

Kombinierter optisch-impedimetrischer Ganzzellbiosensor

Margarita Günther¹, Gerald Gerlach¹, Christine Schirmer², Juliane Posseckardt², Wolfgang Fichtner², Michael Mertig², Falko Altenkirch³, Kai Ostermann³, Astrid Schuller³, Gerhard Rödel³, Andreas T. Winzer⁴, Ingo Tobehn-Steinhäuser⁵, Mathias Schröder⁶, Markus Gläser⁶, Wolfram Scharff⁶, Peter Zimmermann⁷

¹Institut für Festkörperelektronik, Technische Universität Dresden, 01062 Dresden/Deutschland

²Kurt-Schwabe-Institut für Mess- und Sensortechnik e.V. Meinsberg, 04736 Waldheim/Deutschland

³Institut für Genetik, Technische Universität Dresden; 01062 Dresden/Deutschland

⁴medis. Medizinische Messtechnik GmbH, 98693 Ilmenau

⁵CiS Forschungsinstitut für Mikrosensorik GmbH, 99099 Erfurt/Deutschland

⁶IFU GmbH Privates Institut für Umweltanalysen, 09244 Lichtenau/Deutschland;

⁷TEB Ingenieurbüro, 12555 Berlin/Deutschland

mguenthe@mail.zih.tu-dresden.de, schirmer@ksi-meinsberg.de

Zusammenfassung

Im Wachstumskern „Biologische Sensor-Aktor-Systeme auf der Basis von funktionalisierten Mikroorganismen (BioSAM)“ werden Ganzzellensensoren für die Umwelt- und Medizintechnik entwickelt, welche die Reaktion lebender Zellen auf umwelt- oder prozessrelevante Stoffe zur Bewertung der biologischen Wirkung von Analyten nutzen. Im Teilvorhaben HIGS („Hochintegrierte Ganzzellensensoren für die Umwelt- und Medizintechnik“) werden dabei gentechnisch modifizierte Hefezellen eingesetzt, die bei Anwesenheit des Analyten Diclofenac, welches als anthropogener Spurenstoff in Wässern vorkommt, ein Fluoreszenzprotein produzieren. In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Aspekte des entwickelten Ganzzellensensors dargestellt. Im ersten Teil wird der mikrofluidische Aufbau zur sicheren Einhausung der Hefezellen vorgestellt, der einen optischen Zugang zur Detektion des Fluoreszenzsignales gewährleistet und gleichzeitig die Versorgung der Hefezellen mit Nährmedium und Analyt sicherstellt. Mit diesem Aufbau können Diclofenac-Konzentrationen zwischen 10 und 100 µM in Nährmedium unterschieden werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit wird vorgestellt, wie die optische Detektion des Fluoreszenzsignals mit Impedanzmessungen kombiniert wurde. Ein Sensormodell auf der Basis elektrischer Netzwerke wurde entwickelt, welches das dynamische Verhalten der immobilisierten Zellen und die Transportprozesse an den Elektroden beschreibt.

Keywords: Ganzzellensensor, PDMS-Mikrofluidik, *Saccharomyces cerevisiae*, Fluoreszenzprotein, Diclofenac

Einleitung

Die Detektion von Schadstoffen in der Umwelt kann mit traditionellen analytischen Methoden präzise und sensitiv durchgeführt werden. Allerdings erfordern diese Methoden speziell ausgestattete Labore, geschultes Personal und einen Transport der Proben ins Labor, wodurch diese Analysen zeitaufwendig und teuer werden. Eine Alternative können Ganzzellbiosensoren auf der Basis mikrobieller Zellen sein, die einfach genetisch zu verändern sind, kostengünstig in großen Mengen produziert werden können und darüber hinaus nur den bioverfügbaren Anteil des Analyten detektieren. Diclofenac, ein Arzneimittelrückstand, der schon in umweltrelevanten Konzentrationen Schäden bei Wasserorganismen hervorruft, kann mithilfe

gentechnisch veränderter Hefen detektiert werden, wobei es konzentrationsabhängig zur Generierung eines Fluoreszenzsignales kommt [1]. Im Folgenden werden der Aufbau und die Funktionsweise eines neuartigen, im Durchfluss arbeitenden Ganzzellensensors beschrieben, in dem die gentechnisch veränderten Hefezellen sicher eingeschlossen sind, mit Nährstoffen und Analyt versorgt werden können und gleichzeitig ein Auslesen des Fluoreszenzsignales möglich ist.

