

Funktionserhaltende Immobilisierung RFP-exprimierender Sensorhefen in transparente Spot-Arrays aus Silikat-Biopolymer Kompositgelen

U. Soltmann¹, G. Rode¹, H. Haufe¹, L. Schuster², H. Börnick², E. Worch²

¹*Gesellschaft zur Förderung von Medizin-,Bio- und Umwelttechnologien e.V., Bautzner Landstraße 45, 01454 Radeberg/Deutschland*

²*Institut für Wasserchemie, Technische Universität Dresden, 01062 Dresden/Deutschland
E-Mail: soltmann@gmbu.de*

Zusammenfassung

Vorgestellt werden Ergebnisse zur Nutzung von SiO₂-Alginat-Gelen zur funktionserhaltenden Immobilisierung von Sensorhefen in Array- oder Schichtstrukturen, über die eine einfache Integration von Sensorzellen in die technische Sensorumgebung gewährleistet werden soll. Zielstellung war die Realisierung einer gezielten, ortsfesten Ablage von Sensorzellen bei Gewährleistung einer hohen Transparenz der Gelmatrix, Erhalt einer hohen Vitalität und Erhalt des Ansprechverhaltens der Zellen auf die spezifischen Zielschadstoffe oder Hefepheromone. Zusammengefasst konnten mit dem vorgestellten Immobilisierungssystem sehr hohe Überlebensraten der Sensorzellen bei der Herstellung erreicht werden, wobei die immobilisierten Zellen ihre Teilungsfähigkeit behielten. Weiterhin behielten die eingebetteten Zellen ihr Ansprechverhalten auf Hefepheromone bzw. 2,4-Dichlorphenol als ausgewählter Modellschadstoff. Die Induktion der Bildung von RFP (Red Fluorescent Protein) in den immobilisierten Zellen bei Zuführung von Hefepheromon oder des Zielschadstoffs werden dargestellt. Bei nur leichter Verzögerung im Ansprechverhalten, im Vergleich zu nicht immobilisierten Zellen, konnte die Ausbildung eines deutlichen Fluoreszenzsignals nachgewiesen werden.

Keywords: Ganzzellensensoren, Hefezellen, Immobilisierung, Hefepheromon, 2,4-Dichlorphenol

Einleitung

Durch den Einsatz von genetisch modifizierten Mikroorganismen können angepasste Ganzzellensensoren für eine spezifische Detektion von Wasserinhaltsstoffen erzeugt werden. Eine Nutzung gentechnisch veränderter Zellen setzt aber die Berücksichtigung der gesetzlichen Anforderungen gemäß des Sicherheitsstandards S1 voraus. Im Rahmen des Regionalen Wachstumskern „BioSAM“ wird dieses Problem adressiert und an Konzepten zur Realisierung von mobilen Ganzzellensensoren gearbeitet, die den gesetzlichen Anforderungen und den Anforderungen hinsichtlich Sensitivität, Robustheit und Langzeitstabilität genügen. Über eine Immobilisierung der Sensorzellen können Vorteile bei der Integration der Zellen in den technischen Sensoraufbau (z. B.

Lokalisierung hoher und definierter Zelldichten über der elektronischen Sensoreinheit, kontrollierte Anströmung mit Messwässern bzw. Nährlösungen) und hinsichtlich eines weitestgehenden Zellrückhalts erzielt werden. Entscheidend bei der Immobilisierung von Sensorzellen ist es, zum einen den Anforderungen der Sensorzellen hinsichtlich des Erhalts der physiologischen und sensorischen Aktivität zu genügen und zum anderen den Anforderungen hinsichtlich der technischen Integration in den Sensor gerecht zu werden.

Immobilisierungssystem

Über die Nutzung eines Nanoplotters konnte eine gezielte Ablage definierter Volumen/Zellzahlen in Form von Spot-Arrays bzw. Schichten realisiert werden. Zur Immobilisierung wurden SiO₂-Alginat-

Kompositgele genutzt. Über die Verwendung von Amino-funktionalisierten SiO_2 -Solen wurde die Ausbildung sehr stabiler Gelstrukturen erreicht. Im Vergleich zu klassischen Ca-Alginat-Gelen zeigten die SiO_2 -Alginat-Kompositgele eine verbesserte Stabilität in salzhaltigen Medien, Puffern und Nährmedien. Die Einwirkdauer des amino-funktionalisierten Sols muss den jeweiligen Bedingungen (Spots, Schicht, Schichtdicke) angepasst werden. Sie liegt bei Spots im Bereich von wenigen Sekunden bis zu mehreren Minuten bei dickeren Schichten. Bei zu kurzer Einwirkdauer wird eine zu geringe Vernetzung des Alginats erreicht, bei zu langer Einwirkdauer kommt es zu Trübungen und zur Ausbildung einer unebenen Oberfläche. Durch eine zusätzliche Gelierung mit Ca-Ionen wurden homogenere Gelstrukturen erreicht.

