Fleßa, S.; Hübner, C. (2016): Analyse der Kosten von multiresistenten Erregern in den verschiedenen Gesundheitseinrichtungen (Krankenhaus, Reha, Pflegeheim, Arztpraxis). 13. Kongress für Krankenhaushygiene (DGKH), 10.-13. April 2016, https://www.krankenhaushygiene.de/referate/0cdadc7f688ed5dfff57f176788f6492.pdf, zuletzt abgerufen am 19.10.2023

[153] Hübner, C. (2013): Kostenanalyse der stationär behandelten *Clostridium-difficile*-assoziierten Diarrhö (CDAD). *Gesundheitsökonomie & Qualitätsmanagement* 18(2): 80-85

[154] Lübbert, C.; John, E.; von Müller, L. (2014): Clostridium-difficile-Infektion. Leitliniengerechte Diagnostik- und Behandlungsoptionen. *Dtsch. Ärztebl. Int.* 111 (43): 723-731

[155] Hagel, S.; Stallmach, A.; Vehreschild, M. (2016): Fäkaler Mikrobiota-Transfer bei rezidivierenden *Clostridium-difficile*-Infektionen Eine retrospektive multizentrische Beobachtungsstudie des MicroTrans-Registers. *Dtsch. Ärztebl. Int.* 113(35-36): 583-589

[156] Weber, D.J. et al. (2013): Role of the environment in the transmission of Clostridium difficile in health care facilities. *Am. J. Infect. Control.* 41(5) Supplement: S105-S110

[157] Exner, M.; Popp, W. (2013): Hygienekriterien für den Reinigungsdienst. *Hygiene & Medizin* 38(4): 152-157

[158] Wilbrandt, B. (2012): Schlussdesinfektion - Wie können wir dieses Ziel besser erreichen? *aseptica* 2: 5-7

[159] Exner, M. (2002). Nosokomiale Infektionen aus Sicht der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention. https://www.ihph.de/publikationen/NosokomialPost-OP.PDF, zuletzt abgerufen am 05.10.2018

[160] N.N. (2022): Personalmangel bei Pflegekräften verschärft sich, finanzielle Absicherung fehlt, Deutsches Ärzteblatt, https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/130701/Personalmangel-bei-Pflegekraeften-verschaerft-sich-finanzielle-Absicherung-fehlt, zuletzt abgerufen am 19.10.2023

[161] Radtke, R. (2022): Prognostizierter Bedarf an stationären und ambulanten Pflegekräften* in Deutschland bis zum Jahr 2035, Statista GmbH, https://de.statista.com/statistik/daten/studie/172651/umfrage/bedarf-an-pflegekraeften-2025/, zuletzt abgerufen am 19.10.2023

[162] Kucera, M. (2016): Outsourcingmarkt. Konzentration auf das Kerngeschäft. kma Online 29.06.2016, https://www.kma-online.de/aktuelles/management/detail/konzentration-auf-das-kerngeschaeft-a-31678, zuletzt abgerufen am 19.10.2023

[163] N.N. (2016): Outsourcing von Dienstleistungen Chancen und Risiken für Krankenhäuser, Kli-niken und medizinische Einrichtungen. https://www.abfallmanager-medizin.de/themen/outsourcing-von-medizinischen-dienstleistungen-chancen-und-risiken-fuer-krankenhaeuser-kliniken-und-medizinische-einrichtungen/, zuletzt abgerufen am 19.10.2023

[164] Bundesinnungsverband des Gebäudereiniger-Handwerks (2023): Die Branche, Daten und Fakten. https://www.die-gebaeudedienstleister.de/die-branche/daten-und-fakten, zuletzt abgerufen am 19.10.2023

[165] Statistisches Bundesamt (2013): Erzeugerpreisindizes für Dienstleistungen: Informationen zum Preisindex Reinigung von Gebäuden (WZ 2008: 81.2). https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesamtwirtschaftUmwelt/Preise/ErzeugerpreisindizesDienstleistun-gen/Tabellen/BrancheninfoReinigungGebaeude_Basis2010.pdf?__blob=publicationFile, zuletzt abgerufen am 05.10.2018

[166] Wirtschaftsverband Textil Service e.V. (2017): Zukunftsmarkt Textil Service. Branchenkompendium Textil Service

[167] Deutscher Textilreinigungs-Verband: Brancheninfos, Zahlen und Daten, https://www.dtv-deutschland.org/zahlen-und-fakten.html, zuletzt abgerufen am 19.10.2023