Material und Methoden

Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* (S.c.)

Für die Experimente wurde der Diclofenac-sensitive Stamm S.c. BY4741 [MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0]

p426PDR5::TGFP(1000) sowie p426GPD::TGFP als Kontrolle verwendet [1]. Die Vorkultur erfolgte im Schüttelinkubator bei 30 °C und 180 U/min in synthetischem Komplettmedium (SC-Medium) mit 6,9 g Yeast Nitrogen Base mit Ammoniumsulfat (Formedium, UK), 20 g/l D(+)-Glukose (Roth, Deutschland) und 2,002 g/l Kaiser mix SC complete (Formedium, UK). Die Kultivierung der Zellen im Ganzzellensensor erfolgte in synthetischem Minimalmedium (MM), mit 6,9 g/l Yeast Nitrogen Base mit Ammoniumsulfat, 20 g/l D(+)-Glukose, 60 mg/l L-Histidin, 80 mg/l L-Leucin und 20 mg/l L-Methionin (Roth, Deutschland). Die optische Dichte der Vorkultur wurde bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt und die Zellen auf eine $OD_{600} = 2$ durch Abzentrifugieren, Waschen und Resuspendieren in doppelt konzentriertem MM ohne Glukose eingestellt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 1,5 % low melt Agarose (Plaque agarose, Biozym, Deutschland) gemischt und in den Sensorkammern immobilisiert.

Aufbau der Mikrofluidikzelle

Wie bereits in der Einleitung angedeutet, soll der Sensor folgende Kriterien erfüllen: (i) Einhausung der Hefezellen zur Verhinderung von Zellverlusten, welche zu einem Signalverlust und einer Kontamination der Umwelt führen. (ii) Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und (iii) Möglichkeit der Auslesung des Fluoreszenz- und des Impedanzsignales. Der entwickelte Sensoraufbau (Abb. 1) aus Polydimethylsiloxan (PDMS) basiert auf dem kommerziell erhältlichen MicCell™ System der Firma GeSiM (Radeberg, Deutschland) [2], welches wir durch zwei zusätzliche unterliegende Kammern (Zellkammern) zur Einbettung der Sensorzellen und eine zwischenliegende poröse Membran erweitert haben.

Durch die oberen Kanäle (Versorgungskanäle) wird zunächst 1 h lang MM mit einer Geschwindigkeit von 20 μ l/min gepumpt, welches durch die poröse Membran in die unteren Kammern gelangt. Anschließend erfolgt der Wechsel zu MM, versetzt mit unterschiedlichen Diclofenac-Konzentrationen, welches 12 h lang ebenfalls mit 20 μ l/min durch die Versorgungskanäle gepumpt wird. Durch den speziellen Aufbau des Sensors sind die eingebetteten Zellen vollständig eingeschlossen: von unten durch den Glas-Objektträger, seitlich durch den PDMS-Rahmen und von oben durch die poröse Membran.

