

Abschlussbericht DBU-Förderprojekt „Entwicklung molekularer Testverfahren zur Qualitätskontrolle und Prozesssteuerung eines innovativen Power-to-Gas Biokatalysators“

DBU-Aktenzeichen: 33474/01-32

Verfasser: Dr. Felix Popp, Dr. Carolin Pickl, Dr. Jennifer Flechsler, Prof. Dr. Andreas Klingl, Dr. Doris Hafenbradl

Firma/Institution: Electrochaea GmbH, LMU München (AG Prof. Dr. Andreas Klingl)

Projektbeginn: 06.12.2016, Laufzeit: 26 Monate

Planegg, Juli 2019

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	33474/01	Referat	32	Fördersumme	316.540 €
----	-----------------	---------	-----------	-------------	------------------

Antragstitel **Entwicklung molekularer Testverfahren zur Qualitätskontrolle und Prozesssteuerung eines innovativen Power-to-Gas Biokatalysators**

Stichworte Biologische Methanisierung, Power-to-Gas, Biokatalysator, Qualitätskontrolle, Genomanalyse, Archaeen, Ultrastruktur, Elektronenmikroskopie, PCR-Assay

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
26 Monate	06.12.2016	05.02.2019	1

Zwischenberichte Januar 2018

Bewilligungsempfänger	Electrochaea GmbH	Tel	+49 (89) 324936716
	Frau Dr. Doris Hafenbradl	Fax	+49 (89) 324936766
	Semmelweisstrasse 3	Projektleitung	Dr. Doris Hafenbradl
	82152 Planegg	Bearbeiter	Dr. Felix Popp, Dr. Karen Silva

Kooperationspartner Prof. Dr. Andreas Klingl
Biozentrum der LMU München
Dept. Biologie I – Pflanzliche Entwicklungsbiologie & Elektronenmikroskopie
Großhadernerstr. 2-4

82152 Planegg-Martinsried

Zielsetzung und Anlaß des Vorhabens

Zur Erreichung der aktuellen energiepolitischen Ziele Deutschlands ist es notwendig, die Nutzung und Speicherung erneuerbarer Energien verstärkt auszubauen. Hierbei könnte die biologische Methanisierung eine Schlüsselrolle spielen, da mit diesem Verfahren elektrischer Strom aus erneuerbaren Quellen wie z.B. Solar- oder Windenergie unter CO₂-Nutzung in den Energieträger Methan umgewandelt werden kann und die Speicherkapazitäten des bereits bestehenden Erdgasnetzes nahezu unbegrenzt sind. Die Electrochaea GmbH hat ein biologisches „Power-to-Gas“-Verfahren mit hohem Wirkungsgrad entwickelt, das zur Marktreife gebracht werden soll. Hierfür wird eine standardisierte Qualitätskontrolle des biologischen Katalysators benötigt, mit deren Hilfe jederzeit die Reinheit und biologische Integrität des eingesetzten Mikroorganismus (Stamm ECH0100) beurteilt werden kann. Bisher existierten jedoch keine Kenntnisse über spezifische Biomarker und mögliche zugehörige Testverfahren, die daher im Rahmen des vorliegenden Projektes entwickelt und validiert werden sollten.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Für die Entwicklung eines molekularen Testsystems wurde eine vergleichende bioinformatische Analyse durchgeführt zur Identifizierung genetischer Alleinstellungsmerkmale von ECH0100 gegenüber dem Wildtyp-Stamm (WT). Auf dieser Grundlage wurden genetische Marker ausgewählt, die durch Amplifikation mittels PCR und anschließender Sequenzierung nachgewiesen werden konnten.

Gleichzeitig wurde im Rahmen einer Transkriptomanalyse das spezifische Genexpressionsmuster von ECH0100 in Abgrenzung zum WT untersucht. In der AG Klingl wurden komplementär dazu vergleichende Analysen auf Proteomebene mittels Massenspektrometrie durchgeführt und die morphologischen Merkmale von WT und ECH0100 mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen verglichen. Die Ergebnisse aus allen vorgenannten Ansätzen flossen in die Entscheidung über die Auswahl von zwei charakteristischen Protein- sowie einem Zelloberflächen-Biomarker ein. Für letzteren konnten geeignete diagnostische Antikörper generiert, die Spezifität gegenüber verschiedenen Stämmen getestet und die Lokalisation der detektierten Biomarker mithilfe der Immunogold-Färbetechnik nachgewiesen werden (AG Klingl).

Abschließend wurde zur In-Prozesskontrolle des Biokatalysators ein molekulares Testverfahren auf PCR-Basis mit anschließendem Restriktionsverdau entwickelt und validiert (Electrochaea GmbH).

Ergebnisse und Diskussion

Als Grundlage für die Entwicklung eines molekularen Tests zur Feststellung der Stammidentität wurde das Genom vom ECH0100-Stamm mithilfe des PacBio-Verfahrens sequenziert. Die Größe des Genoms, der GC-Gehalt und die Anzahl der detektierten ORFs war vergleichbar mit der von zwei nahe verwandten Modellorganismen. Durch Alignments mit bereits vorhandenen Sequenzdaten des WT konnten 28 Basenvariationen detektiert werden, die im weiteren Verlauf des Projektes zur Entwicklung eines PCR-basierten Stammidentifizierungsassays herangezogen wurden.

Um Kandidaten für die Auswahl mehrerer Biomarker zu erhalten, die sich durch einen Antikörper spezifisch nur im ECH0100 nachweisen lassen würden, nicht jedoch im WT, wurde die spezifische Genexpression von WT und ECH0100 auf Transkriptomebene untersucht. Darüber hinaus wurde das Gesamtproteom der beiden Stämme analysiert und unter Heranziehung vielfältiger ultrastruktureller Techniken der Versuch unternommen, eindeutige zelluläre Marker zu identifizieren.

Die Analyse der Transkriptomdaten ergab, dass eine ganze Reihe von Genen, die direkt in die Methanogenese involviert sind, im ECH0100 hochtranskribiert sind im Verhältnis zum WT. Gleichwohl stellte sich heraus, dass kein Transkript im ECH0100 detektiert wurde, das ausschließlich dort vorhanden war und nicht im WT. Die Auswertung der massenspektrometrischen Daten wurde dadurch erschwert, dass keine eindeutige Zuordnung eines Proteins zu einer Gelbande gelang und nur selten Proteinfragmente identifiziert wurden, welche einzig im ECH0100-Datensatz detektiert wurden.

Für die Entwicklung des Antikörper-Assays wurden unter Zugrundelegung aller verfügbaren Ergebnisse zwei Proteintargets ausgewählt. Die Klonierung und Expression der Zielproteine, die für die Gewinnung von Antikörpern nötig gewesen wäre, verlief jedoch ergebnislos. Daher wurden durch Immunisierung mit ganzen Zellen zusätzlich Antikörper gegen unbekannte Oberflächenmarker von ECH0100 Zellen generiert, die den Biokatalysator spezifisch erkennen und gegen andere Methanogene abzugrenzen vermögen. Mittels SDS-PAGE wurde nachgewiesen, dass keine Reaktion gegen Gesamtzellextrakte nahe verwandter Organismen wie *M. marburgensis* oder *M. wolfei* erfolgt. Die Lokalisation der detektierten Biomarker auf der Zelloberfläche wurde mithilfe der Immunogold-Färbetechnik nachgewiesen. Eine Unterscheidung zwischen ECH0100 und dem WT war dagegen nicht möglich trotz mehrfacher Präzipitation des Serums gegen intakte WT-Zellen vor der eigentlichen Verwendung des Antikörpers.