[168] Robert Koch Institut, Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (2003): Richtlinie für die Krankenhaushygiene und Infektionsprävention, Alte Anlagen. Hygienische Untersuchungen in Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen. Anlage zu Ziffer 5.6. und Anforderungen der Hygiene an die Wäsche aus Einrichtungen des Gesundheitsdienstes, die Wäscherei und den Waschvorgang und Bedingungen für die Vergabe von Wäsche an gewerbliche Wäschereien, Anlage zu den Ziffern 4.4.3 und 6.4, Elsevier, Urban & Fischer

[169] Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention beim Robert Koch-Institut (2004): Anforderungen an die Hygiene bei der Reinigung und Desinfektion von Flächen. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 47: 51-61

[170] Arbeitskreis Krankenhaus- & Praxishygiene der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (2015): Empfehlungen zur Hygiene in Klinik und Praxis. AWMF-Leitlinien-Register Nr. 029/006, Entwicklungsstufe: S1

[171] DIN EN 15224 (2017): Qualitätsmanagementsysteme - EN ISO 9001:2015 für die Gesund-heitsversorgung. Beuth Verlag

[172] DIN EN 14065 (2016): In Wäschereien aufbereitete Textilien, Risikoanalyse, Kontrollsystem Biokontamination. Beuth Verlag

[173] Haak, J.; Backhaus-Pohl, C.; Poldrack, R. (2015): Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen in Krankenhäusern und Reha-Kliniken in Mecklenburg-Vorpommern. *Hygiene & Medizin* 40(6): 242-247

[174] Gleich, P. (2016): Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen in stationären Pflegeeinrichtungen. Labor für Technische Hygiene Klinikum Bogenhausen

[175] Deutsches Institut für Gütesicherung und Kennzeichnung e.V. (2015): Gebäudereinigung im Gesundheitswesen Gütesicherung RAL-GZ 903. http://www.gggr.de/basics/pdfs/GZ903Gebaudereinigung.pdf, zuletzt abgerufen am 05.10.2018

[176] Wiener-Well, Y. et al. (2011): Nursing and physician attire as possible source of nosocomial infections. American *Am. J. Infect. Control.* 39(7): 555-559

[177] Bloomfield, S.F. et al. (2011): The infection risks associated with clothing and household linens in home and everyday life settings, and the role of laundry. International Scientific Forum on Home Hygiene, http://europeantissue.com/wp-content/uploads/The-infection-risks-associated-with-clothing-and-household-linens.pdf, zuletzt abgerufen am 17.10.2018

[178] Mitchell, A.; Spencer, M.; Edmiston, C. Jr (2015): Role of healthcare apparel and other healthcare textiles in the transmission of pathogens: a review of the literature. *J. Hosp. Infect.* 90(4): 285-292

[179] Fijan, S.; Šostar Turk, S. (2012): Hospital textiles, are they a possible vehicle for healthcare-associated infections? *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9(9): 3330-3343

[180] Gerhardts, G. et al. (2012): Welche Rolle spielen textile Oberflächen in der Infektionskette? *Hygiene & Medizin* 37(10): 400-403

[181] Wirtex, DTV, Berufsverband Hauswirtschaft, wfk (2017): Handbuch zur Validierung von des-infizierenden Waschverfahren für die Aufbereitung von Textilien aus hygienisch sensiblen Be-reichen. https://www.wirtex.de/fileadmin/WIRTEX/Website_Content/Documents/2017_Handbuch_Validierung_desinfWaschverfahren.pdf, zuletzt abgerufen am 08.10.2018

[182] Robert-Koch-Institut, Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (2017): Liste der vom Robert Koch-Institut geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren. Stand: 31.10.2017. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 60, 1274-1297, Springer-Verlag

[183] Verbund für Angewandte Hygiene e.V. (2015): Desinfektionsmittel-Liste des VAH. Stand: 01.04.2015. mph-Verlag

[184] Vossebein, L. (2008): Textilhygiene. *Praktische Arbeitsmedizin* 13: 12-14

[185] Heintz, M.; Bohnen, J. (2011): Hygiene in gewerblichen Wäschereien. *Hygiene & Medizin* 7/8: 292-299

[186] DIN 10524 (2020): Lebensmittelhygiene – Arbeitsbekleidung in Lebensmittelbetrieben. Beuth Verlag

