

FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR SILICATFORSCHUNG ISC
FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGIE UND ANGEWANDTE ÖKOLOGIE IME
HOCHSCHULE FÜR ANGEWANDTE WISSENSCHAFTEN COBURG (ISAT)

BIOQUANT

BMBF Zukunftstechnologien für die industrielle Bioökonomie

Abschlussbericht

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

BMBF
Verbundvorhaben: **Biohybride DNA:Metall-Quantencluster basierte
Sensor-Plattformtechnologie
(BioQuant)**

Berichtszeitraum: **01.10.2021 – 30.09.2024**

Verfasser: **Fraunhofer ISC:
Patrick Witzel
Dr. Marina Gárdonyi,
Dr. Jürgen Meinhardt**

**Fraunhofer IME:
Stefano Di Fiore
Dr. Greta Nölke**

Förderkennzeichen: **031B1121**

Zuwendungsgeber: **BMBF**

Projektträger: **PTJ**

Datum: **30.04.2025**

Projektlaufzeit: **01.10.2021 – 30.09.2024**

DOI: **<https://doi.org/10.34657/20568>**

Handle: **<https://oa.tib.eu/renate/handle/123456789/21551>**



Inhalt

1	Kurzbericht	4
1.1	Aufgabenstellung und Stand der Technik	4
1.2	Ablauf des Vorhabens	4
1.3	Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit.....	4
2	Eingehende Darstellung	6
2.1	Zielsetzung	6
2.2	Arbeitspaket 1 Design, Produktion, Charakterisierung und Optimierung von maßgeschneiderten QC:DNAs	7
2.2.1	Task 1.1 Design, Herstellung und Charakterisierung von QC:DNAs.....	7
2.2.2	Task 1.2 Optimierung von QC:DNA-Konstrukten.....	11
2.3	Arbeitspaket 2 Multiplex-Sensor-Arrays und logische Sensorsysteme	14
2.4	Arbeitspaket 3 Bioengineering von QC:DNA.....	14
2.4.1	Task 3.1: QC:DNA-Funktionalisierung.....	14
2.4.2	Task 3.2 QC:DNA-Immobilisierung	18
2.5	Arbeitspaket 4 Systemintegration	20
2.6	Arbeitspaket 5 Projektkoordination, -verwertung und -verbreitung.....	20
2.7	Verwertung	20
2.8	Fremdfortschritt.....	21
2.9	Veröffentlichungen der Ergebnisse	21

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 031B1121 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den AutorInnen.

1 Kurzbericht

1.1 Aufgabenstellung und Stand der Technik

Das Projekt BioQuant zielte darauf ab, DNA-stabilisierte Metall-Quantencluster (QC:DNA) für die industrielle Herstellung und kommerzielle Anwendung zu testen und weiterzuentwickeln. Ausgangspunkt ist der Bedarf an fortschrittlichen Methoden für den spezifischen und quantitativen Nachweis von Molekülen, die in vielfältigen Forschungs- und Anwendungsgebieten essenziell sind. Die derzeitige Lab-on-a-Chip-Technologie (LOC) bietet hierfür keine umfassenden Lösungen, da sie den Nachweis mehrerer Analyte nicht ermöglicht und Einschränkungen hinsichtlich Kosten, Empfindlichkeit, einfacher Handhabung und Haltbarkeit aufweist.

Im Rahmen des BioQuant-Projekts sollten diese Einschränkungen überwunden werden, indem eine neuartige Klasse biologischer Nanomaterialien – die DNA-stabilisierten Metall-Quantencluster (QC:DNA) – mit Mikrofluidik kombiniert wird, um die nächste Generation von LOC-basierten Technologien für industrielle Anwendungen zu entwickeln. Zu Projektbeginn basierte der wissenschaftliche und technische Stand auf bestehenden Ansätzen zur DNA-Immobilisierung und Sensorentwicklung, die jedoch in ihrer Effizienz und den Einsatzmöglichkeiten begrenzt und für die Nutzung mit QC:DNA nicht etabliert waren. QC:DNA sind bis dato noch nicht kommerziell im Einsatz, da viele Fragen zur Beziehung zwischen DNA-Sequenz und Fluoreszenz, der Synthese, der Stabilität und den sensorischen Eigenschaften noch unzureichend geklärt sind.

1.2 Ablauf des Vorhabens

Im Rahmen des Projekts BioQuant wurden grundlegende Fragestellungen zur Technologie der QC:DNA umfassend untersucht. Es wurden neuartige QC:DNA entworfen und getestet, Syntheseprotokolle optimiert und die Stabilität der QC:DNA bei Lagerung sowie in relevanten Umgebungslösungen geprüft. Für die praktische Anwendung erfolgte die Entwicklung innovativer Sensordesigns, gefolgt von der Erarbeitung von Immobilisierungsprotokollen für QC:DNA auf verschiedenen Substraten. Parallel dazu wurde die spezifische Bindung von Analyten durch die Kopplung der QC:DNA mit Biomarkern erforscht. Um die prinzipielle Eignung von QC:DNA für die Hochdurchsatzsensorik nachzuweisen, wurde ein Hochdurchsatzsystem basierend auf Mikrotröpfchen in einem mikrofluidischen System mit integrierter Signalauslese im kompakten Maßstab entwickelt und optimiert.

1.3 Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit

Das BioQuant-Projekt hat wesentliche Fortschritte für die sensorische Anwendung von QC:DNA erzielt. Die Fraunhofer-Institute haben über 120 neue QC:DNA etabliert und getestet, wobei mehr als 60 auf eigene innovative Designs zurückzuführen sind. Diese wurden durch systematische Variationen im Aufbau der DNA-Sequenzen und der Metallbasis gewonnen. In umfangreichen Screenings mit Substanzen aus den Bereichen Mykotoxine, Arzneimittel und hormonell wirkende Stoffe zeigten QC:DNA ein intrinsisch vorhandenes Potential, diese Stoffe qualitativ wie auch quantitativ zu erfassen. Intrinsisch bedeutet in diesem Fall, dass keine Funktionalisierung der QC:DNA mehr erforderlich ist. Vielversprechende Kandidaten wurden für weitere Entwicklungen angepasst und optimiert. Dieses intrinsische Sensorvermögen der QC:DNA stellt einen zentralen Erfolg des BioQuant-Projekts dar und bietet erhebliches Potential für die Entwicklung zukünftiger Sensorplattformen mit einer Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten.

Bei der Funktionalisierung mit Biomolekülen konnten erfolgreiche Protokolle zur Anbindung von Peptiden an QC:DNA entwickelt werden. Darüber hinaus wurden für ein Aptamersensing mehr als 20 Methoden zur Kopplung von QC:DNA mit Aptameren entwickelt, die jedoch in nachfolgenden Projekten bis zur vollen Funktionalität optimiert werden müssen.

Um eine breite Nutzbarkeit der QC:DNA-Technologie sicherzustellen, wurden Protokolle zur Immobilisierung der QC:DNA auf verschiedenen Substraten unter Erhalt ihrer Funktionalität entwickelt. Die Immobilisierung von QC:DNA auf Partikeln oder Oberflächen mit den optimierten Protokollen konnte erfolgreich demonstriert werden.

Die Zusammenarbeit mit dem ISAT der Hochschule Coburg war von entscheidender Bedeutung für das BioQuant-Projekt. Das ISAT steuerte eine umfassende Expertise in fluidischen und optischen Technologien bei, wodurch die material- und biotechnologischen Kompetenzen der Fraunhofer-Partner maßgeblich ergänzt wurden. Diese Kooperation ermöglichte die Entwicklung innovativer Lösungen, die für zukünftige Forschungsprojekte und Anwendungen von erheblichem Wert sind. In enger Abstimmung entwickelte das ISAT ein mikrofluidisches Hochdurchsatzsystem auf Basis von phasen-getrennten Mikrotröpfchen, das eine fluoreszente Auslese der QC:DNA-Signale ermöglicht. Der Proof-of-Concept einer sensorisch aktiven QC:DNA konnte im System des ISAT erfolgreich demonstriert werden. Diese Ergebnisse und die gewonnenen Erkenntnisse eröffnen vielversprechende Perspektiven für den Einsatz von QC:DNA in der biotechnologischen Forschung und der industriellen Sensorik.

Insgesamt hat das Projekt BioQuant dazu beigetragen, die Anwendbarkeit und die Anwendungsmöglichkeiten von QC:DNA erheblich zu erweitern und den Weg für weitere Forschungsinitiativen und Kooperationen zu ebnen.

2 Eingehende Darstellung

2.1 Zielsetzung

Sensorkonzepte wie Lab-on-a-Chip (LOC) sind essentielle und leistungsfähige Diagnosewerkzeuge im Gesundheitswesen und werden zunehmend im industriellen Umfeld der Bioökonomie eingesetzt. Die Kombination von Biologie und Technologie ist ein wichtiger Treiber für die Entwicklung neuartiger Biosensoren für die Bioökonomie. Sie ermöglicht zukünftige Innovationssprünge, die für die Sicherung der Wettbewerbsfähigkeit des Innovations- und Technologie-Standorts Deutschland erforderlich sind. Die derzeitige LOC-Technologie ist jedoch keine *All-in-One*-Lösung, da sie nicht den Nachweis mehrerer Analyten erlaubt und Limitierungen in Bezug auf Kosten, Empfindlichkeit, einfache Handhabung und Haltbarkeit aufweist.

Im Projekt BioQuant sollten die bestehenden Limitierungen aktueller Biosensoren überwunden werden, indem eine neuartige Klasse biologischer Nanomaterialien – DNA-stabilisierte Metallquantencluster (QC:DNA) – mit Mikrofluidik kombiniert werden, um die nächste Generation von LOC-basierten Technologien für industrielle Anwendungen zu entwickeln. QC:DNAs bestehen aus kurzen DNA-Molekülen, die einen Cluster aus 6–20 Metallionen oder -atomen stabilisieren^{1,2,3}. Aufgrund der intrinsischen physikochemischen Eigenschaften von nanoskaligen Quantenclustern in Kombination mit der Spezifität und Vielseitigkeit von DNA haben QC:DNAs ein hohes, disruptives Potenzial, um neuartige, leistungsstarke Biosensoren der nächsten Generation zu entwickeln.