Zum eindeutigen Nachweis von ECH0100 durch Abgrenzung vom WT-Stamm wurde deshalb ein Nachweis auf genetischer Ebene entwickelt, der auf die Detektion von sogenannten „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNPs) abzielt. Durch Amplifikation der entsprechenden Genabschnitte mittels PCR und anschließender Sanger-Sequenzierung konnte das Vorhandensein der charakteristischen DNA-Marker nachgewiesen werden. Um den Assay dahingehend zu vereinfachen, dass eine Auswertung ohne Sequenzierung der Basenfolge erfolgen kann, wurde ein Assay zum selektiven Restriktionsverdau an der Position des Basenaustauschs für vier verschiedene SNPs entwickelt. Die Auswertung erfolgt in diesem Fall direkt über die Analyse des Bandenmusters auf einem Agarosegel: das Vorhandensein der ECH0100-spezifischen DNA-Sequenz führt jeweils zur Spaltung der Amplikons in zwei Fragmente definierter Größe, während das Vorhandensein der WT-spezifischen Sequenz die Spaltung verhindert.

Nachdem der Assay für alle vier SNPs mithilfe von aufgereinigten Proben genomischer DNA etabliert worden war, wurde schließlich die Verwendung von Zellproben als Ausgangsmaterial für die Amplifikation der Genabschnitte getestet und die Zuverlässigkeit des Assays bewertet. Drei von vier in dieser Weise generierten Amplikons wurden während mehrfach wiederholter, unabhängiger Testreihen zuverlässig von dem eingesetzten Restriktionsenzym geschnitten. Der Restriktionsverdau der ECH0100 Amplikons aus Zellproben verlief häufig nur unvollständig, daher ist eine WT-Kontrolle bei jedem Testlauf miteinzuschließen, um eine eindeutige Abgrenzung zwischen ECH0100 und WT zu ermöglichen.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Die Forschungsarbeiten im Rahmen des Förderprojektes wurden regelmäßig bei der Präsentation der Firma beim Besuch von universitären und anderen Gruppen präsentiert und fanden stets Erwähnung bei Teilnahme an internationalen Konferenzen (Poster oder Präsentationen). Zudem wurden Teile der Arbeiten im Rahmen der KiKa-Produktion Erde an Zukunft dargestellt (<https://www.kika.de/erde-an-zukunft/sendungen/sendung11602.html>). Die Ergebnisse dieses Projektes sollen in Zukunft teilweise im Rahmen von Patentanmeldungen und wissenschaftlichen Publikationen verwertet werden.

Fazit

Der Nachweis des Biokatalysators zur Qualitätskontrolle im „Power-to-Gas“-Verfahren der Electrochaea GmbH und die dafür nötige Abgrenzung des ECH0100 Stammes vom WT konnte nicht auf Proteinebene erfolgen, sondern erfordert den Nachweis spezifischer genetischer Marker. Der dazu entwickelte PCR-Assay, der die kombinierte Testung von drei Biomarkern einschließt, erlaubt eine zuverlässige Aussage über die Stammidentität einer getesteten Zellprobe und wird zukünftig routinemäßig für den Nachweis von ECH0100 eingesetzt.

Inhaltsverzeichnis

Projektkennblatt	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Inhaltsverzeichnis	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	5
Abkürzungen.....	6
Zusammenfassung	7
Abschlussbericht	9
Zielsetzung des Projekts.....	9
Arbeitsplan und Methoden.....	9
Ergebnisse.....	10
1. Vergleichende bioinformatische Analyse.....	10
2. Entwicklung eines DNA-Testsystems für die Stammidentifizierung.....	11
3. Vergleichende mikroskopische Untersuchungen.....	22
4. Vergleichende Transkriptomanalyse.....	27
5. Massenspektrometrische Analyse zur Biomarkeridentifizierung.....	28
6. Rekombinante Herstellung der weiteren Proteine für die Immunisierung.....	31
7. Immunochemische Analysen mittels rabbit-anti-ECH0100 Antikörper (Ganzzellantikörper)	32
Diskussion und Fazit.....	38
Literatur	39

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Optimierung der Gelfärbung mittels GelRed	14
Abbildung 2 Temperaturgradienten-PCR für SNPb und SNPc mit getesteten Annealing-Temperaturen zwischen 55 °C und 70 °C.....	15
Abbildung 3 Untersuchung der Assay-Sensitivität	15
Abbildung 4 Restriktionsverdau SNPb PCR-Produkt.	16
Abbildung 5 Restriktionsverdau SNPc PCR-Produkt.....	17
Abbildung 6 Restriktionsverdau SNPe PCR-Produkt.....	17
Abbildung 7 Restriktionsverdau SNPf PCR-Produkt.	18
Abbildung 8 Verdau der SNPc Amplikons aus ECH0100 und WT Zellproben durch RE II	19
Abbildung 9 Restriktionsverdau SNPe PCR-Produkt aus Zellprobe	19
Abbildung 10 Mikroskopische Untersuchungen des WT (A, C, E, G) und des ECH0100 Stammes (B, D, F, G) mit verschiedenen Präparationsmethoden.....	23
Abbildung 11 Negativkontrastierungen von <i>M. thermautotrophicus</i>	24
Abbildung 12 Ultradünnschnitt von <i>M. thermautotrophicus</i>	25
Abbildung 13 Negativkontrastierung von auf Goldgrids gewachsenen <i>M. thermautotrophicus</i> Zellen.	25
Abbildung 14 Ultradünnschnitt einer chemisch fixierten <i>M. thermautotrophicus</i> Zelle (ECH0100) mit potentieller S-layer Struktur.	26
Abbildung 15 Negativkontrastierung einer Zellhülle von <i>M. thermautotrophicus</i> nach S-layer Isolationsprotokoll	27
Abbildung 16 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von ECH0100 (A) und Wildtyp (B) nach Aufschluss mittels Ultraschallbad und FastPrep24, Negativ Kontrastierung	28
Abbildung 17 Proteinbandenmuster einer 10% SDS-PAGE, Färbung: Coomassie;.....	29
Abbildung 18 Ergebnis PCR Blunt End Ansatz	31
Abbildung 19 Ergebnis PCR Sticky End Ansatz	31
Abbildung 20 Western Blot mit Ganzzellextrakt	33
Abbildung 21 Western Blot mit Ganzzellextrakt anderer Methanogener.....	34
Abbildung 22 Western Blot mit Ganzzellextrakt anderer Methanogener (2).	34
Abbildung 23 Immunmarkierung von ECH0100 Zellen nach Cryofixierung, Gefriersubstitution, Einbettung und Ultramikrotomie mit rabbit-anti-ECH0100 (affinitätsgereinigt)	36
Abbildung 24 Immunmarkierung von <i>M. wolfei</i> (Abb. A) und <i>M. marburgensis</i> (Abb. B) Zellen nach Cryofixierung, Gefriersubstitution, Einbettung und Ultramikrotomie mit rabbit-anti-ECH0100 (affinitätsgereinigt).....	37

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht Verdaureaktionen SNP-Amplikons	12
Tabelle 2 Auswertung der Restriktionsanalyse der SNP PCR-Produkte der Durchläufe 1-3.....	20
Tabelle 3 Morphologische Charakterisierung des Wildtyp- und des ECH0100 Stammes in logarithmischer und katalytischer Wachstumsphase.	22
Tabelle 4 Ergebnis der Auswertung (Auszug) der massenspektrometrischen Untersuchung der Proteinbanden bei 180, 200, 76 bzw. 74, 100, 50 und 34 kDa von ECH0100 (ECHO) und Wildtyp (WT) mittels MaxQuant, Darstellung der Gesamtintensität der einzelnen Peptide im Vergleich zur Gesamtintensität.....	30

Abkürzungen

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch <i>polymerase chain reaction</i>)
WT	Wildtyp
DNA	Desoxyribonukleinsäure (abgekürzt DNA für englisch <i>deoxyribonucleic acid</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese (Abkürzung für englisch <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP, engl. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
bp	Basenpaar
kDa	Kilodalton, atomare Masseneinheit

Zusammenfassung

„Power-to-Gas“ ist ein Verfahren, bei dem elektrischer Strom aus erneuerbaren Quellen in gasförmige Energieträger wie beispielsweise Methan oder Wasserstoff umgewandelt wird. Die Electrochaea GmbH hat mit ihrem BioCat-Verfahren ein biologisches Power-to-Gas-Verfahren mit hohem Wirkungsgrad entwickelt, das auf der Umwandlung von CO₂ und H₂ in CH₄ durch das proprietäre methanogene Archaeon ECH0100 basiert. Der „biologische Katalysator“ ECH0100 wurde ausgehend von einem Wildtyp-Stamm (WT) der Spezies *Methanothermobacter thermautotrophicus* ohne Gentechnik optimiert, und als Folge dieser Weiterentwicklung wandelt ECH0100 CO₂ und H₂ mit sehr hoher Effizienz in CH₄ um.