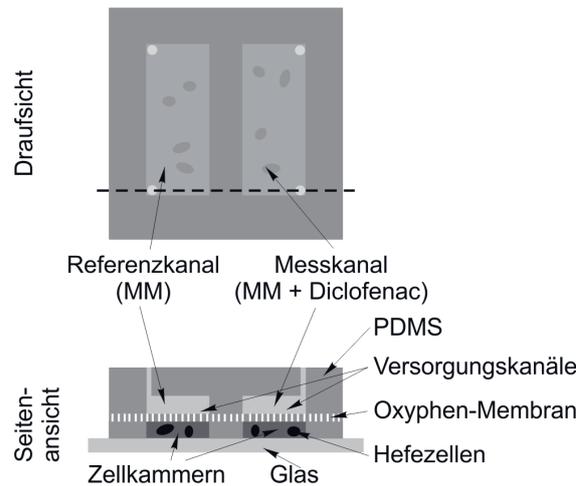


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Mikrofluidikzelle in Auf- und Seitenansicht (gestrichelte Linie = Schnittebene). Auf einem Glas-Objektträger wird ein Rahmen aus PDMS platziert, sodass unten zwei Kammern, eine Messkammer und eine Referenzkammer, entstehen. In diesen Zellkammern werden die Hefezellen in Agarose immobilisiert. Die Kammern werden mit einer Oxyphen-Membran mit einer Porengröße von 1 μ m bedeckt. Auf der Membran wird deckungsgleich zu den unteren Kanälen ein weiterer Rahmen aus PDMS platziert, sodass sich oben zwei Versorgungskammern bilden, über welche die Zellen mit Nährmedium und Analyt versorgt werden. Wie im MicCell™ System, schließt ein Polycarbonat-Körper mit fluidischen Anschlüssen den Sensor nach oben hin ab (nicht gezeigt).

Auslesen des optischen Signals

Die Auswertung des Fluoreszenzsignales erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskopes, wobei alle 10 min Mikroskopbilder mit einem für TGFP geeigneten Filtersatz aufgenommen wurden. Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgte mit ImageJ [3] und dem zugehörigen Bioformats Plugin [4]. In den Abbildungen ist die Intensität der aufgenommenen Fluoreszenz als Funktion der Zeit dargestellt.

Aufbau des kombinierten optisch-impedimetrischen Sensorsystems

Der komplette Aufbau des Sensorsystems besteht aus vier Teilen:

- 1) Vier-Kammer-Mikrofluidikzelle, die als eine S1-kompatible Einhausung der genmodifizierten Hefezellen dient und die

- Nährstoffversorgung der Zellen sowie das Durchströmen des Analyten ermöglicht.
- 2) Modul zur Impedanzmessung, bestehend aus einer Glasplatte mit zwei beschichteten transparenten ITO (*indium tin oxide*)-Mikroelektrodenarrays (jeweils mit 24 Fingern, CiS, Erfurt, Deutschland) und einer Platine mit einem Steuerteil, einem Multiplexer und Federkontakten zu den Elektroden (CiS, Erfurt, Deutschland). Die Mikrofluidikzelle ist auf der Glasplatte oberhalb von den Elektrodenarrays positioniert. Die Impedanzmessung erfolgt mittels eines Impedanzspektrometers ISX-3v2 (Sciospec, Bennewitz, Deutschland), das über geschirmte SMA-Leitungen mit den Elektroden verbunden ist. Durch den Multiplexer ist es möglich, die ITO-Elektrodenfinger (Länge 11 mm, Dicke 0,5 μm) beliebig zu Arrays zusammenzufassen oder sie einzeln zu betreiben. Der Abstand zwischen den Fingern variiert abhängig vom Layout zwischen 2,5 μm und 133,5 μm und die Breite beträgt zwischen 5 μm und 186 μm . Das Verfahren der 4-Punkt-Messung wurde angewendet, da es den Einfluss der Zuleitungen und Kontakte auf die Impedanz der Probe minimiert. Die Impedanzspektren wurden über einen Frequenzbereich von 0,1 Hz bis 10 MHz mit einer Amplitude von 12 mV aufgenommen.
- 3) Das Modul zur optischen Messung enthält einen Aufbau des CiS zur Anregung und Messung des Fluoreszenzsignals sowie einen Strom-Spannungs-Wandler, basierend auf einem Operationsverstärker OP177. Der CiS-Fluoreszenzaufbau besteht aus zwei LED-Reihen (für den Mess- und Referenzkanal) mit eingebauten Anregungslangpassfiltern OG515 zum Nachweis von grün fluoreszierenden Proteinen (TGFP, Absorptionsmaximum bei 485 nm, Emissionsmaximum bei 510 nm), aus einem Prisma zur Einkopplung des optischen Signals, aus einem Fluoreszenzfilter und aus einer Photodiode OC808 mit einer Fläche von 1 cm^2 . Das Anregungslicht des CiS-Fluoreszenzaufbaus wurde mit zwei Reihen in Serie geschalteter LEDs erzeugt. Jede Reihe wurde separat mit einer Spannungsversorgung von 27 V in Strombegrenzung (optimal 8 mA) betrieben. Die Temperatur in der Probenebene wurde mit einem Temperatursensor LM61CIZ (Texas Instruments Inc., Dallas, Texas, USA) kontrolliert.