[187] Krämer, J.; Prange, A. (2017): Lebensmittel-Mikrobiologie. Eugen Ulmer KG

[188] Beeh, M. (2012): Sporen in wasserführenden Systemen. Desinfektionsmethode für sporenbelastete Prozesswässer in gewerblichen Wäschereien. *ReinRaumTechnik* 4: 44-45

[189] Mucha, H.; Grunwald, D.; Beeh, M. (2012): Entwicklung einer effizienten Desinfektionsmethode für sporenbelastete Prozesswässer in gewerblichen Wäschereien. IGF-Forschungsprojekt 16416 N, Schlussbericht (2012)

[190] Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit 2023, zuletzt abgerufen am 23.10.2023

a) Erkrankung durch *Bacillus cereus* in Lebensmitteln. https://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/hygiene/bakterien/bacillus_cereus/index.htm
b) Erkrankung durch *Clostridium perfringens* in Lebensmitteln. https://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/hygiene/bakterien/clostridium_perfringens/index.htm,
c) Erkrankung durch *Clostridium botulinum* in Lebensmitteln. https://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/hygiene/bakterien/clostridium_botulinum/index.htm,

[191] Heiss, R.; Eichner, K. (1995): Chemische, physikalische und mikrobiologische Grundlagen der Verfahren, Springer-Verlag: 222

[192] Grömling, M. (2007): Branchenporträt Gebäudereiniger-Handwerk. Bundesinnungsverband des Gebäudereiniger-Handwerks

[193] Böttger, G. (2014): HACCP in der Lebensmittelindustrie – Wachstumsmarkt HACCP-Bekleidung. *Wäscherei + Reinigungspraxis* 11: 56-61

[194] Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene. https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0001:0054:de:PDF, zuletzt abgerufen am 23.10.2023

[195] IFS Management GmbH:

a) Standard zur Beurteilung der Qualität und Sicherheit von Lebensmitteln, Stand 2014, Version 6.1. https://www.ifs-certification.com/images/standards/ifs_food6_1/documents/standards/IFS_Food_V6_1_de.pdf, zuletzt abgerufen am 08.10.2018
b) Standard zur Auditierung der Produkt- und Prozesskonformität in Bezug auf Lebensmittelsicherheit und -qualität, Stand 2023, Version 8, https://www.ifs-certification.com/images/ifs_documents/IFS_Food_v8_standard_DE_1681804099.pdf, zuletzt abgerufen am 23.10.2023

[196] DIN 10516 (2020): Lebensmittelhygiene - Reinigung und Desinfektion. Beuth Verlag

[197] Kwok, C.K., Yet al. (2013): A hybridization-based approach for quantitative and low-bias single-stranded DNA ligation. *Anal. Biochem.* 435:181-186

10 Anhang

Ergebnisse der SELEX zur Identifizierung potentieller Aptamere gegen Dipicolinsäure.

Tabelle A1 enthält die 85 häufigste Varianten aus der 3. Selektionsrunde.

Tab. A1: Übersicht über die 85 häufigste Varianten potentieller Aptamere gegen Dipicolinsäure aus der 3. Selektionsrunde

