

Signalverstärkersystem basierend auf der Pheromon-gekoppelten Bildung eines Fluoreszenzproteins in Hefen

Alfred Kick¹, Julia Lenhart¹, Lisa Heike Tranelis², Julia Döring², Maria Patschin², Kai Ostermann², Michael Mertig^{1,3}

¹Kurt-Schwabe-Institut für Mess- und Sensortechnik Meinsberg e.V., Waldheim, Deutschland

²Umweltmonitoring und Endokrinologie - Fakultät Biologie, Technische Universität Dresden, Deutschland

³Physikalische Chemie, Technische Universität Dresden, Deutschland

Kontakt: alfred.kick@ksi-meinsberg.de

Einleitung

Arzneimittelrückstände und deren Metabolite im Wasserkreislaufsystem sind ein weltweites Problem, da diese Stoffe potenziell gesundheitsschädlich sein können [1]. Auf die erste EU-Beobachtungsliste wurde u.a. der Wirkstoff Diclofenac gesetzt [2], eines der weltweit am häufigsten eingesetzten Medikamente, welches zur Familie der nichtsteroidalen Entzündungshemmer/Antirheumatika gehört. Bei oraler Gabe von Diclofenac werden 60 bis 70 % des Wirkstoffs über den Urin ausgeschieden. Die mittlere Diclofenac-Konzentration im Abwasser beträgt 0,11 bis 2,3 µg/l, in Krankenhausabwässern kann sie auf bis zu 6,88 µg/l und in Abwässern der pharmazeutischen Industrie auf 203 µg/l (0,69 µM) ansteigen [3].

Ziel der Arbeit ist die Entwicklung eines Sensorprinzips auf Grundlage genetisch modifizierter Hefen [4]. Diese Hefen (*Saccharomyces (S.) cerevisiae*) sollen in Ganzzellensensoren zur Detektion von Arzneimittelrückständen in Umweltproben [5, 6] genutzt werden. Im Speziellen soll Diclofenac in geringen Konzentrationen sicher nachgewiesen werden können.

Das hier verwendete Sensorprinzip (Abb. 1) beruht auf der Bildung des Hefe-Pheromons [7] (α -Faktor) durch einen genetisch modifizierten Hefestamm, der bei Anwesenheit von Diclofenac den α -Faktor, ein Peptid aus 13 Aminosäuren (Trp-His-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Met-Tyr), bildet. Hierbei wird der *PDR5*-Promoter der Hefe genutzt. Der α -Faktor führt dann in einem zweiten Stamm zur Aktivierung des *FIG1*-Promoters und damit zur Bildung eines fluoreszierenden Proteins (mNeonGreen). Die Bildung des α -Faktors, bei sonst gleichen Bedingungen, ist im Wesentlichen von der Diclofenac-Konzentration abhängig, die innerhalb der Detektionszeit als konstant angesehen wird. Damit wächst die α -Faktor-Konzentration näherungsweise linear mit der Zeit an. Unter diesen Voraussetzungen kann die Bildungsrate des mNeonGreen als proportional zur α -Faktor-Konzentration angenommen werden. Damit erhöht sich die Bildungsrate dieses Fluoreszenzproteins mit der Zeit. Durch die Kumulation des α -Faktors in der Zellsuspension erhöht sich auch die Produktion des mNeonGreen, wodurch - neben dem Ansteuern einer großen Zahl entsprechender Zellen - eine Signalverstärkung im Vergleich zur direkten Detektion des Diclofenac über den *PDR5*-Promoter erreicht werden kann [4]. Wie in Abb. 1 (links) angedeutet, ist es weiter auch möglich, das Signal zu erhöhen, in dem die Zelldichte,

insbesondere der Aktorhefe, durch geeignete Kultivierungsbedingungen erhöht wird.