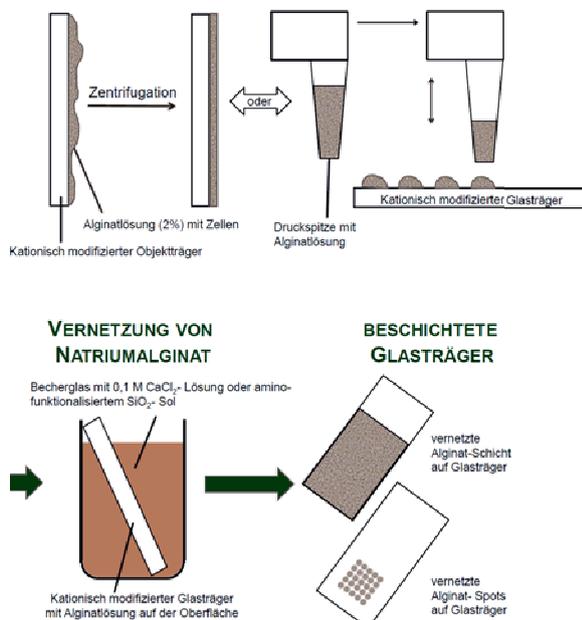


Abb.1: Herstellung von SiO_2 -Alginat-Spots oder Schichten. Oben: Auftrag (Plotten, dip-coating) von Alginatlösungen mit Hefezellen. Unten: Infiltration mit amino-funktionalisierten Solen und ggf. Ca-Ionen zur Gelierung

Messungen zur Transparenz der erzeugten SiO_2 -Alginat-Kompositgele zeigten eine Abhängigkeit vom pH-Wert bei der Gelierung. Durch Gelierung bei zellfreundlichen pH-Werten (pH 6,5 und pH 7,5) konnte eine Transmission bei Alginat/ SiO_2 Schichten von ca. 100% erreicht werden (Schichtdicke ca. $25\mu\text{m}$). Auch nach mehreren Wochen Lagerung dieser Schichten in Kultivierungsmedium blieb die hohe Transparenz der Schichten erhalten. Im

Gegensatz dazu trat bei niedrigeren oder höheren pH-Werten eine leichte Trübung bereits bei der Herstellung der Schichten auf.

Vitalität immobilisierter Zellen

Untersuchungen zur Vitalität eingebetteter Hefezellen wurden in Vergleich mit nicht immobilisierten Zellen durchgeführt. Bei der Immobilisierung von Hefezellen aus der stationären Phase (40h Kultivierungsdauer) betrug die Überlebensrate ca. 75%. Bei Verwendung von Zellen aus der exponentiellen Phase (16h) sowie aus dem Beginn der stationären Phase (21h) wurden Überlebensraten von 95-99% erreicht. Veränderungen in der Zellform und Zellteilungen waren in den SiO_2 -Alginat-Gelen durch die immobilisierten Zellen möglich. Im Vergleich zu Ca-Alginat-Gelen, die einen Aufwuchs dreidimensionaler Kolonien innerhalb der Gele erlaubten, zeigten die Hefezellen in SiO_2 -Alginat-Gelen ein flächiges Wachstum, häufig in Monolagen (Abb. 2). Die durch die Infiltration mit dem amino-funktionalisierten SiO_2 -Nanosol entstehenden SiO_2 -Alginat-Hybridgele scheinen durch ihre höhere Gelfestigkeit einem Aufwuchs der Hefezellen in die Höhe entgegenzuwirken. In Abhängigkeit von der Einwirkdauer und der Wegstrecke des SiO_2 -Nanosols werden die Gele mit zunehmender Entfernung von der Oberfläche weicher und erlauben dann Zellteilungen. Hinsichtlich der Ausbildung einer gleichmäßigen Fluoreszenz, auch bei zunehmendem Zellaufwuchs, ist der flächige Aufwuchs in den Alginat- SiO_2 -Spots günstig.

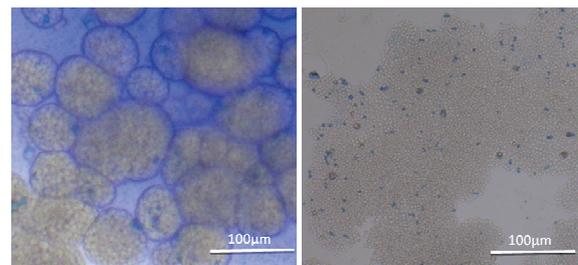


Abb.2: Wachstum eingebetteter Hefezellen (BY4741) nach 24h Inkubation in YNB-Medium. Links: Ca-Alginat Schicht. Rechts: SiO_2 -Alginat-Gel Beschichtung.