Die standardisierte Qualitätskontrolle des Biokatalysators ist eine wesentliche Anforderung an die Entwicklung und den Betrieb des Methanisierungsverfahrens im Großmaßstab. Um im Rahmen einer solchen Qualitätskontrolle eindeutig die Identität des kultivierten Mikroorganismus feststellen zu können, wurden zunächst die charakteristischen Merkmale analysiert, die den ECH0100- vom WT-Stamm unterscheiden. Dazu wurde die Genomsequenz der beiden Stämme miteinander verglichen und die spezifische Genexpression auf Transkriptomebene untersucht. Darüber hinaus wurde das Gesamtproteom der beiden Stämme analysiert und unter Heranziehung vielfältiger ultrastruktureller Techniken der Versuch unternommen, eindeutige zelluläre Marker zu identifizieren, die sich potenziell über einen Antikörper-basierten Assay nachweisen lassen.

Für die Entwicklung des Antikörper-Assays wurden unter Zugrundelegung aller verfügbaren Ergebnisse zwei Proteintargets ausgewählt. Die Klonierung und Expression der Zielproteine, die für die Gewinnung von Antikörpern nötig gewesen wäre, verlief jedoch ergebnislos. Daher wurden durch Immunisierung mit ganzen Zellen zusätzlich Antikörper gegen unbekannte Oberflächenmarker von ECH0100 Zellen generiert, die den Biokatalysator spezifisch erkennen und zumindest gegen nahe verwandte Organismen abzugrenzen vermögen. Eine Unterscheidung zwischen ECH0100 und dem WT war dagegen nicht möglich trotz mehrfacher Präzipitation des Serums gegen intakte WT-Zellen vor der eigentlichen Verwendung des Antikörpers.

Zum eindeutigen Nachweis von ECH0100 durch Abgrenzung vom WT-Stamm wurde deshalb ein Nachweis auf genetischer Ebene entwickelt, der auf die Detektion von sogenannten „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNPs) abzielt. Durch Amplifikation der entsprechenden Genabschnitte mittels PCR und anschließender Sanger-Sequenzierung konnte das Vorhandensein der charakteristischen DNA-Marker nachgewiesen werden. Um den Assay dahingehend zu vereinfachen, dass eine Auswertung ohne Sequenzierung der Basenfolge erfolgen kann, wurde ein Assay zum selektiven Restriktionsverdau an der Position des Basenaustauschs für vier verschiedene SNPs entwickelt. Die Auswertung erfolgt in diesem Fall direkt über die Analyse des Bandenmusters auf einem Agarosegel: das Vorhandensein der ECH0100-spezifischen DNA-Sequenz führt jeweils zur Spaltung der Amplikons in zwei Fragmente definierter Größe, während das Vorhandensein der WT-spezifischen Sequenz die Spaltung verhindert.

Nachdem der Assay für alle vier SNPs mithilfe von aufgereinigten Proben genomischer DNA etabliert worden war, wurde schließlich die Verwendung von Zellproben als Ausgangsmaterial für die Amplifikation der Genabschnitte getestet und die Zuverlässigkeit des Assays bewertet. Drei von vier in dieser Weise generierten Amplikons wurden während mehrfach wiederholter, unabhängiger Testreihen zuverlässig von dem eingesetzten Restriktionsenzym geschnitten und die kombinierte Testung der drei verbleibenden Biomarker wird zukünftig routinemäßig für den Nachweis der Stammidentität eingesetzt.

Abschlussbericht

Zielsetzung des Projekts

Der von der Electrochaea GmbH (EC) in ihrem industriellen „Power-to-Gas“-Prozess als Biokatalysator verwendete, proprietäre Stamm ECH0100 wurde durch Kultivierung unter selektiven Wachstumsbedingungen aus dem Wildtyp-Stamm (WT) *Methanothermobacter thermautotrophicus* DSM3590 gezüchtet und unterscheidet sich von diesem auf physiologischer, wie auch auf molekularer Ebene. Die standardisierte Qualitätskontrolle von ECH0100 ist eine wesentliche Anforderung an die Entwicklung und den Betrieb des Methanisierungsverfahrens im Großmaßstab und damit entscheidend für eine erfolgreiche Kommerzialisierung der biologischen Methanisierung. Für eine standardisierte Qualitätskontrolle muss die Identität und biologische Integrität des kultivierten Stammes jederzeit beurteilt werden können. Ziel des von der DBU geförderten Forschungsprojektes war die Entwicklung eines einfachen Biomarker-basierten Testsystems, das sowohl zur internen Qualitätskontrolle des Biokatalysators herangezogen werden kann als auch zur eindeutigen Stammidentifizierung etwa im Falle einer Patentverteidigung.

Arbeitsplan und Methoden

Zur Erreichung dieses Ziels sollte der ECH0100-Stamm auf verschiedenen molekularen Ebenen analysiert und mit dem WT verglichen werden: zum einen auf der DNA-, Transkriptom- und Proteom-Ebene, zum anderen mittels einer mikroskopischer Techniken auf der ultrastrukturellen Ebene.

Die Identifizierung spezifischer DNA-Sequenzmerkmale von ECH0100 in Arbeitspaket 1.1 war Grundbedingung für die Entwicklung und Validierung eines DNA-basierten Qualitätstests in den folgenden Arbeitspaketen 1.3, 1.4. Die DNA-Sequenz selbst und die darin gespeicherte Information eigneten sich jedoch nicht dazu, um ohne Weiteres Rückschlüsse auf funktionelle, physiologische Konsequenzen dieser Merkmale zu ziehen. Im Rahmen einer Transkriptomanalyse wurden daher ECH0100-spezifische Eigenschaften ermittelt (WP 1.2). Diese Analyse erlaubte zudem die Vorauswahl spezifischer Proteinbiomarker für die Entwicklung eines Testsystems für die In-Prozesskontrolle von ECH0100.

Die Analyse der Proteinexpressionsmuster sowie deren Lokalisation im Organismus und Elektronenmikroskopische Untersuchungen (EM) der Morphologie waren weitere, unabhängige Methoden, um zusätzliche Anhaltspunkte für die Auswahl der Proteinmarker zu erhalten und um zusätzliche Alleinstellungsmerkmale von ECH0100 zu definieren (WP 2.1, 2.2, 2.5). Diese sollten die Basis bilden für die Entwicklung eines einfach handhabbaren Testsystems zur Überwachung von Produktionsprozessen. Für den einfachen und spezifischen Nachweis der Biomarker wurden Antikörper generiert und in der AG Klingl mittels Western Blot und Immunolokalisation getestet (WP 2.4, 2.5). Im Electrochaea-Labor sollte anschließend die Entwicklung des Biomarker-basierten Assays stattfinden als auch die weitere Optimierung für den Einsatz in der In-Prozess-Kontrolle des Biokatalysators statt (WP 2.6, 2.7).

