

Schlussbericht

zum Vorhaben: Probenvorbereitung für Einzelzell-Diagnostik durch Photodynamische Lyse (PhotoDynaLysis)

Zuwendungsempfänger: Stiftung für Lasertechnologien in der Medizin und Meßtechnik an der Universität Ulm

Förderkennzeichen: 13N15459

Laufzeit des Vorhabens: 01.06.2021 – 31.03.2024

Der vorliegende Bericht ist zur Veröffentlichung bestimmt. Ggf. vertrauliche Ergebnisse/Informationen werden im Erfolgskontrollbericht dargestellt.

Zusammenfassung

Das Projekt „PhotoDynaLysis“ wurde im Rahmen der Bekanntmachung Wissenschaftliche Vorprojekte (WiVoPro) beantragt und gefördert. Es wurde als Einzelprojekt durch das ILM mit dem Hahn-Schickard Institut für Mikroanalysesysteme (Freiburg) als Unterauftragnehmer durchgeführt. Das Projekt zielte darauf ab, ein photodynamisches (d. h. durch Licht schaltbares) Verfahren für den effizienten Zellaufschluss von Mikroorganismen im Rahmen eines Arbeitsablaufs einer digitalen Rekombinase Polymerase Amplifikationsreaktion (RPA) zu etablieren. Dieses Verfahren ist insbesondere für die Nukleinsäurediagnostik am Point-of-Care bedeutsam. Im Rahmen des Vorhabens wurden zunächst fluoreszenzbasierte (Exo) RPA Assays für repräsentative Modellorganismen für Gram-positive und -negative Bakterien sowie Pilze etabliert. Nach Identifizierung effizienter Protokolle für die photodynamische Inaktivierung der Testorganismen wurden diese hinsichtlich ihrer Kompatibilität mit dem Exo RPA Assay geprüft und angepasst. Im nächsten Schritt erfolgte die Anpassung des Exo RPA Assays von der Echtzeitmessung zur digitalen Messung, wobei mikrofluidische Kartuschen und das erforderliche know-how durch den Unterauftragnehmer bereitgestellt wurden. Um die Effizienz der photodynamischen Lyse zu verbessern und damit die Projektziele zu erreichen, wurde das Projekt zunächst kostenneutral verlängert und anschließend aufgestockt, wobei die digitale Exo RPA auf die kommerziell verfügbare Stilla Naica Plattform transferiert wurde. Nach erforderlichen Anpassungsarbeiten konnte der photodynamisch vermittelte Bakterienaufschluss in einem digitalen Exo RPA Arbeitsablauf auf dieser Plattform erfolgreich durchgeführt werden. Ein Konzeptnachweis mittels einer Biplex- Exo RPA an humanpathogenen methicillinresistenten *Staphylococcus aureus* wurde in Zusammenarbeit mit Unterauftragnehmer Hahn-Schickard versucht, jedoch konnte hier bisher keine photodynamische Freisetzung RPA-amplifizierbarer DNA eindeutig nachgewiesen werden.

Die Projektergebnisse sind von hoher Relevanz für zellbasierte Multiplex-Assays, da bis dato kein Konzept für einen schaltbaren Zellaufschluss in einem komplexen automatisierten Arbeitsablauf realisiert ist. Effizienz, Reproduzierbarkeit und Universalität des in PhotoDynaLysis erforschten Ansatzes müssen in Folgeprojekten weiter evaluiert werden. Im Erfolgsfall kann das Konzept nicht nur im digitalen Assay, sondern auch in anderen zellbasierten Multiplexanalysen (bspw. Fluoreszenz in situ-Hybridisierung [FISH]) eingesetzt werden. Neben dem attraktiven Konzept der Schaltbarkeit des Zellaufschlusses existieren weitere Vorteile, bspw. die geringen Beschaffungskosten und die hohe Stabilität von Photosensibilisatoren im Vergleich mit rekombinanten Enzymen.

1 Einleitung

1.1 Aufgabenstellung

PhotoDynaLysis zielte darauf ab, die „schaltbare“ Desintegration von Bakterienzellen allgemein und im speziellen Fall für humanpathogene Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) durch einen lichtinduzierten photodynamischen Prozess in einem diagnostischen Arbeitsablauf zu realisieren. Der Bedarf für dieses schaltbare Verfahren wurde in Vorarbeiten erkannt. Hier wurde die Desintegration von Bakterienzellen in einem automatisierten digitalen biplex Exo RPA Assay durch die Zugabe eines lytischen Enzyms erreicht. Da das Enzym bereits zum Zeitpunkt der Mischung der Probe mit dem Reaktionsgemisch aktiv wird, erfolgt eine Lyse der Zellen und damit der Verlust der Zelle als diagnostische Einheit partiell bereits vor der vollständigen Kompartimentierung der Probe in Tröpfchen. Durch Kombination von Analyten aus 2 verschiedenen Zellen in einem Tröpfchen kann dadurch ein falsch positives Signal erzeugt werden. Eine schaltbare Lyse nach Kompartimentierung des Reaktionsansatzes kann diese Fehlerquelle ausschließen und war Ziel von PhotoDynaLysis.

Da es sich bei der photodynamischen Lyse um ein physikalisches Verfahren handelt, ist zu erwarten, dass keine artspezifische, sondern lediglich eine dem grundsätzlichen Zellwandaufbau entsprechende Anpassung notwendig ist. Demzufolge sollen Photosensibilisator und Bestrahlungsmodalitäten für drei repräsentative Testorganismen (Gram-positives Bakterium: *Staphylococcus warneri*, Gram-negatives Bakterium: *Pseudomonas syringae*, Pilz: *Saccharomyces cerevisiae*) zunächst hinsichtlich ihrer Lyseeffizienz untersucht und anschließend hinsichtlich ihrer Kompatibilität mit der Exo RPA evaluiert und angepasst werden. Im Einzelnen werden folgende Teilziele angestrebt:

- Etablierung von Exo RPA-Protokollen für die Detektion der Testorganismen.
- Photodynamische Lyse der drei repräsentativen Testorganismen, Etablierung jeweils eines Protokolls mit 100% Permeabilisierungseffizienz.
- Evaluierung / Steigerung der Kompatibilität der photodynamischen Lyse mit Exo RPA, benchmarking durch Vergleich der Amplifikationskinetik mit äquivalenten Mengen freier genomischer DNA (gDNA) in konventionellem, „analogem“ Assay.
- Untersuchung der photodynamischen Lyse im digitalen Assay.
- Proof-of-Concept: Integration der photodynamischen Lyse in einen Biplex Exo RPA Assay zur Identifizierung des Humanpathogens MRSA.

Meilenstein 1 (12 Monate): Für die Testorganismen konnte jeweils ein Protokoll für die photodynamische Permeabilisierung erarbeitet werden, welches eine Keimabtötung um mindestens 4 Logstufen innerhalb von 5 Minuten sicherstellt.

Das Vorhaben wurde als Einzelprojekt im Programm „Wissenschaftliche Vorprojekte“ realisiert.

1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Als Unterauftragnehmer fungierte das Hahn-Schickard Institut für angewandte Forschung (Standort Freiburg). Hahn-Schickard hat bei der Etablierung von Exo RPA Assays fachlich unterstützt, mikrofluidische Chips für die digitale Tröpfchen-RPA bereitgestellt und know-how und Laboreinrichtung für die abschließenden Experimente zum Funktionsnachweis an MRSA bereitgestellt.

1.3 Stand der Technik

Bis Projektbeginn zielten Forschungen zur photodynamischen Elimination von Mikroorganismen vornehmlich auf eine Nutzung dieser Technologie als antimikrobiell-therapeutisches Verfahren ab. Hier hat die Methode gegenüber konventionellen biochemisch wirkenden Antibiotika entscheidende Vorteile, z.B. dass die Wechselwirkung der Sensibilisatoren mit den Bakterien im Wesentlichen durch die Zellwandstruktur bestimmt wird und die Abtötung auf physikalischen Prozessen beruht, gegen die sich nur schwer Resistenzen ausprägen können. Für einige PS (z.B. Eosin-(KLAKLAK)) wurde eindeutig nachgewiesen, dass die Bakterienabtötung mit einer Desintegration der Zelle einhergeht, die möglicherweise auch zur Freisetzung bzw. Zugänglichkeit von gDNA führt (doi: 10.1021/bc3005254). Bisher wurde diese Tatsache jedoch nicht beachtet, da sie für die antimikrobielle Wirkung irrelevant ist.

Die digitale Einzelzell-Nukleinsäureanalytik, für die eine schaltbare Analyt-Freisetzung eine essentielle Grundlage darstellt, ist eine vergleichsweise junge Anwendung. Im F&E Vorhaben „IDAK“ (Fördergeber: MFW Baden-Württemberg) in dem das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Uniklinik Freiburg als klinisch-infektiologischer Partner eingebunden war, konnte beim Unterauftragnehmer Hahn-Schickard die Vereinzelung gram-positiver Bakterien (*S. aureus*) in Tröpfchen erstmals erfolgreich gezeigt werden (doi: 10.1039/d0lc00294a). Für die schaltbare Lyse der Bakterien in den Tröpfchen steht jedoch noch keine Lösung zur Verfügung. Neben der in o. g. Studie durchgeführten enzymatischen Lyse (Stand der Technik) könnte die Anwendung Detergenzien-basierter Lyseverfahren (doi: 10.1039/c6lc00329j) eine Alternative zur photodynamischen Lyse darstellen. Bei beiden Methoden ist jedoch im Gegensatz zur photodynamischen Lyse keine exakte zeitliche Steuerung möglich, so dass die in Abschnitt 1.1 beschriebenen Nachteile bei einer ungewollten Lyse vor der Vertropfung auftreten können.

1.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die im Projekt verwendeten Photosensibilisatoren wurden teilweise von externen Partnern bereitgestellt (BLC2003 von Dr. Arno Wiehe, biolitec AG und FU Berlin, Chlorin e6 Trinatriumsalz von Dr. Dirk Hüttenberger, Synverdis GmbH).

2 Hauptteil

2.1 Ergebnisse und Arbeiten zu den einzelnen Arbeitspaketen

2.1.1 Arbeitspaket (AP) 1: Etablierung von RPA-Assays für die Evaluierung der Detektion von Testkeimen (Monate 1-6)

Ziel dieses Arbeitspaket ist der robuste und reproduzierbare Nachweis der Testkeime durch eine RPA Reaktion.