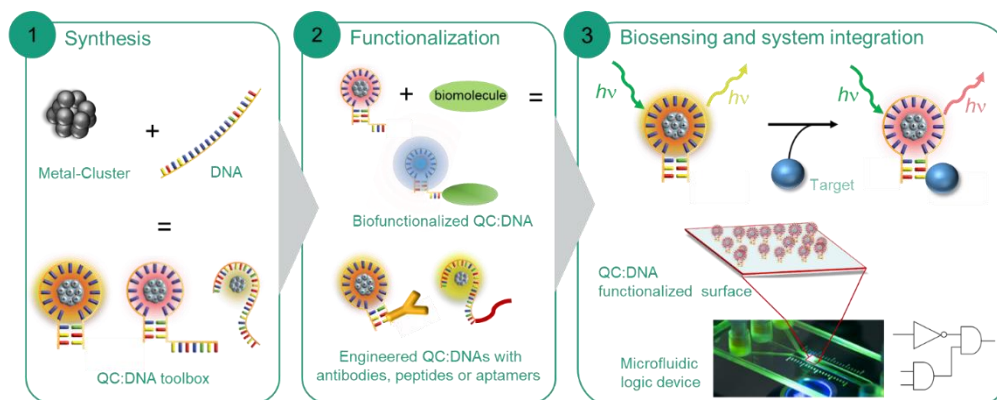


Abbildung 1 | QC:DNA-Technologie für fortschrittliche Biosensoranwendungen. (1) QC:DNA synthetisiert aus kurzen DNA-Sequenzen, die einen Cluster aus 6–20 Metallionen oder -atomen stabilisieren. Die QC:DNA interagiert mit Licht basierend auf elektronischen Übergängen zwischen Energieniveaus und kann als optischer Emittor fungieren. (2) Die Variation der DNA-Struktur oder die Funktionalisierung mit Biomolekülen (z. B. Antikörper, Peptide, Aptamere) ermöglicht die spezifische Detektion von Analyten. (3) Die Interaktion der QC:DNA mit dem Zielmolekül verändert die Fluoreszenzemis-

¹ Sengupta B. et al. Base-directed formation of fluorescent silver clusters. J. Phys. Chem. C., 2008, 112, 18776–18782.

² Sengupta B. et al. DNA templates for fluorescent silver clusters and I-motif folding. J. Phys. Chem. C., 2009, 113, 19518–19524.

³ Vosch T. Strongly emissive individual DNA-encapsulated Ag nanoclusters as single-molecule fluorophores. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007, 104 12616–12621.

sion, wpatentelche zur quantitativen Analyse genutzt werden kann. QC:DNA kann in LOC-Technologien wie in mikrofluidische Geräte integriert werden, um Biosensoren der nächsten Generation herzustellen.

Um dieses Ziel zu erreichen, sollte in BioQuant durch die transdisziplinäre Expertise der Partner in den Bereichen der Molekularbiologie, Quantenphysik, Chemie und Ingenieurwesen eine einzigartige Technologieplattform auf Basis von Metall-DNA-Kompositmaterial entwickelt werden, welche ultrasensitive Nachweisverfahren im industriellen Umfeld ermöglicht (siehe Abbildung 1).

2.2 Arbeitspaket 1

Design, Produktion, Charakterisierung und Optimierung von maßgeschneiderten QC:DNAs

2.2.1 Task 1.1 Design, Herstellung und Charakterisierung von QC:DNAs

Zielsetzung des Arbeitspakets 1 war die Entwicklung und Bereitstellung maßgeschneiderter QC:DNAs für intrinsische Sensingzwecke oder für weitere Funktionalisierungen. Innerhalb von Task 1.1 wurde das Design, die Herstellung und die Charakterisierung im Projekt zu verwendender QC:DNA am ISC und IME durchgeführt. Mit dem Ziel das Portfolio der vorhandenen QC:DNA-Konstrukte zu erweitern und Ausübungsfreiheit (Freedom to Operate, FTO) zu gewährleisten, wurden im Rahmen des BioQuant-Projekts mehr als 150 verschiedene QC:DNA etabliert und für weitere Arbeitspakete charakterisiert (Abbildung 2).

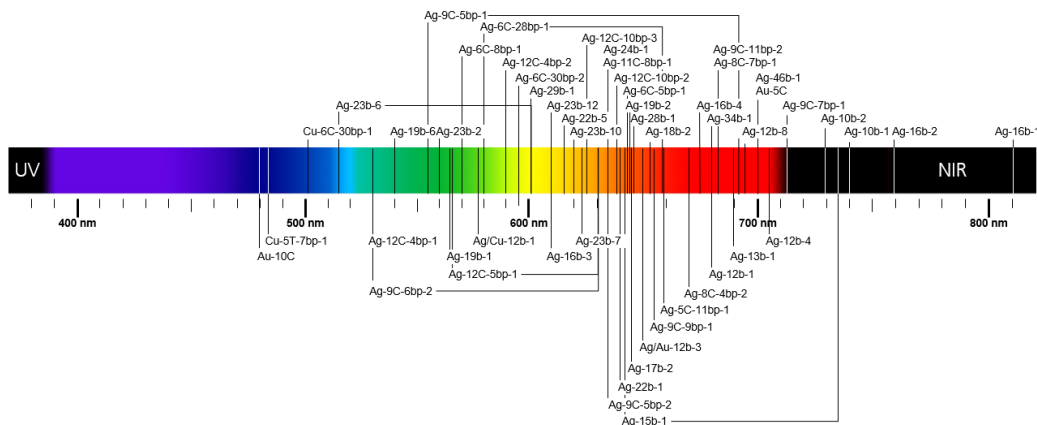


Abbildung 2 | Übersicht der Emissionsmaxima für die meisten der im Rahmen des BioQuant-Projekts etablierten, entwickelten und optimierten QC:DNA.

Davon wurden mehr als 50 neuartige QC:DNA mit unterschiedlichen Strukturen (linear, Haarnadel, palindromisch, triplex und G-Quadruplex) und Fluoreszenzeigenschaften identifiziert und am Fraunhofer ISC und IME synthetisiert.

Basierend auf QC:DNA mit bekannter Umgebungssensitivität wurde ein breit angelegtes Screening durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurde das intrinsische Potential der Quantencluster zur Detektion der definierten Analyte (Toxine und Arzneimittelrückstände) getestet und ausgewertet. Ein erstes Screening wurde dazu genutzt, um Kandidaten ausfindig zu machen, die im Anschluss genauer untersucht wurden. In diesem Screening wurde untersucht, ob in Anwesenheit der jeweiligen Analyte Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften der QC:DNAs beobachtet werden können. In einem zweiten Screening wurde die Reproduzierbarkeit der im ersten Screening erhaltenen Ergebnisse aufgezeigt und die QC:DNAs wurden hinsichtlich ihrer Sensitivität genauer charakterisiert. In einem dritten und

letzten Screening wurde die Reproduzierbarkeit der Messungen mit einer Dreifachbestimmung abgesichert und es wurde ein größerer Konzentrationsbereich der Analyte untersucht.

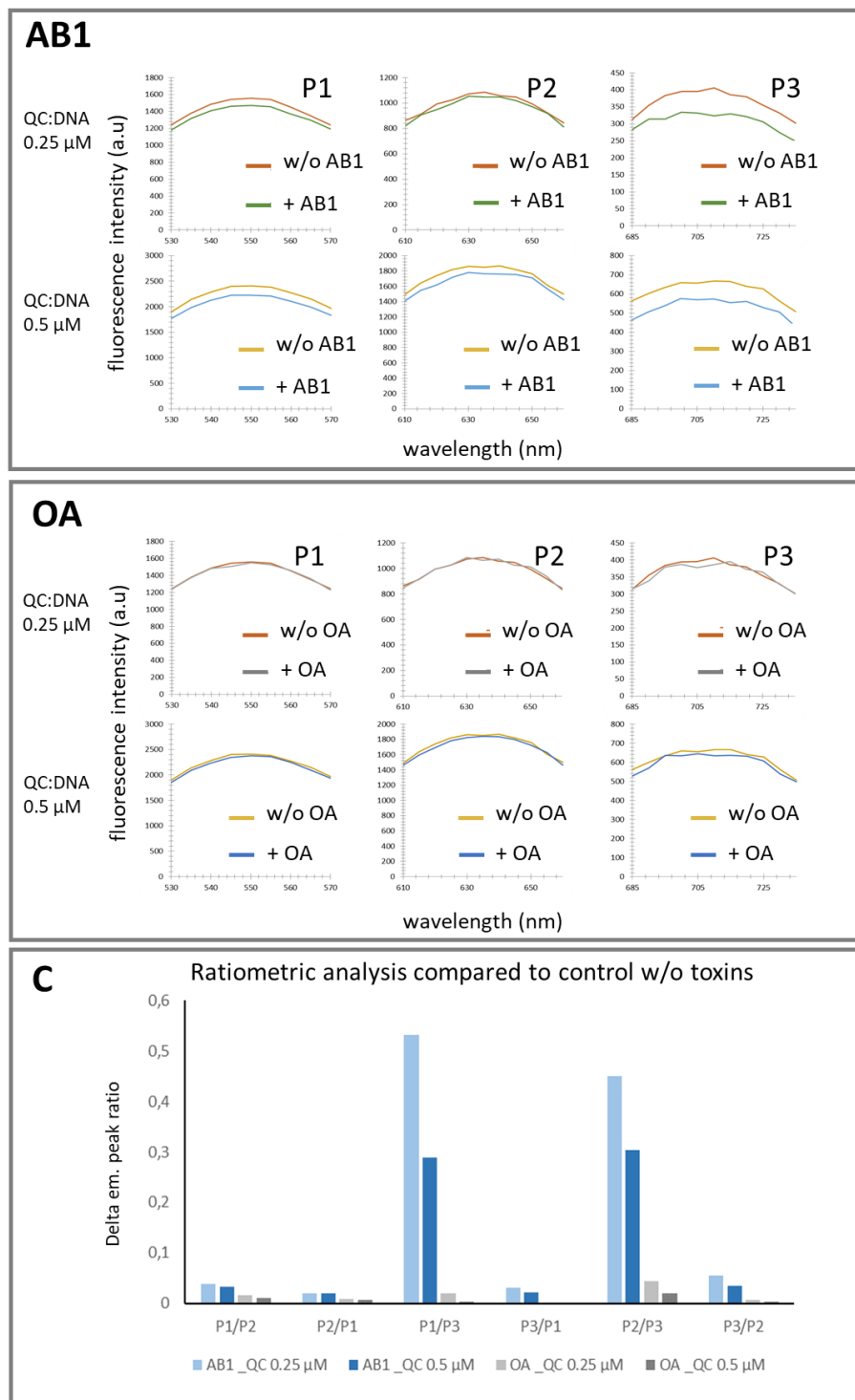


Abbildung 3 | Beispielhafter Nachweis von Mykotoxinen in Wasser mittels QC:DNA: AB1: Fluoreszenzemissionsspektrum einer QC:DNA bei zwei Konzentrationen (0,25 μM und 0,5 μM) zum Nachweis von Aflatoxin B1 (5 μM in Wasser) (Das Spektrum zeigt drei Peaks: P1, P2 und P3). OA: Fluoreszenzemissionsspektrum der gleichen QC:DNA für die Detektion von Ochratoxin A (5 μM in Wasser). C: Ratiometrische Auswertung der Daten jeweils am Emissionsmaximum der drei Peaks im Vergleich zu

einer QC:DNA-Lösung ohne Mykotoxine. Die Daten deuten auf eine selektive Detektion von Aflatoxin B1 mittels QC:DNA hin.