Ansprechverhalten auf Hefepheromone

Ein interessanter Aspekt bei der Nutzung von Hefen für Sensorzwecke besteht darin, dass die Pheromon basierte Zellkommunikation zur Verstärkung von Sensorsignalen genutzt werden kann. Zur Bewertung des Ansprechverhaltens (Induktion Fluoreszenz und Gestaltänderung) eingebetteter Zellen auf

Hefepheromone im Medium wurden Versuche mit BY4741- P_{FIG1} -TRFP durchgeführt. Der verwendete Stamm P_{FIG1} -BY4741 reagiert auf das Pheromon α -Faktor. Bei Anwesenheit von α -Faktor wird auf genetischer Ebene die Expression von RFP (Red Fluorescent Protein) veranlasst.

Für die Versuche wurden dem Nährmedium $10\mu\text{M}$ α -Faktor zugegeben. Die eingebetteten Zellen sprachen auf das von außen mit dem Nährmedium zugegebene Hefe-Pheromon an (Abb. 3). Im Fluoreszenzmikroskop setzte bei den eingebetteten Zellen nach ca. 2h die Bildung von RFP ein. Nach ca. 4h zeigte sich ein beginnender Shmoo-Effekt. Nicht immobilisierte Zellen zeigen i.d.R. 1-2 Stunden nach Aktivierung des Pheromonrezeptors morphologische Änderungen.

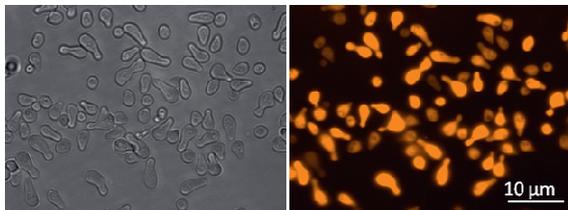


Abb.3: *Gestaltänderung und Fluoreszenz immobilisierter Hefezellen (BY4741- P_{FIG1} -TRFP in SiO_2 -Alginate-Gel) nach 7 h Inkubation bei 30°C in YNB-Medium mit $10\mu\text{M}$ α -Faktor.*

Ansprechverhalten auf 2,4-Dichlorphenol

Zur weiteren Testung des Ansprechverhaltens immobilisierter Sensorhefen wurden Versuche mit modifizierten Hefen durchgeführt, die bei Anwesenheit von 2,4-Dichlorphenol (2,4-DCP) mit der Expression von RFP reagieren. Für vergleichende Bewertungen zum Ansprechverhalten und zur Fluoreszenzintensität wurden Versuche unter Nutzung eines Fluoreszenzplattenreaders durchgeführt. Zur Nutzung des Plattenreaders wurden die Zellen auf den Boden der Wells einer 96-Well-Platte immobilisiert. Für eine ausreichende Haftung der Hybridgelspots an der transparenten Kunststoffoberfläche der Platten war eine Vorbeschichtung notwendig. Über eine Aktivierung der Oberfläche im Plasma und einer nachfolgenden Beschichtung mit einem polykationischen Polymer konnte eine ausreichende Anhaftung erreicht werden. Zur Erzeugung einer für den Plattenreader ausreichenden Fläche wurden Spots in Arrays von 8×8 dicht aneinander gesetzt, so dass sich eine zusammenhängende Fläche ergab.

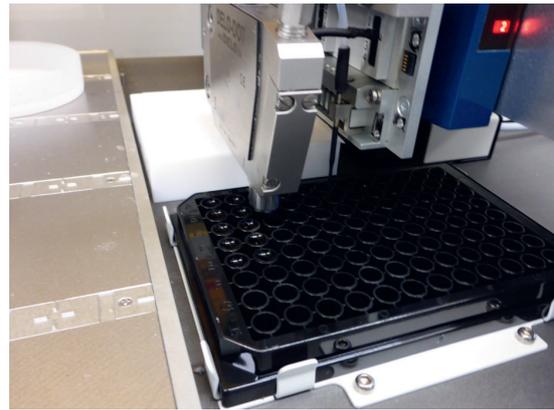


Abb.4: *Plotten von Alginate mit Sensorzellen auf die Wellböden einer 96-Well-Platte. Primäre Gelierung durch amino-funktionalisiertes Sol; sekundäre Gelierung durch Calciumchlorid*

Der Verlauf des Fluoreszenzsignals bei unterschiedlichen immobilisierten und nicht-immobilisierten Hefen ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Alginate- SiO_2 -Hybridgele zeigten sich für die Immobilisierung der Sensorzellen hinsichtlich des Ansprechverhaltens und der Fluoreszenzstärke als geeignet. Die Sensorzellen behielten ihr Ansprechverhalten gegenüber 2,4-DCP auch nach der Immobilisierung. In Anwesenheit von 2,4-DCP zeigten die Sensorzellen eine um ca. 100 % gesteigerte Fluoreszenz gegenüber den Sensorzellen, die nicht 2,4-DCP ausgesetzt waren. Hefen, die nur mit einem leeren Plasmid ausgestattet waren zeigten kein Fluoreszenzsignal. Von den nicht-immobilisierten Sensorzellen unterschieden sich die immobilisierten Hefen in einem leicht verzögerten Ansprechverhalten.