Methoden und Materialien

Genetisch modifizierte Hefen

Die Transformation der *S. cerevisiae*-Hefestämme erfolgte analog zu der Arbeit von Schuller *et al.* [4]. Es wurde ein Stamm generiert (*S. cerevisiae* BY4742 Δ MF α 1 [MAT α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 YPL187w::kanMX4*]), welcher das Plasmid p426 PDR5-MF α 1 enthält. Dadurch produziert der Stamm in Anwesenheit von Diclofenac α -Faktor. Entsprechend wurde eine Aktorhefe (*S. cerevisiae* BY4741 Δ bar1 Δ far1 [MAT α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 YIL015w::kanMX4 YJL157c::natMX6*]) mit dem Plasmid p426 FIG1-mNeonGreen entwickelt. Dieser Stamm reagiert mit der Produktion des Fluoreszenzproteins mNeonGreen in Abhängigkeit der Anwesenheit des Pheromons α -Faktor. Somit erfolgt eine indirekte Detektion von Diclofenac. Die Auswertung erfolgt mittels Fluoreszenzspektroskopie.

Kultivierung der Hefestämme

Die Experimente wurden in Minimalmedium (1,9 g/l Hefestickstoff-Basis ohne Aminosäuren, 5 g/l Ammoniumsulfat, 20 g/l Glucose) supplementiert mit entsprechenden Aminosäuren durchgeführt. Die Supplementierung für die Aktorhefe erfolgte mit 60 mg/l L-Histidin, 80 mg/l L-Leucin und 20 mg/l L-Methionin; für die Sensorhefe mit 60 mg/l L-Histidin, 80 mg/l L-Leucin und 30 mg/l L-Lysin (Carl Roth GmbH + Co. KG).

Vorkulturen wurden in SC-Ura Medium (1,9 g/l Minimalmedium mit 1,926 g/l *Kaiser SC Ura Drop-out* (ein Medium ohne Uracil; ForMedium™) über Nacht bei 30 °C im Schüttler bei 180 rpm angelegt. 2 ml der jeweiligen Vorkultur wurde zweimal mit Minimalmedium gewaschen und zentrifugiert (3000 rcf, 7 min). Um eine gewünschte Zelldichte (Start-OD₆₀₀) einzustellen, wurden die optische Absorption bei 600 nm mit dem NanoDrop-Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) in einer Küvette (1 cm Schichtdicke) gemessen und das Pellet im entsprechenden Volumen des Minimalmediums resuspendiert.

Fluoreszenzspektroskopie

Zur Messung der Fluoreszenzintensitäten der Zellsuspensionen wurden ein Mikroplatten-Reader (Synergy™ H1, BioTek Instruments, Inc.) verwendet (30 °C, doppel-