Ergebnisse

1. Vergleichende bioinformatische Analyse

Im Rahmen des WP 1.1 wurde eine umfangreiche bioinformatische Analyse der genomischen Sequenz des proprietären ECH0100-Stammes durchgeführt. Ein wichtiger erster Schritt und Voraussetzung für alle nachfolgenden Analysen war hierbei die Erstellung einer vollständigen, zirkulären Genomsequenz. Anschließend wurde das Genom annotiert und durch Mapping bereits vorhandener Sequenzdaten konnten genetische Varianten im Vergleich zum WT analysiert werden.

1.1. Sequenzierung des ECH0100 Genoms (PacBio-Verfahren)

Als Grundlage für alle weiteren Arbeiten wurde eine Sequenzierung des Gesamtgenoms des ECH0100-Stammes durchgeführt. Die Sequenzierung wurde mithilfe des PacBio-Verfahrens von einem externen Dienstleister (GATC Biotech, Konstanz) erstellt und beinhaltet die bereits assemblierte, jedoch noch lineare Genomsequenz, sowie deren automatische Annotation. Die Größe des ECH0100-Genoms beträgt etwa 1,715 Mb und ist damit etwa 80 kb größer als die bereits öffentlich verfügbare Genomsequenz des nahverwandten Stammes *Methanothermobacter marburgensis* (NC_014408), sowie etwa 35 kb kleiner als die Genomsequenz des zweiten gut untersuchten *Methanothermobacter*-Stammes *Methanothermobacter thermoautotrophicus str. Delta H* (AE000666). Der GC-Gehalt liegt durchschnittlich bei 48,8% und ist damit fast identisch mit den Werten der anderen beiden Modellorganismen. Auch die Anzahl der detektierten ORFs liegt mit 1752 nahe bei der Zahl der vorhergesagten Gene in *M. marburgensis* (1719) und *M. thermoautotrophicus str. Delta H* (1819).

Die vom Dienstleister bereitgestellte genomische Sequenz war zunächst noch linear und ließ sich nicht durch einfachen Zusammenschluss zu einem zirkulären Chromosom zusammenfügen. Durch intern im Hause EC erstellte manuelle Alignments mit bereits vorhandenen Sequenz-Datensätzen konnte jedoch ein Ringschluss der genomischen Sequenz hergestellt werden.

1.2. Annotation des Genoms

Nach Abschluss der Zirkularisierung wurden die fehlenden Annotationen im Bereich des Ringschlusses von einem ECH0100-Vorgängerstamm übertragen, dessen Genom zuvor durch unseren amerikanischen Kooperationspartner Prof. Laurens Mets annotiert worden war.

Als generelle Qualitätskontrolle der Annotationen wurden stichprobenartig 26 über das komplette Genom verteilte ORFs ausgewählt (rund 1.5% der Gesamtanzahl) und hinsichtlich eines korrekten Leserahmens, sowie vor allem der funktionellen Annotation einzeln überprüft. Dieser Schritt erfolgte insbesondere anhand von BLAST-Suchanfragen und Abgleichen mit der Uniprot-Datenbank, und alle untersuchten 26 Gene erfüllten die erforderlichen Qualitätskriterien.

Die Gesamtheit der als hypothetisch eingestuften Gene wurden zudem mittels BLAST-Suchen genauer überprüft. Sofern keine auf Ähnlichkeit beruhende Annotation durch Detektion eines homologen Proteins möglich war, wurde bei der Benennung der Gene, soweit charakteristische funktionelle Domänen vorhanden waren, zumindest auf jene Bezug genommen. Trotz

manueller Inspektion aller ORFs, konnte schlussendlich für 35% der Sequenzen keine andere Funktion als die eines hypothetischen Gens bestimmt werden.

1.3. Variantenanalyse im Vergleich zum WT

Auf Grundlage der nun verfügbaren Referenzsequenz wurden Nukleotidvarianten des ECH0100-Stammes im Vergleich zum WT-Ausgangsstamm DSMZ3590 identifiziert. Dazu wurden in einem Mapping-Prozess die bereits verfügbaren Illumina-Sequenzdaten des WT-Genoms auf der ECH0100-Referenzsequenz in den Bereichen größtmöglicher Sequenzübereinstimmung lokalisiert und anschließend die an einzelnen Basen oder längeren Abschnitten auftretenden Unterschiede analysiert. Hierbei wurden vor allem Austausch an einer einzelnen Base detektiert, sogenannte „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNPs) oder Deletionen und Insertionen einzelner Basen (mehrheitlich SNPs, daher im Folgenden der Einfachheit halber zusammenfassend generell als „SNPs“ bezeichnet).

Insgesamt wurden 28 SNPs detektiert, die mit hoher Frequenz in ECH0100 auftraten (>84%). Für alle weiteren Basenvariationen, die im Gegensatz zu den 28 SNPs in deutlich geringerer Häufigkeit vorkamen, konnte durch Abgleich der WT- und ECH0100-Illumina Datensets gezeigt werden, dass jene konstant in nahezu unveränderter Frequenz sowohl im WT als auch im ECH0100 anzutreffen sind. Aus diesem Grund eignen sie sich nicht als molekulares Unterscheidungsmerkmal zwischen WT und ECH0100, lassen zudem keine Rückschlüsse auf veränderte physiologische Eigenschaften der beiden Stämme zu und wurden daher nicht weiter betrachtet.

Da die untersuchten Variationen häufig auf wenige Nukleotidbasen begrenzt waren, zielte die anschließende Entwicklung des DNA-Testsystems auf die spezifische Überprüfung der Basensequenz an der Position der SNPs ab und konnte nicht über den Nachweis der Gegenwart oder Abwesenheit eines längeren DNA-Abschnitts erfolgen.

2. Entwicklung eines DNA-Testsystems für die Stammidentifizierung

Um eine eindeutige Stammidentifizierung auf genetischer Ebene sicherzustellen sollten im Rahmen des Förderprojektes für mehrere Nukleotidvarianten Testverfahren entwickelt werden, die es ermöglichen den EC-eigenen Stamm ECH0100 vom WT abzugrenzen. Zur spezifischen Überprüfung der Basensequenz an den SNP-Positionen wurden PCR-basierte Verfahren angewendet, die auf einer Amplifikation der entsprechenden Genom-Regionen mittels spezifischer Primer beruhen mit einer anschließenden Sequenzierung oder Verdaureaktion des PCR-Amplikons.

Zuerst wurden vier SNPs ausgewählt (SNPa, SNPb, SNPc, SNPd), deren Vorhandensein mithilfe des Testsystems überprüft werden sollte. SNPa, SNPc und SNPd betreffen jeweils ein hypothetisches Protein und rufen eine Veränderung des Leserahmens hervor. Dies führt zum vorzeitigen Abbruch der Transkription (SNPa) oder zu einem am N-Terminus verkürzten Protein (SNPc und SNPd; unter (postulierter) Verwendung eines stromabwärts gelegenen alternativen Startcodons). SNPb betrifft ein potenziell in zentrale Stoffwechselforgänge involviertes Enzym, und hat durch Einführung eines zusätzlichen Stoppcodons ein am N-Terminus um 21 Aminosäuren verkürztes Protein zur Folge.

Alle entsprechenden PCR-Reaktionen wurden parallel jeweils mit ECH0100- und WT-DNA als Ausgangsmaterial durchgeführt und durch konventionelle Sanger-Sequenzierung analysiert. Hierbei konnten alle erwarteten Basenaustausche, Deletionen und Insertionen bestätigt werden. Somit konnte ein erster tragfähiger Assay etabliert werden, der eindeutige Rückschlüsse auf die Stammidentität zulässt.

2.1. Entwicklung PCR-RFLP Assay

Nachdem mittels PCR-Amplifikation und anschließender Sequenzierung ausgewählter Genombereiche der Nachweis der Stammidentität durch die Detektion spezifischer Nukleotidvariationen erfolgreich demonstriert werden konnte, wurde im Anschluss nach praktikablen Alternativen zu diesem Verfahren gesucht, da sich die Sequenzierung der SNP-Amplikons relativ zeit- und kostenaufwendig gestaltet.