Die Entwicklung der Schadstoffkonzentration in den Ansätzen wurde analytisch begleitet (Abb.6). Hierbei zeigte sich in allen Ansätzen mit 2,4-DCP innerhalb weniger Stunden eine starke Abnahme der Konzentration sowohl in Ansätzen mit immobilisierten oder suspendierten Zellen als auch in zellfreien Ansätzen. Ursächlich könnte eine Sorption von 2,4-DCP an die Kunststoffwandungen der Wellplatten sein. Trotz der sich stark verringerten Konzentration ($< 0,2\mu\text{M}$ bei der Ausbildung erster 2,4-DCP bedingter Fluoreszenzsignale) kam es zum Ansprechen der Sensorzellen.

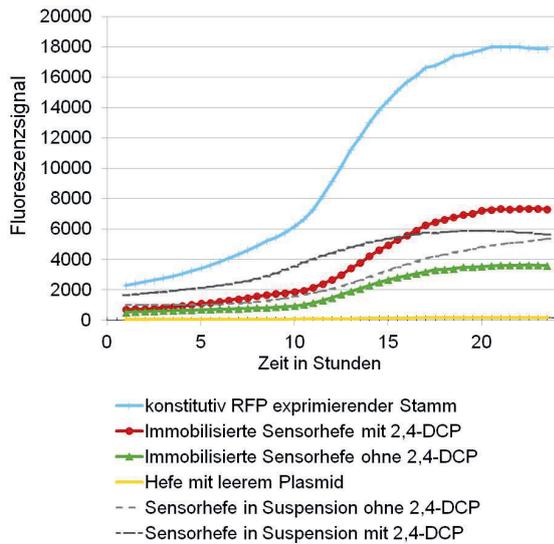


Abb. 5: Entwicklung des Fluoreszenzsignals nach Zugabe von 2,4-DCP zum Medium

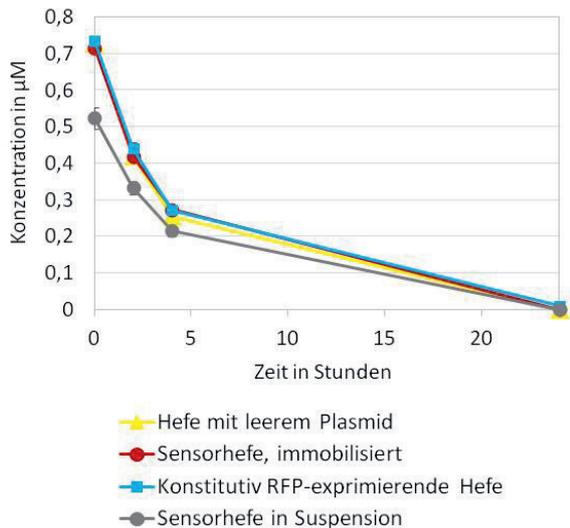


Abb. 6: Verlauf der 2,4-Dichlorphenol-Konzentration in den Testansätzen

Zusammenfassend belegen die erzielten Ergebnisse, dass wesentliche Anforderungen an die Immobilisierungsmatrix, wie

- Erhalt des Ansprechverhaltens der immobilisierten Sensorzellen auf Hefepheromone oder die Zielschadstoffe,
- Möglichkeit von Veränderungen in der Zellmorphologie und zu Zellteilungen,
- Gewährleistung einer hohen Transparenz und Gelstabilität sowie
- Erhalt einer hohen Vitalität bei den immobilisierten Zellen durch die vorgestellten SiO_2 -Alginate-Gele

für eine erfolgreiche Integration in die technische Sensorumgebung erfüllt werden können.

Danksagung

Dem Institut für Genetik der TU-Dresden möchten wir für die Bereitstellung der Hefestämme und für die Ermöglichung der Versuchsdurchführung danken. Die Durchführung der Arbeiten erfolgte im Rahmen des Wachstumskerns BioSAM und wurde durch die Förderung des BMBF im Programm „Innovative regionale Wachstumskerne“ ermöglicht.