

# Abschlussbericht

## **Entwicklung einer neuartigen Kokultur-Plattform zur Untersuchung der Kommunikation zwischen bakteriellen Biofilmen und dem Wirtsorganismus über Quorum Sensing Signalmoleküle (MBFSt-Kennziffer: 3671)**

Dr. Mareike Müller, Cμ - Center for Micro- and Nanochemistry and Engineering, Physikalische Chemie I (Prof. Dr. Holger Schönherr), Nachwuchsgruppe: Biofunktionale Materialien für zelluläre und angewandte Mikrobiologie, Universität Siegen.



### 1. Motivation und Zielsetzung

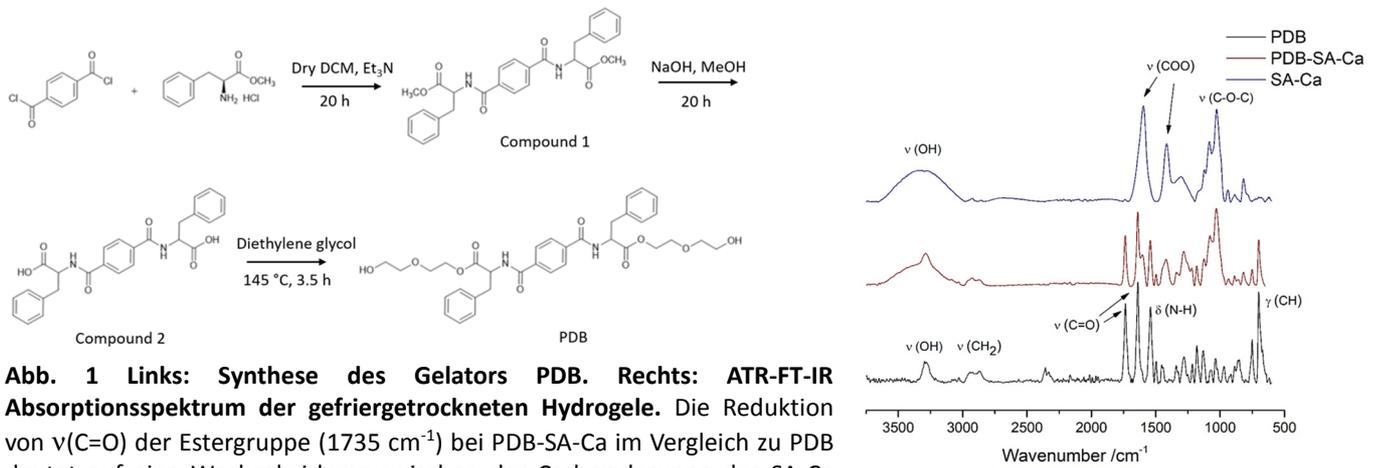
Bakterielle Infektionen, insbesondere solche, die mit einer Biofilmbildung und damit mit einer höheren Widerstandsfähigkeit gegenüber Antibiotika einhergehen, stellen eine große Bedrohung für die menschliche Gesundheit dar [1]. Die Kommunikation von Bakterien mit den Immunzellen des Wirtsorganismus, auch *Interkingdom-Crosstalk* (IKC) genannt, über kleine Signalmoleküle scheint eine wesentliche Rolle bei der Immunantwort zu spielen [2,3]. Sie ist allerdings aufgrund des Fehlens geeigneter Kokultur-Modelle noch unzureichend erforscht, um Behandlungsstrategien von Infektionserkrankungen auf der Modulation dieser chemischen Zellkommunikation zu entwickeln. Das langfristige Ziel des geförderten Projekts ist es, eine Kokultur-Plattform zu entwickeln, die eine bakterielle Biofilm-Kulturplattform mit einer Hydrogel-basierten 3D-Kultur von humanen Immunzellen kombiniert, welche einerseits den direkten Kontakt von Bakterien und eukaryotischen Zellen verhindern soll und zum anderen den Austausch der niedermolekularen Signalmolekül über eine minimale Distanz gewährleisten soll. Ein solches Kokultur-Modell ist die Voraussetzung für systematische Untersuchungen des Biofilm-Wirtszell-IKC sowohl in Hinblick auf Änderungen in der Genexpression, als auch im Sekretionsspektrum von bakteriellen Biofilmen und humanen Immunzellen.