Durchgeführte Arbeiten: Photodynamische Effekte zur Schädigung von Bakterien beruhen auf der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (insbesondere Singulett-Sauerstoff) nach Lichtanregung eines Photosensibilisators und Energietransfer auf molekularen Sauerstoff. Da es um ein physiko-chemisches Verfahren handelt, ist zu erwarten, dass für eine photodynamisch vermittelte Lyse von Mikroorganismen im Rahmen der Probenvorbereitung für diagnostische Tests keine artspezifische, sondern lediglich eine dem grundsätzlichen Zellwandaufbau entsprechende Anpassung des photodynamischen Verfahrens notwendig ist. Es wurden drei repräsentative Testorganismen (Gram-positives Bakterium: *Staphylococcus warneri* [Stamm DSM 20316], Gram-negatives Bakterium: *Pseudomonas syringae* [Stamm DSM 50252], Pilz: *Saccharomyces cerevisiae* [Stamm Weinhefe Lalvin CY3079]) ausgewählt, für die in Arbeitspaket 1 spezifische RPA Assays mit Exonuklease-vermittelter Sondenaktivierung (Exo RPA) entwickelt wurden. Exo RPA Assays erlauben eine fluoreszenzbasierte (semi)quantitative Analyse von DNA-Analyten im Echtzeitmodus oder im digitalen Format. Die Etablierung der Exo RPA Assays erfolgte unter Verwendung genomischer DNA der ausgewählten Mikroorganismen in enger Zusammenarbeit und mit fachlicher Unterstützung durch Unterauftragnehmer Hahn-Schickard Freiburg, der über fundierte Expertise in der Anwendung von RPA Assays verfügt. Im Folgenden werden die Arbeiten zur Etablierung der unterschiedlichen Assays beschrieben.

a) Gram-negativer Testkeim: *Pseudomonas syringae* (P. syringae, Psy)

Die Isolierung genomischer DNA, welche für die Etablierung des RPA Assays als *template* verwendet wurde, erfolgte unter Verwendung des GenElute bacterial genomic DNA-Kit (Sigma-Aldrich). Anhand der im TwistAmp Exo Anwendungsprotokoll beschriebenen Richtlinien wurde ein Assay-Design unter Verwendung der für DSM 50252 publizierte Genomsequenz (Accession Nr. GL385256.1 / GCA_000145905) sowie der PrimerBLAST Web-Anwendung entworfen. Nach erfolgreicher Testung der Primerpaare mittels PCR und gelelektrophoretischer Verifizierung der Amplikongröße (nicht gezeigt) wurden die Primerpaare zusammen mit der Sonde in Exo RPA Reaktionen evaluiert. Die Echtzeitanalyse der Amplifikation wurde im LightCycler 96 (Roche) unter Nutzung der Voreinstellungen für den FAM-Farbstoff durchgeführt und zeigte bei Verwendung der Primerpaare 1, 5, 6 und 7 in Anwesenheit von P. syringae DNA einen Anstieg der Fluoreszenzintensität nach ca. 10 Zyklen (entspricht ca. 5 Minuten, ein Zyklus entspricht ca. 30 Sekunden Reaktionszeit), wobei sowohl Zeitpunkt als auch Ausmaß des Anstiegs

unterschiedlich waren. In Abwesenheit von DNA (NTC) konnte für das Primerpaar 5 ein leichter Anstieg der Fluoreszenzintensität ab ca. Zyklus 35 beobachtet werden (Abb. 1a). Da der Zeitpunkt des Fluoreszenzanstiegs als semi-quantitatives Maß für die in der Reaktion vorhandene Zielsequenz dienen kann und ein Fluoreszenzanstieg in Abwesenheit von DNA die Quantifizierung geringer DNA Mengen erschwert, wurde Primerpaar 7 (257 bp Amplicon) mit den diesbezüglich günstigsten Eigenschaften für weiterführende Analysen ausgewählt. Es konnte nachfolgend eine reproduzierbare Abhängigkeit des Zeitpunkts der Fluoreszenzintensitäts-zunahme von der eingesetzten DNA-Menge gezeigt werden (Abb. 2b), was Primerpaar 7 für Testungen zu Kompatibilität und Effizienz der photodynamischen Lyse mit der Exo RPA qualifiziert.

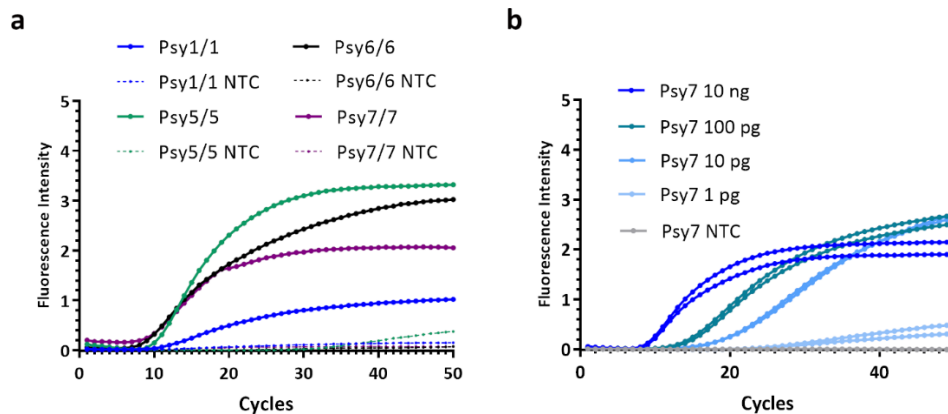


Abbildung 2: Etablierung von Exo RPA Assays für *P. syringae*. (a) Real time Exo RPA mit den in der Legende bezeichneten Primerkombinationen jeweils unter Einsatz von 10 ng genomischer DNA vs. in Abwesenheit von DNA (NTC). (b) Real time Exo RPA unter Verwendung der Primerkombination 7F/7R. Replikationsmessungen in Gegenwart unterschiedlicher DNA Mengen zeigen ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit.

b) Gram-positiver Testkeim: *Staphylococcus warneri* (*S. warneri*, Swa)

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte unter Verwendung des GenElute bacterial genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich). Für den verwendeten Stamm DSM 20316 ist die Sequenz für die 16S rRNA in der Genbank hinterlegt (Accession Nr. NR_025922.1). In Vorarbeiten konnte bereits ein geeignetes Primerpaar für die Amplifikation eines 151 bp Segments aus diesem Gen mittels Real-time PCR identifiziert werden. Obwohl diese Primer prinzipiell auch in der RPA funktionieren, wurden unter Verwendung der PrimerBLAST Web-Anwendung zwei weitere Primerpaare mit für die RPA angepassten Eigenschaften ausgewählt (Swa2, Swa3) und mittels PCR erfolgreich getestet (nicht gezeigt). Nach Entwurf und Beschaffung einer geeigneten Sonde zeigte sich während der Exo RPA in Abwesenheit von DNA (NTC) ein Anstieg der Fluoreszenzintensität nach ca. 20 Zyklen, wodurch eine Quantifizierung geringerer DNA-Mengen mit diesen Assays nicht möglich war. Testreaktionen zeigten, dass das Fluoreszenzsignal in der NTC aufgrund einer Wechselwirkung der Sonde mit den reverse Primern entstand (nicht gezeigt). Darum wurden weitere reverse Primer entworfen / beschafft (5R, 6R) und in Kombination mit den forward Primern (2F, 3F) in der Exo RPA getestet. Unter Verwendung des 5R Primers

konnte eine sensitive Detektion von *S. warneri* DNA bei gleichbleibend niedrigem Signal in der NTC erzielt werden (Abbildung 3a). Im direkten Vergleich der Primerkombinationen 2F/5R und 3F/5R zeigte sich ein geringfügig schnellerer Fluoreszenzanstieg und damit eine höhere Sensitivität für das 2F/5R Primerpaar (Abbildung 3b). Replikatmessungen unter Verwendung dieses Primerpaars zeigten weiterhin eine hohe Reproduzierbarkeit sowie eine hohe Sensitivität (Abbildung 3c), so dass dieser Assay für weiterführende Arbeiten zu Kompatibilität und Effizienz der photodynamischen Lyse mit der exo RPA verwendet wurde.

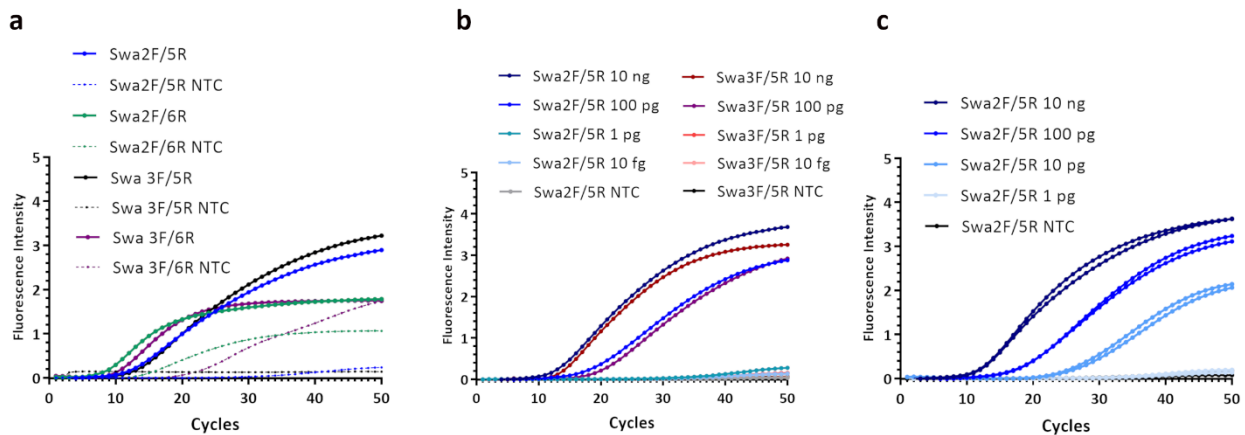


Abbildung 3: Etablierung von Exo RPA Assays für *S. warneri*. (a) Real time Exo RPA mit den in der Legende bezeichneten Primerkombinationen jeweils unter Einsatz von 10 ng genomischer DNA vs. in Abwesenheit von DNA (NTC). (b) Real time Exo RPA unter Verwendung der Primerkombinationen 2F/5R und 3F/5R in Gegenwart unterschiedlicher DNA-Mengen. (c) Primerkombination 2F/5R: Replikatmessungen in Gegenwart unterschiedlicher DNA Mengen zeigen ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit.

c) Pilz: *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*, SC)

Die Isolierung genomischer DNA, welche für die Etablierung des RPA-Assays als *template* verwendet wurde, erfolgte unter Verwendung des Yeast DNA Extraction Kit (Thermo Scientific). Für den verwendeten Stamm (Weinhefe Lalvin CY3079) ist keine spezifische Sequenz in der Genbank hinterlegt, jedoch sind Primer für die Amplifikation einer Teilsequenz des 5.8S rRNA Gens von *S. cerevisiae* in einer Publikation beschrieben (van den Brink et al. 2020, doi: 10.1101/2020.10.14.337808). Die Funktionalität des publizierten Primerpaars (SC1F/R) für die Amplifikation der 5.8S rRNA des Stammes CY3079 wurde mittels Endpunkt-PCR und gelelektrophoretischer Analyse des 191 bp Amplicons verifiziert (nicht gezeigt). Für die Etablierung der Exo RPA wurde ein weiteres Primerpaar (SC2F/R, 244 bp Amplicon) sowie eine SONDENSEQUENZ, welche von beiden Primerpaaren flankiert ist und somit unter Verwendung beider Primerpaare verwendet werden kann, entworfen (nicht gezeigt). Die Testung aller Primerpaar-Kombinationen mit der Sonde in der Exo RPA zeigte eine gute Amplifikationskinetik, jedoch auch einen