- 4) UV-Denaturierungsmodul zur Inaktivierung lebender Zellen (IFU, Lichtenau, Deutschland, UMEX, Dresden Deutschland).

Ergebnisse und Diskussion

Um zu zeigen, dass die eingeschlossenen Hefen mit Nährstoffen versorgt werden können, wurden zunächst konstitutiv fluoreszierende Kontrollzellen (p426GPD::TGFP) in Nährmedium ohne Glukose, in welchem keine Fluoreszenz gezeigt werden sollte, in den Zellkammern des Sensors eingebettet (Abb. 2a).

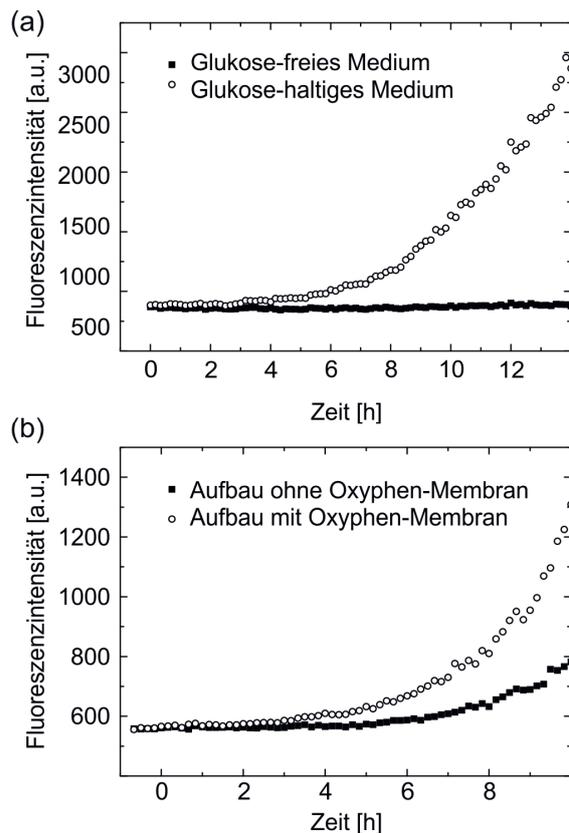


Abb. 2: (a) Nährstoffversorgung der eingebetteten Zellen. Konstitutiv fluoreszierende Hefen (p426GPD::TGFP) wurden in den Zellkammern glukosefrei eingebettet. Die Versorgungskammern wurden mit Glukose-haltigem Medium (○) bzw. mit Glukose-freiem (■) Medium überströmt. (b) Diclofenac-sensitive Hefen (p426PDR5::TGFP(1000)) wurden mit MM mit 100 μM Diclofenac mit (○) bzw. ohne (■) zwischenliegender Membran überströmt und die Fluoreszenzintensität über die Zeit durch Auswertung von Mikroskopbildern bestimmt.

Nur wenn diese Zellen mit Glukose-haltigem Medium in den Versorgungskammern überströmt wurden, fand ein Zellwachstum statt, welches sich in einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität zeigte (●). Wurden die oberen Kammern mit Glukose-freiem Medium durchströmt (■), konnte kein Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Damit konnte gezeigt werden, dass die Versorgung der Hefezellen über die Diffusion der Glukose durch die Poren der Oxyphen-Membran in die unteren Zellkammern möglich ist.