Eine Möglichkeit das bisherige Verfahren zu vereinfachen haben wir in der Durchführung selektiver Restriktionsverdau-Reaktionen an der Position der Basenvariation gesehen, um ohne weitere Sequenzierung des Amplikons direkt eine Aussage über das Vorhandensein der Nukleotidvariationen zu ermöglichen.

Wie bei dem klassischen Verfahren muss hierfür zunächst der entsprechende Bereich der genomischen DNA amplifiziert werden, um anschließend eine Aussage über die vorliegende Basensequenz treffen zu können. Eine weitere Voraussetzung für das alternative Verfahren ist das Vorhandensein einer Restriktionsenzym-Erkennungssequenz ausschließlich im WT oder im ECH0100, die auf der Basenvariation beruht. Ziel dieses auch als PCR-RFLP oder CAPS Assay (Akopyanz, Bukanov, Westblom, & Berg, 1992; Berg, 2012; Konieczny & Ausubel, 1993) bekannten Verfahrens ist das spezifische Fragmentmuster nach einem Restriktionsverdau auf einem Agarose-Gel sichtbar machen zu können.

Tabelle 1 Übersicht Verdaureaktionen SNP-Amplikons

	SNPb	SNPc	SNPe	SNPf
Größe des Amplikons	317 bp	328 bp	924 bp	514 bp
Verwendetes Restriktionsenzym	RE I	RE II	RE III	RE IV
Inkubationstemperatur	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Inkubationsdauer	2 h	2 h (od. über Nacht)	2 h	2 h
Sequenz ECH0100 5'...3' *	NN A NNN	NNNN-NN	NNNNNNNN T NN	NN A NNN
Sequenz WT 5'...3' *	NN C NNN	NNNN A NN	NNNNNNNN G NN	NN G NNN
Anzahl d. Fragmente nach Verdau	2	2	2	2
Fragmentgrößen	209 bp + 112 bp	167 bp + 163 bp	523 bp + 404 bp	416 bp + 102 bp
Verdau des WT Amplikons	-	-	-	-

* Die für die differentiellen Verdaureaktionen im ECH0100 und WT kritischen Nukleotidbasen sind jeweils **fett** markiert.

Für zwei der zuvor etablierten PCR-Assays (SNPb und SNPc) wurden selektiv schneidende Restriktionsenzyme identifiziert und die ersten Verdaureaktionen zeigten überwiegend vielversprechende Ergebnisse. Um ein breiteres Spektrum der charakteristischen Basenaustausche abzubilden, wurden zusätzlich zu den beiden bereits getesteten Amplikons weitere Primer zur Amplifikation der genomischen Sequenzen im Bereich von SNPe und SNPf design, deren spezifische Basenabfolge sich ebenfalls durch differentiellen Restriktionsverdau nachweisen lassen sollte. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Länge der amplifizierten DNA-Abschnitte und über die verwendeten Restriktionsenzyme sowie die Größe der resultierenden Fragmente nach erfolgtem Verdau.

Für alle vier PCR-Reaktionen wurde zunächst die Visualisierung der Fragmente mittels Gelelektrophorese verbessert und die Reaktionsbedingungen dahingehend optimiert, die Interpretierbarkeit der Ergebnisse zu erleichtern. Anschließend wurde der Restriktionsverdau in unterschiedlichen Puffersystemen und über verschiedene Inkubationsdauern getestet. Schließlich wurde die Verwendung von nicht speziell aufgereinigter DNA direkt aus Reaktorproben als Template erprobt und insgesamt die Zuverlässigkeit des entwickelten Protokolls bewertet.

2.1.1. Optimierung der Visualisierung mittels Gelelektrophorese

Zu Beginn dieser Arbeit konnte aufgrund mangelhaft gefärbter Gele nicht immer festgestellt werden, ob eine PCR oder Verdaureaktion erfolgreich stattgefunden hatte. Die Optimierung der Färbemethode war zudem erforderlich, um den zur Auswertung der Restriktionsanalyse nötigen Nachweis deutlich kleinerer Fragmente zu ermöglichen.

Das ursprüngliche im Labor verwendete Protokoll sah vor, die Gele im Anschluss an die Gelelektrophorese für 0,5-1 h in einer Färbelösung zu färben, diese Färbung erzeugte jedoch nur schwach sichtbare Banden. Bei einer Verlängerung der Einwirkzeit wurde zwar die Intensität der Banden verstärkt, allerdings diffundierten die Banden zunehmend und die Restriktionsanalyse konnte daher mit dieser Methode nicht erfolgen.

Alternativ wurde eine zweite Methode getestet, die durch Zugabe des Farbstoffs zum flüssigen Gel deutlich hellere Banden erzeugt. Allerdings wirkte sich diese Art der Färbung auf die Mobilität der Banden aus und verglichen zur ursprünglichen Methode liefen die Banden desselben Fragments höher und die Banden des Längenstandards ließen sich nicht ausreichend auftrennen. Trotz Verbesserungsmaßnahmen konnten dieser Effekt nicht völlig ausgeschlossen werden und daher war keine verlässliche Interpretation der Fragmente möglich.

Bei der dritten getesteten Methode nach Huang et al. (2010) wurde das für die Färbung eingesetzte GelRed direkt mit den aufzutragenden Proben gemischt und diese Methode lieferte schließlich die zuverlässigsten Ergebnisse. Um den Einfluss der GelRed Konzentration auf das Färbe- und Laufverhalten der Proben zu untersuchen, wurde der Ladepuffer mit 10- oder 100-fach konzentriertem (100x) GelRed gefärbt, der dann vor der Gelelektrophorese zu den Proben und dem Marker pipettiert wurde.

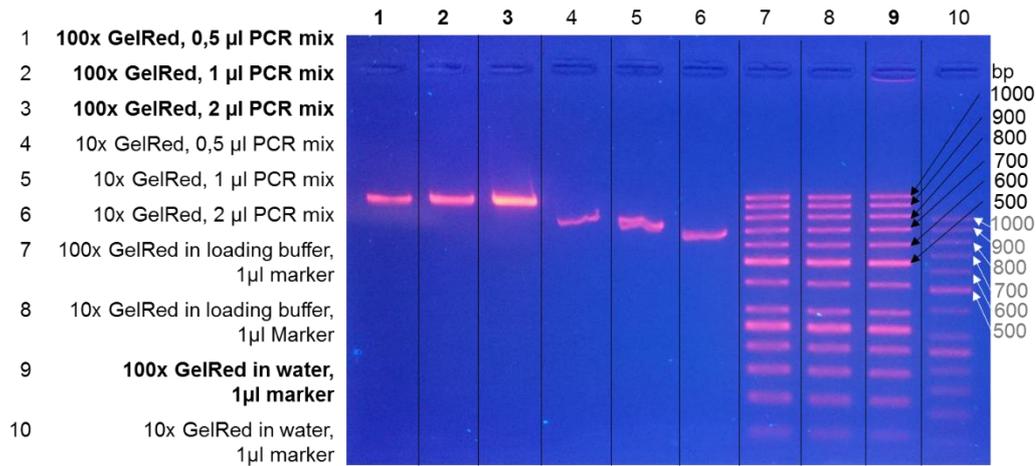


Abbildung 1 Optimierung der Gelfärbung mittels GelRed. 10x und 100x konzentrierte GelRed Lösung wurde zur Färbung verschiedener Volumina eines PCR-Amplikons bzw. des Markers eingesetzt, um die Abhängigkeit des Laufverhaltens von den eingesetzten Konzentrationen zu beurteilen.

Diese Methode führte insgesamt zu intensiv gefärbten Banden hoher Intensität, die bei Verwendung des 100-fach konzentrierten Farbstoffs ein einheitliches Laufverhalten zeigten (Abb. 1). Bei Verwendung des weniger konzentrierten Farbstoffs (10x GelRed) war hingegen die Laufhöhe von der aufgetragenen DNA-Menge abhängig und mit zunehmender DNA-Menge vergrößerte sich die Laufstrecke. Um diesem Effekt entgegenzuwirken und eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen, wurde im weiteren Verlauf des Projektes ausnahmslos die Färbung der aufzutragenden mit 100x konzentriertem GelRed verwendet.