Mithilfe dieses Screenings konnten vielversprechende QC:DNA-Kandidaten ermittelt werden (siehe Tabelle 1). Am Fraunhofer IME wurden ebenfalls QC:DNA-Kandidaten (z. B. #24–27 in der Tabelle 1) bezüglich der Sensing-Eigenschaften durch ein ähnlich angelegtes Screening ermittelt und selektiert. Aus den ausgewählten QC:DNA wurde durch Austausch einzelner Basen der DNA-Sequenz eine kleine Sammlung von Sequenzen erstellt, mit dem Ziel, QC:DNA mit verbesserten Detektionseigenschaften gegen bereits ausgewählte Analyten oder für den Einsatz zur Detektion weiterer Analyte herzustellen.

Insgesamt konnten durch das Screening am ISC und IME QC:DNA-Kandidaten für den Nachweis von Aflatoxin B1 (Abbildung 3), Ochratoxin A, Amoxicillin, 17 β -Estradiol, Oxytetracyclin und mono- und bivalenten Ionen (Abbildung 4) identifiziert werden. Mit dieser Auswahl an QC:DNA wurde der Meilenstein MS 1: „Mindestens 20 verschiedene maßgeschneiderte QC:DNA-Konstrukte für die Entwicklung in AP 2 und 3 (M12)“ in vollem Umfang erreicht (siehe Tabelle 1).

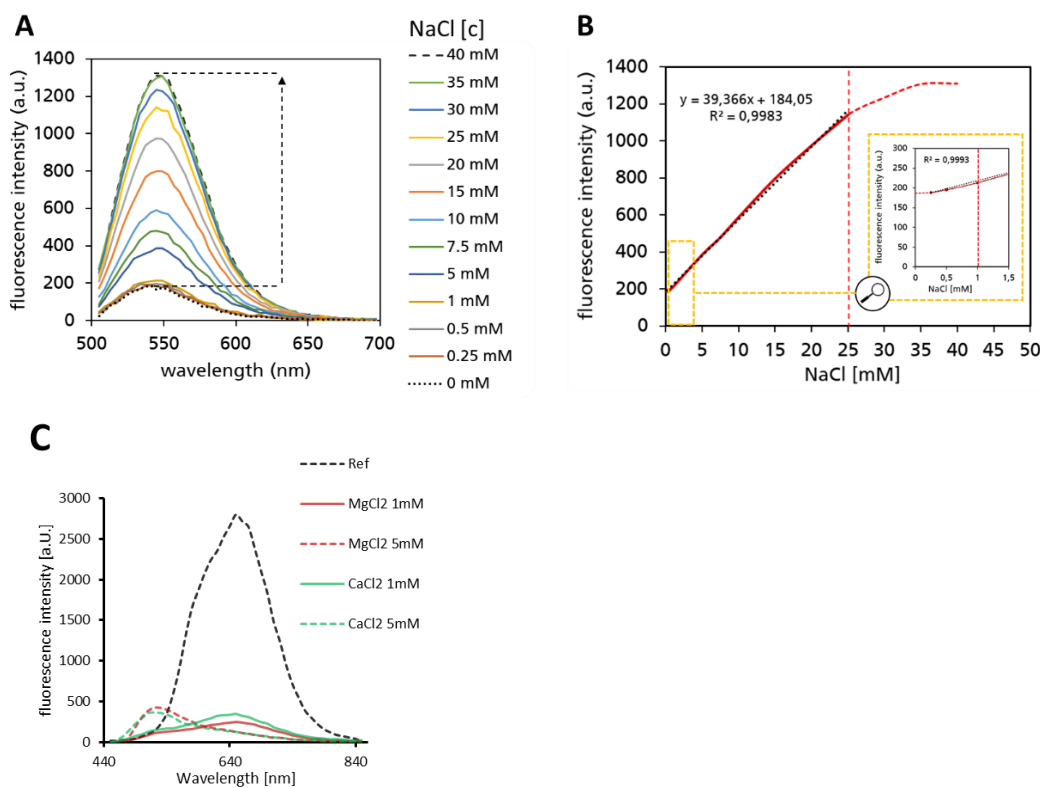


Abbildung 4 | Nachweis von mono- und bivalenten Kationen in Wasser: A: Fluoreszenzemissionsspektrum einer QC:DNA-Lösung mit steigender NaCl-Konzentration; B: Lineare Interpolation der Messdaten in A am Emissionsmaximum der Fluoreszenzintensität der QC:DNA. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die Interpolation der Daten im niedrigen Konzentrationsbereich. Der lineare Messbereich liegt zwischen 1 und 25 mM NaCl. C: Fluoreszenzemissionsspektrum einer weiteren QC:DNA, die in einer Lösung von 1 mM Magnesiumchlorid bzw. Calciumchlorid in Wasser einen Signalverlust (durchgezogene rote oder grüne Linie) und in einer Lösung von 5 mM eine Verschiebung der Emission in den kurzwelligen Bereich des sichtbaren Spektrums zeigt (gestrichelte rote oder grüne Linie). Fluoreszenzemissionsspektrum einer QC:DNA-Lösung ohne Calcium oder Magnesium als Referenz (gestrichelte schwarze Linie).

Das benötigte Know-how zur Synthese von QC:DNA wurde in einem Technologietransfer ans ISAT übermittelt, so dass etablierte und optimierte Systeme direkt am ISAT für weitere Testungen zur Systemintegration und fluoreszenten Vermessung hergestellt werden konnten.

Tabelle 1 | Maßgeschneiderte QC:DNA-Konstrukte für die Entwicklung in AP2 und AP3.

#	ID	Ex/Em (nm)	Typ	Quelle
1	22b-1	570/635	1	10.1002/adma.201204624
2	28b-1	605/665	1	10.1002/adma.201204624
3	14C-9bp-1	580/635 620/685	2: Amoxicillin	intern
4	15C-9bp-1	590/650 640/730	2: Amoxicillin	intern
5	5C-11bp-1	440/510 580/660	2: 17 β -Estradiol, Na ⁺ -Ionen	10.1016/j.aca.2018.08.030
6	12C-9bp-1	485/555 565/630	2: Oxytetracyclin	intern
7	7C-9bp-1	465/560 565/645	2: monovalente Ionen	intern
8	9C-7bp-1	475/555 575/640 640/710	2: monovalente Ionen	intern
9	19b-1	495/560	4	10.1002/adma.201204624
10	12b-4_12b-1	610/685	3	Modifikation, 10.1021/ja8005644
11	12b-1_12b-4	445/520 565/635	3	Modifikation 10.1021/ja8005644
12	12b-4_3T_ AP-AMX-1_ 3T_12b-1	585/640	3	Modifikation 10.1021/ja8005644
13	9C-5bp-1	470/560 560/630	3	intern
14	9C-6bp-2	410/535 565/630	3	10.1021/jp809274m
15	6C-8pb-1	470/570 555/665	3	10.1021/acs.jp cb.9b09741
16	12C-4bp-1	455/540 600/675	3	10.1039/COPP00263A
17	7C-6bp-1	465/555 600/675	3	10.1021/jp809274m
18	6C-16bp-1	475/585 575/655	3	10.1021/acs.jp cb.9b09741
19	6C-24bp-1	475/575 585/660	3	10.1021/acs.jp cb.9b09741
20	29b-1	550/615	3	10.1039/B927268B
21	16b-1_C13_ AP-AB1-2-1	485/565 585/660	3	Modifikation 10.1021/jz100817z
22	46b-1	635/710	3	10.1039/B927268B
23	12C-4bp-2	485/575 555/615	3	10.1039/COPP00263A
24	QC3Ar	445/525 570/640	2: Aflatoxin B1, Ochratoxin A	intern
25	QC4Ar	455/520 585/640	2: Aflatoxin B1, Ochratoxin A	intern
26	DCS_41_B	475/555 545/635 625/710	2: 17 β -Estradiol, Afla- toxin B1, monovalente Ionen	intern
27	DCS_43	505/575 575/665	2: 17 β -Estradiol, Afla- toxin B1, monovalente Ionen	intern

Typ 1: Zeigt durch geeignete Erweiterung der DNA-Sequenz einen signifikanten Shift in der Wellenlänge

Typ 2: Intrinsischer Sensor: Zeigt signifikanten Shift in der Intensität verschiedener Peaks mit angegebenem Analyten

Typ 3: Peak-weise sensitiv: Zeigt bei Änderung der Umgebungsschemie signifikante und unterschiedliche Shifts in der Intensität einzelner Peaks (mögliche Nutzung als intrinsischer Sensor)

Typ 4: Shift-sensitiv: Zeigt durch Änderung der Umgebungsschemie signifikante Shifts in der Wellenlänge einzelner Peaks

2.2.2 Task 1.2 Optimierung von QC:DNA-Konstrukten

Zielsetzung war die Optimierung von Design und Synthesen sowie die Testung der Temperatur- und Lagerstabilität unter Umweltbedingungen. Beide sind für eine industrielle Anwendung von Bedeutung.

Durch Variation der Temperatur und Pufferzusammensetzung konnten QC:DNA identifiziert werden, welche bei erhöhten Temperaturen (37–40 °C) und diversen Pufferzusammensetzungen stabile Emissionen zeigen. So nimmt beispielsweise die Fluoreszenz der G-Quadruplex-QC:DNA QC3Ar bei höheren Temperaturen in Ammoniumacetatpuffer im Vergleich zu HEPES-Puffer ab (Abbildung 5), während die Fluoreszenz einer anderen QC:DNA (QC4Ar) stabil bleibt.

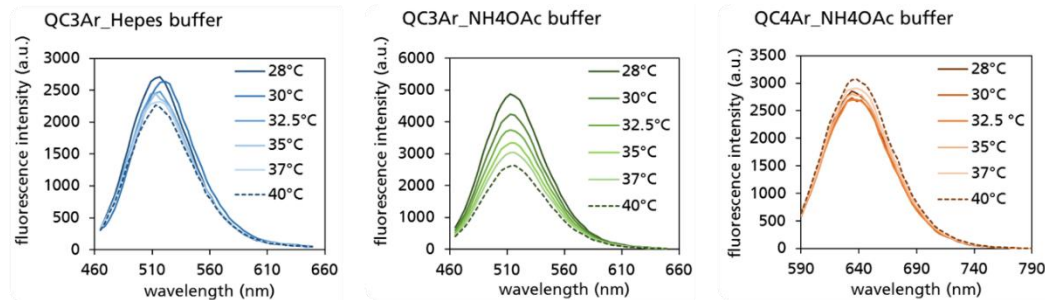


Abbildung 5 | Einfluss von Temperatur und Pufferzusammensetzung auf die Fluoreszenzmission von QC:DNA basierend auf einer G-Quadruplex-Sequenz.

