

Aptazym-initiierte Generierung netzwerkbildender Magneto-Dendronen auf Zelloberflächen zum Nachweis mikrobieller Kontaminationen mittels magnetisch induzierter Thermographie

IGF 21938 N

Ziel des Forschungsprojektes war, durch eine Aptazym-initiierte Hybridisierungskettenreaktion unter Generierung netzwerkbildender Magneto-Dendronen (selbstorganisierte dendritische Nukleinsäurestrukturen, in denen magnetische Partikel eingebunden sind) eine Erhöhung der Belegungsdichte magnetischer Partikel auf der Zelloberfläche von Mikroorganismen zu realisieren, um mit dem im IGF-Vorläufer-Projekt 18612 N entwickelten Nachweissystem auf Basis magnetisch induzierter Thermographie einzelne Zellen auf einem Beprobungsmedium visualisieren zu können.

Um die Generierung netzwerkbildender Magneto-Dendronen in Gegenwart mikrobieller Kontaminationen auslösen zu können, waren zunächst cis-reaktive Aptazyme zu entwickeln, die bei Bindung an ihre Zielstruktur auf der Zelloberfläche ihre katalytische Aktivität entfalten und eine Initiatorsequenz freilegen. Basis für die Entwicklung solcher allosterisch kontrollierter Aptazyme waren Aptamere, d.h. Nukleinsäurestränge, die mit hoher Spezifität an eine Zielstruktur binden, und Nucleozyme, d.h. Nukleinsäurestränge mit katalytischer Aktivität.

Es konnten Aptamere identifiziert und umfassend charakterisiert werden, die sich gegen eine ubiquitär auf der Zelloberfläche von Mikroorganismen vorliegende Zielstruktur (Peptidoglykan, zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl) und gegen hygiene-relevante Mikroorganismen richten. Ferner wurde ein Nucleozym, das DNAzym I R3, identifiziert, welches sich effizient selber spalten kann und sich aufgrund seiner kurzen Sequenzlänge und einfachen Sekundärstruktur besonders eignete, um mit Aptameren zu einem cis-reaktiven Aptazym verknüpft zu werden.

Fortsetzung auf Seite 2

Aptazyme-initiated generation of network-forming magneto-dendrons on cell surfaces for detection of microbial contamination by magnetically induced thermography

IGF 21938 N

The aim of the project was to use an aptazyme-initiated hybridization chain reaction to generate network-forming magneto-dendrons (self-organized dendritic nucleic acid structures in which magnetic particles are embedded) to increase the occupation density of magnetic particles on the cell surface of microorganisms in order to be able to visualise individual cells on a sampling medium using the detection system based on magnetically induced thermography developed in the IGF predecessor project 18612 N.

In order to be able to trigger the generation of network-forming magneto-dendrons in the presence of microbial contamination, cis-reactive aptazymes had to be developed. These cis-reactive aptazymes have to be allosterically controlled, i.e. they only develop their catalytic activity when they bind to their target structure on the cell surface. In addition, an initiator sequence had to be exposed as a result of the strand cleavage. The basis for the development of such aptazymes are aptamers (nucleic acid strands that bind to a target structure with high specificity) and nucleozymes (nucleic acid strands with catalytic activity).

Aptamers binding specifically either to a ubiquitously present target structure on the cell surface of microorganisms (peptidoglycan, for determining of the total bacterial count) or to hygiene-relevant microorganisms were identified and comprehensively characterised. Furthermore, a nucleozyme, DNAzyme I-R3, was identified which can cleave itself efficiently and is particularly suitable for linking with aptamers to form a cis-reactive aptazyme due to its short sequence length and simple secondary structure.

To be continued on page 2

Fortsetzung:

IGF 21938 N

In silico wurde das DNAzym I R3 exemplarisch mit dem Aptamer AntibacI verknüpft, das sich gegen Peptidoglykan richtet, welches Bestandteil der Zellwand grampositiver und gramnegativer Mikroorganismen ist. Durch Modifikation der Sequenz ist es gelungen, unter Erhalt der Spaltaktivität eine Initiatorsequenz in das Aptazym zu integrieren und aus einem dauerhaft aktiven Aptazym ein allosterisch kontrolliertes Aptazym zu generieren, dessen Selbstspaltung bei Bindung an Peptidoglykan aktiviert wurde.

Zudem gelang es, Oligonukleotide mit Haarnadelstruktur (Hairpins) zu identifizieren, die sich in Gegenwart der Initiatorsequenz autonom zu hochverzweigten Nukleinsäurestrukturen zusammenlagerten. Ausgewählte Hairpins wurden mit magnetischen Partikeln gekoppelt; so konnten Magneto-Dendronen zunächst auf Glasoberflächen und danach auch auf Zelloberflächen generiert und nach induktiver Anregung (in einem alternierenden Magnetfeld) thermographisch visualisiert werden.

Der Forschungsbericht ist auf Anfrage beim wfk - Cleaning Technology Institute erhältlich.

Continued:

IGF 21938 N

The DNAzyme I-R3 was linked in silico to the aptamer Anti-bacI which is targeting peptidoglycan, a component of the cell wall of gram-positive and gram-negative microorganisms. By modifying the sequence, it was possible to integrate an initiator sequence into the aptazyme but retaining the cleavage activity and to generate an allosterically controlled aptazyme from a permanently active aptazyme whose self-cleavage was activated upon binding to peptidoglycan.

In addition, it was possible to identify oligonucleotides with a hairpin structure that autonomously assembled into highly branched nucleic acid structures in the presence of the initiator sequence. Selected hairpins were coupled with magnetic particles; magneto-dendrones could thus be generated first on glass surfaces and then also on cell surfaces and visualised thermographically after inductive excitation (in an alternating magnetic field).

The research report is available on request from the wfk - Cleaning Technology Institute

Das IGF-Projekt 21938 N der Forschungsvereinigung Forschungskuratorium Textil e.V., Reinhardtstraße 14-16, 10117 Berlin, wurde 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:



aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

The IGF-project 21938 N of the research association Forschungskuratorium Textil e.V., Reinhardtstr. 14-16, D-10177 Berlin, was supported within the funding program „Industrielle Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF)“ by the Federal Ministry of Economic Affairs and Climate Action due to a decision of the German Parliament.