2.1.2. Optimierung PCR-Reaktionsbedingungen

Grundsätzlich wurde zunächst versucht ein gemeinsames Protokoll mit gleichen Versuchsbedingungen für alle PCR-Reaktionen zu entwickeln, so dass alle Assays gleichzeitig durchgeführt werden können. Zu Beginn wurde hierfür aus WT- und ECH0100-Zellen DNA extrahiert und photometrisch die Konzentration der erhaltenen Präparationen bestimmt. Daraufhin wurde in einem ersten Schritt experimentell die Templatmenge bestimmt, die die besten Ergebnisse lieferte. Dies war unter Verwendung von 10-20 ng DNA der Fall, wobei teilweise auch deutlich geringere oder höhere Konzentrationen eine erfolgreiche Amplifikation der Templates ermöglichte. Alle Primerkombinationen lieferten Fragmente der erwarteten Größe (s. Tabelle 1).

Um die Bildung von Artefakten zu vermeiden wurde die Elongationszeit so weit wie möglich verringert, ohne die Amplifikation des längsten Amplikons (SNPe PCR) zu beeinträchtigen. Um die insgesamt für die Amplifikation benötigte Zeit so gering wie möglich zu halten, wurden ebenfalls die Denaturierungsdauer pro Zyklus und die initiale Denaturierung verkürzt, was zu erheblichen zeitlichen Einsparungen führte. Zur Erhöhung der Ausbeute und der Stringenz der PCR wurde eine Temperaturgradienten-PCR für alle Primer durchgeführt. Exemplarisch ist in Abbildung 2 das Ergebnis für SNPb und SNPc gezeigt. Im Fall von SNPb lieferte die Amplifikation bei 55 °C die größtmögliche Ausbeute, im Gegensatz dazu war im Falle von SNPc die Ausbeute bei 70 °C maximal. Die experimentell bestimmten idealen

Reaktionsbedingungen wurden anschließend für alle Reaktionen im Standardprotokoll übernommen.

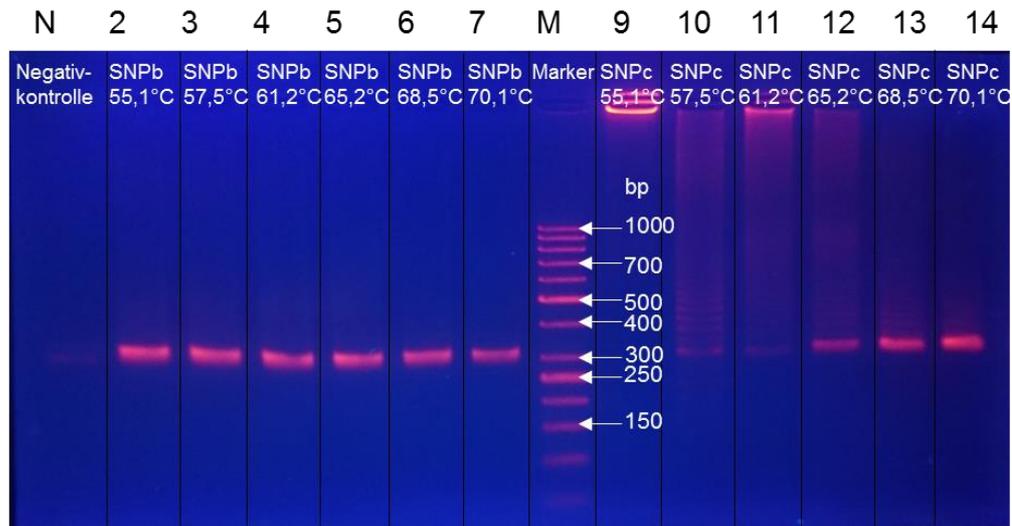


Abbildung 2 Temperaturgradienten-PCR für SNPb und SNPc mit getesteten Annealing-Temperaturen zwischen 55 °C und 70 °C

Um die Spezifität der PCR-Reaktionen weiter zu erhöhen, wurde für alle Assays ein Touchdown-Programm etabliert, soweit die ermittelte ideale Annealing-Temperatur dies erlaubte. Dieses Programm sah ein Absinken der Annealing-Temperatur um 1 °C pro Zyklus vor, bevor eine weitere Amplifikation über mehrere Zyklen bei der finalen Elongationstemperatur erfolgte.

Unter Verwendung des nun festgelegten PCR-Protokolls wurde die Sensitivität der Assays untersucht, indem eine Verdünnungsreihe des DNA-Templates angefertigt wurde. Die ursprüngliche Konzentration des unverdünnten DNA-Templates wurde photometrisch bestimmt und betrug 547 ng/μl. Von dieser DNA-Lösung wurde eine 1:10, 1:50 und 1:100 Verdünnung hergestellt, und diese Lösungen wurden jeweils als Template für einen PCR-Ansatz mit den unterschiedlichen Primerkombinationen verwendet (Abb. 3).

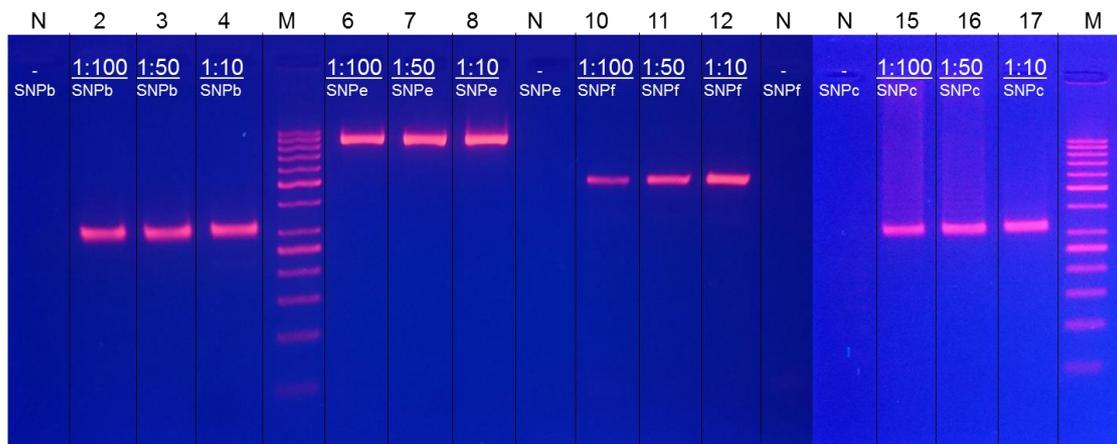


Abbildung 3 Untersuchung der Assay-Sensitivität. Verwendung unterschiedlicher Verdünnungen (1:10, 1:50 und 1:100) einer 547 ng/μl Ausgangs-DNA-Lösung als PCR-Template.

Bei drei der verschiedenen Assays (SNPb, SNPf, SNPe) wurden gleichbleibend verlässliche Ergebnisse erzielt unabhängig von der eingesetzten Templatemenge. Lediglich im Falle des SNPf-Assays sank die Amplikonausbeute mit ansteigender Verdünnung des Templates. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden standardmäßig etwa 5 ng genomische DNA für alle weiteren Experimente als Template für die Positivkontrolle verwendet, lediglich für die SNPf-PCR wurden standardmäßig etwa 50 ng Template eingesetzt.

2.1.3. Restriktionsverdau der PCR-Amplikons: Testung und Optimierung

Im Anschluss an die Optimierung des Amplifikationsprotokolls wurden die ausgewählten Restriktionsenzyme dahingehend getestet, ob sie die mit ECHO100-DNA erzeugten Amplikons entsprechend der Erwartungen spezifisch schneiden, nicht jedoch die WT-Amplikons, die unverdaut bleiben sollten (s. Tabelle 1).