Variante	Sequenz	MFE [1] [kcal/mol]	Häufigkeit der Reads in SELEX-Runde 3
V1	GGGGACGGACCGAAGTCTCTGGCAACGTTAGGCGGTCCCC	-5.2	2698
V2	GGGGGGAGGAAATGGCAACGAGCGGCCTACCACCGGCCCC	-4.7	2563
V3	GGGGGCCGCAAAGCCTGCTGATATCAGGACGTCCCACCCC	-4.1	2286
V4	GGGGCGGCAAACGACCCTGAATTCCCCGACGCGCTTCCCC	-4.9	1804
V5	GGGGACGCGGCGCGACACTGGTAGCCGAGGGACCCGCCCC	-6.1	1635
V6	GGGGCGGGCGCGCACCGTGTCCACACTCCTTCGTCTGTCC	-5.5	1620
V7	GGGCACGACGAAGCACACCCCTCACGATGTCGCGCTGTCC	-2.6	1498
V8	GGGGACGGCAGGTGCATGCAAGTTTGGACGCCTGTACCCC	-6.3	1381
V10	GGGGGGACGAGAGGAGGGGTGGGGAGATCCCACCTTGGCC	-6.5	1276
V11	GGGGCACCTGGAGGGGACATGATCTTGAGGTGGCCTGCCC	-7.0	1257
V12	GGGCGGGGAAACGGTGCCTCGGGGATAGTGATGCGCGGCC	-2.4	1203
V13	GGGGACGGCGCATACATTCCTAGTTCGTCGGTACCACCCC	-1.9	1147
V14	GGGGGCACAGGGGCTCAATAGGTCAGGTATTGCCCCCCCC	-7.5	1070
V15	GGGCGGGAATGGCAATCCCACTCGCCTTAGCCCTTGGCCC	-6.8	1001
V16	GGGCCACCGCACAGTACCAGTTCTAGAAGGTTTCGCCCCC	-1.0	985
V17	GGGGCGGGGAACCCAGACGGTGTCGCTCATGGGTCGCGCT	-7.6	974
V18	GGGGCGTAAGCAGCGACCGCTCCACGAGGCCAATGCCCCC	-6.5	930
V19	GGGGGGGGCCCGGTAGGCGAGTGGCACTAAGGGTCGTCCC	-7.5	929
V20	GGGGGCTGCACATGACTGCGGGACATCCCTTTCTGTGCCC	-4.0	916
V21	GGGGCGGGGATGCAGATTAGCTACGTTGGGAAATGGCGCC	-2.3	913
V22	GGGGCCGGAAATGGACCAAGCACCTTTACTTGGTGCCCCC	-8.2	896
V23	GGGGGCAGGGGGGCCTAGCCTCACTTGCGGTGAGCGCGCC	-7.9	866
V24	GGGGGGCTCCCAGCACAGAAGGTGGGACCATCATGCCCCC	-9.2	855
V25	GGGGGGGCCCATGATGGGTATGTAATTGCCACCTGGCCCC	-6.4	833
V26	GGGGCGGCGAGGACTGTCGTTAGTTGTAGCTCCGAACCCC	-3.9	832
V27	GGGCACGGGGCAGGAAAGCGACCTCACCTCTCCTCCGGCC	-6.4	831
V28	GGGGGGGCGTAACGAATAGATAAGGTAGCCTGTGCCTGCC	-2.4	823
V29	GGGGACCTGACCGTAAGCCACTGACAATCCGACGTGCCCC	-0.4	816
V30	GGGGCGGGCCTACACGCGCGAGTCTACATCCTACAGGCCC	-4.0	796
V31	GGGGGCGGCGAAAGATGGGTCCCGGTTAAGTGTTAGGCCC	-1.5	780
V32	GGGGGCCAGGCGGAACTCTGACTACCCAACTACCCCGTCC	-2.3	771
V33	GGGCCGTGCAGATCGGTCGGGGCAATCCTCCGCGTCCCCC	-5.0	753
V34	GGGGGGGGTAGTCACGACCCAATTCCATTTCCACCTCGCC	-2.9	729
V35	GGGGCCGATAGGTTCAGTCCGTAGTACCGAAGGCCCGCCC	-4.9	693
V36	GGGCCACGCACCGGTTAACAAGTGGTTTAGACTCCGCGCC	-3.3	684
V37	GGGGAGTGGATGTGAAGGTTACTAAACTTGGCTGCTCCCC	-5.2	680
V38	GGGGCAGCCGAGGCCCGACCGAGAGCCTCGTCACTGGCCC	-9.9	669
V39	GGGGCGCGGCGGAGAGACGAGAAACACATCCTGCCTGGCC	-5.3	664
V40	GGGGACCAGCAGGAGCGACTTTCCCACAATGCTGTACGCC	-3.5	656
V41	GGGGACACTAGAGCAGCCCCACTTCGTTACACGCCGGCCC	-3.6	656

[1] MFE = *Minimum free energy* der thermodynamisch stabilsten Sekundärstruktur [113] (Faltungsvorhersagen s. Tab. A2) nach Matthews Modell 2004

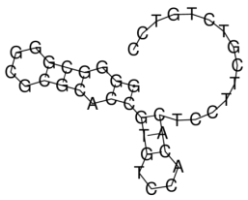
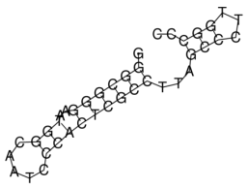
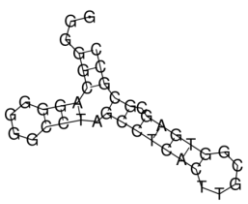
Tab. A1: Übersicht über die 85 häufigste Varianten potentieller Aptamere gegen Dipicolinsäure aus der 3. Selektionsrunde - Fortsetzung