Es konnte festgestellt werden, dass die QC:DNA-Stabilität bei steigenden Temperaturen stark von der Art der QC:DNA abhängt. Die meisten untersuchten QC:DNA-Konstrukte sind jedoch bis zu Temperaturen von 65 °C ohne Verlust der Fluoreszenzintensität stabil. Um extreme Temperaturbedingungen zu testen, wurde die Temperaturstabilität nach 10-minütigem Erhitzen bei 95 °C untersucht (Abbildung 6). Es konnte eine Abnahme der Fluoreszenzintensität (15 %) für das bekanntermaßen sehr stabile Konstrukt Ag:28b-1 (links) beobachtet werden, während sensitive Konstrukte wie Ag:19b-1 und das Haarnadelkonstrukt Ag:9C-7bp-1 Fluoreszenzverluste von 48 % bzw. bis zu 90 % (für den roten Peak) aufweisen. Bei QC:DNA basierend auf Haarnadel-Sequenzen ist der Verlust der roten Peaks naheliegend, da diese Emissionen auf eine Spezies mit hybridisiertem (geschlossenem) Stamm zurückgehen, der oberhalb der spezifischen Schmelztemperatur geöffnet wird, so dass diese Konstrukte dabei wahrscheinlich zerstört werden.

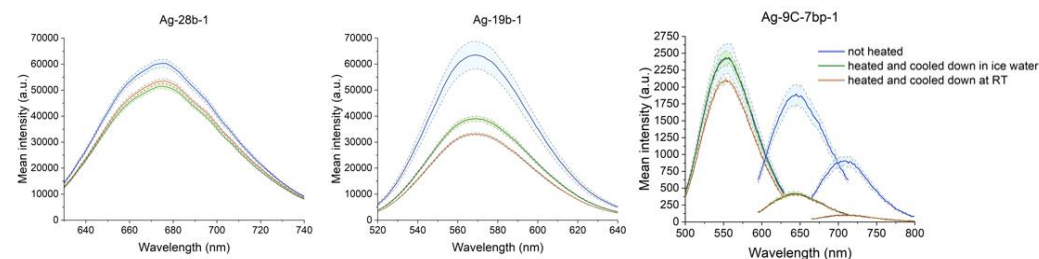


Abbildung 6 | Fluoreszenzstabilität bei extremen Temperaturen für drei QC:DNA: (links) stabile lineare (Ex: 605 nm), (mittig) empfindliche lineare (Ex: 495 nm), (rechts) sensitive Haarnadel-QC:DNA (Ex: 475 nm, 575 nm, 645 nm) vor (blau) und nach dem Erhitzen auf 95 °C für 10 Minuten und dem raschen Abkühlen in Eiswasser (grün) bzw. bei langsamem Abkühlen bei Raumtemperatur (20 °C, RT, rot). Die Fluoreszenzmessung wurde bei 20 °C durchgeführt. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzmissionsintensität (durchgezogene Linie) mit Standardabweichung (Fläche mit gestrichelten Linien) einer Dreifachbestimmung.

Neben der Temperaturbeständigkeit wurde auch die Lagerstabilität ausgiebig getestet. Langzeitmessungen deuten darauf hin, dass einige QC:DNA sehr stabil sind, während andere über einen Zeitraum von mehreren Monaten oxidativ zerstört werden und teilweise blau-verschobene fluoreszierende Spezies bilden.

Auch die Bedingungen der Lagerung sind für eine industrielle Anwendung von großer Bedeutung. Während stabilere QC:DNA-Konstrukte (Abbildung 7 A) keine temperaturbedingten Unterschiede in ihren Fluoreszenzeigenschaften aufweisen, zeigen einige sensitive Konstrukte einen anfänglichen Verlust der Fluoreszenzintensität von 40 % (Abbildung 7 B) bis 90 % (Abbildung 7 C, rechts). Jedoch verliert das Haarnadelkonstrukt nur 20 % der Intensität seines Hauptpeaks (Abbildung 7 C, links).

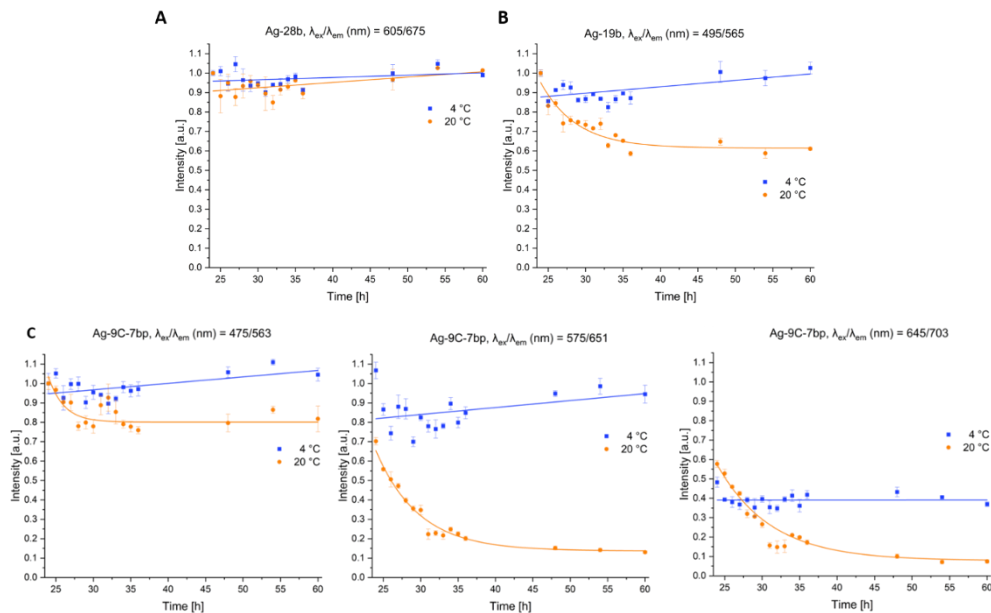


Abbildung 7 | Lagerstabilität von aufgereinigter Ag:DNA: Fluoreszenzintensität des Emissionsmaximums über einen Zeitraum von 60 Stunden, gemessen für drei verschiedene Ag:DNA (A: stabile lineare (Ex: 605 nm), B: empfindliche lineare (Ex: 495 nm), C: empfindliche Haarnadel-Ag:DNA mit drei Emissionspeaks (Ex: 475 nm, 575 nm, 645 nm)), gelagert im Dunkeln bei Raumtemperatur (orange, 20 °C) oder im Kühlschrank (blau, 4 °C). Trendlinien wurden eingefügt: exponentiell für Raumtemperatur (durchgezogen, orange) und linear bei 4 °C (durchgezogen, blau).

Nach etwa 48 Stunden erreichen auch Konstrukte, die bei Raumtemperatur an Fluoreszenzintensität verlieren, ein stabiles Plateau. Im Gegensatz dazu wird keine Abnahme der Intensität beobachtet, wenn die Ag:DNA-Proben bei 4 °C gekühlt gelagert werden. Bei einigen Proben nahm die Intensität über den Messzeitraum sogar zu. Dieser Effekt kann jedoch noch nicht erklärt werden.

Für Praxistauglichkeit und eine Industrie-relevante Umsetzung ist die Stabilität der QC:DNA-Konstrukte in verschiedenen Umgebungen ein wichtiges Thema. QC:DNA sind sehr kleine Konstrukte (~2–5 nm) und enthalten Metallcluster mit nur wenigen Atomen, die höchst instabil sind, außer sie werden schützend stabilisiert. Daher können sich die optischen Eigenschaften im Laufe der Zeit ändern, und die Strukturen können besonders empfindlich auf bestimmte Ionen reagieren. QC:DNA auf Silberbasis können zum Beispiel gegenüber Chloridionen besonders anfällig sein, da Silberchlorid in wässrigen Lösungen ein extrem geringes Löslichkeitsprodukt besitzt. Da einige der Metallquantencluster bekanntermaßen positiv geladen sind oder Silberionen an sich gebunden haben – dieser Punkt ist noch Gegenstand aktueller Forschung –, ist es wahrscheinlich, dass chloridhaltige Lösungen diese Silberionen binden und ausfällen. Dies kann die optischen Eigenschaften der gegebenen Ag:DNA verändern, was in den meisten Fällen zu einer geringeren Intensität führt.

Typische Beispiele für dieses Verhalten sind in Abbildung 8 (links) dargestellt. Während die silberbasierten Konstrukte (Ag:28b-1, Ag:34b-2, Ag:12b-4, Ag:6C-15bp-1) schon bei niedrigen Chloridkonzentrationen im Bereich weniger mM starke Intensitätsverluste aufweisen, sind goldbasierte (Au:8C) und Gold-Silber-Hybridkonstrukte (Ag/Au:12b-3) noch bis in den hohen 200 mM-Bereich stabil. Die Chlorid-Konzentrationsbereiche typischer physiologischer Medien wie Speichel, Blut und Urin wurden hier als Messbereiche angewandt.

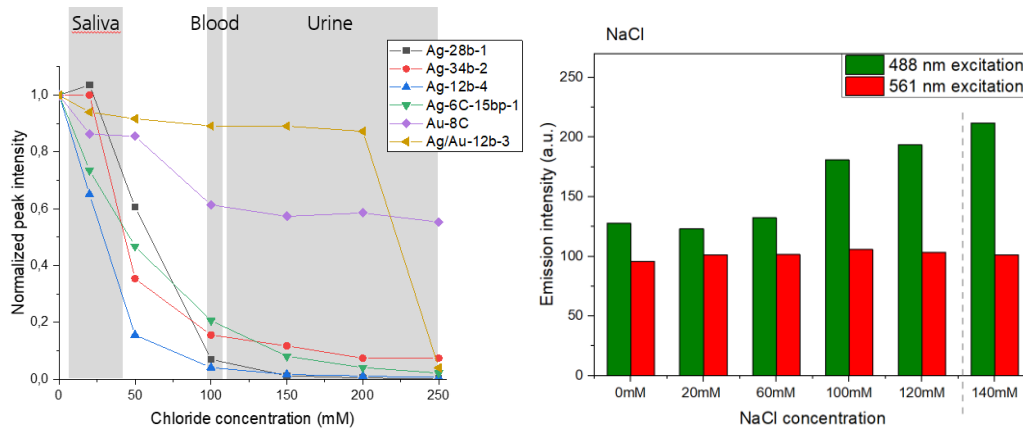


Abbildung 8 | Einfluss von Chloriden auf die Fluoreszenz von QC:DNA: (links) Fluoreszenzemission verschiedener Ag:DNA, Au:DNA und Ag/Au:DNA in Lösungen mit unterschiedlichen Natriumchlorid-Konzentrationen. Typische Chloridkonzentrationen physiologischer Flüssigkeiten sind durch grau schraffierte Bereiche dargestellt. (rechts) Fluoreszenzemission zweier fluoreszierender Ag:DNA-Spezies in stabilisierten NaCl-Lösungen. Diese Konstrukte erzeugen zwei Emitter, die bei 488 nm und 561 nm angeregt werden können.