Anstieg der Fluoreszenzintensität in Abwesenheit von DNA für alle Primerpaare (Abb. 4a). Versuche zur Unterdrückung des Signals in der NTC beinhalteten die Anhebung der Reaktionstemperatur von 39 (Standard) auf 42°C (nicht gezeigt), die Reduktion der Sondenkonzentration von 120 nM (Standard) auf 60 nM (nicht gezeigt) sowie die Reduktion der Primerkonzentration von 420 nM (Standard) auf 280 nM (Abbildung 4b). Alle Variationen der Reaktionsbedingungen bewirkten eine Reduktion des Anstiegs der Fluoreszenzintensität in der NTC, jedoch auch eine geringere Sensitivität des Assays. Zusammenfassend konnte auch für *S. cerevisiae* ein geeigneter Exo RPA Assay etabliert werden, mit der Einschränkung, dass geringe DNA-Mengen aufgrund eines ähnlich späten / schwachen Anstiegs der Fluoreszenzintensität wie in der NTC nicht hinreichend quantifiziert werden können. Als Rückfallszenario wird in Übereinstimmung mit der vom Reagenzienhersteller TwistDx empfohlene Reaktionsdauer beim verwendeten TwistAmp Exo Kit eine Termination der Reaktion nach Zyklus 40 (entspricht ca. 20 min Reaktionszeit) in Betracht gezogen. Falls der Fluoreszenzanstieg in der NTC in der Etablierung / Evaluierung der photodynamischen Lyse für *S. cerevisiae* ein persistierendes Problem darstellt, erfolgt eine weitere Anpassung des *S. cerevisiae* Exo RPA Assays zu einem späteren Zeitpunkt.

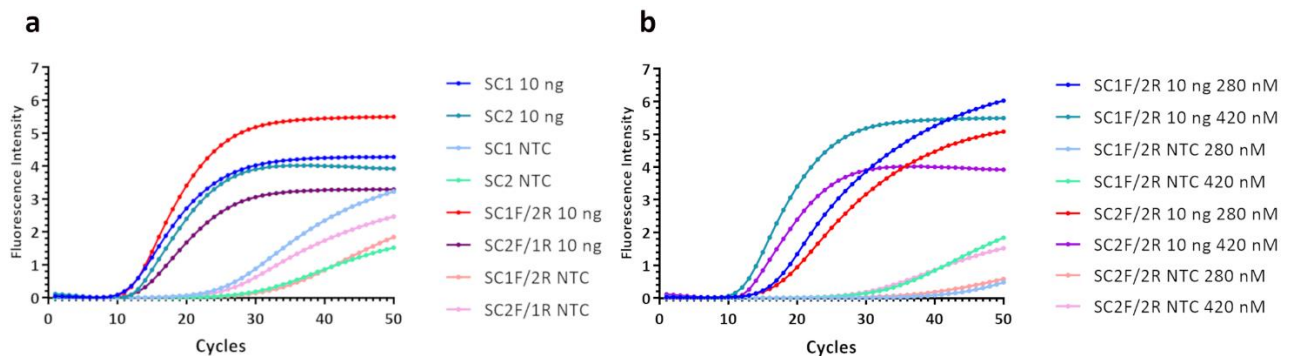


Abbildung 4: Etablierung von Exo RPA Assays für *S. cerevisiae*. Fluoreszenzmessung für die in der jeweiligen Legende bezeichneten Primerkombinationen jeweils unter Einsatz von 10 ng genomischer DNA vs. in Abwesenheit von DNA (NTC) unter Verwendung der durch den Hersteller TwistDx empfohlenen Konzentrationen für Primer und Probe (a) sowie nach Reduktion der Primerkonzentration im Exo RPA assay von 420 nM (Standardkonzentration) auf 280 nM (b).

Soll-Ist-Vergleich: Die Etablierung von Exo RPA Assays für Gram-negative und -positive Bakterien sowie Pilze wurde erreicht. Da die RPA für den im Antrag als Gram-negativer Modellorganismus definierten Bakterienstamm *E. coli* aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht durchführbar war, wurde *P. syringae* ersatzweise als Modellorganismus ausgewählt.

2.1.2 AP 2: Dosis-Wirkungsstudien für die photodynamische Permeabilisierung / Lyse mittels unterschiedlicher Photosensibilisatoren (Monate 4-12)

Ziel: Charakterisierung der DNA-Freisetzungseffizienz unterschiedlicher Photosensibilisatoren.

Durchgeführte Arbeiten: In AP 2 wurde die Effizienz der photodynamischen Permeabilisierung auf die Testkeime unter Anwendung unterschiedlicher Photosensibilisatoren (PS) evaluiert. Nach Beratung mit Dr. Wiehe (biolitec AG, Jena), einem renommierten Experten für antibakterielle PS, wurde die Substanz BLC2003 durch biolitec kostenfrei zur Verfügung gestellt und primär evaluiert. Das Absorptionsmaximum von BLC2003 liegt bei ca. 530 nm. Weitere in AP2 zu evaluierende PS waren zunächst Chlorin e6 (Absorptionsmaxima 407 nm und ca. 650 nm), Methyleneblau (Absorptionsmaximum ca. 660 nm) sowie Toluidinblau O (Absorptionsmaximum ca. 630 nm). Um die PS effizient anzuregen, wurde eine Bestrahlungseinheit entworfen und aufgebaut (Abbildung 5).

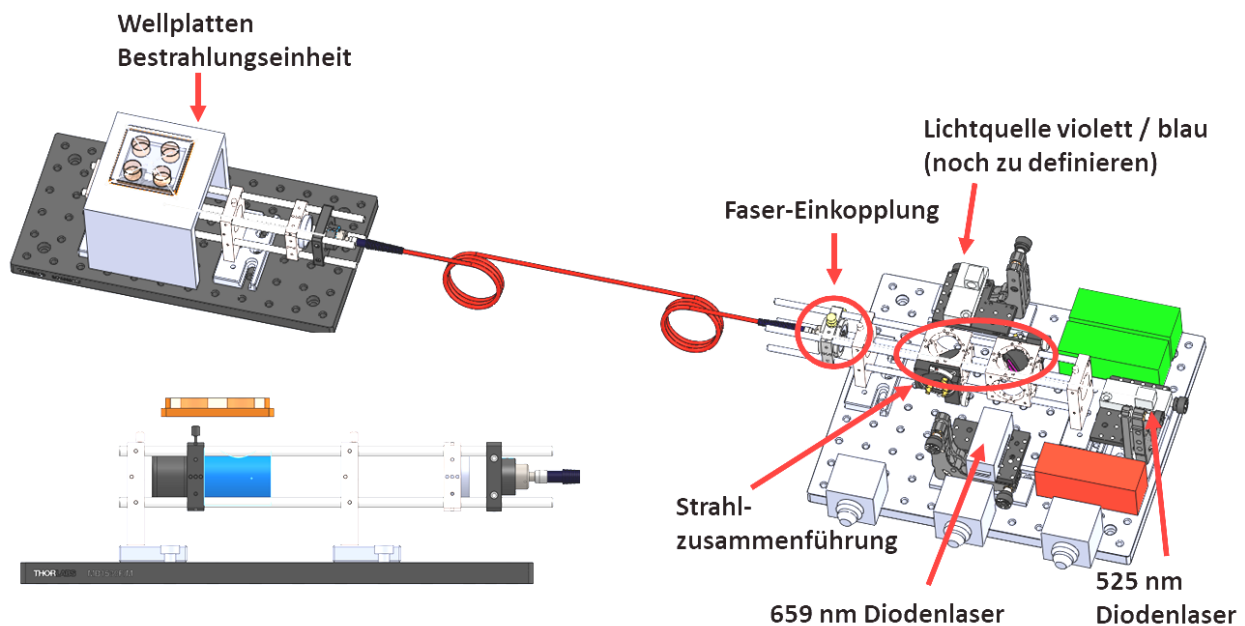


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Bestrahlungsaufbaus für die Evaluierung der photodynamischen Lyse.

Dosis-Wirkungsstudien zur photodynamischen Inaktivierung der Testorganismen wurden mit BLC2003, Chlorin e6 (Ce6), Methyleneblau (MB) und Toluidinblau O (TBO) durchgeführt. Hinsichtlich der avisierten Inaktivierungsrate von mindestens 4 Log-Stufen innerhalb von 5 Minuten zeigten erste Experimente vor allem für BLC2003 und Ce6 vielversprechende Ergebnisse, so dass für diese beiden PS umfangreiche Experimentserien unter Variation und mit dem Ziel der Minimierung von PS-Dosis, Prä-Inkubationszeit und Lichtdosis durchgeführt wurden. Die für die Erfüllung des Meilensteins

erforderliche Inaktivierungsleistung von 4 Log-Stufen innerhalb von 5 Minuten wurde für alle 3 Testorganismen unter Verwendung von BLC2003 erreicht (Abbildung 6). Die photodynamische Inaktivierung der Mikroorganismen mittels Ce6 war weniger effizient und erforderte eine längere Präinkubationsdauer und höhere PS-Konzentrationen (nicht gezeigt), wurde jedoch als Rückfallszenario für den Fall unbefriedigender Ergebnisse bei Verwendung von BLC2003 im weiteren Projektverlauf in Betracht gezogen.

