

# Schnelle Vor-Ort-Risikobewertung für die Prozess- und Produktsicherheit im lebensnahen Einsatz

*C. Hettrich<sup>1</sup>, D. Bader<sup>1</sup>, P. Wessig<sup>2</sup>, E. Ehrentreich-Förster<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie, Institutsteil Bioanalytik und Bioprozesse, Fraunhofer IZI-BB, 14476 Potsdam, Am Mühlenberg 13*

<sup>2</sup> *Universität Potsdam, Institut für Chemie, 14476 Potsdam, Karl-Liebknecht-Str. 24-25*

## Zusammenfassung

Es wurde ein Schnelltests zur biochemischen Detektion von *E. coli*-Bakterien, welcher eine Einschätzung der mikrobiellen Verunreinigung vor Ort ermöglicht, entwickelt. Dieser Test ist nicht Antikörper-basiert wie herkömmliche Immunoassays. Grundlage dieses Tests ist ein Proteinbindeassay für die Detektion von Typ-1-Fimbrien-tragenden *E. coli*. Die Fimbrien weisen eine spezifische Bindungsstelle für Mannose-Liganden auf.

Die Anwendung des terminal Mannose-funktionalisierten OSK-Stabes als Sensormodul wurde an einem nichtpathogenen *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  getestet. Bei Bindung der *E. coli*-Bakterien wird aufgrund der veränderten Umgebungspolarisation das Fluoreszenzsignal verstärkt werden. Die Wechselwirkung von *E. coli* mit dem Mannose-funktionalisiertem OSK-Stab wurde an einem Konfokalen Laser-Rastermikroskop (CLSM (*confocal laser scanning microscope*)) untersucht. Hierzu wurde *E. coli* im Wachstumsmedium kultiviert, gewaschen, in PBS-Puffer resuspendiert und mit dem synthetisierten Sensormodul inkubiert.

Bei Anbindung der Bakterien an den mit Mannose-funktionalisierten Stab wird die Mikro-Umgebung des Fluorophors deutlich unpolarer, was in einer erhöhten Fluoreszenz resultiert.

Schlüsselwörter: *E. coli*, Konfokales Laser-Rastermikroskop (CLSM), Vor-Ort-Test

## Einleitung

Mehr als 4000 Menschen erkrankten im Jahr 2011 in Deutschland an einer Infektion mit dem enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC), ein krankheitsauslösender Stamm des Darmbakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*). Die Suche nach der Infektionsquelle konzentrierte sich dabei schnell auf verschiedene Gemüse, gefolgt von Sprossen.

Generell sind mikrobielle Verunreinigungen von Wasser, Lebensmitteln aber auch von Medizinprodukten und Hygieneartikeln aus textilen Kompositmaterialien unerwünscht. Zur Qualitätssicherung und Überwachung der Produktionshygiene bei deren Herstellung sowie der Trinkwassergewinnung geht es zunächst darum, potentiell pathogene Keime wie z.B. Salmonellen und Shigellen zu erfassen. Da die Nachweismethoden für pathogene Mikroorganismen sehr zeit- und arbeitsaufwendig sind, werden Organismen wie *E. coli* und coliforme Bakterien stellvertretend für die Krankheitserreger bestimmt. Es ist nicht möglich, alle pathogenen Mikroorganismen routinemäßig zu untersuchen.

*Escherichia coli* ist ein normaler Bestandteil des menschlichen und tierischen Darmtraktes und fakultativ pathogen. In der Trinkwasser- und Lebensmittelkontrolle dient die Anzahl von *E. coli*-Bakterien als Hinweis auf fäkale Verunreinigungen. Daher gilt *E. coli* außerhalb des Darmes als Markerkeim. Auch in den Hygienepflichtungen für die Medizintechnik ist ein Nachweis von *E. coli* als Indikator für mögliche Verunreinigung oder ungenügende Desinfektion üblich. Durch die verschiedenen Pathogenitätsfaktoren, die *E. coli* besitzt, ist der Erreger für intra- und extra-intestinale Infektionen verantwortlich.

Bakterielle Krankheitserreger werden in der Regel in aufwändigen Prozeduren nachgewiesen, die ab dem Eintreffen der Probe im Labor mehrere Tage in Anspruch nehmen können. Gefragt sind daher alternative Testsysteme, die wesentlich schneller, vor Ort, ohne aufwändige Probenvorbereitung und dennoch exakt und fehlerfrei arbeiten.

## 2 Methoden und Materialien

Hydrophobe molekulare Stäbe, d.h. relativ steife Moleküle mit einem großen Länge/Breite-Verhältnis können dafür genutzt werden, Rezeptoren in einem bestimmten gewünschten Abstand zu positionieren. Solche Systeme, die modular aufgebaut sind und mit geeigneten Erkennungsgruppen sowie Fluorophoren funktionalisiert werden können, sind für Untersuchungen von Interaktionen über größere Distanzen auf molekularer Ebene interessant.

Für das folgende Konzept wurde ein sogenannter Oligospiroketal(OSK)-Stab verwendet.<sup>[1]</sup> Basis dieses molekularen Stabes sind, die in Abbildung 1 gezeigten, spirocyclisch verbundenen, gesättigten sechsgliedrigen Ringe.