Variante	Sequenz	MFE* [kcal/mol]	Häufigkeit der Reads in SELEX-Runde 3
V42	GGGCACCCACAGTGTAGCGATTACGAGACCACGCTCCCCC	-4,60	649
V43	GGGCACACACAGGAATAATACTCAGTTACCATACCCGCCC	-0,50	648
V44	GGGCCCACACGGTGGCGGATTAGAAATCCGTTGTCGCGCC	-6,90	645
V45	GGGGCCACGGGCGATCCAGATGGAGGGGTGTCTTGGGGCC	-3,70	641
V46	GGGGACCGGCACATTGGAATCAAGGCAATCCCGGCACCCC	-6,20	640
V47	GGGGCGGAACGAACAACGAAGATTGGGGACATGCTCCTCC	-1,90	629
V48	GGGCGGACGGCTCGCACTGATCGTCTATAACTCGGTCGCC	-4,40	624
V49	GGGGCGGGTGCGGACTGTAGACTATAGACGGTCGCATGCC	-7,10	611
V50	GGGGGTGCGGACAGCAGGAATACTTACAATGGCGCCCCCC	-6,40	607
V51	GGGGAGCAGAAGACGGGTTGAGGAGAGCCTCGGACCCCCC	-5,00	598
V52	GGGGGCCAATGCTGATTGCCCTTGCACCTATACGCTGCCC	-4,50	596
V53	GGGGTGTACACAGTCAACCTAACCTGCTTGGTCCTGGCCC	-2,40	592
V54	GGGGGGAGCACCGACACGAAGACACATGCCAGCTGTTGCC	-0,80	588
V55	GGGGCAAGGGGATCTCAAGGCGCGCTGTATGTGGTACCCC	-1,90	586
V56	GGGGGGCGAGGAGCGTTTAAGTACCTAGTGTGGACCCCCC	-4,50	585
V57	GGGGACCGCCGTGGGGGAGCTCTTCGCCCGTACGGTGCCC	-11,00	580
V58	GGGCGCCACAGGAAGACCATCGGGCCCAAACACCGTCCCC	-4,90	580
V59	GGGCCACCATACGATCGGAAGCAACCTGCCCAAGCGCCCC	-1,90	578
V60	GGGGGGGCTGTATCGAGGGGGGTACGCACCCACCGTCTCC	-5,90	575
V61	GGGGGGCAGCATGCTAGAGCATCTTTCTCCGTCTTACGCC	-2,20	567
V62	GGGCAGCGATACGTTGCTTAGTGCACCTAATCGGTCCCCC	-4,00	562
V63	GGGGGCGGACCGGCTTCACTAATGCCAGAGTGGACGGGCC	-4,90	559
V64	GGGGCGGGAACCAAGGCTGCGTACTGCTGTCCTAGCCGCT	-3,50	556
V65	GGGGACACGGAAGCTGCACCAACGTCTTGTCGTTAGCCCC	-2,70	550
V66	GGGGGCGGGTAACCGTCAAGGAGGCTGTGAAATGCCCGCC	-7,10	550
V67	GGCAACGGGGAGGGTTACGCCTTTTCGGCCGCAACGCCCC	-3,60	549
V68	GGGGAGGCGGGGGTGGTTGATAACAACGGCACTATGGCCC	-4,70	546
V69	GGGCACAAACCTGGAAGCCGTTACGGCCTCGCTCCTGCCC	-5,70	545
V70	GGGGGCAGACCCGTAGGCCTGTTGTTTCTCGCCCTTTGCC	-3,50	544
V71	GGGCAGGAGGCCGGAGACTACAGCTCCCGCTGGCAACCCC	-5,50	542
V72	GGGGGCACAGAGTGACCAATGACACACGCCATGCAGTCCC	-3,70	542
V73	GGGGGCGGGGGTGCGCGTCAGAAGCCTTTCTCCTCTCGCC	-5,10	539
V74	GGGGAGGACATCGATAGACTCGAAACGGCCTATACCGCCC	-4,10	537
V75	GGGGGAGGGTGCCCGTGGCCCTGTCGCACGGGATCTGCCC	-8,70	536
V76	GGGGGGTGCGAGCTACCGGGCTGCAAAGATCTCCGGGGCC	-3,70	530
V77	GGGGGCCCGAGTGGGGACCGGGCTAGGTTGAGACCCCCCC	-9,20	530
V78	GGGGGGACCATTCCGAACTGCTACTCCTATCACTCGTCCC	-1,50	529
V79	GGGGAGCGGGTAAGAAACGGGGGGGGTAGGCGGTTTCCCC	-3,20	525
V80	GGGCACATACCAACGCGGCTACCCCGTTTGCATTGGCCCC	-5,10	521
V81	GGGGACAGGTCAGGTCGGCGAAGACAGTTTCTCCATGGCC	-0,80	515
V82	GGGGGCGTCCGCTAGCCGTCTTGGACGCACTAGGGTCCCC	-8,30	514
V83	GGGCACAGGACGAAGGCGGTCCAGTCGCCAGCTAGTGTCC	-5,20	511
V84	GGGGAGGCCGTGCTACTGAGATTTTGATAAGTGTGCCGCC	-2,10	510
V85	GGGCAAACCGTGGATAACACGAATTCCGCACCCGGCCGCC	-5,70	501