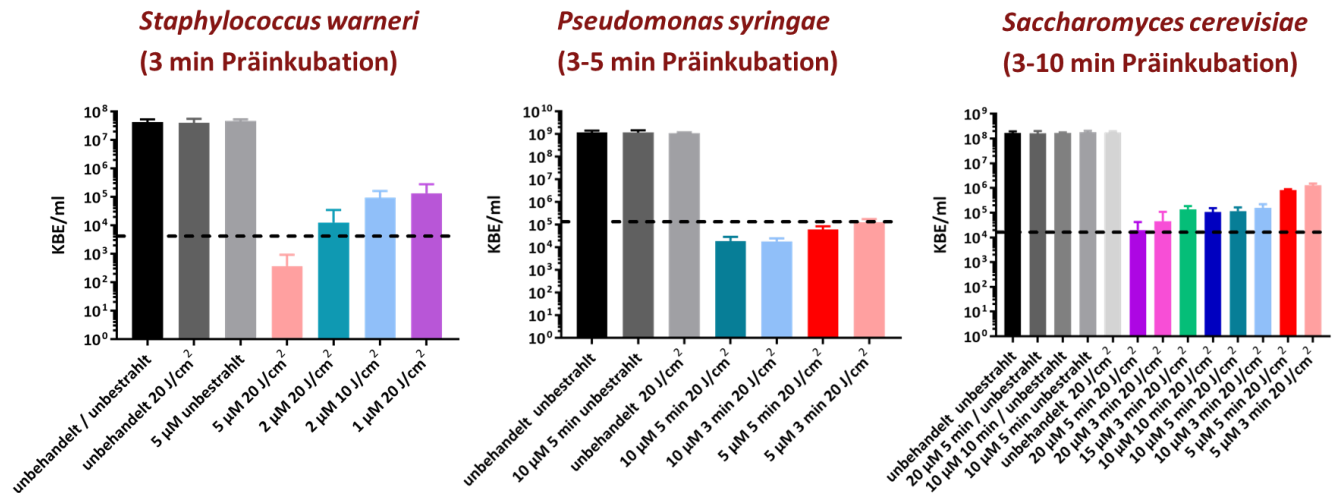


Abbildung 6: Photodynamische Inaktivierung der 3 Testorganismen unter Verwendung von BLC2003 und Laserlicht ($\lambda = 525 \text{ nm}$, Photonenflussdichte 250 mW/cm^2). Frische Übernachtskulturen der Teststämme wurden mit 0,9% NaCl auf $\text{OD}_{600} = 1$ eingestellt, mit Photosensibilisator oder äquivalentem Volumen 0,9% NaCl (unbehandelt) versetzt, über die angegebenen Zeiträume präinkubiert und anschließend bestrahlt. Danach wurde die Reduktion der koloniebildenden Einheiten (KBE) durch die photodynamische Behandlung in Relation zur unbehandelten / unbestrahlten Kontrolle ermittelt (gestrichelte Linie signalisiert jeweils eine Inaktivierung um 4 Log-Stufen, $n \geq 3$, Fehlerbalken: Standardabweichung).

Soll-Ist-Vergleich: Der Aufbau einer Bestrahlungseinheit und umfassende Dosis-Wirkungsstudien für unterschiedliche PS wurden wie geplant durchgeführt. Der mit AP 2 assoziierte Meilenstein der Etablierung eines PDI-Protokolls für die Inaktivierung der Modellorganismen um 4 Log-Stufen innerhalb von 5 Minuten wurde erreicht.

2.1.3 AP 3: Evaluierung und Verbesserung der Kompatibilität der photodynamischen Lyse mit RPA (Monate 13-18)

Ziel: Photodynamische Lyse ohne negativen Einfluss auf Exo RPA.

Durchgeführte Arbeiten: AP 3 zielte darauf ab, einen möglichen negativen Einfluss der PS bzw. des photodynamischen Prozesses auf die Detektion des RPA-Reporterfarbstoffs (FAM) sowie auf die Amplifikationsreaktion zu identifizieren und zu minimieren. BLC2003 absorbiert als einziger der evaluierten PS das Anregungslicht für den verwendeten Reporterfarbstoff FAM, jedoch ist der im LightCycler96 für die FAM-Detektion verwendete Filter ungeeignet für die Detektion der BLC2003-Fluoreszenz, so dass eine Störung der FAM-Detektion ausgeschlossen werden konnte. Das Anregungslicht für die photodynamische Reaktion wird nicht (Ce6, $\lambda=652 \text{ nm}$) bzw. nur schwach (BLC2003,

$\lambda=525$ nm) durch das Sonden-Fluorophor absorbiert, so dass ein Photobleaching des Sonden-Fluorophors durch Bestrahlung unwahrscheinlich ist und in Testreaktionen bei Applikation photodynamisch effizienter Lichtdosen auch nicht beobachtet wurde. Nachfolgend wurde eine systematische Untersuchung des Einflusses der Photosensibilisatoren BLC2003, Ce6 und MB in der Dunkelreaktion sowie für BLC2003 und Ce6 bei Bestrahlung unter Verwendung von genomischer DNA von *S. warneri* und des entsprechenden Exo RPA assay durchgeführt.

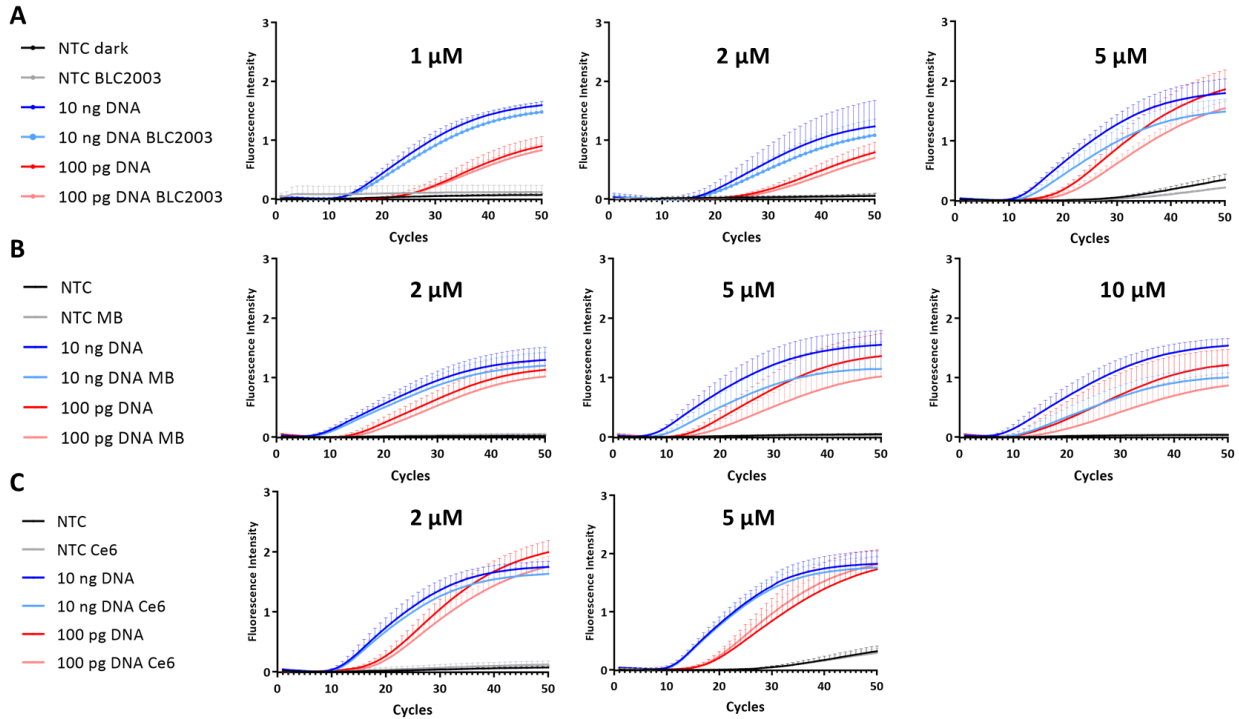


Abbildung 7: Beeinflussung der Exo RPA Reaktionen in Abwesenheit von Licht und in Gegenwart der jeweils angezeigten Konzentrationen der Photosensibilisatoren (A) BLC2003, (B) MB und (C) Ce6. Abgebildet ist die mittlere Fluoreszenzintensität (von jeweils mindestens 2 Experimenten mit mindestens 2 technischen Replikaten) in Abhängigkeit der Zeit für die Amplifikationsreaktion im Echtzeit-Assay (*S. warneri*) in Abwesenheit von DNA (NTC) sowie in Gegenwart von 10 ng (blaue Linien) und 100 pg (rote Linien) genomischer DNA. Die Verläufe für die Reaktionen in Anwesenheit des Photosensibilisators sind durch jeweils hellere Linien gekennzeichnet (s. Legende). Vertikale Balken auf den Verlaufskurven zeigen die Standardabweichung im jeweiligen Meßpunkt.

MB wurde bzgl. seiner photodynamischen Wirkung auf die Exo RPA zunächst nicht getestet, da eine Konzentration von 10 μM ohne Bestrahlung bereits zu starker Inhibition der RPA führt (Abbildung 7B), gleichzeitig jedoch nur eine geringe PDI-Effizienz bei *S. warneri* (ca. 1 Log-Stufe) aufweist. Während in den nicht bestrahlten Reaktionen bei BLC2003 und Methylenblau Konzentrationen >2 μM eine deutliche Verzögerung des Fluoreszenzanstiegs bewirken, konnte für Ce6 bis zu einer Konzentration von 5 μM nahezu kein inhibitorischer Effekt auf die RPA beobachtet werden (Abbildung 7). Nach Bestrahlung der Reaktionen zeigten sowohl BLC2003 als auch Ce6 bei einer

Konzentration von 2 μM eine deutliche Verzögerung des Fluoreszenzanstiegs in der Exo-RPA, was auf eine photodynamische Schädigung der Exo-RPA Enzyme hinweist (Abbildung 8).

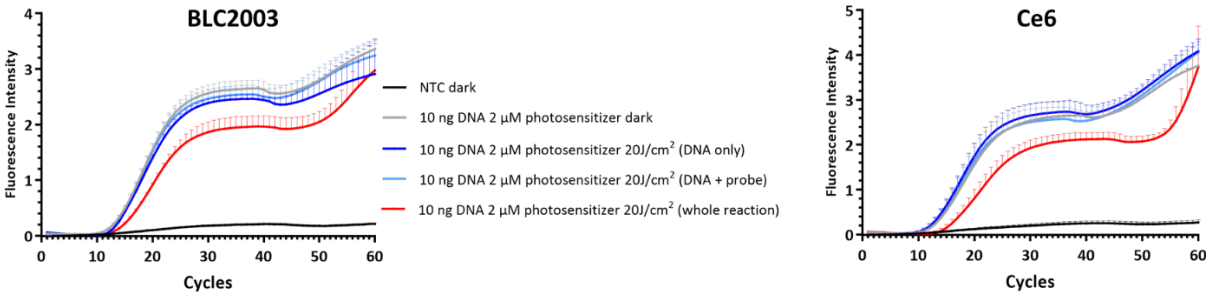


Abbildung 8: Beeinflussung der Exo RPA Reaktionen (*S. warneri*) durch vorhergehende photodynamische Behandlung mit 2 μM BLC2003 (linkes Diagramm, $\lambda=525$ nm) und Chlorin e6 (rechtes Diagramm, $\lambda=652$ nm) und einer Lichtdosis von jeweils 20 J/cm². Während bei separater Bestrahlung von DNA sowie DNA und Sonde vor Mischung mit den übrigen RPA-Reagenzien kein verzögerter Signalhub auftrat, war bei Bestrahlung der vollständigen Reaktion (rote Kurve) ein verzögerter Signalhub gegenüber der unbestrahlten Reaktion erkennbar, was auf eine partielle Inhibition der Exo-RPA Enzyme durch die photodynamische Behandlung hinweist.