*Zentrales Ziel war es daher zunächst, geeignete Kulturplattformen für Pseudomonaden-Biofilme und humanen THP-1-Makrophagen mit polymerbasierten bioaktiven Oberflächen bzw. Hydrogelmatrices separat herzustellen und auf ihre biologische Kompatibilität zu testen, bevor sie dann zu einer Kokultur-Plattform kombiniert werden können.*

### 2. Durchführung und Ergebnisse

#### **a) Hydrogel basierte Kulturplattform für THP-1 Makrophagen**

Als Modell-Wirts-Immunzellen dienten humane THP-1-Monozyten, die wie zuvor beschrieben mittels PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) erfolgreich hin zu einem Makrophagen-Phänotyp differenziert wurden [4]. Aufbauend auf dem bereits für die Einkapselung von Bakterien getesteten synthetischem Hydrogel des niedermolekularen Gelbildner PDB (1,4-bis(Phenylalanin-Diglykol)-Benzol) [5] wurden PDB-Hydrogele zusätzlich über  $\text{Ca}^{2+}$ -vernetztes Natrium-Alginat (SA) mechanisch stabilisiert, wodurch man ein PDB-SA-Ca Hybridhydrogel erhielt (s. Abb. 1). Alle PDB-basierten Hydrogele wurden chemisch mittels ATR-FT-IR (*attenuated total reflection Fourier transform* Infrarot)-Spektroskopie und rasterelektronenmikroskopisch sowie hinsichtlich ihres Quellverhaltens und ihrer Viskoelastizität mittels oszillatorischer Rheologie charakterisiert. Die Hydrogele wiesen eine faserige Struktur auf und bildeten ein 3D-Netzwerk (Faser-Durchmesser: 0,4 - 1,3  $\mu\text{m}$ ). Darüber hinaus wurde der Alginatanteil des Hybridhydrogels mittels *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) und *N*-hydroxysuccinimide (NHS) Chemie mit dem Fibronectin-abgeleiteten Tripeptid RGD (Arginin, Glycin und Asparaginsäure) chemisch modifiziert oder mit Fibronectin selbst beschichtet, um die Zelladhäsion zu verbessern. PDB wurde dabei für die Herstellung des Hydrogels entweder in DMSO oder in 90°C warmen Wasser gelöst. Daraufhin wurden verschiedene Kultivierungsprotokolle mit THP-1-Makrophagen in Kombination mit den synthetisierten PDB-SA-Ca Hydrogelen getestet. Als effizienteste und schonendste Methode zum Ablösen der stark adhärenen Makrophagen, bevor sie in die Hydrogel-Kultur eingebracht wurden, wurde die Ablösung mit Trypsin identifiziert (60 min bei 37°C). Es stellte sich heraus, dass diese Methode auch einer Accutase Behandlung oder der Verwendung eines mechanischen Zellschabers überlegen war.



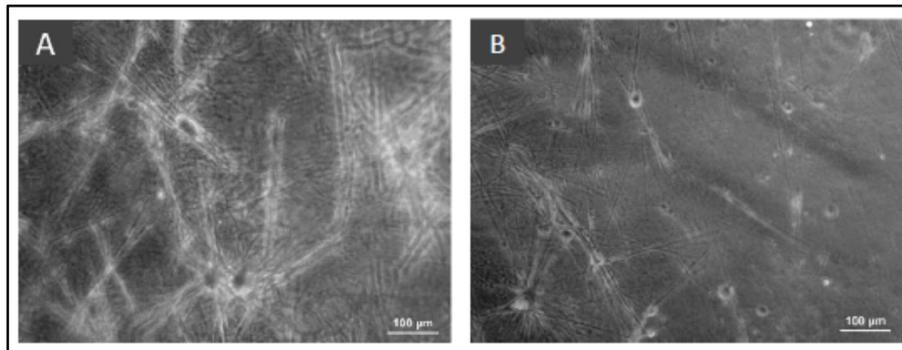
**Abb. 1 Links: Synthese des Gelators PDB. Rechts: ATR-FT-IR Absorptionsspektrum der gefriergetrockneten Hydrogele.** Die Reduktion von  $\nu(\text{C}=\text{O})$  der Estergruppe ( $1735\text{ cm}^{-1}$ ) bei PDB-SA-Ca im Vergleich zu PDB deutet auf eine Wechselwirkung zwischen der Carbonylgruppe des SA-Ca und der  $-\text{N}-\text{H}$  Gruppe des PDB hin.

Da eine homogene Nährstoffversorgung von allen Seiten für ein 3D-Zellkulturmodell essentiell ist, wurden die Hydrogel basierten Zellkulturen auf einem Transwellinsert inkubiert. Zum Vergleich wurde zudem das Wachstumsverhalten von NIH 3T3-Fibroblasten und der humanen Pankreas-Tumorzelllinie PatuT auf den synthetisierten PDB-Hydrogelen zwecks Identifikation Zelltyp-spezifischer Effekte geprüft.