Die spätere Kopplung mit Biomolekülen zur spezifischen Bindung von Analyten erforderte neue Designs, damit eben diese Anbindung zu einer mess- und quantifizierbaren Beeinflussung der Fluoreszenz der QC:DNA führt. Für die Kopplung mit Aptameren, siehe 2.4.1.1, wurden während des Projekts mehrere dieser Sensormechanismen getestet und entwickelt werden. Diese wurden zum Teil initial der Literatur entnommen und angepasst oder selbst entworfen. Diese Mechanismen sind wertvolle Designwerkzeuge für den generellen Sensoaufbau.

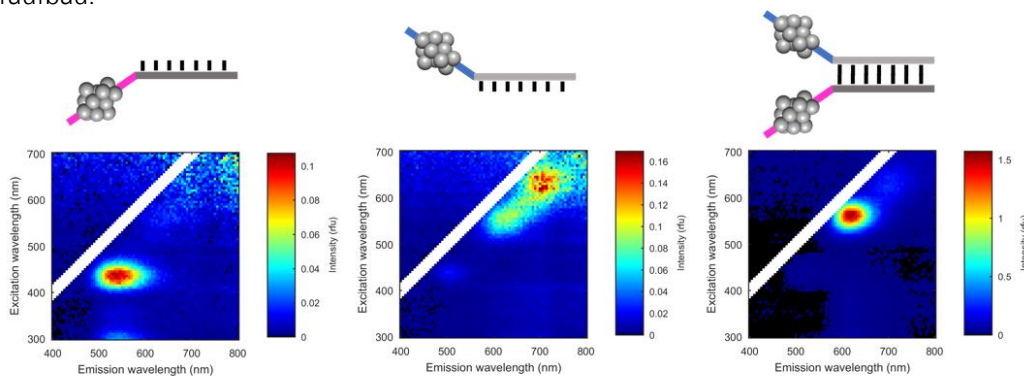


Abbildung 9 | Sensorkonzept der Kombination zweier dunkler QC:DNA: Fluoreszenzspektren der einzelnen QC:DNA (links, mittig) und der Kombination beider QC:DNA (rechts). Die erzwungene Nähe durch eine Hybridisierung sorgt für eine Verstärkung der Fluoreszenz bei $\lambda_{Ex/Em} = 570/625$ nm um einen Faktor von 96,3.

So konnten unter anderem Kopplungen mit Guanin-reichen Sequenzen und zwischen relativ dunklen QC:DNA etabliert werden, die nicht nur die Fluoreszenzintensität steigern, sondern auch Fluoreszenzen bei weiteren Emissionswellenlängen erzeugen. Die Kopplungen

hängen stark von den verwendeten QC:DNA ab. So konnten mit Guanin-reichen Sequenzen Steigerung der Intensität von QC:DNA bei gleicher Wellenlänge um einen Faktor von bis zu 100 erreicht werden. Die Kombination mehrerer dunkler (= schwach emittierender) QC:DNA erbrachte Verstärkungsfaktoren in der gleichen Größenordnung (Abbildung 9), jedoch nur für einzelne Fälle, wobei hier auch Verschiebungen der Emissionswellenlängen möglich waren.

2.3 Arbeitspaket 2 Multiplex-Sensor-Arrays und logische Sensorsysteme

Die Zielsetzung von AP 2 war die Entwicklung von Multiplex-Sensorsystemen und Logikschaltungen auf Basis von QC:DNA zur Systemintegration.

Mehrere unterschiedliche QC:DNA wurden positiv in Mischversuchen kombiniert und konnten unabhängig voneinander, soweit es die einzelnen Emissionspeaks erlaubten, fluorometrisch vermessen werden. Eine Grundvoraussetzung für ein direktes Multiplexing mehrerer unterschiedlicher QC:DNA in Lösung oder immobilisiert auf einer Oberfläche ist hiermit nachgewiesen. Während des Projektes wurde im Austausch mit dem ISAT ein abgewandeltes Analyse- und Messverfahren etabliert, eine Droplet-basierte Methode. Hierbei wird der Sensor, die QC:DNA, direkt mit dem Analyten in einem wässrigen Tropfen durch ein Trägermedium, meist ein Öl, eingeschlossen, weitertransportiert, und dann jeder Tropfen einzeln fluorometrisch vermessen. Diese Methode erlaubt eine nahezu Echtzeit-Messung mehrerer QC:DNA in Kontakt mit der zu analysierenden Flüssigkeit in kurzer Zeit in sequentieller Reihenfolge bei geringem Proben- und Sensorverbrauch. Gleichzeitig ist eine spektrale Auftrennung unterschiedlicher QC:DNA nicht mehr essentiell. Dieses mikrofluidische Misch- und Messverfahren macht damit den Meilenstein MS2.2 zum Multiplexing durch eine technische Lösung obsolet. Das Konsortium hat daher beschlossen, ein direktes Multiplexing seitens der QC:DNA vorerst nicht primär weiterzuverfolgen. Wenn die QC:DNA-Sensoren finalisiert sind, werden zur Analyse der gemeinsamen Beeinflussung und Spezifität der Sensoren noch einmal gemeinsame Tests in Lösungen durchgeführt. Die eingesparten Ressourcen wurden effektiv in Task 1.2 investiert um Stabilität, Reproduzierbarkeit und eine größere Vielfalt an Sensoren zu ermöglichen.

2.4 Arbeitspaket 3 Bioengineering von QC:DNA

Das Arbeitspaket 3 umfasste die Entwicklung und Bereitstellung funktionalisierter und immobilisierter biohybrider Sensoren auf Basis maßgeschneiderter QC:DNAs zur späteren Integration in das Messsystem des ISAT.

2.4.1 Task 3.1: QC:DNA-Funktionalisierung

Die Funktionalisierung der QC:DNA mit Biomolekülen wie Aptameren oder Peptiden war geplant, um Wechselwirkungen zwischen den QC:DNA und den Biomolekülen nach der Herstellung eines Konjugats zu untersuchen. Die Konjugate sollten die sensorischen Eigenschaften der QC:DNA erweitern, indem sie die Spezifität der Bindung der Biomoleküle an ausgewählte Analyten mit der Nachweisempfindlichkeit der QC:DNA kombinieren.

2.4.1.1 Funktionalisierung mit Aptameren

Die Konjugation der QC:DNA mit Aptameren erweist sich als naheliegend, da Aptamere und QC:DNA denselben Grundbaustein, die DNA, haben. Allerdings müssen die Wechselwirkungen zwischen den Oligonukleotiden des Aptamers und der QC:DNA im Detail beachtet werden.

Am ISC wurden verschiedene Kopplungsmethoden zwischen Aptameren und QC:DNA aus AP 1 mit mehr als 15 verschiedenen Aptameren entwickelt, designt und getestet. Zu diesem Zweck wurden aus der Literatur bekannte Verfahren reproduziert, angepasst und optimiert und eigene Designs entwickelt. Vier übergreifende Kopplungskonzepte wurden eingesetzt, so dass die Bindung eines Analyten an das Aptamer die QC:DNA selbst oder ihre unmittelbare Umgebung beeinflusst. Dies sollte eine Emissionsänderung der QC:DNA zur Folge haben. Diese Methoden werden im Folgenden kurz erläutert und sind in Abbildung 10 beispielhaft dargestellt.

1. Fluoreszenzveränderung aufgrund der Umgebungssensitivität einer QC:DNA bei Bindung des Zielmoleküls an das Aptamer, getestet mit verschiedenen langen Spacern zwischen QC:DNA-Sequenz und Aptamer
2. Fluoreszenzverstärkung oder -verschiebung durch Nähe und Wechselwirkung einer Guanin-reichen Sequenz und einer QC:DNA (a) auf der Grundlage der strukturellen Veränderung des Aptamers oder (b) auf der Grundlage von geteilten Aptameren.
3. Fluoreszenzverstärkung oder -verschiebung durch Wechselwirkung von zwei „dunklen“ QC:DNA
4. Fluoreszenzveränderung durch Störung einer QC:DNA-Sequenz und Wiederherstellung der ursprünglichen Fluoreszenz nach Bindung des Zielmoleküls

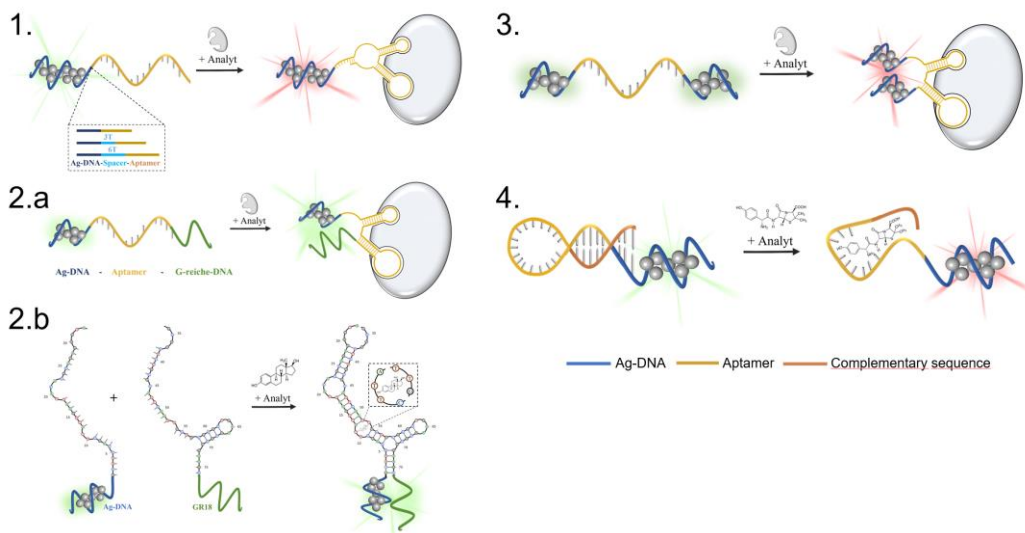


Abbildung 10 | Verschiedene Ansätze für die Kombination von Aptameren mit QC:DNA zur Änderung der Fluoreszenz der QC:DNA bei der Bindung eines Analyten an das Aptamer.