Die im Rahmen der Laufzeitverlängerung / Projektaufstockung eingesetzten Additive zur Steigerung der photodynamischen Effizienz bzw. zum Schutz der RPA-Enzyme wurden allein und in Kombination mit Photosensibilisatoren hinsichtlich ihrer Beeinflussung der RPA untersucht. Die Experimente und Ergebnisse werden in den Ausführungen zu Arbeitspaket 4 beschrieben.

Soll-Ist-Vergleich: Das Ziel der Identifizierung eines Protokolls, welches eine effiziente photodynamische Lyse der Testorganismen ohne Beeinträchtigung der (in Echtzeit gemessenen) Exo RPA ermöglicht, konnte zunächst nicht erreicht werden. Da in der Echtzeitmessung jedoch nur eine partielle Beeinträchtigung gemessen wurde, besteht die Möglichkeit, dass diese die in Endpunktmessung ermittelten Ergebnisse der digitalen Exo RPA nicht beeinflussen.

2.1.4 AP 4: Benchmarking der Effizienz der photodynamischen Lyse in der RPA (ursprüngliche Planung Monate 16-18, nach Aufstockung / Laufzeitverlängerung Monate 16-31)

Ziel: Photodynamische Lyse bewirkt vollständige Zugänglichkeit der Ziel-DNA von Testorganismen in Suspension.

Durchgeführte Arbeiten: Um die Anreicherung extrazellulärer Ziel-DNA nach photodynamischer Behandlung der Modellorganismen zu untersuchen, wurden die Zeitpunkte des Fluoreszenz-Intensitätsanstiegs in der Exo RPA an Photosensibilisator-versetzten bestrahlten vs. nicht bestrahlten Suspensionen (insgesamt jeweils ca. 10^5

Bakterienzellen) sowie in Relation definierter Mengen identisch behandelte genomischer DNA verglichen. Abbildung 9 zeigt, dass PS-inkubierte bestrahlte *S. warneri* Suspensionen verglichen mit identisch behandelten unbestrahlten Suspensionen einen reproduzierbar früheren Signalhub in der Echtzeit-RPA bewirkten, was mutmaßlich auf photodynamisch freigesetzte Ziel-DNA zurückzuführen ist. Die Dynamik des Fluoreszenzverlaufs ist derjenigen einer Amplifikation von 1 ng DNA (entspricht dem Gehalt von ca. $3,85 \times 10^5$ Bakterienzellen) ähnlich, was darauf hindeutet, dass die Menge an Ziel-DNA in diesen Reaktionen vergleichbar ist. Aufgrund des starken Hintergrunds an extrazellulärer DNA in der unbestrahlten Bakteriensuspension ist eine Quantifizierung der photodynamisch vermittelten DNA-Freisetzung in diesem Experiment jedoch nicht möglich. Vergleichbare Experimente an *P. syringae* und *S. cerevisiae* hingegen zeigten nach photodynamischer Behandlung der Bakteriensuspensionen keinen reproduzierbar früheren und stärkeren Signalhub (nicht gezeigt).

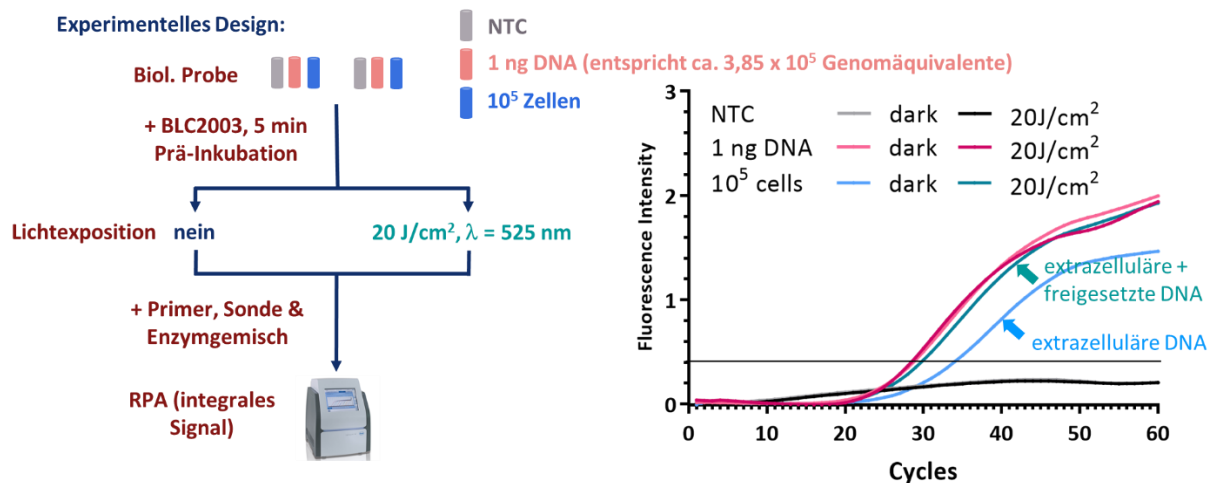


Abbildung 9: Freisetzung von Ziel-DNA in Bakteriensuspensionen durch photodynamische Lyse. Schema links: DNA-freie Proben (NTC), DNA-haltige Proben sowie Bakteriensuspensionen wurden mit BLC2003 versetzt und unterschiedlichen Lichtdosen (keine Lichtexposition vs. 20 J/cm^2) ausgesetzt, anschließend mit dem RPA-Reaktionsgemisch versehen und mittels Echtzeit Exo RPA im Lightcycler analysiert. Graphik rechts: während die NTC sowie die DNA-haltigen Proben unabhängig von der Lichtexposition ähnliche Fluoreszenzintensitäten über die Zeit aufwiesen, zeigte sich bei der Bakteriensuspension ein deutlich früherer und stärkerer Signalhub nach Bestrahlung. Während das Fluoreszenzsignal bei der unbestrahlten Probe mutmaßlich auf extrazelluläre DNA in der Bakteriensuspension zurückzuführen ist (dies ist ein normales Phänomen, das auf das Absterben einzelner Bakterien während der Wachstumsphase der Kultur zurückzuführen ist), wird der frühere / stärkere Signalhub der Präsenz zusätzlicher photodynamisch freigesetzter DNA zugeschrieben. Die dargestellten Fluoreszenzverläufe repräsentieren Mittelwerte aus 5-11 technischen / biologischen Replikaten.

In diesen Experimenten wurden nur die Bakteriensuspensionen, nicht jedoch die Reagenzien für die RPA der photodynamischen Behandlung unterzogen. Die in AP3 erzielten Ergebnisse zeigten hingegen, dass die photodynamische Reaktion auch zu einer Inhibition der RPA-Reaktion führt. Somit bestimmen nach photodynamischer Lyse von

Bakteriensuspensionen 2 gegenläufige Effekte den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität in der Echtzeit RPA, was ein verlässliches benchmarking im Sinne der für AP 4 beschriebenen Arbeiten unmöglich macht. Obwohl das Ausmaß der Inaktivierung der RPA-Reagenzien durch die Wahl geeigneter Kontrollen, bspw. bestrahlter Reaktionen mit genomischer DNA, in jedem einzelnen Experiment hätte ermittelt werden können, wäre unklar gewesen, ob sich die photodynamisch vermittelte Hemmung der Exo RPA in Gegenwart von Bakterien anders verhält als in Gegenwart genomischer DNA. Aufgrund dieser Unwägbarkeiten wurde auf die ursprünglich vorgesehenen Experimente zum benchmarking verzichtet. Stattdessen erfolgten im Rahmen der Projektaufstockung zusätzliche Arbeiten zur Identifizierung von Additiven, welche die photodynamische Reaktion modulieren (Singulett-Sauerstoffquencher Quercetin, beta-Carotin, Ascorbinsäure) oder verstärken (Kaliumiodid [KI]). Ziel des Einsatzes der Additive war, die Effizienz der photodynamischen Lyse der Mikroorganismen gezielt zu erhöhen bei gleichzeitigem Schutz der Amplifikationsenzyme vor Inaktivierung.

Quercetin führte bereits bei einer Konzentration von 10 µM zu einer signifikanten Inhibition der RPA (nicht gezeigt), während eine nennenswerte Verstärkung der photodynamischen Inaktivierung von Bakterien sowie Quenching von Singulett-Sauerstoff erst bei höheren Konzentrationen beobachtet wurde (doi: 10.7603/s40730-016-0008-6), so dass auf weitere Tests mit Quercetin verzichtet wurde. Die Verwendung von β-Carotin in der RPA war aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit der Substanz nur ≤1 µM praktikabel, was ebenfalls deutlich unter der für das Quenching erforderlichen Konzentration von 100 µM lag (doi: 10.7603/s40730-016-0008-6), so dass auch mit dieser Substanz keine weiteren Experimente durchgeführt wurden. Die gut wasserlösliche Ascorbinsäure zeigte sich bei einer Endkonzentration von 100 µM kompatibel mit der RPA-Reaktion, jedoch in Kombination mit Ce6 und photodynamischer Lyse von *S. warneri* einen deutlich verzögerten Fluoreszenzanstieg gegenüber der unbeleuchteten und nicht Ascorbat-enthaltenden Reaktion (nicht gezeigt) so dass auch mit Ascorbat bis auf Weiteres nicht weitergearbeitet wurde.

KI erwies sich ab einer Endkonzentration von 10 mM als effizient für eine signifikante Verstärkung der MB-vermittelten photodynamischen Inaktivierung (PDI, s. doi: 10.1128/AAC.00019-15) als auch kompatibel mit der RPA (nicht gezeigt). Darum wurde zunächst die PDI-verstärkende Aktivität von KI in Kombination mit den 3 vielversprechenden Photosensibilisatoren BLC2003, Ce6 und MB untersucht. Während KI als Zusatz von MB und Ce6 auch die PDI-Effizienz bei *S. warneri* und *P. syringae* verstärken konnte, zeigte sich in Kombination mit BLC2003 bei der Anwendung an *S. warneri* überraschenderweise eine deutlich geringere PDI-Effizienz (Abbildung 10). Dies ist wahrscheinlich auf eine reduktive Inaktivierung des Photosensibilisators durch Iodid zurückzuführen (doi: 10.1006/mchj.1997.1533), so dass für die Kombination BLC2003 / KI keine weiteren Tests an *P. syringae* durchgeführt wurden.