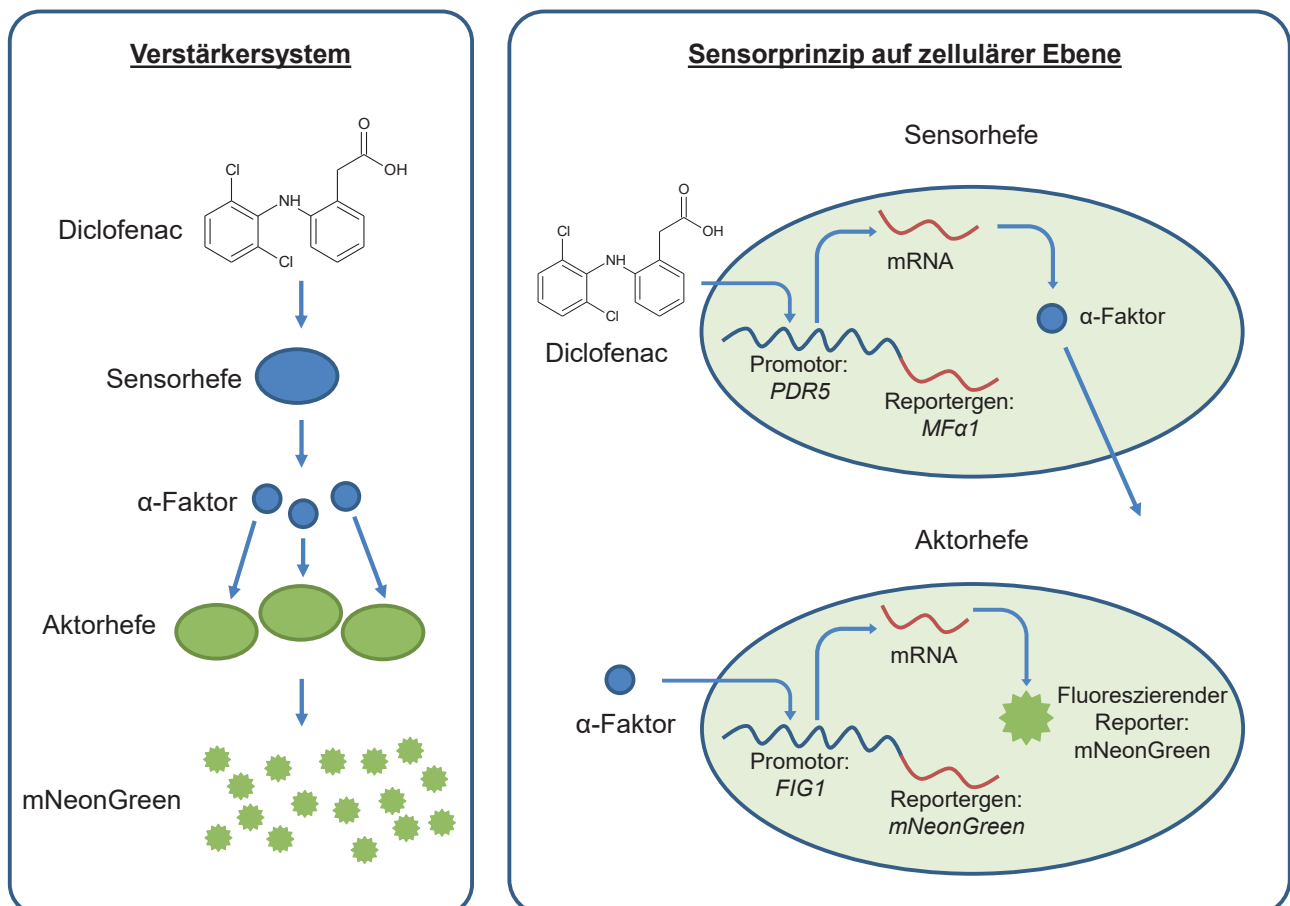


Abb. 1: Prinzip des Signalverstärkersystems und der zelluläre Wirkmechanismus von Diclofenac und α -Faktor in den genetisch modifizierten Hefestämmen.

orbitales Schütteln). Je 250 μ l der Zellsuspensionen wurden in 96-Well-Platten gegeben (F-Boden, BRAND plates® - cell Grade™ premium; BRAND GmbH & Co KG). Die Wells wurden durch eine gasdurchlässige Membran abgedeckt (Breathe-Easy, Diversified Biotech). Die Fluoreszenz wurde bei 485 nm Anregungs- und 525 nm Emissionswellenlänge durch den Boden der Wells ausgelesen. Die Auswertung der Kinetik der Fluoreszenzintensitäten erfolgte als Änderung zum Wert beim Start der Messungen im jeweiligen Well.

Diclofenac im Gemisch von Sensor- und Aktorhefe

Die Detektion von Diclofenac wurde durch seine Wirkung in einer Mischung von Sensor- und Aktorhefen untersucht. Dabei wurden die Zelldichten von Sensor- und Aktorhefe von $OD_{600} = 0,1$ bzw. $OD_{600} = 1$ gewählt. Je 3 Wells wurden mit 250 μ l dieser Hefesuspensionen befüllt wobei Suspensionen mit 1 μ M Diclofenac (als Natriumsalz; Sigma-Aldrich) und ohne Diclofenac getestet wurden.

Wirkung des α -Faktors auf die Aktorhefe

Zur Prüfung der Wirkung des α -Faktors auf die Aktorhefe, wurden je 3 Wells mit 250 μ l Hefesuspensionen ($OD_{600} = 2$) befüllt wobei Suspensionen mit 50 nM α -Faktor (Zymo Research Corporation) und ohne α -Faktor untersucht wurden.