Diese Methoden wurden jeweils an die verschiedenen Arten von QC:DNA und vor allem an die Bindungsgeometrie der Aptamere angepasst. QC:DNA konnten mit allen ausgewählten Aptameren kombiniert werden und zeigten in den meisten Fällen die QC:DNA-spezifische Fluoreszenz. Eine Kopplung war damit erfolgreich unter Erhalt der QC:DNA-eigenen Fluoreszenz und damit entsprechend des gebildeten Metallclusters. Ein Rückschlag war jedoch das Ausbleiben von Fluoreszenzveränderungen nach Zugabe der aptamerspezifischen Analyte. Bei keinem der getesteten Aptamer-QC:DNA-Konstrukt konnte eine Veränderung der Fluoreszenz festgestellt werden.

Um dieses Problem zu beheben, wurden verschiedene Aptamere in Zusammenarbeit mit der Universität Würzburg mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) und mit dem Fraunhofer IZI-BB in Potsdam mittels mikroskaliger Thermophorese (MST) weitergehend untersucht. Diese Messungen ergaben, dass die verwendeten Aptamere keine Affinität zu ihrem jeweiligen Analyten aufwiesen. Im weiteren Austausch wurde bestätigt, dass dies bei vielen publizierten Aptamersystemen der Fall ist, was auf den komplexen Findungsprozess der Aptamere und die benötigten Modifikationen der Zielmoleküle zurückgeht. Daher wurden in

Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer IZI-BB weitere Experimente an dort entwickelten Aptameren durchgeführt. Die direkte MST-Vermessung der adaptierten QC:DNA-Aptamersequenz ergab eine Bindungsaffinität zum Analyten vergleichbar zu der des reinen Analyten. Nach erfolgter QC:DNA-Synthese dieses Konstrukts war jedoch keine MST-Messung mehr möglich, vermutlich durch das Vorhandensein größerer Agglomerate. Hier wäre eine weitere Aufreinigung der QC:DNA-Aptamer-Konstrukte nötig, welche aufgrund fehlender Geräte nicht durchgeführt werden konnte. Auch bei diesen Konstrukten konnte keine Anbindung der Zielmoleküle durch eine veränderte Fluoreszenz der QC:DNA festgestellt werden. Die genauen Gründe sind bislang unklar und müssen weiter untersucht werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass unerwünschte Metallcluster die spezifischen Bindungsfalten der Aptamere blockieren, oder dass sich größere Agglomerate aus mehreren Konstrukten bilden. Trotz des fehlenden Nachweises der Funktionalität konnten im Projekt enorme Fortschritte, Techniken und Methoden zur Kopplung zwischen Aptameren und QC:DNA entwickelt und etabliert werden (mehr als 100 erfolgreich gekoppelte Aptamer-QC:DNA-Konstrukte). Zusammen mit den etablierten Sensormechanismen aus Task 1.2 stellen diese eine vielversprechende Grundlage dar, wenn die Funktionalität der Aptamere weiter untersucht und schlussendlich hergestellt werden kann. Hier fehlt es aktuell an Analysemethoden und -techniken, die dem ISC in diesem Projekt nicht zur Verfügung standen.

2.4.1.2 Funktionalisierung mit Peptiden

Am IME wurde die Funktionalisierung der in AP1 selektierten QC:DNA mit Peptiden evaluiert, die spezifisch an einige der zu Beginn des Projekts ausgewählten Analyten binden. Die Peptide wurden aus der Literatur identifiziert und anhand ihrer Eigenschaften, wie z. B. Länge und Zusammensetzung der Primärsequenz sowie struktureller Eigenschaften, die für die Bindung an das Zielmolekül relevant sind, ausgewählt. Im Rahmen dieser Arbeiten wurde ein antimikrobielles Peptid (AMP) untersucht, um die Machbarkeit zu demonstrieren. Außerdem wurden zwei Peptide untersucht, die spezifisch an das Mykotoxin Ochratoxin A binden, da Mykotoxine häufige Lebensmittelkontaminanten sind, die im Verdacht stehen, krebserregend zu sein. Um die Entwicklung der Funktionalisierungsmethoden zu beschleunigen, wurden zunächst zwei Firmen mit der Synthese der Peptide beauftragt, die die Peptid-Synthese für die Forschung kommerziell anbieten.

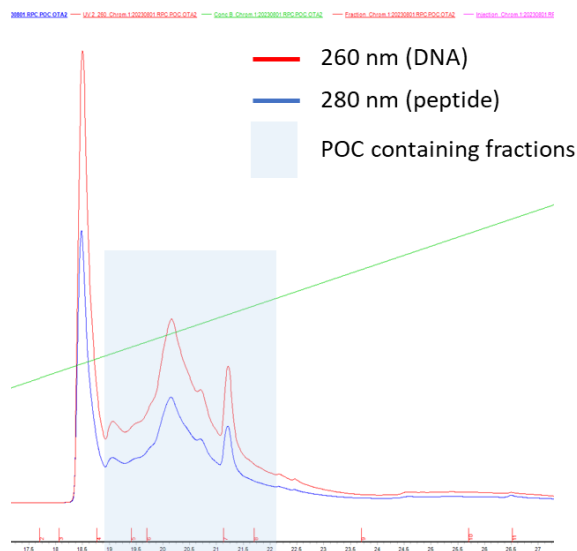


Abbildung 11 | Aufreinigung eines Peptid-Oligonukleotid-Komplexes mittels Ionenaustausch-FPLC: Absorptionswerte bei 260 nm für die DNA (rot) und bei 280 nm für das Peptid (blau) der eluierten Fraktionen nach Gradientenbildung aus zwei Pufferlösungen mit unterschiedlicher Lösungsmittelkonzentration (grüne Linie). Der hellblaue Bereich des Chromatogramms zeigt die gesammelten Fraktionen des Peptid-Oligonukleotid-Komplexes (POC), die zur weiteren Verarbeitung für die Synthese von fluoreszenten Peptid-QC:DNA-Konjugaten verwendet wurden.

Die primäre Aminosäuresequenz der Peptide wurde leicht modifiziert, um die chemische Synthese der Peptid-QC:DNA-Konjugate zu ermöglichen. Die Methode zur Herstellung der Konjugate basierte auf der Verwendung eines bifunktionellen Linkers, der eine kovalente Bindung zwischen dem Peptid und dem Oligonukleotid ermöglicht. Die Peptid-QC:DNA-Konjugate wurden synthetisiert, mittels Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) gereinigt und für die Synthese von QC:DNA mit Silberatomen verwendet (Abbildung 11).

Die Synthese von fluoreszierenden Peptid-QC:DNA-Konjugaten (Abbildung 12) sowie die Bindungs- und sensorischen Eigenschaften eines antimikrobiellen Peptid-QC:DNA-Konjugats wurden nach Aufreinigung erfolgreich demonstriert.

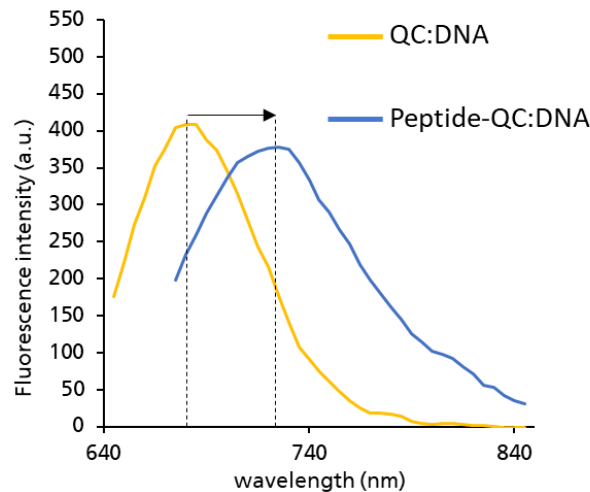


Abbildung 12 | Fluoreszenzemissionsspektrum eines Peptid-QC:DNA-Konjugats nach Reinigung und Synthese der QC:DNA. Die gelbe Linie zeigt das Emissionsspektrum einer nicht konjugierten QC:DNA bei einer mit dem Konjugat vergleichbaren Konzentration. Die blaue Linie zeigt das Emissionsspektrum des Peptid-QC:DNA-Konjugats, welches eine signifikante Verschiebung des Emissionsmaximums in den langwelligeren Bereich aufweist.

Die sehr langen Wartezeiten für die Synthese und Bereitstellung der Peptide durch die beauftragten Firmen wirkten sich negativ auf die geplanten Arbeiten aus, die sich verzögerten. Daher wurde parallel am IME eine Strategie zur Produktion rekombinanter Peptide in bestehenden Expressionssystemen evaluiert, die auch zur Senkung der Herstellungskosten beitragen sollten. Die ersten Versuche zeigten, dass die Herstellung der rekombinanten Peptide mittels einer zellfreien Expressionsplattform, die am IME etabliert wurde, erfolgreich war. Allerdings war die Ausbeute der Konjugate nach der Aufreinigung geringer als erwartet (Abbildung 13).

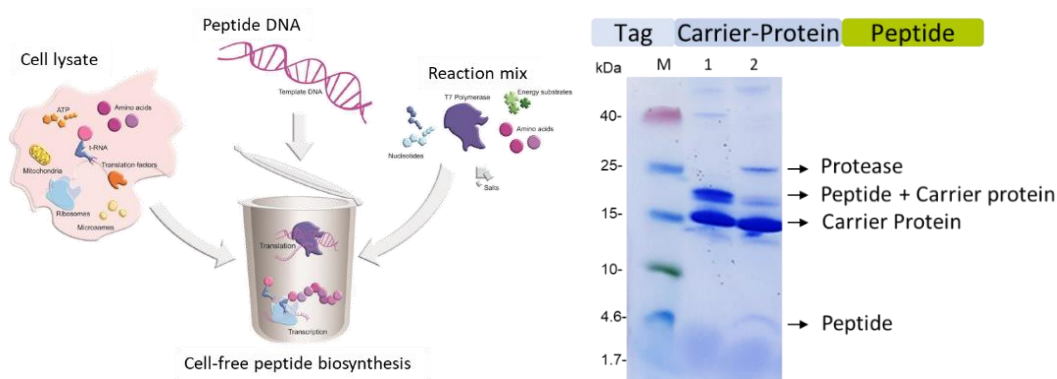


Abbildung 13 | Expression und biochemische Charakterisierung eines rekombinanten Peptids für die Bindung an Ochratoxin A. Links: Grafische Darstellung des Funktionsprinzips der zellfreien

Expressionsplattform. Rechts: SDS-Gelelektrophorese mit Comassie-Färbung des aufgereinigten Peptids. Das Peptid wurde für die Aufreinigung genetisch an ein Trägerprotein fusioniert und mit einem Tag versehen. Das Trägerprotein wurde nach der Aufreinigung des Komplexes mit einer Protease vom Peptid abgespalten. M = Protein Marker; 1 = Komplex Peptid + Proteinträger vor der proteolytischen Spaltung; 2 = gespaltener Komplex nach Zugabe der Protease. Eine spontane Spaltung des Komplexes, sichtbar in Spur 1, führte zu einer geringen Ausbeute des gewünschten Peptids.