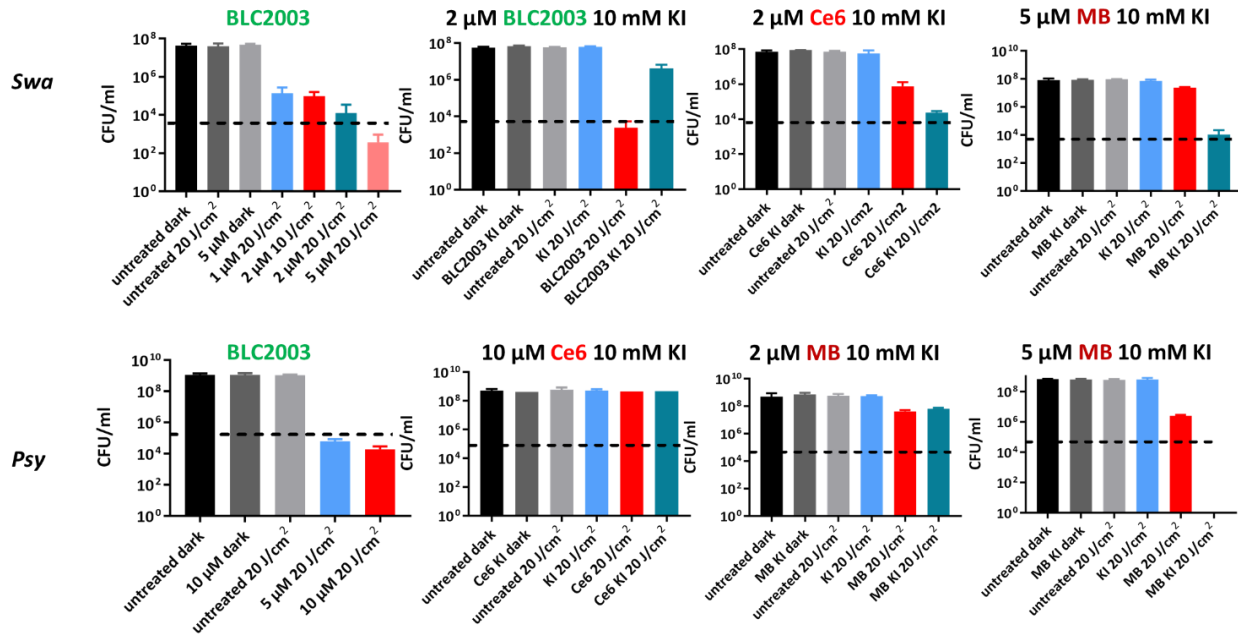


Abbildung 10: Modifizierung der PDI-Effizienz von BLC2003, Ce6 und MB auf *S. warneri* (Swa) und *P. syringae* (Psy) durch Zugabe von 10 mM KI. Während BLC2003 aufgrund der Reaktion mit den Iodid-Anion inaktiviert wird und dadurch die PDI-Effizienz von BLC2003 durch KI signifikant reduziert wird, bewirkt KI eine Verstärkung der MB-vermittelten PDI bei sowohl Swa als auch Psy sowie eine Verstärkung der Ce 6 vermittelten PDI-Effizienz bei Psy.

Im Folgenden wurde die Kompatibilität von MB / KI in Abwesenheit von Licht sowie nach Bestrahlung (20 J/cm², λ=652 nm) mit der Echtzeit-RPA überprüft. Während der Zusatz von 10 mM KI bei 2 μM MB in Abwesenheit von Licht keinen inhibitorischen Einfluss auf die RPA aufwies, war eine Inhibition in Gegenwart von 5 μM MB meßbar (blaue Kurvenverläufe in Abbildung 11). Bei Bestrahlung der RPA-Enzyme sowie des ganzen Reaktionsansatzes (rote Kurvenverläufe) zeigte sich hingegen bei beiden MB-Konzentrationen eine Inhibition der Reaktion.

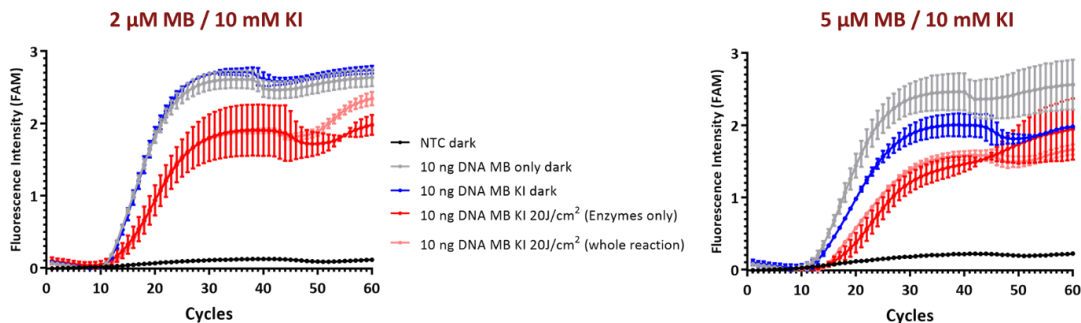


Abbildung 11: Einfluss von 10 mM KI auf die in Echtzeit gemessene Exo-RPA an genomischer DNA bei Anwendung der angezeigten MB-Konzentrationen in Abwesenheit vs. Gegenwart von Licht (λ=652 nm, 20 J/cm²). Während der Zusatz von 10 mM KI in Gegenwart von 5 μM MB ohne Bestrahlung einen leicht verzögerten Anstieg der Fluoreszenz aufweist (blaue Kurvenverläufe), ist die Inhibition nach Bestrahlung deutlich stärker ausgeprägt (rote Kurvenverläufe).

Während die Inaktivierungseffizienz von MB und Ce6 durch den Zusatz von 10 mM KI signifikant erhöht werden konnte, wurde bis dato kein Additiv identifiziert, das die inhibitorische Wirkung der photodynamischen Reaktion auf die Exo-RPA unterbindet. Die nachfolgend für AP 5 beschriebenen Ergebnisse verdeutlichen jedoch, dass eine in der Echtzeit-Reaktion gemessene Inhibition der Exo RPA nicht zwangsläufig zu einer Reduktion der Anzahl RPA-positiver Tröpfchen in der digitalen Reaktion führt, so dass die Nutzung von KI für die Steigerung von Effizienz und Reproduzierbarkeit der photodynamischen Lyse untersucht wurde.

Soll-Ist-Vergleich: Aufgrund der sich im Echtzeit-Assay gegenläufig auswirkenden Effekte der photodynamischen Inaktivierung von Exo RPA Reagenzien einerseits und der Freisetzung genomischer DNA aus den Testorganismen andererseits konnte in diesem Format keine Quantifizierung der Freisetzungseffizienz der Ziel-DNA aus den Bakterien ermittelt werden.

2.1.5 AP 5: Etablierung der digitalen RPA mit photodynamischer Lyse im DropChip (ursprüngliche Planung Monate 16-21, nach Aufstockung / Laufzeitverlängerung Monate 16-32)

Ziel: Photodynamische Lyse bewirkt vollständige Zugänglichkeit der Ziel-DNA einzelner Testorganismen in Mikrokompartimenten in digitaler Exo RPA.

Durchgeführte Arbeiten: Die Exo RPA in dem von UA-Nehmer Hahn-Schickard bereitgestellten DropChip wurde zunächst mit genomischer DNA und dem für die Echtzeitanalyse entwickelten Protokoll durchgeführt. Während der für die Echtzeitanalyse von *P. syringae* DNA etablierte Assay auch im digitalen Format funktionierte und eine einfache Unterscheidung zwischen positiven und negativen Tröpfchen ermöglichte (Abbildung 12), war für den *S. warneri* Assay aufgrund der sehr geringen Fluoreszenzintensität in positiven Tröpfchen zunächst eine Protokollanpassung erforderlich. Nach Variation unterschiedlicher Parameter konnte durch Anpassung der Reaktionstemperatur von 39°C auf 42°C eine höhere Fluoreszenzintensität in den Tröpfchen erreicht werden.

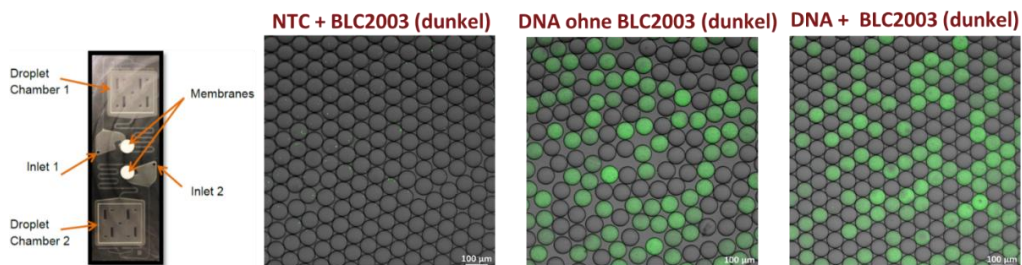


Abbildung 12: Exo RPA zur Detektion von *P. syringae* im digitalen Detektionsformat. Links: Abbildung eines DC24 DropChips (Hahn-Schickard). Inlet 1 + 2: Einlassöffnungen für die Vertropfung der RPA-Reaktion nach dem durch Hahn-Schickard bereitgestellten Protokoll. Die Tröpfchen akkumulieren in den zugehörigen Tröpfchenkammern (droplet chambers 1 + 2) und werden mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop dokumentiert. Dargestellt sind exemplarische Aufnahmen vertropfter Reaktionen in Gegenwart (rechtes Bild) vs. Abwesenheit (mittleres Bild) von BLC2003 (links: NTC). RPA-positive Tröpfchen sind durch grüne Fluoreszenz erkennbar.

Nach erfolgreicher Detektion der *S. warneri* Exo RPA-Reaktion mit genomischer DNA im digitalen Format erfolgte die Erprobung der photodynamischen Lyse der Bakterien in Tröpfchen mit anschließender digitaler Exo RPA. Dabei wurden die Exo RPA-Reaktionen (50 μ l) nach der photodynamischen Behandlung aufgeteilt und sowohl mittels Echtzeit-RPA im Lightcycler96 (35 μ l) als auch parallel im DC24 DropChip (15 μ l) analysiert, um die Kongruenz der Ergebnisse der beiden Auswerteverfahren zu untersuchen. Sowohl bei BLC2003 als auch bei Ce6 zeigte sich in der digitalen Endpunkt-RPA in den DropChips im Mittel eine leichte Zunahme der amplifizierbaren DNA nach photodynamischer Behandlung, erkennbar an einem signifikant höheren Prozentsatz grün fluoreszierender Tröpfchen. Die parallel durchgeführte Echtzeit-RPA zeigte hingegen bei beiden Photosensibilisatoren einen verzögerten Fluoreszenzanstieg (für Ce6 exemplarisch in Abbildung 13 dargestellt). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die durch die photodynamische Inaktivierung verursachte partielle Inhibition der enzymatischen Reaktionen sich in der digitalen Exo RPA (Endpunktmessung in jedem einzelnen Tröpfchen) weniger stark oder garnicht bemerkbar macht, während sie in der Echtzeit-Exo RPA trotz der möglicherweise höheren Menge amplifizierbarer DNA zu einem verzögerten Fluoreszenzanstieg führt.