Eine Reihe von Vorversuchen ergab, dass für die verlässliche Restriktion die Aufreinigung der PCR-Amplikons notwendig war. Hierzu wurden zunächst verschiedene Aufreinigungs-Kits getestet. Der Vergleich der Kits ergab, dass alle getesteten Produkte zu einem vergleichbaren Ergebnis führten und daher wurde fortan das Kit mit den geringsten Anschaffungskosten verwendet.

Alle Verdaureaktionen wurden zunächst mit Amplikons getestet und optimiert, zu deren Herstellung aufgereinigte genomische DNA als PCR-Matrize verwendet wurde. In einem zweiten Schritt wurden die etablierten Verdaureaktionen dann mit Amplikons getestet, die unter Verwendung nicht-aufgereinigter Zellproben erzeugt worden waren (siehe Abschnitt 2.1.4.).

Die Restriktionsverdau des SNPb PCR-Produktes mit RE I ergab eine Aufspaltung des mit ECHO100 DNA erzeugten Amplikons, erwartungsgemäß in zwei Fragmente von 209 bp und 112 bp Länge (Abb. 4). Im Falle des mit WT DNA erzeugten Amplikons blieb die Spaltung dagegen aus und die Länge des detektierten Fragmentes entsprach der Größe des PCR-Produktes.

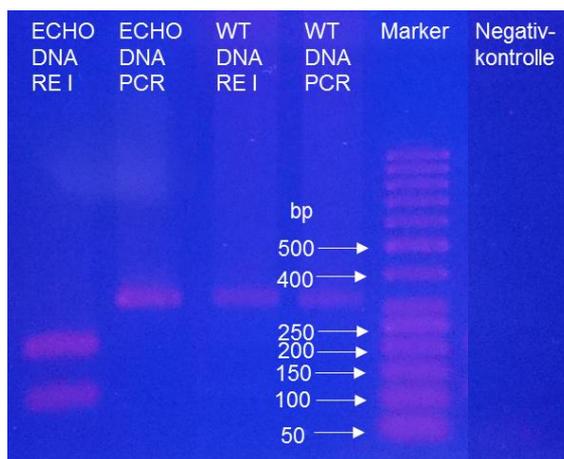


Abbildung 4 Restriktionsverdau SNPb PCR-Produkt. Das ECHO100- und WT-Amplikon wurde für 2h mit RE I inkubiert und anschließend auf ein 2,5%iges Agarose-Gel aufgetragen, ebenso eine Negativkontrolle und jeweils das unbehandelte PCR Amplikon. Der verwendete Marker war die GeneRuler 50 bp DNA Ladder von Thermo Fisher.

Analog zum Verdau des SNPb Amplikons erfolgte der Restriktionsverdau des SNPc PCR-Produktes durch RE II (Abb. 5). Das ECH0100 Amplikon wurde durch RE II in zwei fast identisch große, und durch konventionelle Gelelektrophorese schlecht voneinander auftrennbare Fragmente von 167 bp und 163 bp Größe geschnitten. Im Gegensatz dazu blieb das WT Amplikon intakt und wies nach Inkubation mit RE II die gleiche Größe auf wie das unbehandelte PCR-Produkt (328 bp).

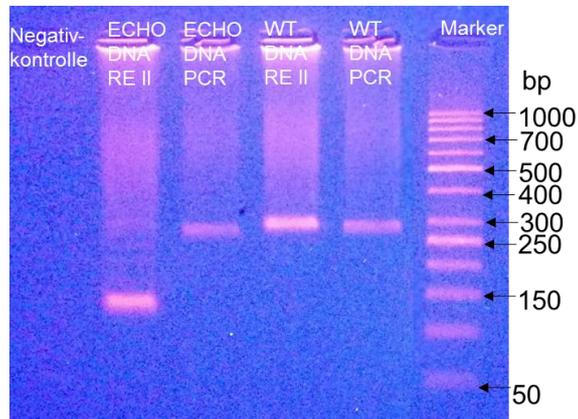


Abbildung 5 Restriktionsverdau SNPc PCR-Produkt. Das ECH0100- und WT-Amplikon wurde für 2h mit RE II inkubiert und anschließend auf ein 2,5%iges Agarose-Gel aufgetragen, ebenso eine Negativkontrolle und jeweils das unbehandelte PCR Amplikon. Der verwendete Marker war die GeneRuler 50 bp DNA Ladder von Thermo Fisher.

In manchen Fällen war der Verdau des SNPc PCR-Produktes durch RE II unvollständig. Da der Großteil der Tests nach 2 h ein eindeutig zu interpretierendes Ergebnis lieferte, wurde für das Standardprotokoll eine Inkubationszeit von 2 h festgelegt. Mittels einer Zeitreihe konnte zudem gezeigt werden, dass eine Inkubation über Nacht einen vollständigen Verdau ermöglicht. Bei zweifelhaften Ergebnissen kann daher der Restriktionsverdau wiederholt und die Inkubation über Nacht durchgeführt werden.

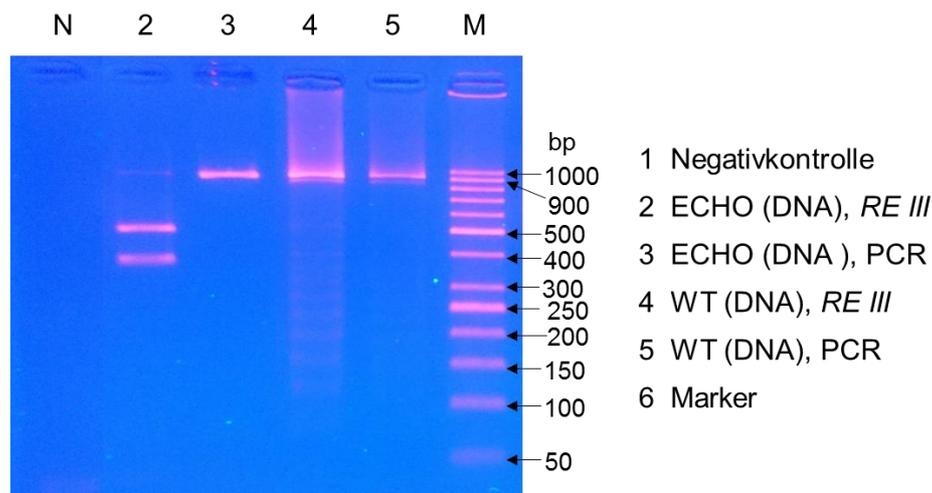


Abbildung 6 Restriktionsverdau SNPc PCR-Produkt. Das ECH0100- und WT-Amplikon wurde für 2h mit RE III inkubiert und anschließend auf ein 2,5%iges Agarose-Gel aufgetragen, ebenso eine Negativkontrolle und jeweils das unbehandelte PCR Amplikon. Der verwendete Marker war die GeneRuler 50 bp DNA Ladder von Thermo Fisher.

Der Verdau der SNPc Amplikons ergab im Falle der ECH0100 Probe erwartungsgemäß zwei Fragmente von 523 bp und 404 bp Größe, im Falle der WT-Probe blieb das Amplikon stets

unverdaut (Abb. 6). Gelegentlich war der Restriktionsverdau des ECHO100 Amplikons unvollständig. Aus diesem Grund wurde eine Verlängerung der Inkubationsdauer getestet (4 h und über Nacht), was in diesem Fall jedoch keine Verbesserung des Ergebnisses bewirkte und daher nicht in das Standardprotokoll aufgenommen wurde.