Eine gute Ausbeute war Voraussetzung für die erfolgreiche Synthese von fluoreszenten QC:DNA-Peptid-Konjugaten nach der Aufreinigung. Aus diesem Grund wurden Versuche zur Hochskalierung der Produktion durchgeführt. Die geringe Ausbeute der Peptide nach Expression und Aufreinigung im Großmaßstab zeigte, dass weitere Arbeiten zur Optimierung der Produktionsprozesse erforderlich waren. Da diese Arbeiten nicht Teil des ursprünglichen Projektantrags waren, konnte die Umsetzung der Verfeinerung dieser Methoden mit den im Projekt vorgesehenen Mitteln nicht gewährleistet werden und diese Strategie wurde daher nicht weiterverfolgt.

Die Experimente zur Funktionalisierung der DNA-Oligonukleotide mit den kommerziell erworbenen Peptiden wurden fortgesetzt. Die Aufreinigung der Peptid-DNA-Konjugate erwies sich jedoch als schwierig, z. B. aufgrund von Produktverlusten bei der Entfernung von Lösungsmittelrückständen, die sich negativ auf die anschließende Synthese von fluoreszenten QC:DNA-Peptid-Konjugaten auswirkten.

Aufgrund des hohen Aufwands und der Kosten für die Herstellung der Konjugate und des geringen Erfolgs der Experimente, wurde die Erforschung dieser Strategie als nicht zielführend erachtet und die verbleibende Zeit und Ressourcen auf die Untersuchung der intrinsischen Sensingeigenschaften weiterer QC:DNA ohne Funktionalisierung für andere Zielmoleküle umgelenkt.

2.4.2 Task 3.2 QC:DNA-Immobilisierung

Die Immobilisierung der QC:DNA-Sensoren kann zwei technische Vorteile bieten: a) Die simultane Untersuchung verschiedener Kontaminanten in einer Flüssigkeit, welche mikrofluidisch über Oberflächen-immobilisierte QC:DNA geführt werden und b) die Wiederverwendbarkeit einer mit QC:DNA-Sensoren funktionalisierten Oberfläche nach Entfernung der zu analysierenden Flüssigkeit oder von Partikeln mit immobilisierten Sensoren, die aus der zu analysierenden Flüssigkeit wieder abgetrennt werden können.

Die Immobilisierungsmethode wurde an planaren Oberflächen und an Partikeln untersucht. Für die Auswahl der Immobilisierungsmethoden wurden folgende Kriterien festgelegt: Effizienz der Immobilisierung, Stabilität der Bindung, einfache, schnelle und kostengünstige Durchführung, Eignung für die Orientierung der QC:DNA, Kompatibilität mit der Synthese bzw. mit den Fluoreszenzeigenschaften der QC:DNA allein oder nach Funktionalisierung mit ausgewählten Biomolekülen.

Die Methode der Biotin-Streptavidin-Konjugation erfüllte die meisten der festgelegten Kriterien und wurde zuerst untersucht. Dabei handelt es sich um eine weit verbreitete Methode, die eine sehr stabile und schnelle Konjugation gewährleistet und eine gezielte Ausrichtung der Sensoren durch eine Biotin-Modifikation der Oligonukleotide, aus denen die QC:DNA-Sensoren bestehen, ermöglicht.

Zur Erprobung und Verfeinerung der Immobilisierung wurden QC:DNA verwendet, die sich durch eine hohe und langanhaltende Fluoreszenzintensität bei RT auszeichnen.

Verschiedene Varianten der Biotin-Streptavidin-Kopplungsmethode wurden hinsichtlich Pufferlösungen, Anwendung unterschiedlicher stöchiometrischer Verhältnisse zwischen den Komponenten und Synthese der fluoreszierenden QC:DNA vor oder nach der Immobilisierung getestet und bewertet.

Diese Versuche führten zur Etablierung eines zuverlässigen Protokolls, das auf der direkten Bindung von Biotin-modifizierten Oligonukleotiden an eine Streptavidin-beschichtete Oberfläche und anschließender Synthese der QC:DNA beruht. Leider führte dieses Protokoll nur zu einer Bindungseffizienz von 20%. (Abbildung 14).

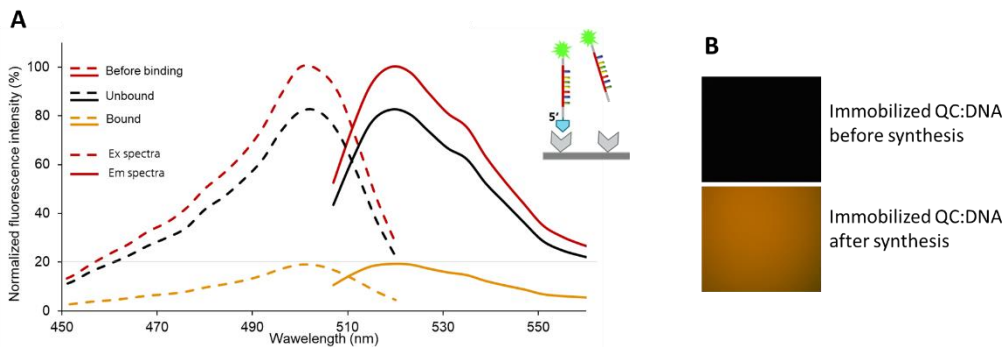


Abbildung 14 | Immobilisierung von biotinylierten Oligonukleotiden auf einer mit Streptavidin beschichteten planaren Oberfläche und Synthese von QC:DNA. A: Fluoreszenzanregungs- (gestrichelte Linie) und Emissionsspektren (durchgezogene Linie) verschiedener Proben eines fluoreszenzmarkierten Oligonukleotids, die vor und nach der Immobilisierung zur Bestimmung der Immobilisierungseffizienz gesammelt wurden. Anschließend wurde das Experiment mit nicht-markierten Oligonukleotiden wiederholt, um die Synthese von QC:DNA direkt auf der Oberfläche durchzuführen. B: Mikroskopische Aufnahme der Streptavidin-beschichteten Oberfläche nach Immobilisierung der biotinylierten Oligonukleotide vor und nach der Synthese der QC:DNA.

Im Laufe des Projekts wurden weitere Studien zur Immobilisierung und Synthese von QC:DNA auf Streptavidin-funktionalisierten Beads durchgeführt. Analog zu den Immobilisierungsstudien auf Oberflächen zeigten diese Experimente, dass sich biotinylierte DNA-Oligonukleotide gut auf der Oberfläche von Streptavidin-beschichteten Partikeln immobilisieren lassen und anschließend fluoreszierende QC:DNA synthetisiert werden können. (Abbildung 15).

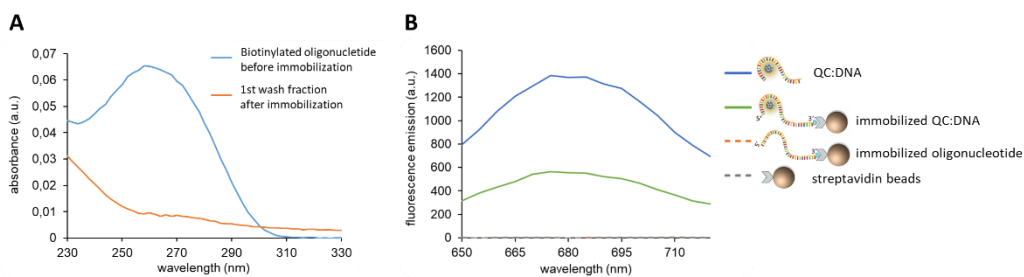


Abbildung 15 | Immobilisierung biotinylierter Oligonukleotide an Streptavidin-beschichtete Beads und Synthese von QC:DNA. A: Absorptionsspektrum biotinylierter Oligonukleotide vor der Bindung (blau) und der ersten Überstandfraktion nach Abtrennung der Beads (1st Wash, orange). Die Daten zeigen eine nahezu vollständige Bindung der Oligonukleotide. B: Synthese von QC:DNA nach Immobilisierung der biotinylierten Oligonukleotide auf der Oberfläche der Beads. Die Immobilisierung führt zu einer geringen Fluoreszenzemission (grün) im Vergleich zu einer geschätzten vergleichbaren Konzentration der QC:DNA in Lösung (blau). Erwartungsgemäß zeigen die Streptavidin-Beads (grau) und die immobilisierten Oligonukleotide vor der QC:DNA-Synthese (orange) keine Fluoreszenz.

Mit diesen Ergebnissen wurde der Meilenstein MS 3.1: „QC:DNAs, die auf mindestens zwei verschiedenen Oberflächen immobilisiert sind, die für die Systemintegration geeignet sind“ vollständig erreicht, wenn auch aus den oben beschriebenen Gründen mit einer leichten zeitlichen Verzögerung gegenüber dem ursprünglichen Arbeitsplan.

Da die Synthese der fluoreszierenden QC:DNA nach der Immobilisierung jedoch stark von der Sequenz der QC:DNA abhängig war, wurde die Methode als nicht allgemein anwendbar

eingestuft. Nachdem eine Parallelisierung im mikrofluidischen Setup des ISAT auf die Messung der Fluoreszenzemission von QC:DNA in Mikro-Tröpfchen umgestellt wurde, war eine Immobilisierung nicht mehr zwingend erforderlich und wurde daher nicht weiterverfolgt.

2.5 Arbeitspaket 4 Systemintegration

Die Entwicklung eines Funktionsdemonstrators mit Integration von fluidischem Handling, Sondenzuordnung, Fluoreszenzauslesung und optobiohybriden Sensoren oblag dem ISAT, siehe Teilbericht ISAT. Für die Verifizierung des Messsystems wurde das Know-how zur Synthese und Handhabung von QC:DNA ans ISAT übertragen und es wurden QC:DNA-Proben für den Proof-of-Concept geliefert. QC:DNA wurden als Sensor im mikrofluidischen Präparations- und Messtechnikaufbau des ISAT erfolgreich implementiert und getestet.