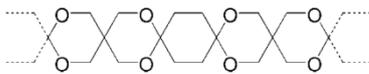


Abb. 1 Struktur eines Oligospiroketal(OSK)-Stabes

Oligospiroketale sind aus spiroverknüpften Cyclohexan- und 1,3-Dioxanringen aufgebaut. Als entsprechende Edukte dienen Ketone und 1,3-Diole.<sup>[2]</sup>

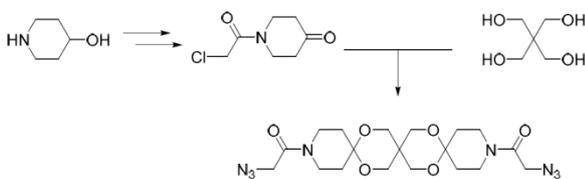


Abb. 2 Aufbauprinzip eines kurzen OSK-Stabes

Über eine verzweigte Linkerstruktur war es möglich das eigentliche Rezeptormolekül Mannose und einen Fluoreszenzfarbstoff in das System zu integrieren.

## 3 Testsystem und Ergebnisse

Grundlage dieses Tests ist ein Proteinbindeassay für die Detektion von Typ-1-Fimbrien-tragenden *E. coli*. Die Fimbrien weisen eine spezifische Bindungsstelle für Mannose-Liganden auf.

Die Anwendung des terminal Mannose-funktionalisierten OSK-Stabes als Sensor modul wurde an einem nichtpathogenen *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  am Fluoreszenzmikroskop (CLSM (*confocal laser scanning microscope*)) getestet.

Hierzu wurden die *E. coli* in LB-Medium kultiviert, gewaschen, in PBS resuspendiert und eine Stunde mit dem Sensorstab inkubiert. Nach einem erneuten Waschen wurden die Bakterien auf Objektträgern fixiert.

In einem ersten Experiment wurde festgestellt, dass der funktionalisierte Stab in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-7}$  bis  $10^{-13}$  mol/l gut einsetzbar ist.<sup>[3]</sup>

Die Aufnahmen wurden im Fluoreszenzmodus für die Anregung  $\lambda_{ex} = 405$  nm und Emission  $\lambda_{em} = 530-600$  nm aufgenommen.

In Abbildung 3 sind zwei untersuchte Konzentrationen dargestellt.

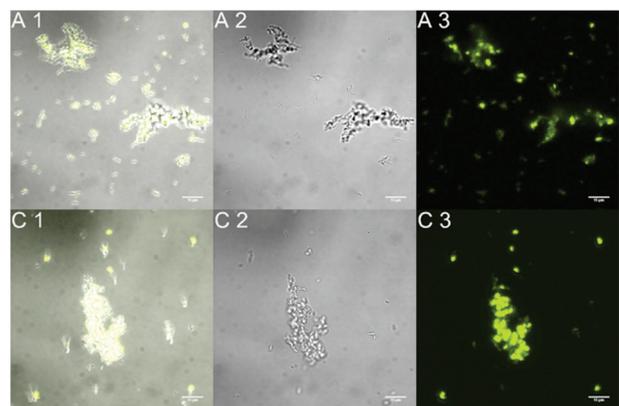


Abb. 3 CLSM-Bilder von *E. coli*-Bakterien gebunden am molekularen Stab, inkubiert in den Konzentrationen  $c = 10^{-7}$  (A),  $10^{-13}$  (C) mol/L

1 = 2-Kanalbild, 2 = Hellfeld, 3 = Fluoreszenz ( $\lambda_{ex}=405$  nm,  $\lambda_{em}=530-600$  nm)

In der Abbildung ist zu erkennen, dass zum einem auch bei sehr hoher Verdünnung von  $10^{-13}$  mol/L (C) immer noch ein sehr gutes Fluoreszenzsignal detektierbar ist und zum anderen kommt es bei allen untersuchten Konzentrationen zu einer auffälligen Agglutination der Bakterien. Da der Stab an beiden Seiten Mannoserezeptoren trägt, kann dieser auch gleichzeitig von zwei Bakterien erkannt und gebunden werden. Beim Andocken der Bakterien an den mit Mannose-funktionalisierten Stab wird die Mikro-Umgebung der Fluorophorsonde deutlich unpolarer, was in einer erhöhten Fluoreszenz resultiert.

Für die Negativ-Kontrolle wurde die Acetylgeschützte Mannose an den Stab verankert. Damit war kein Rezeptor für die Fimbrienproteine vorhanden. So konnte in diesem Experiment weder ein Fluoreszenzsignal noch eine Agglutination der Bakterien beobachtet werden.

Der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  wurde ebenfalls für eine Co-Lokalisationsuntersuchung der Bakterien verwendet. Diese sind in der Lage, das rot fluoreszierende Protein (RFP - pDsRed Express) zu produzieren, wodurch sie durch die Fluoreszenzeigenschaften des Proteins exakt lokalisiert werden können.