Weiterhin wurden Experimente durchgeführt, bei denen keine Membran zwischen Zellkanälen und Versorgungskanälen implementiert wurde. Abbildung 2b zeigt, dass das Fluoreszenzsignal ohne Membran deutlich geringer war. Das bedeutet möglicherweise, dass es trotz der Immobilisierung der Zellen in der Agarose aufgrund der auftretenden Scherkräfte durch die Strömung des Nährmediums zu einem Zellverlust und damit zu einem Signalverlust kam.

Um die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der eingesetzten Diclofenac-Konzentration zu ermitteln, wurden Diclofenac-sensitive Hefen in den Zellkammern eingebettet und mit MM, versetzt mit unterschiedlichen Diclofenac-Konzentrationen überströmt. In Abb. 3 ist der zeitliche Verlauf der Intensität der Fluoreszenz ($\Delta i(t) = i(t) - i(t=0)$) dargestellt. Es zeigte sich ein Anstieg der Fluoreszenzintensität mit steigender Diclofenac-Konzentration.

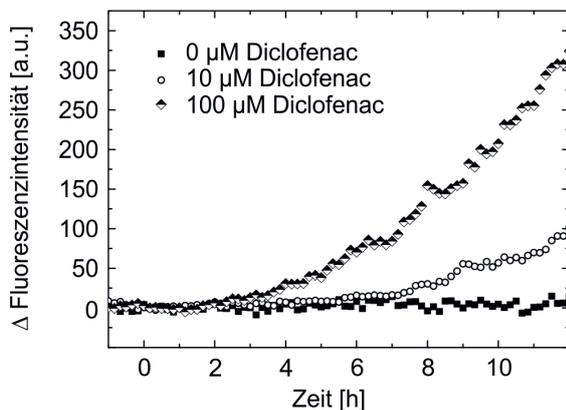


Abb. 3: Diclofenac-sensitive Hefen wurden in den Zellkammern immobilisiert und mit MM überströmt, versetzt mit unterschiedlichen Diclofenac-Konzentrationen. Es wurde die Entwicklung der Fluoreszenzintensität über die Zeit durch Auswertung von Mikroskopbildern detektiert.

Im kombinierten optisch-impedimetrischen Sensorsystem erfolgte die optische Detektion des Fluoreszenzsignals mithilfe des CiS-

Fluoreszenzaufbaus beim Einschalten einer LED-Reihe bzw. zweier LED-Reihen (470 nm, 27 V, 8 mA, Abb. 4). Der Photodiodenstrom wurde mittels eines Strom-Spannungswandlers auf der Basis eines Operationsverstärkers OP177 und einer LabJack U6-PRO-Karte gemessen (Abb. 5).

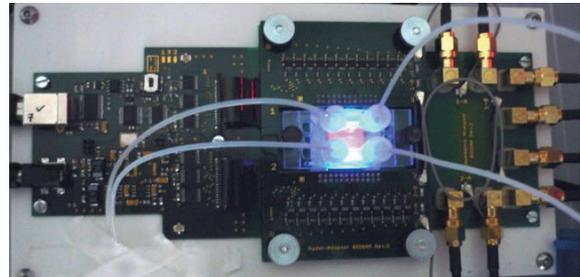


Abb. 4: CiS-Platine mit der Mikrofluidikzelle und zwei eingeschalteten LED-Reihen des CiS-Fluoreszenzaufbaus