Natürliche Fibringele wurden als Goldstandard-Hydrogelreferenz verwendet, welche gute Zelladhäsions sowie Wachstumseigenschaften aller getesteten Zellen auch im Inneren des Gels aufwiesen. Der Nachteil von Fibringelen liegt allerdings in ihrer

begrenzten Reproduzierbarkeit aufgrund möglicher Aktivitätsschwankungen der Ausgangskomponenten Fibrinogen und Thrombin und der im Vergleich zu synthetischen Gelen hohen Kosten.

Unter den getesteten synthetischen Hydrogelen wiesen die THP-1-Makrophagen auf dem mit RGD modifizierten PDB-SA-Ca-Hydrogel die für Makrophagen typischste Morphologie



**Abb. 1 THP-1 Makrophagen haften an PDB-SA-Ca, das mit RGD modifiziert wurde an.** Lichtmikroskopische Bilder von A) NIH 3T3 Fibroblasten, B) THP-1 Makrophagen. Maßstab: 100μm

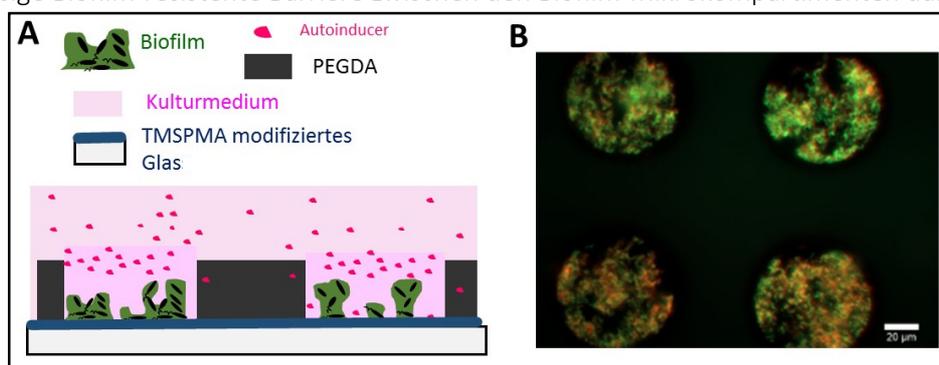
(siehe Abb. 2) sowie eine hohe Vitalität auf. Ein Wachstum im Inneren der PDB-basierten Hydrogele konnte ebenso wie für die Referenzzelllinien NIH3T3 und PatuT nicht erzielt werden. Der Versuch, eine Migration der THP-1 Makrophagen mit Hilfe des Chemokins MCP-1 (*monocyte chemotactic protein 1*) ins Innere des Hydrogels zu erzielen, blieb ohne Erfolg.

Auch wenn die mechanischen Eigenschaften des PDB-Alginat-Hydrogels in Hinblick auf die Diffusion der Nährstoffe und Signalmoleküle optimal ist sowie eine schonende Freisetzung der Zellen für weitere Untersuchungen ermöglichen würde, lässt sich aufgrund dieser Ergebnisse vermuten, dass THP-1-Makrophagen festere Hydrogelmatrices bevorzugen. Das hier untersuchte Hydrogel ist demnach zu weich für eine optimale Zell-Adhäsion und Migration. Weiterführende chemische Modifikationen des PDB Hydrogels sind in einem nächsten Schritt geplant, um die mechanische Festigkeit des Hydrogels zu erhöhen.

#### **b) Kulturplattform für *Pseudomonas fluorescens* Biofilme**

Als Modellorganismus wurde in diesem Projekt zunächst der nicht-pathogene Biofilmbildner *Pseudomonas (P.) fluorescens* verwendet. *P. fluorescens* Biofilme konnten erfolgreich auf einem speziell entwickelten Biofilmsubstrat in definierten Hydrogelwells angezogen werden (s. Abb. 3). Der Zweck dieser Hydrogel-Wells ist es zum einen, die Biofilm-bewachsenen Flächen zu definieren und zu kontrollieren und somit zu standardisieren. Zum anderen kann durch entsprechende Biofilmspots in der anvisierten Kokultur ein Signalmolekülgradient erzeugt werden, wodurch man zum Beispiel eine gerichtete Migration oder eine Protein-Expressionsänderung in Abhängigkeit von der Nähe zu einem Biofilm-Spot untersuchen könnte.