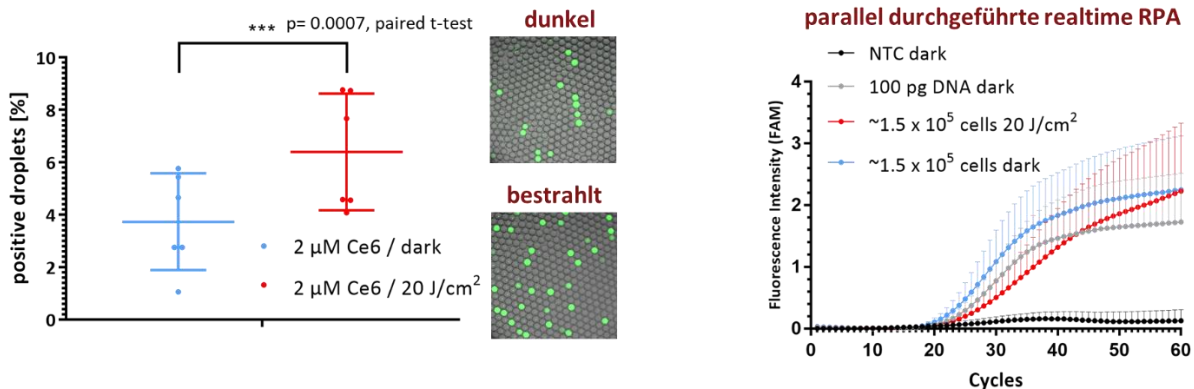


Abbildung 13: Exo RPA von *S. warneri* in Gegenwart von Ce6 (unbestrahlt vs. 20 J/cm², λ =652 nm). Links: quantitative Auswertung der digitalen Exo RPA nach Auszählung von jeweils 6-12 Sichtfeldern bei 6 unabhängigen Experimenten. Dargestellt ist der durchschnittliche Prozentsatz Exo RPA-positiver Tröpfchen mit Standardabweichung der unbestrahlten (blau) vs. bestrahlten (rot) Reaktionen. Mitte: exemplarische Darstellung repräsentativer Sichtfelder. Rechts: exemplarische Darstellung von Fluoreszenzverläufen der Echtzeit Exo RPA-Reaktionen (Kontrollen: Exo RPA ohne Zugabe von DNA oder Bakterien [NTC], Exo RPA unter Verwendung von 100 pg genomischer DNA von *S. warneri*).

Da bis April 2023 ein großer Teil der von Hahn-Schickard bereitgestellten DropChips verbraucht und eine Herstellung weiterer DropChips mit sehr hohen Kosten und Zeitverzögerungen verbunden gewesen wäre, wurde im Rahmen der Projektaufstockung die kommerzielle Crystal digital PCR Technologieplattform der Firma Stilla beschafft. Prinzipiell ist diese Plattform geeignet für die Implementierung der photodynamischen

Lyse in einen Exo RPA-Arbeitsablauf, d.h. ein aus spezifischen Druck- und Temperaturverläufen bestehendes Protokoll zur Vertropfung und Amplifikation kann nahezu beliebig für die Insertion eines Bestrahlungsschritts unterbrochen und/oder modifiziert werden. Jedoch waren die von Stilla verfügbaren Protokolle für die digitale PCR optimiert und wurden bis dato noch nicht für isothermale DNA-Amplifikationsverfahren wie RPA verwendet. Dabei ist die verhältnismäßig lange Dauer und hohe Temperatur der Vertropfung (ca. 45 min. Gesamtdauer, davon ca. 20 min. bei 40°C) nicht ideal, da die Exo RPA Reaktion nach Mischung aller Reagenzien startet, ein Temperaturoptimum von ca. 40°C aufweist und folglich während der Vertropfung, d.h. vor der erwünschten Kompartimentierung, nahezu vollständig abgelaufen ist. Eine Anpassung des Vertropfungsprotokolls für Exo RPA erfolgte durch schrittweise Senkung der Vertropfungstemperatur und Beschleunigung von Druckaufbau und Druckabbau bei jeweiliger Kontrolle des Erfolgs der Vertropfungsreaktion (hier wurde eine durchschnittliche Anzahl ≥ 10.000 durch die Crystal Miner Software analysierbare Tröpfchen als unterer Schwellenwert definiert) sowie des Reaktionsstatus (Anzahl RPA-positiver Tröpfchen) vor bzw. nach der sich anschließenden Inkubation für 30 min bei 42°C. Es stellte sich heraus, dass bei Erreichen einer akzeptablen Anzahl analysierbarer Tröpfchen die Vertropfungstemperatur auf 20°C abgesenkt und Druckaufbau und -abbau signifikant verkürzt werden konnte. Dadurch wurde die benötigte Zeit von ca. 45 min (Stilla Standardprotokoll für PCR) auf ca. 6 min. verkürzt (nicht gezeigt). Das für Exo RPA angepasste Vertropfungsprotokoll wurde ab Dezember 2023 bis Projektende für nachfolgende Experimente zur Effizienz der photodynamischen Lyse sowie für den Funktionsnachweis an MRSA (AP 6) verwendet. Während für *S. warneri* bei Testung von BLC2003 sowie der Kombinationen Ce6/KI und MB/KI keine Erhöhung der Anzahl Exo RPA-positiver Tröpfchen nach Bestrahlung gemessen werden konnte (nicht gezeigt), konnte für Exo RPA Reaktionen mit *P. syringae* Zellsuspensionen eine signifikante Erhöhung von Zielmolekülen nach photodynamischer Behandlung unter Verwendung von 5 μ M MB und 10 mM KI gezeigt werden (Abbildung 14).

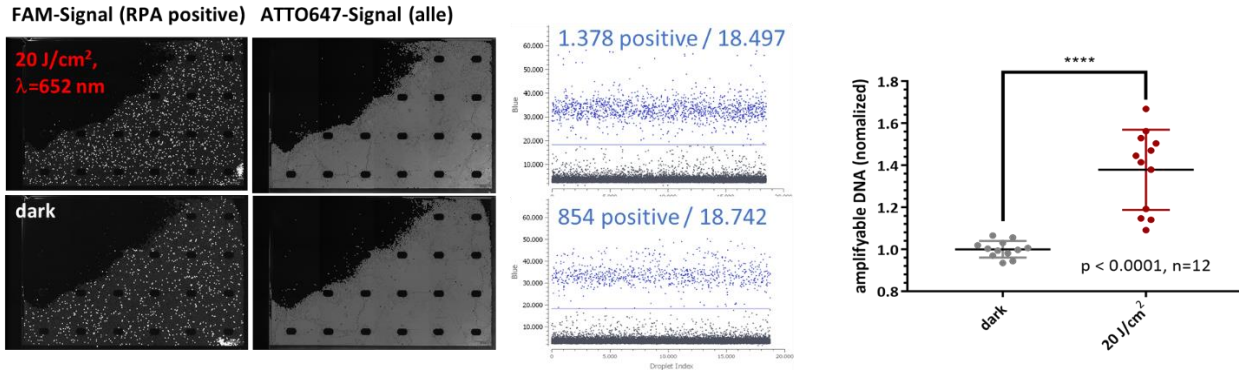


Abbildung 14: Digitale Exo RPA an *S. warneri* Suspensionen in Gegenwart von MB / KI (unbestrahlt vs. 20 J/cm², λ=652 nm). Links: Bilder repräsentativer Experimente bestrahlter (obere Reihe) vs. unbestrahlter Exo-RPA Reaktionen nach Vertropfung in Stilla Sapphire Kartuschen. Das linke Bildpaar zeigt die Fluoreszenzintensität des FAM Reporters, d.h. die RPA-positiven Tröpfchen sind hier hell dargestellt. Das rechte Bildpaar zeigt das Signal des Fluoreszenzfarbstoffs ATTO647, der in allen Tröpfchen präsent ist. Mitte: Auftragung der FAM-Fluoreszenzintensität einzelner Tröpfchen der im linken Bildpaar dargestellten Reaktionen im sogenannten „droplet plot“. Nach Festlegung eines Schwellenwerts in der Stilla Crystal Miner Software (blaue Linie) erfolgt die Definition Exo RPA-positiver Tröpfchen (blau). Rechts: normalisierte Darstellung amplifizierbarer DNA in der RPA unbestrahlter (grau) vs. bestrahlter (rot) Reaktionen.

Soll-Ist-Vergleich: Die digitale RPA mit photodynamischer Lyse konnte im DropChip etabliert werden. Die für eine Nutzung des Stilla Naica Systems erforderliche Anpassung des Vertropfungsprotokolls konnte erfolgreich durchgeführt und die digitale Exo-RPA etabliert werden. Die Reaktion nach photodynamischer Lyse zeigte auch in diesem Format eine signifikante Erhöhung der Ziel-DNA Menge im Vergleich zur Dunkelreaktion, wobei Effizienz und Reproduzierbarkeit des DNA-Freisetzungsprozesses für eine Routinenutzung des Verfahrens in diagnostischen Tests noch verbessert werden sollten.

2.1.6 AP 6: Photodynamische Lyse am humanpathogenen Keim MRSA (Monate 22-24)

Ziel: Photodynamische Lyse bewirkt vollständige Zugänglichkeit der Ziel-DNA von MRSA in Mikrokompartmenten in digitaler RPA.

Durchgeführte Arbeiten: Die Testung eines Protokolls für die photodynamische Lyse wurde im Rahmen eines digitalen Bplex Assays für die MRSA-Detektion unter Nutzung der Stilla Naica Plattform bei Unterauftragnehmer Hahn-Schickard durchgeführt. Der Assay wurde in Anlehnung an publizierte Vorarbeiten (doi: 10.1039/d0lc00294a) durchgeführt, wobei die Detektion des *vicK* Gens für die Identifizierung des Organismus durch Spaltung einer FAM-markierten Sonde angezeigt werden sollte, während die Resistenz durch die Spaltung einer TAMRA-markierten Sonde detektiert werden sollte. Die photodynamische Lyse sollte durch Ce6 (2 µM) und KI (10 µM) und einer

Lichtapplikation von 20 J/cm^2 ($\lambda=652 \text{ nm}$) erreicht werden. Die Quantifizierung der RPA-positiven Tröpfchen im direkten Vergleich der unbestrahlten vs. bestrahlten Reaktion zeigte keinen Unterschied, was darauf hindeutet, dass die Freisetzung der genomischen DNA aus den Bakterienzellen für die RPA-Reaktion nicht erfolgte.

Soll-Ist-Vergleich: Der Funktionsnachweis der photodynamischen Lyse im digitalen Exo-RPA Assay an MRSA konnte nicht erbracht werden.

2.2 Verwertung

Wie in 3.1 beschrieben wurden die Ergebnisse des Projekts in Präsentationen und Posterbeiträgen auf Kongressen der Öffentlichkeit vorgestellt und sollen in einem peer-reviewed Journal veröffentlicht werden (Einreichung geplant bis Ende 2024). Dies trägt zur Sichtbarkeit des ILM bei, was bei der Akquisition neuer Fördermittel für Anschlussprojekte (bspw. BMBF-Verbundprojekte) hilfreich ist. Für PhotoDynaLysis ist hier eine weitere Verbesserung des Protokolls zur photodynamischen Lyse erforderlich, um Reproduzierbarkeit und Effizienz des Verfahrens zu steigern. Die Akquisition von Folgeprojekten ist für 2025 geplant.