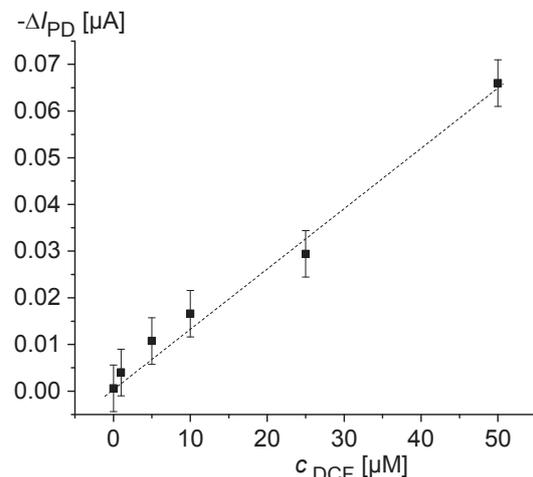


Abb. 5: Änderung des Photodiodenstroms I_{PD} in Abhängigkeit von der Diclofenac-Konzentration c_{DCF} nach 16-stündiger Überströmung mit MM, versetzt mit unterschiedlichen Diclofenac-Konzentrationen. Das optische Signal wurde mithilfe des CiS-Fluoreszenzaufbaus ermittelt, der sich unterhalb von der Mikrofluidikzelle mit immobilisierten Hefezellen BY4741 p426PDR5::TGFP befindet.

Parallel zur optischen Charakterisierung wurde die Impedanzmessung an Hefezellen BY4741 p426PDR5::TGFP durchgeführt, die im low-melt-Agarose-Gel auf einem Glassubstrat mit zwei ITO-Elektrodenarrays in der unteren Mikrofluidikkammer immobilisiert waren (Abb. 6). Zum Vergleich sind die Messergebnisse für die Zellsuspensionen mit lebenden und mit toten Zellen in YPD (yeast extract peptone dextrose)-Medium in Abb. 6

dargestellt, ermittelt mithilfe der Gold-Interdigitalelektroden Roche xCelligence einer E-Platte 16 (ACEA Biosciences Inc., San Diego, USA).

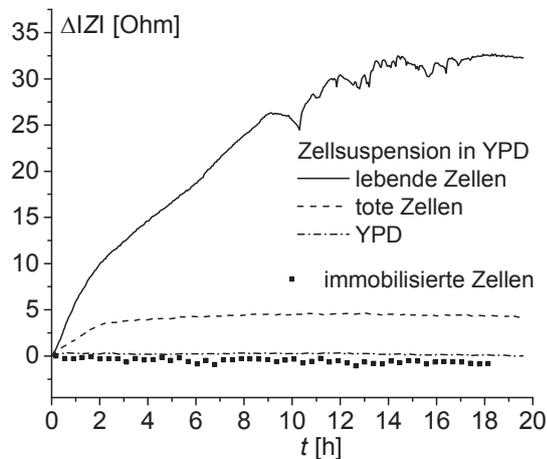


Abb. 6: Änderung des Impedanzbetrags $|Z|$ über der Zeit bei einer Frequenz von 100 kHz für die in der Mikrofluidikkammer auf den ITO-Elektrodenarrays (CiS-Glassubstrat BioSAM-01_4) immobilisierten Hefezellen BY4741 p426PDR5::TGFP bei der Überströmung mit MM (*). Für die Zellsuspensionen in YPD wurde die E-Platte 16 verwendet.

Die Messergebnisse der Impedanzspektroskopie wurden als Bode-Diagramme (Impedanzbetrag $|Z|$ gemäß Abb. 7a und Phasenwinkel φ vs. Frequenz f) sowie als Nyquist-Diagramm (Imaginärteil $\text{Im}(Z)$ der Impedanz Z als Funktion des Realteils $\text{Re}(Z)$, siehe Abb. 7b) graphisch dargestellt und mittels ZView-Software analysiert.

Ein Sensormodell auf der Basis elektrischer Netzwerke wurde entwickelt, welches das dynamische Verhalten der immobilisierten Zellen und die Transportprozesse an Elektroden beschreibt. Abbildung 8 zeigt das Ersatzschaltbild, dessen Parameter (Tab. 1) an die Messdaten, ermittelt mithilfe einer entsprechenden ITO-Elektrodenkonfiguration (mit kontinuierlich zunehmenden Fingernbreiten von $5\ \mu\text{m}$ bis $186\ \mu\text{m}$ und Abständen von $2,5\ \mu\text{m}$ bis $133,5\ \mu\text{m}$), angepasst wurden. Das Verhalten der Elektrode lässt sich mittels einer offenen Warburg-Impedanz Z_{W0} , eines Durchtrittswiderstands R_1 und einer Doppelschicht-Kapazität C_1 modellieren. Die Zellsuspension wird durch ein RC-Glied (die Parallelschaltung von R_2 und C_2) abgebildet, das in Reihe mit einem Widerstand R_s der Lösung geschaltet ist. Die Warburg-Impedanz modelliert das Verhalten der Transportvorgänge (normalerweise Diffusion) an Elektroden.