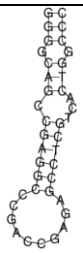
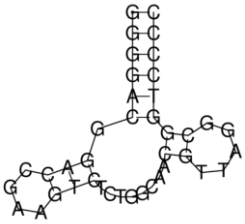
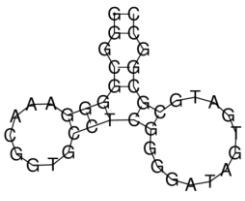
[1)] MFE = *Minimum free energy* der thermodynamisch stabilsten Sekundärstruktur [113] (Faltungsvorhersagen s. Tab. A2)

Tabelle A2 sind die Sekundärstrukturen der 85 häufigsten Varianten aus der 3. Selektionsrunde unterteilt in Kategorien wiedergegeben. Die mit dem RNAfold WebServer [113] erstellten Faltungsvorhersagen wurden anhand der Anzahl und Lage der Loops sowie der allgemeinen Form in die Kategorien S1 bis S12 eingeordnet. Grau unterlegte Kategorien stellen selten auftretende Strukturen dar, die zur besseren Übersicht gepoolt wurden.

Tab. A2: Übersicht über die Sekundärstrukturen [113] der 85 häufigsten Varianten aus der 3. Selektionsrunde

Strukturkategorie	Beschreibung	Varianten	Beispiel
S1	1 geschlossener Loop mit Stamm, i-Form bzw. abgeknickte i-Form	V5, V7, V49	V05
S2	1, 2 oder 4 geschlossene Loops + 1 offener Loop am Stammende, i-Form bzw. abgeknickte i-Form	V6, V10, V30, V41, V63, V66, V67, V76	 V06
S3	2 geschlossene Loops + 1 offener Loop ~mittig im Stamm, i-Form bzw. abgeknickte i-Form	V15, V36, V42	 V15
S4	2 geschlossene Loops mit Stamm, i-Form	V3, V8, V17, V39, V43, V50, V64, V75, V80	V03
S5	2 geschlossene Loops mit Stamm, abgeknickte i-Form	V9, V22, V24, V44, V51, V82	V09
S6	2 geschlossene Loops an den Enden, abgeknickte i-Form	V23, V31, V33, V48, V52	 V23

Tab. A2: Übersicht über die Sekundärstrukturen [113] der 85 häufigsten Varianten aus der 3. Selektionsrunde - Fortsetzung

Strukturkategorie	Beschreibung	Varianten	Beispiel
S7	2 geschlossene Loops + 1 offener Loop am Stammende, i-Form	V14, V25, V34, V35, V40, V47, V58, V60, V61, V70, V81, V84, V85	V14
S8	3 geschlossene Loops mit Stamm, i-Form	V2, V4, V18, V19, V27, V37, V45, V46, V54, V62, V65, V71, V72, V73, V78	V02
S9	3 geschlossene Loops mit Stamm, abgeknickte i-Form	V38, V53, V56, V69, V79, V83	 V38
S10	3 oder 4 geschlossene Loops mit Stamm, y-Form	V1, V20, V21, V59, V77	 V01
S11	3 geschlossene Loops + 1 offener Loop am Stammende, i-Form	V11, V13, V16, V26, V32, V55, V68, V74	V11
S12	4 oder 5 Loops mit Stamm, i-Form bzw. abgeknickte i-Form	V12, V28, V29, V57	 V12