Separate Nutzung der Sensor- und Aktorhefe

Bei diesem Experiment wurde 2 Kolben mit je 25 ml Suspension der Sensorhefe (Start- $OD_{600} = 1$) über 5 h bei 30 °C im Schüttler kultiviert. In einen Kolben wurden zu Beginn 10 μ M Diclofenac dazugegeben. Danach wurden die Suspensionen zentrifugiert (3000 rcf, 1 min) und je 125 μ l Überstand mit 125 μ l Aktorhefe (mit frischem Minimalmedium gewaschene Vorkultur, $OD_{600} = 2$) gemischt. Damit wurde die Fluoreszenz der Aktorhefe in je 3 Wells mit und ohne vorherige Einwirkung von Diclofenac auf die Sensorhefe untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

Abb. 2 zeigt die Wirkung des α -Faktors auf den Hefestamm, der das Fluoreszenzprotein bildet. Man kann zeigen, dass nach etwa einer Stunde die Fluoreszenzintensität in der Hefekultur mit 50 nM α -Faktor im Vergleich zur Kontrolle ohne α -Faktor deutlich ansteigt. Die Fluoreszenzintensität in den Wells ohne α -Faktor steigt ebenfalls an; dieser Anstieg ist aber vergleichsweise gering (nach 10 Stunden < 10000 RFU). Er resultiert sehr wahrscheinlich aus der Synthese des Fluoreszenzproteins durch eine basale Aktivität des *FIG1*-Promotors auch ohne Wirkung des α -Faktors. Bei 25 nM α -Faktor konnte in Vorversuchen nur eine schwache Erhöhung der Fluoreszenzintensität nach 6 h detektiert werden. Dies deutet darauf hin,

dass es unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine Schwellenkonzentration des α -Faktors ($c_{\alpha,s} < 25$ nM) gibt, welche für die Steigerung der mNeonGreen-Bildung notwendig ist.

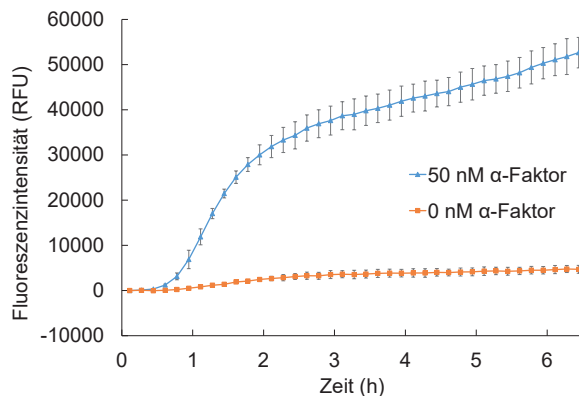


Abb. 2: Kinetik der Fluoreszenzintensität der Aktorhefe-Suspension bei: 0 nM und 50 nM α -Faktor. Start- $OD_{600} = 2$. Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 3 Wells.

Im nächsten Experiment wurde untersucht, ob bei Verwendung einer Mischung aus Sensor- und Aktorhefe die Detektion von Diclofenac möglich ist. Dazu wurde die Menge der Sensorhefe auf 10 % der Menge an Aktorhefe eingestellt, um die Konzentration des basal produzierten α -Faktors in Abwesenheit von Diclofenac gering zu halten. Jedoch erkennt man in Abb. 3, dass in diesem Fall trotzdem eine deutliche Produktion des Fluoreszenzproteins stattfindet. Diese ist zwar deutlich geringer als im Medium mit 1 μ M Diclofenac, begrenzt jedoch die angestrebte Quantifizierung von kleineren Diclofenac-Konzentrationen in Wasserproben unbekannter Zusammensetzung.