Abseits der Anwendung in isothermalen Nukleinsäurenachweisverfahren wie der RPA kann das Verfahren auch für einfachere Zwecke wie bspw. der Einschleusung markierter Moleküle in Zellen (bspw. für die Markierung von Mikroorganismen bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung [FISH]) genutzt werden. Da hier im Gegensatz zur digitalen Exo RPA keine komplexen enzymatischen Reaktionen nachfolgen, ist zu erwarten, dass die im Vorhaben erforschten Protokolle hier hinreichende Effizienz und Reproduzierbarkeit bieten und keine weitere aufwändige Optimierung erforderlich ist. Auch hier sollen Möglichkeiten der Zusammenarbeit mit Unternehmen und ggfs. Forschungseinrichtungen ab sofort evaluiert werden. Die Implementierung des Verfahrens in bestehende diagnostische Arbeitsabläufe könnte bspw. in Auftragsforschung, einem BMBF-Verbundprojekt oder einem ZIM-Projekt realisiert werden (ab ca. 2025). Eine Validierung kann im Erfolgsfall recht schnell (bis ca. 2027) durchgeführt werden, ebenso wie eine nachfolgende Produktentwicklung (bis ca. 2029).

Im Rahmen der erfolgreichen Anpassung der Exo-RPA-Reaktion an die Stilla Naica Plattform erfolgte ein wesentlicher Schritt hin zur Verwertung der im Vorhaben erforschten Technologie. Das Interesse des bisher auf die digitale PCR fokussierten Herstellers Stilla an einer Realisierung der Exo-RPA auf ihrer Analyseplattform wird aktuell erfragt.

2.3 Fortschritte und Ergebnisse Dritter

Es sind keine Forschungsergebnisse Dritter bekannt, die die Ergebnisse des Projekts betreffen oder ihrer Verwertung entgegenstehen.

3 Anhang

3.1 Veröffentlichungen

1. microTEC Südwest Clusterkonferenz 2022 (18.-19.05.2022, Freiburg) Vortrag: „Schaltbare Probenvorbereitung für Einzelzellanalysen in mikrofluidischen workflows“.
2. 5. Münchner POCT Symposium (27.-29.09.2022, München) Vortrag & Poster: “PhotoDynaLysis: Photoswitchable sample preparation for single cell analysis in automated digital assay workflows”.
3. Photodynamic Therapy and Photodiagnosis Update 2024 (16.-20.09.2024, Kochel am See) Vortrag: „Photodynamic disintegration of bacteria for single cell diagnostics”
4. Petra Kruse, Thomas Stegmayer, Michael Lehnert, and Rainer Wittig: “Photodynamic lysis of bacteria as a switchable sample preparation for single cell-resolved recombinase polymerase amplification in digital assay workflows”. Manuskript in Vorbereitung für Lab on a Chip (Journal der Royal Society of Chemistry, Impact Factor 6,1)

3.2 Schutzrechte

Es wurden keine Patente oder Gebrauchsmuster angemeldet.

Projektinformation

zum Vorhaben: Probenvorbereitung für Einzelzell-Diagnostik durch Photodynamische Lyse (PhotoDynaLysis)

Zuwendungsempfänger: Stiftung für Lasertechnologien in der Medizin und Meßtechnik an der Universität Ulm

Förderkennzeichen: 13N15459

Laufzeit des Vorhabens: 01.06.2021 – 31.03.2024

Der vorliegende Bericht ist zur Veröffentlichung bestimmt.

1 Projektziele

Ziel des Projekts war die Etablierung eines durch die Applikation von Licht schaltbaren, photodynamisch vermittelten Aufschlusses von Mikroorganismen (Gram-positive Bakterien, Gram-negative Bakterien, Pilze) für die nachfolgende Amplifikation von Gensequenzen mittels des Rekombinase Polymerase Amplifikationsverfahrens (RPA) in einem digitalen Assay-Format. Bis dato wurde dies durch die Verwendung eines lytischen Enzyms erzielt, welches die Zelle jedoch bereits vor Kompartimentierung des Reaktionsansatzes aufschließen kann. Dies kann zu falschen diagnostischen Ergebnissen führen.

2 Projektinhalte

Im Projekt wurden zunächst Modellorganismen identifiziert (Gram-positive Bakterien: *Staphylococcus warneri* DSM 20316; Gram-negative Bakterien: *Pseudomonas syringae* DSM 50252; Pilze: *Saccharomyces cerevisiae* Weinhefe Lalvin CY3079) und fluoreszenzbasierte Exo-RPA-Assays im Echtzeitmodus (Real-time Exo-RPA) etabliert (Arbeitspaket [AP] 1). Anschließend erfolgte die Konstruktion einer Bestrahlungseinheit mit den für die photodynamische Behandlung erforderlichen Wellenlängen sowie Dosis-Wirkungsstudien zur photodynamischen Inaktivierung (PDI) der Modellorganismen unter Verwendung unterschiedlicher Photosensibilisatoren (AP 2). Die für die photodynamische Lyse potentiell geeigneten Photosensibilisatoren wurden hinsichtlich ihrer Kompatibilität mit der Real-Time Exo-RPA in Abwesenheit und Gegenwart von Licht evaluiert (AP 3). In AP 4 erfolgte die Evaluierung der Effizienz des photodynamisch vermittelten Zellaufschlusses durch Vergleich des Real time Exo-RPA-Signals nach photodynamischer Lyse von Zellen vs. des Signals nach Amplifikation äquivalenter Mengen zellfreier genomischer DNA. Kompatible Lyseverfahren mit hoher Freisetzungseffizienz der Ziel-DNA wurden für die Etablierung eines Protokolls für die tröpfchenbasierte digitale Exo-RPA verwendet (AP 5). Das vielversprechendste Verfahren aus AP 5 wurde in AP 6 für den Konzeptnachweis an humanpathogenen Mikroorganismen in den Arbeitsablauf einer Bplex-RPA für die Identifizierung von Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA) integriert und funktionell evaluiert.

3 Ergebnisse

Für alle drei Testkeime konnten Exo-RPA Assays etabliert werden, welche reproduzierbar eine semiquantitative Bestimmung DNA-Menge in einer Probe ermöglichen. Die Bestrahlungseinheit wurde erfolgreich fertiggestellt und für PDI Dosis-Wirkungsstudien an den Modellorganismen verwendet. Es wurden Leistungsdichten von 200 mW/cm² und Energiedichten von 10-20 J/cm² unter Verwendung der Photosensibilisatoren BL2003, Chlorin e6 (Ce6), Methylenblau (MB) und Toluidinblau O

getestet. Ziel und Meilenstein des Projekts war die Etablierung eines PDI-Protokolls, das die Inaktiverung der Testorganismen um mindestens 4 Log-Stufen innerhalb von 5 Minuten ermöglichte. Dieses Ziel wurde unter Verwendung des Photosensibilisators BLC2003 bei einer Lichtdosis von 20 J/cm² ($\lambda=525$ nm) erreicht. In den Arbeitspaketen 3 und 4 zeigte sich, dass alle evaluierten Photosensibilisatoren konzentrationsabhängig zu einer leichten Hemmung der Effizienz der RPA-Reaktion führten, die durch Applikation von Licht verstärkt wurde. Durch die selektive photodynamische Behandlung einzelner Komponenten der RPA-Reaktion konnte demonstriert werden, dass insbesondere eine Schädigung der Enzyme und zu einem geringeren Maße die Schädigung von Sonde und Primern die Hemmung der Exo-RPA Reaktion bewirkte. Nach photodynamischer Behandlung von *S. warneri* Suspensionen mit BLC2003 und nachfolgender Zugabe der bestrahlten Probe zur Exo-RPA Reaktion konnte im Vergleich mit einer identisch behandelten unbestrahlten Probe gezeigt werden, dass die photodynamische Behandlung zu einem signifikant beschleunigten Fluoreszenzintensitätsanstiegs im Real-Time Exo-RPA Assay führte. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine photodynamisch vermittelte Freisetzung von Ziel-DNA aus den Bakterien zurückzuführen. Im digitalen Assay unter Verwendung der von UA-Nehmer Hahn-Schickard bereitgestellten DC24 dropchips konnte durch die Bestrahlung der Reaktion ebenfalls ein signifikanter Anstieg Exo-RPA positiver Tröpfchen gemessen werden. Effizienz und Reproduzierbarkeit des photodynamischen Verfahrens wurden jedoch entweder durch unvollständigen Bakterienaufschluss oder die Schädigung der Reaktionskomponenten. Um das Projektziel der Integration der photodynamischen Lyse in den Arbeitsablauf der digitalen Exo-RPA zu erreichen, erfolgte eine kostenneutrale Projektverlängerung sowie nachfolgend eine Aufstockung des Projekts. Hier wurden PDI-verstärkende Additive sowie Singulett-sauerstoffquencher hinsichtlich einer Verbesserung der photodynamischen Lyse im Exo-RPA Arbeitsablauf getestet, wobei insbesondere Kaliumiodid (KI) die PDI-Effizienz von Chlorin e6 und Methylenblau signifikant verstärkte. Im Rahmen der Aufstockung wurde auch die Beschaffung eines kommerziell verfügbaren Systems für digitale PCR (Stilla Naica 6) bewilligt, da UA-Nehmer Hahn-Schickard nicht in der Lage war, weitere benötigte DC24 dropchips für die Evaluierung der digitalen Exo-RPA bereitzustellen. Nach erfolgreicher Anpassung der Vertropfungsprotokolle der Stilla Naica 6 Plattform auf die Erfordernisse der Exo-RPA konnte eine Zunahme positiver Signale durch den photodynamischen Aufschluss von *P. syringae* mit Ce6 und KI demonstriert werden. Das Protokoll wurde im abschließenden Konzeptnachweis in der Biplex Exo-RPA bei UA-Nehmer Hahn-Schickard an MRSA getestet. Hier konnte jedoch kein eindeutiger Nachweis des erfolgreichen photodynamischen Aufschlusses von MRSA erzielt werden.

4 Nutzen bzw. Anwendungsmöglichkeiten der Ergebnisse

Die Projektergebnisse zeigen, dass eine durch Licht schaltbare Lyse von Bakterien im Arbeitsablauf der digitalen Exo-RPA grundsätzlich möglich ist. Effizienz und Reproduzierbarkeit des Verfahrens müssen jedoch durch nachfolgende Forschung deutlich verbessert werden, da eine verlässliche Diagnostik die RPA-kompatible Freisetzung der Zielsequenzen aus allen in der Probe befindlichen Bakterien erfordert. Abseits der Exo-RPA erscheint die photodynamische Permeabilisierung von Zellen insbesondere für solche Methoden der Zelldiagnostik attraktiv, die lediglich den Transport eines kleinen Moleküls in das Zellinnere erfordern (bspw. Fluoreszenz in situ Hybridisierung).