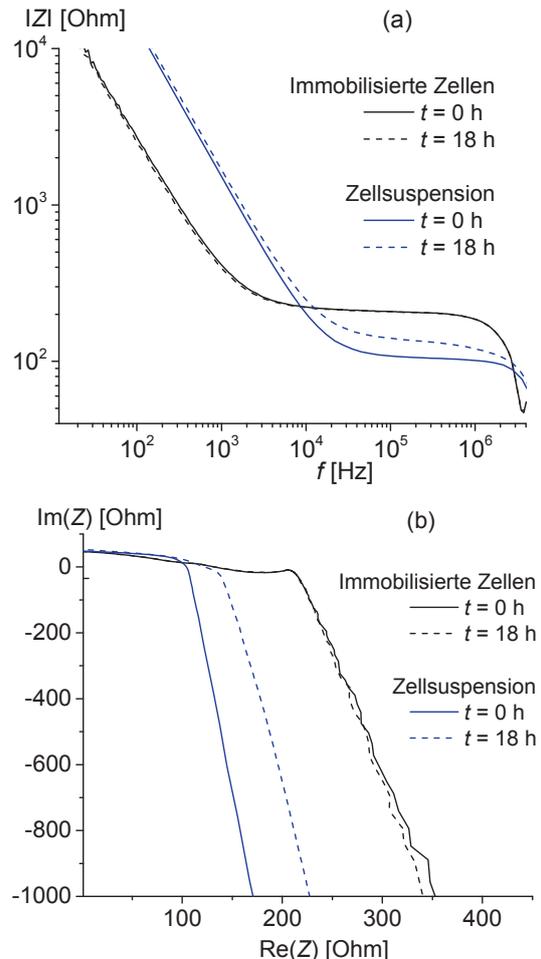


Abb. 7: Impedanzspektren (a) und entsprechende Nyquist-Diagramme (b) für die im low-melt-Agarose-Gel immobilisierten Hefezellen BY4741 p426PDR5::TGFP, platziert auf den ITO-Elektrodenarrays (CiS-Glassubstrat BioSAM-01_4) in der unteren Mikrofluidikkammer. Die Impedanzspektren wurden über einen Frequenzbereich von 10 Hz bis 4 MHz mit einer Amplitude von 12 mV (DC-Offset = 0 V) bei der Überströmung mit MM aufgenommen. Für die Zellsuspension in YPD wurde die E-Platte 16 verwendet.

Je niedriger die Frequenz ist, desto stärker wird der Einfluss der Diffusion, gegeben durch die Warburg-Impedanz Z_{W0} :

$$Z_{W0} = R_W \frac{\text{ctnh}\left[(j\tau\omega)^p\right]}{(j\tau\omega)^p} \quad (1)$$

Gleichung (1) beschreibt die Diffusion in einem begrenzten Elektroden-nahen Bereich. Hier sind τ die Diffusionszeit, ω die Kreisfrequenz und $j = \sqrt{-1}$ die imaginäre Einheit. Die Diffusionszeit τ wird durch die Diffusionslänge

l und durch den effektiven Diffusionskoeffizienten D ausgedrückt:

$$\tau = \frac{l^2}{D} \quad (2)$$

Bei hohen Frequenzen steigt der Einfluss der Induktivität L_1 der Zuleitungen. Bei der Immobilisierung der Zellen in einem Gel wird zusätzlich ein Widerstand R_3 eingeschaltet.