2.6 Arbeitspaket 5 Projektkoordination, -verwertung und -verbreitung

Die Projektkoordination wurde durch das Fraunhofer ISC im Rahmen des agilen Managements durchgeführt. In zweiwöchentlichen digitalen Treffen wurden wissenschaftliche, koordinatorische und weiterführende Planungsthemen diskutiert und gemeinsam entschieden. In diesem Format wurde auch die Änderung von Arbeitspaket 2 und 4 sowie die Umwidmung der Ressourcen zu Arbeitspaket 1 und 3 beschlossen (siehe 2.3).

2.7 Verwertung

Wissenschaftlich betrachtet werden die Ergebnisse des Projektes nach Veröffentlichung unmittelbar Einfluss auf die Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten der QC:DNA-Technologie für „Point-of-Use“-Detektion von Analyten nehmen. Sowohl das intrinsische Sensingpotential als auch Methoden zur Immobilisierung und zur Funktionalisierung sind in der Literatur noch weitestgehend unerforscht und können daher Anstoß für weitere Untersuchungen liefern.

Die wirtschaftlichen Aspekte der QC:DNA-Technologie sind vielfach. Die Integration der QC:DNA-Technologie in mikrofluidische Systeme, wie das des ISAT, könnte mittelfristig einen signifikanten Beitrag zur Beschleunigung und zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit der QC:DNA für Analyten in flüssigen Medien wie z. B. für die Überwachung der Wasserqualität aus Kläranlage ermöglichen. Hier ist eine Verwertung nicht nur hypothetisch, sondern durch Weiterentwicklung der Technologie insbesondere auf der Ebene der QC:DNA sowie der Eigenschaften des mikrofluidischen Systems, z. B. zur Verbesserung der Portabilität und Benutzerfreundlichkeit, realistisch und durchaus möglich. Sowohl eine Nutzung der QC:DNA zur Detektion von DNA/RNA (patentiert durch Fraunhofer ISC), als auch das intrinsische Sensingpotential zur Detektion von Mykotoxinen und Kontaminationen durch Salzbestandteile können in weiterführenden Forschungsprojekten in industrierelevante Applikationen überführt werden.

Kurz- bis mittelfristig ist der wirtschaftliche Belang des Projektes auch für die einzelnen Partner von großer Bedeutung, da bereits neue Projekte im Bereich der QC:DNA laufen (BMBF WiVoPro QC4EP) bzw. bereits abgeschlossen wurden (interne Eigenforschung bei Fraunhofer), sowie gemeinsame Folgeanträge geplant sind und die Ergebnisse, sobald sie publiziert sind, die Initiierung vielfältiger neuer Kooperationen ermöglichen.

Während der Projektlaufzeit wurden für die im Projekt entwickelten bzw. untersuchten Methoden zur Synthese, Testung und Selektion der QC:DNA sowie zur Funktionalisierung, Immobilisierung und für den Aufbau des mikrofluidischen Systems des ISAT keine Schutzrechtsanmeldungen geplant oder eingereicht, die der Ergebnisverwertung entgegenstehen könnten.

2.8 Fremdfortschritt

Während des Projekts wurde dem Konsortium kein neuer Fortschritt in der technischen oder industriellen Anwendung von QC:DNA bekannt. Im wissenschaftlichen, nicht-technischen Bereich wurden weiterhin Veröffentlichungen zum Thema QC:DNA bekannt. Zu den wichtigsten Themen gehörten neu entdeckte QC:DNA mit Emissionen im IR-Bereich^{4,5}, Konstrukte mit verschiedenen DNA-Strukturen, welche bereits im Projekt getestet und etabliert wurden, sowie verschiedene Ansätze zur Optimierung und Anpassung der Synthese⁶. Des Weiteren wurde von Rück et al. eine Kopplungsmethode von QC:DNA mit Peptiden via Click-Chemie publiziert⁷. Diese Arbeiten basieren auf einer anderen Kopplungsmethode und die Verwendung von Peptid-QC:DNA-Konjugaten ist hauptsächlich für die intrazelluläre Bildgebung und nicht für die Detektion von Analyten vorgesehen. Daher sprechen diese Ergebnisse nicht gegen eine mögliche Veröffentlichung unserer Daten.

2.9 Veröffentlichungen der Ergebnisse

Das Projekt wurde an folgende Veranstaltungen anderen Stakeholdern vorgestellt:

Tabelle 2 | Präsentation der QC:DNA-Technologie im Rahmen öffentlicher und semiöffentlicher Veranstaltungen.

Veranstaltung	Typ	Datum
Biotechnologietage Hamburg	Vortrag	2022
Kuratoriumssitzung Fh ISC	Vortrag	2022
Kuratoriumssitzung Fh ISC	Vortrag	2024
CBM 2022, Ilmenau	Posterpräsentation	2022
BMBF Statusseminar Berlin	Vortrag	2023
Microfluidic Handling Systems MFHS2024, München	Posterpräsentation	2024
ICCC, Cottbus	Posterpräsentation	2024
CBM 2024, Ilmenau	Vortrag	2024
CBM 2024, Catanzaro	Posterpräsentation	2024
Technologietag angewandte Sensorik (TAS) 2025, Coburg	Posterpräsentation	2025
Akquise Industriekontakte	Akquise via Teaser	N/A

⁴ González-Rosell, A. & Copp, S. M. An Atom-Precise Understanding of DNA-Stabilized Silver Nanoclusters. *Acc. Chem. Res.* 57, 2117–2129; 10.1021/acs.accounts.4c00256 (2024).

⁵ Mastracco, P., González-Rosell, A., Evans, J., Bogdanov, P. & Copp, S. M. Chemistry-Informed Machine Learning Enables Discovery of DNA-Stabilized Silver Nanoclusters with Near-Infrared Fluorescence. *ACS nano* 16, 16322–16331; 10.1021/acsnano.2c05390 (2022).

⁶ Guha, R., Rafik, M., González-Rosell, A. & Copp, S. M. Heat, pH, and salt: synthesis strategies to favor formation of near-infrared emissive DNA-stabilized silver nanoclusters. *Chem. Commun.* 59, 10488–10491; 10.1039/d3cc02896h (2023).

⁷ Rück, V. et al. Bioconjugation of a Near-Infrared DNA-Stabilized Silver Nanocluster to Peptides and Human Insulin by Copper-Free Click Chemistry. *J Am Chem Soc* 145, 16771–16777; 10.1021/jacs.3c04768 (2023).

Die Präsentation des BioQuant-Vorhabens und seiner Inhalte führte bei den genannten Veranstaltungen zu regen Diskussionen und interessiertem Austausch. Direkte Kooperationen konnten hieraus aufgrund fehlender Fördermöglichkeiten noch nicht erwachsen, es bestehen allerdings weiterhin rege Kontakte. Darüber hinaus wurde der Projektsteckbrief „Winzige Sensoren für die Wasseranalytik“ seitens des BMBF veröffentlicht.

Es sind mindestens fünf Publikationen nach dem Abschluss des Projekts geplant, in der Vorbereitungsphase bzw. bereits eingereicht:

- *Consistent Evaluation Methods for Microfluidic Mixers*
O. Blaschke et al, Micromachines 2024, 15(11), 1312; doi: 10.3390/mi15111312
- *Droplet Based Measurements of DNA Templated Nanoclusters for Point of Care Applications*
ISAT, Fraunhofer IME, J. Kluitmann et al., eingereicht, im Reviewprozess
- *DNA/RNA sensing via fluorophore distortion in DNA-stabilized silver nanoclusters* (working title)
Fraunhofer ISC, in Vorbereitung
- *Droplet based DNA sensing by DNA-stabilized silver nanoclusters for Point of Care Applications (working title)*
ISAT, Fraunhofer ISC, in Vorbereitung
- *Intrinsic sensing capabilities of DNA-stabilized silver nanoclusters* (working title)
Fraunhofer ISC, Fraunhofer IME, in Vorbereitung

Während des Projekts wurden die folgenden Praktika und Abschlussarbeiten in Kooperation mit den jeweiligen Universitäten bearbeitet und abgeschlossen:

- A new Sensor System Based on the Intrinsic Functionality of DNA-stabilized Quantum Metal Clusters, Masterarbeit, Hochschule Mannheim, 2022
- Novel Aptamer Biosensors Based on DNA-stabilized Metal Quantum Clusters for Food and Feed Applications, Masterarbeit, Universität Bayreuth, 2022
- Themenkomplex: Thermisch-Chemisches Bonding von Polycarbonat mit Silikon, Internationales Praktikum, Hochschule Coburg, 2022
- Themenkomplex: Entwicklung, Bau und Test eines Filtermonochromators, Praxissemester, Hochschule Coburg, 2022
- Neuartiges Umweltmonitoring auf Basis Aptamer-funktionalisierter DNA-Metall-Quantencluster, Masterarbeit, Hochschule Coburg, 2023
- Surface Immobilisation of DNA-stabilised Silver Quantum Clusters for Application in Microfluidic Biosensors, Masterarbeit, Technische Universität Braunschweig, 2023
- Integration von Drucksensoren in mikrofluidische Aufbauten, Praxissemester, Hochschule Coburg, 2023
- DNA-Quantencluster-basierte Analyse von biologischen Proben in Mikrofluidik-Chips, Masterarbeit, Hochschule Coburg, 2023
- Design, Fabrication and Result Evaluation for Mixers Based on Multilayer Microfluidic Chips, Masterarbeit, Hochschule Coburg, 2023
- Aufbau eines Transmissionssensors zur Vermessung von Tropfen in Schläuchen, Praxissemester, Hochschule Coburg, 2024
- Design of Aptamer Biosensors for Environmental Monitoring of Pharmaceuticals Based on DNA-stabilized Metal Quantum Clusters, Masterarbeit, Hochschule Jena, 2024
- Analyse des Einflusses anorganischer Ionen auf die Fluoreszenzemission DNA-stabilisierter Silberquantencluster, Bachelorarbeit, Hochschule für angewandte Wissenschaften Ansbach, 2024
- Intrinsisches Sensorpotential von DNA-stabilisierten Metallquantenclustern zur Wasserkontrolle, Masterarbeit, Goethe-Universität Frankfurt, 2024

- Optimierung und Evaluierung eines Verfahrens zur hydrophoben Beschichtung von Polycarbonat, Praxissemester, Hochschule Coburg, 2024
- Mischen von Fluiden in mikrofluidischen Kammern und Kanälen mittels akustischer Kavitation, Bachelorarbeit, Hochschule Coburg, 2024

Eingehende Darstellung