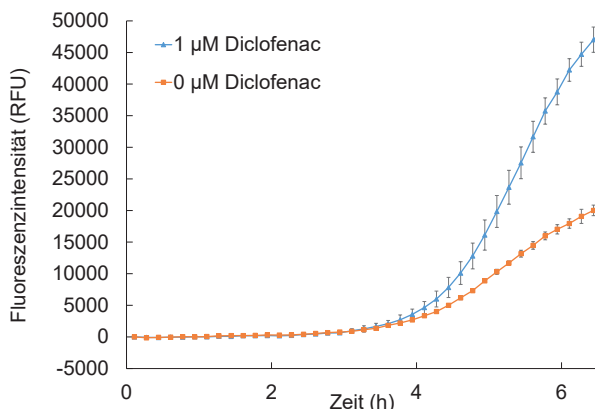


Abb. 3: Kinetik der Fluoreszenzintensität in Suspensionen aus Sensorhefe (Start- $OD_{600} = 0,1$) und Aktorhefe (Start- $OD_{600} = 1$); ohne Diclofenac oder mit 1 μ M Diclofenac. Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 3 Wells.

Da in anderen Versuchen (hier nicht gezeigt) auch durch weitere Verringerung des Anteils an Sensorhefe das gleiche Problem auftrat, wurde im Weiteren angenommen,

dass ggf. durch die unmittelbare Nachbarschaft der Aktor- und Sensorhefezellen in der Suspension lokal eine zu hohe Konzentration an basal produziertem α -Faktor auftritt und dieses eine starke Fluoreszenzprotein-Bildung hervorruft, obwohl die auf das Gesamtvolumen bezogene mittlere α -Faktor-Konzentration (\bar{c}_α) kleiner als die bereits erwähnte Schwellenkonzentration ist ($\bar{c}_\alpha < c_{\alpha,s}$) (Abb. 4).

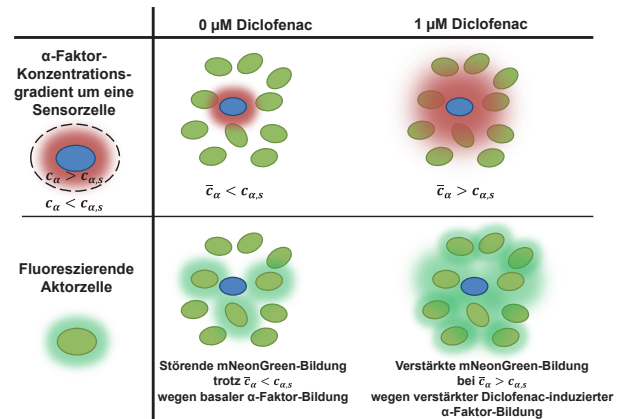


Abb. 4: Veranschaulichung der Konzentrationsverteilung des α -Faktors in einer Mischung aus Sensor- und Aktorhefe. c_α - α -Faktor-Konzentration, \bar{c}_α - mittlere α -Faktor-Konzentration, $c_{\alpha,s}$ - Schwellenkonzentration des α -Faktor.

Daher wurde diese Annahme in einem Experiment überprüft, wo die Sensorhefe in Abwesenheit der Aktorhefe zunächst mit Diclofenac versetzt wird. Nach einer bestimmten Einwirkzeit bildet sich in Abhängigkeit der Diclofenac-Konzentration der α -Faktor, welcher dann homogen im Überstand der zentrifugierten Zellsuspension vorliegt. Die Zugabe dieses Überstandes in eine Suspension mit Aktorhefe sollte dann zur Bildung des Fluoreszenzproteins in Abhängigkeit von der α -Faktor-Konzentration ohne lokal überhöhte Pheromon-Konzentrationen führen. Die Messwerte in Abb. 5 bestätigen diese Annahme.