Das dynamische Verhalten der Zellen wie Zellsedimentation und Zellrasenbildung auf den Elektroden bei Zellsuspensionen sowie Zellmetabolismus wird mittels der zeitabhängigen Werte von R_4 bzw. von R_s beschrieben. Da die im Gel immobilisierten Zellen im Gegensatz zur Zellsuspension im Zeitverlauf keine Ablagerung auf den Elektroden zeigen, ist der Widerstand $R_4 = 0 \Omega$. Die Finger der Elektrodenstruktur können über einen Multiplexer vollkommen unabhängig voneinander angesteuert und in beliebiger Weise zu Arrays zusammenschaltet oder einzeln betrieben werden. Bei einer parallelen Schaltung der n Finger sollen die $(n-1)$

Widerstände zwischen den Kontaktfingern im Wert von R_3 sowie in Parametern der Warburg-Impedanz berücksichtigt werden.

In Tabelle 1 sind die Parameter des Modells für immobilisierte Zellen und für die Zellsuspension zusammengefasst. Die Vergrößerung des Betrags bzw. des Realteils der Impedanz mit der Messzeit t für die Zellsuspension (Abb. 6 und 7) ist mit dem zeitabhängigen Widerstand R_4 bezeichnet.

Mit der Weiterentwicklung der Zellen in Richtung höherer Sensitivität (z.B. durch ein Amplifikationssystem) und eines stabilen Signals zur Vergleichbarkeit verschiedener Experimente (z.B. durch genomische Integration des PDR5::TGFP-Konstruktes) sowie der Entwicklung einer kleinen Detektionseinheit zum Auslesen der Fluoreszenz kann der entwickelte Sensoraufbau in der Zukunft einen Beitrag zur verbesserten, inline-fähigen Abwasseranalyse bieten.

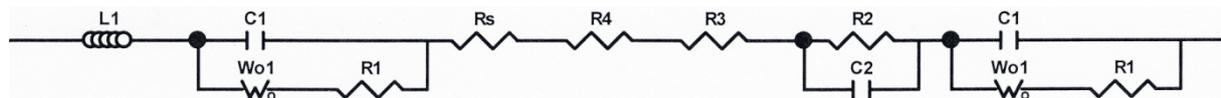


Abb. 8: Ersatzschaltbild des entwickelten Netzwerkmodells

Tab. 1: Parameter des Netzwerkmodells

Parameter	Immobilisierte Zellen		Zellsuspension		Einheit
	$t = 0 \text{ h}$	$t = 18 \text{ h}$	$t = 0 \text{ h}$	$t = 18 \text{ h}$	
L_1	$9 \cdot 10^{-8}$	$9 \cdot 10^{-8}$	$7 \cdot 10^{-7}$	$7 \cdot 10^{-7}$	H
C_1	$6 \cdot 10^{-8}$	$6 \cdot 10^{-8}$	$6 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-8}$	F
R_W	$6 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-3}$	$3,5 \cdot 10^{-3}$	$3,5 \cdot 10^{-3}$	Ω
τ	$2,4 \cdot 10^{-9}$	$2,6 \cdot 10^{-9}$	$2,7 \cdot 10^{-10}$	$2,7 \cdot 10^{-10}$	s
P	0,46	0,46	0,475	0,47	
R_1	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$	Ω
R_2	100	100	100	100	Ω
R_3	166	166	0	0	Ω
R_4	0	0	0	35	Ω
R_s	42	39	110	107	Ω
C_2	$5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	F

Literaturnachweis

- [1] Schuller, A., Rödel, G., Ostermann, K., *Sensors* 17, 1506-1522 (2017); doi: 10.3390/s17071506
- [2] Gast, F.-U., Dittrich, P.S., Schwille, P., Weigel, M., Mertig, et al., *Microfluid Nanofluid* 2, 21-36 (2006); doi: 10.1007/s10404-005-0047-6
- [3] Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., *Nature methods* 9 (7), 671-675 (2012); doi: 10.1038/nmeth.2089

- [4] Linkert, M., Rueden, C.T., Allan, C., et al., *The Journal of cell biology* 189, 777-782 (2010); doi: 10.1083/jcb.201004104

Danksagung

Die Autoren danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die Förderung des Projektes HIGS (FKZ 03WKCL01F, 03WKCL01G und 03WKCL03G) im Rahmen des Wachstumskerns BioSAM.