PEGDA (Polyethylenglycol-Diacrylat) wurde zur Herstellung dieser Mikro-Wellen verwendet, welches als bioinert nicht adhäsiver Platzhalter zwischen den Wells fungierte. Ein Glasplättchen wurde mit 3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylat (TMSPMA) silanisiert, das einerseits die Anhaftung von PEGDA erhöhte, sich zum anderen aber auch als optimales Substrat für die Anhaftung der Bakterien und das Biofilmwachstum in den Wells herausstellte. Mit Hilfe eines Polydimethylsiloxan (PDMS)-Stempels wurde PEGDA über Kapillarkräfte in die Zwischenräume gefüllt, wobei Mikrowells mit 50 µm Durchmesser ausgespart blieben und das PEGDA-Hydrogel im Anschluss mittels UV-Vernetzung auspolymerisierte. Die resultierenden Mikrowells waren nach UV-Vernetzung aufgrund eines Schrumpfungseffekts allerdings etwas größer als im ursprünglichen PDMS-Stempel ( $92,0 \pm 3,9 \mu\text{m}$  in Luft und  $46,5 \pm 1,1 \mu\text{m}$  in wässriger Lösung). Das Biofilmwachstum nach 1, 2 und 3 Tagen wurde durch Anfärben der Biofilme mit dem Lektin WGA-TRITC (*wheat germ agglutinin, tetramethylrhodamine conjugate*) und Syto9 (DNA-Interkalator) fluoreszenzmikroskopisch untersucht, um jeweils die Aminosäuren der Extrapolymere Substanz (EPS) [6] sowie die Bakterien darzustellen, aus denen sich ein Biofilm zusammensetzt. Nach 2 Tagen war in den Mikro-Wellen bereits ein vielschichtiger EPS-reicher Biofilm unter dem Fluoreszenzmikroskop deutlich erkennbar (siehe Abb. 3B). Nach 3 Tagen waren die kompletten Mikrowells bereits mit der Biofilmmatrix gefüllt. Es ist weiterhin erkennbar, dass das PEGDA-Hydrogel eine zuverlässige Biofilm-resistente Barriere zwischen den Biofilm-Mikrokompartimenten darstellt.



**Abb. 2** *P. fluorescens* Biofilme konnten auf einer PEGDA-Hydrogel-Mikrowell-Plattform kultiviert werden. **A:** Schematische Darstellung der Biofilmkultur-Plattform. Biofilme setzen sich aus Bakterien (schwarz) und EPS (grün) zusammen **B:** Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme von 2 Tage alten *P. fluorescens* Biofilmen, die auf

TMSPMA-modifiziertem Glas in PEGDA-Hydrogel-Mikrowells kultiviert wurden. Doppelfluoreszenzfärbung mit WGA-TRITC (rot: Aminosäuren der EPS) und dem DNA-Interkalator Syto9 (grün: Anfärben der Bakterien). Maßstab: 20 µm-

### 3. Fazit

Im Rahmen des Projekts konnte mit RGD gekoppelten PDB-SA-Ca erfolgreich ein zytokompatibles Hybridhydrogel hergestellt werden, auf dem THP-1-Makrophagen mit hoher Vitalität und typischer Morphologie adhären können. Zudem konnten *P. fluorescens* Biofilme in definierten Mikro-Kompartimenten in Form von PEGDA-Hydrogel-Mikrowells kultiviert und fluoreszenzmikroskopisch durch Anfärben der EPS als Biofilme charakterisiert werden. Aufgrund der technischen Herausforderung der Einzel-Kulturmodelle, insbesondere der Etablierung des 3D-THP-1 Makrophagen-Kulturmodells, welches noch weiterer technischer Optimierung bedarf, war es im Rahmen der Projektlaufzeit noch nicht möglich, weitergehende Genexpressions- und Sekretions-Screenings mit der kompletten Kokultur-Plattform durchzuführen, die beide Kulturmodelle kombiniert. Die nun zur Verfügung stehenden Einzel-Kulturplattformen sowie die im Projekt gewonnenen Erkenntnisse über die Limitationen der Kultursysteme, bilden jedoch eine solide Basis für die nächsten experimentellen Schritte zur finalen Realisierung einer Makrophagen-Biofilm-ICC-Kokultur-Plattform.

### 4. Literatur

- [1] Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C (2014) Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 78(3):510–543. doi: 10.1128/MMBR.00013-14
- [2] Freestone P (2013) Communication between Bacteria and Their Hosts. *Scientifica* 2013:361073. doi: 10.1155/2013/361073
- [3] Holm A, Vikstrom E (2014) Quorum sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets, and functions. *Frontiers in plant science* 5:309. doi: 10.3389/fpls.2014.00309
- [4] Shigeru Tsuchiya, Yasuko Kobayashi, Yoichi Goto, Hidesada Okumura, Shingi Nakae, Tasuke Konno and Kelya Tada (1982) Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a Phorbol Diester. *Cancer Research* (42):1530–1536
- [5] Li P, Dou X-Q, Feng C, Müller M, Chang MW, Frettlöh M, Schönherr H (2017) Isolated Reporter Bacteria in Supramolecular Hydrogel Microwell Arrays. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. doi: 10.1021/acs.langmuir.7b00749
- [6] Wright CS (1984) Structural comparison of the two distinct sugar binding sites in wheat germ agglutinin isolectin II. *Journal of molecular biology*, 178(1), 91-104.