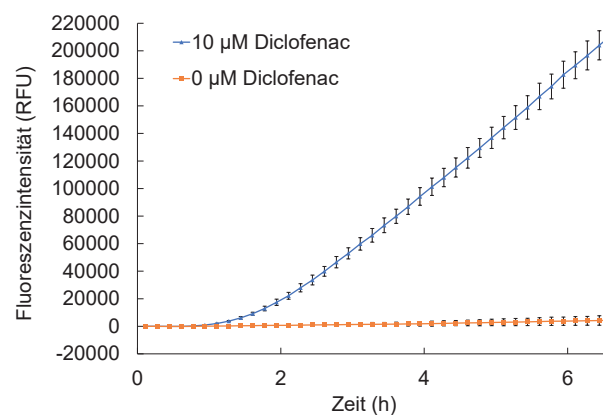


Abb. 5: Kinetik der Fluoreszenzintensität der Aktorhefe-Suspension nach Zugabe des Überstandes aus einer Sensorhefe-Suspension (5 h Einwirkzeit mit 0 μ M bzw. 10 μ M Diclofenac). Start- $OD_{600} = 1$ Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 3 Wells.

Die Konzentration des basal produzierten α -Faktors nach 5 h ist bei anschließender homogener Verteilung in eine Suspension der Aktorhefe nicht ausreichend, um eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzintensität innerhalb der Detektionszeit zu bewirken. Die entstandene Konzentration an α -Faktor beim Einwirken von 10 μ M auf die Sensorhefe zeigt hingegen bereits nach 1,5 Stunden einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität. Mit diesem Vorgehen kann eine falschpositive Detektion von Diclofenac vermieden werden.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird die erfolgreiche Detektion von Diclofenac mittels genetisch modifizierter Hefen durch Implementierung eines α -Faktor-gekoppelten Signalverstärkersystems gezeigt. Das Problem der basalen Produktion des α -Faktors wird durch die separate Nutzung von Sensor- und Aktorhefen gelöst. Mit der Einwirkzeit des Diclofenacs auf die Sensorhefe von etwa 5 Stunden, kann die Detektion nach spätestens 10 h ab Zugabe der Diclofenac-haltigen Probe abgeschlossen werden.

Literatur

- [1] Umweltbundesamt: *Empfehlungen zur Reduzierung von Mikroverunreinigungen in den Gewässern*, 2018, https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/1410/publikationen/uba_pos_mikroverunreinigung_final_bf.pdf
- [2] *Richtlinie 2013/39/EU des Europäischen Parlaments und des Rates zur Änderung der Richtlinien 2000/60/EG und 2008/105/EG in Bezug auf prioritäre Stoffe im Bereich der Wasserpolitik*, 2013
- [3] VIENO, N.; SILLANPÄÄ, M.: Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant - A review. In: *Environ Int* 69 (2014), S. 28–39
- [4] SCHULLER, A.; RÖDEL, G.; OSTERMANN, K.: Tuning the Sensitivity of the PDR5 Promoter-Based Detection of Diclofenac in Yeast Biosensors. In: *Sensors* 17 (2017), S. 1506–1522
- [5] SCHIRMER, C.; POSSECKARDT, J.; KICK, A.; REBATSCHKE, K.; FICHTNER, W.; OSTERMANN, K.; SCHULLER, A.; RÖDEL, G.; MERTIG, M.: Encapsulating genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* cells in a flow-through device towards the detection of diclofenac in wastewater. In: *J Biotechnol* 284 (2018), S. 75–83
- [6] SCHIRMER, C.; J. POSSECKARDT, J.; SCHRÖDER, M.; GLÄSER, M.; HOWITZ, S.; SCHARFF, W.; MERTIG, M.: Portable and low-cost biosensor towards on-site detection of diclofenac in wastewater. In: *Talanta* 203 (2019) 242–247
- [7] GROß, A.; RÖDEL, G.; OSTERMANN, K.: Application of the yeast pheromone system for controlled cell–cell communication and signal amplification. In: *Lett Appl Microbiol* 52 (2011), S. 521–526

Danksagung

Die vorgestellten Arbeiten sind Teil eines vom Europäischen Fond für Regionale Entwicklung (EFRE) geförderten Projektes (FKZ 100388387). Die Autoren bedanken sich

bei der SAB für die finanzielle Unterstützung. Das Kurt-Schwabe-Institut für Mess- und Sensortechnik Meinsberg e.V. wird mitfinanziert durch Steuermittel auf der Grundlage des vom Sächsischen Landtag beschlossenen Haushaltes.