Die Abbildung 4 zeigt sowohl das Hellfeld-Bild (1), als auch die Fluoreszenzbilder bei  $\lambda_{ex} = 405$  nm für

den Stab (2) und bei  $\lambda_{\text{ex}} = 543 \text{ nm}$  für das RFP der Bakterien (3).

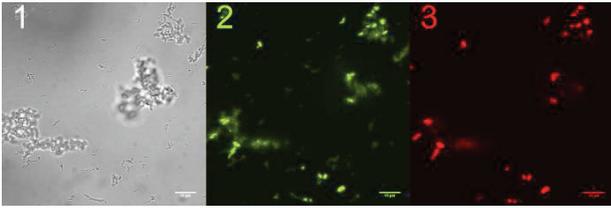


Abb. 4 Co-Lokalisationsuntersuchungen von *E. coli*-Bakterien, gebunden am molekularen Stab (1, 2) und sichtbar durch das rot fluoreszierenden Protein RFP (3) 1 = Hellfeld, 2 = Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{ex}}=405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=530-600 \text{ nm}$ ), 3 = Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{ex}}=543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=560-700 \text{ nm}$ )

Es ist eine deutliche Übereinstimmung der Signale der rot fluoreszierenden Bakterien mit den örtlich vergleichbaren Fluoreszenzsignalen, der vom molekularen Stab gebundenen Bakterien erkennbar.

In einem weiteren Experiment wurde versucht, den Stab aus seinem Bakterienverbund zu verdrängen. Dazu wurde  $\alpha$ -D-Methylmannopyranosid im Überschuss ( $c = 1.4 \text{ mol/L}$ ) zu der bereits vorliegenden Suspension von Bakterien und Stab in der Konzentration von  $c = 10^{-7} \text{ mol/L}$  zugegeben. Nach einer erneuten Inkubationszeit wurden die Bakterien nochmals gewaschen und in PBS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Bakterien auf Objektträgern fixiert und am Mikroskop untersucht (Abb. 5).

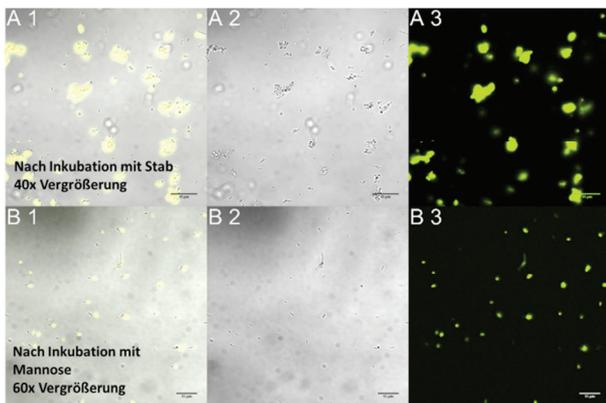


Abb. 5 Verdrängungsexperiment zwischen dem Mannose-funktionalisiertem Stab (A) und Mannose (B) und dem Bindungsverhalten der *E. coli*-Bakterien

Nach Inkubation der Bakterien mit dem Mannose-funktionalisierten Stab (A) konnte erneut eine Agglutination der *E. coli* beobachtet werden. Nach der zweiten Inkubation mit  $\alpha$ -D-Methylmannopyranosid (B) wurden keine agglutinierten Bakterien mehr gefunden. Durch den sehr großen Überschuss an  $\alpha$ -D-Methylmannopyranosid kann der ebenfalls mit Mannose funktionalisierte

molekulare Stab verdrängt werden. Allerdings zeigt die verbleibende Fluoreszenz, dass immer noch einzelne Bakterien an den Stab binden. Möglicherweise werden beide Bindungsstellen des Stabes aufgrund der räumlichen Nähe von einem Bakterium eingenommen.

## 4 Zusammenfassung

Mit dem Design eines molekularen Stabes, der in einem bestimmten Abstand zueinander die entsprechenden Rezeptormoleküle und Fluoreszenzsonden trägt, wurde ein modular aufgebautes System vorgestellt, bei dem präorganisierte Bindungsstellen für eine beliebige Anwendung vorgegeben werden können.

Das Konzept wurde am Beispiel von *E. coli* (Stamm DH5 $\alpha$ ) bestätigt. Es konnte festgestellt werden, dass der Stab eine 1:2-Bindung mit den Bakterien eingeht, da eine Agglutination der Bakterien zu beobachten war. In einem Kontrollexperiment wurde keine unspezifische Wechselwirkung zwischen dem Stab und den Bakterien nachgewiesen.

Weiterhin konnte mit den autofluoreszierenden Bakterien ein Co-Lokalisationsexperiment erfolgreich durchgeführt werden.

## Danksagung

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (03IS2201A) gefördert.

## Literatur

- [1] C. Grimm, T. Meyer, S. Czaplá, J. Nikolaus, H. A. Scheidt, A. Vogel, A. Herrmann, P. Wessig, D. Huster, P. Müller. *Chemistry Eur. J.* **2013**, *19*, 2703-2710.
- [2] Möllnitz, K. Dissertation, Universität Potsdam, Potsdam, 2012.
- [3] Bader, D. Dissertation, Universität Potsdam, Potsdam, 2014.