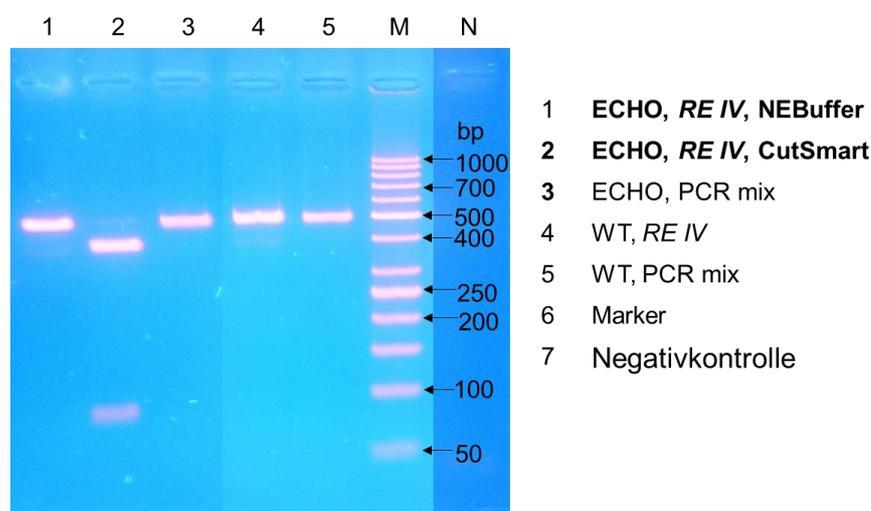


Abbildung 7 Restriktionsverdau SNPf PCR-Produkt. Das ECHO100- und WT-Amplikon wurde für 2h mit RE IV inkubiert und anschließend auf ein 2,5%iges Agarose-Gel aufgetragen, ebenso eine Negativkontrolle und jeweils das unbehandelte PCR Amplikon. Der verwendete Marker war die GeneRuler 50 bp DNA Ladder von Thermo Fisher.

Der Verdau des SNPf PCR-Produktes mit RE IV wurde wie vom Hersteller empfohlen zunächst im NEBuffer 3.1 durchgeführt, doch hierbei blieb sowohl das WT- als auch das ECHO100-Amplikon unverdaut und eine Inkubation von 4 h und über Nacht führte ebenfalls keine Verbesserung herbei. In weiteren Tests wurde neben dem NEBuffer 3.1 der CutSmart Puffer verwendet, der laut Herstellerangaben auch zu 100% Aktivität des Enzyms führt. Mit dem alternativen Puffer wurde das entsprechende PCR-Produkt bereits nach 2 h hydrolysiert und Banden wurden erwartungsgemäß auf Höhe von 416 bp und 102 bp detektiert (Abb. 7), während die Anwendung mit dem NEBuffer 3.1 zu keinem Verdau führte.

2.1.4. Testung von Reaktorproben ohne DNA-Aufreinigung

Nachdem die Protokolle für die Nachweisreaktionen der vier ausgewählten SNPs etabliert waren, wurden im nächsten Schritt zur weiteren Vereinfachung des Arbeitsablaufes Zellen direkt aus Reaktorproben als Templates für die PCR-Amplifikation eingesetzt. Auf die aufwändige Isolation der genomischen DNA wurde hierbei verzichtet, die Zellen wurden lediglich durch mehrmaliges Einfrieren bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ und anschließendem Auftauen mechanisch aufgeschlossen. Die dadurch freigesetzte Menge an genomischer DNA war ausreichend, um mittels der Protokolle, die zuvor für aufgereinigte DNA entwickelt worden waren, zu vergleichbaren Ausbeuten zu kommen (Abb. 8). Der anschließende Restriktionsverdau der erzeugten Amplikons erfolgte analog zu den zuvor untersuchten Proben, es war lediglich zu beobachten, dass die Restriktion tendenziell etwas häufiger als bei Verwendung gereinigter DNA unvollständig verlief.

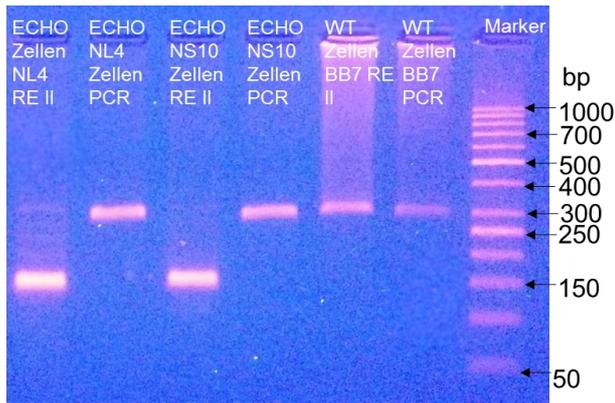


Abbildung 8 Verdau der SNPc Amplikons aus ECHO100 und WT Zellproben durch RE II

2.1.5. Bewertung der Assay-Zuverlässigkeit

Im Anschluss an die Optimierung des Testprotokolls wurde die Zuverlässigkeit des Stamm-identifizierungstests untersucht. Hierzu wurden die Amplifikations- und Restriktionsreaktionen aller vier SNP-Amplikons an drei aufeinanderfolgenden Tagen unabhängig voneinander getestet. Als zu identifizierende Probe wurden ECHO100-Zellen eines laufenden Fermenterexperimentes verwendet. Alle Primerpaare wurden unter den oben beschriebenen Bedingungen getestet, als Positivkontrolle diente extrahierte ECHO100- und WT-DNA, die Negativkontrolle enthielt Wasser anstatt eines Templates.

Das Ergebnis eines solchen Testlaufs ist beispielhaft für das SNPe Amplikon in Abb. 9 dargestellt. Der gezeigte Verdau des zu testenden Amplikons der Zellprobe verlief erwartungsgemäß, lediglich ein kleiner Anteil blieb unverdaut, was allerdings ebenso bei der ECHO100 DNA-Kontrolle beobachten wurde. Die WT DNA-Kontrolle hingegen blieb wie erwartet unverdaut.

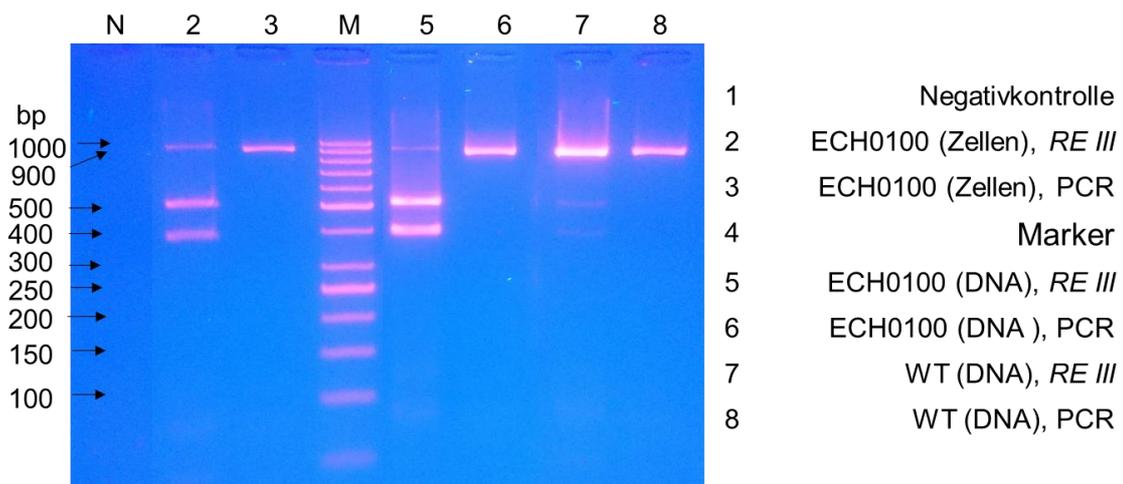


Abbildung 9 Restriktionsverdau SNPe PCR-Produkt. Eine Zellprobe aus einem laufenden Reaktor wurde ohne Aufreinigung der genomischen DNA amplifiziert und anschließend verdaut. Als Kontrollen dienten genomische DNA des ECHO100 und des WTs, die parallel analysiert wurden.

Die Ergebnisse der unabhängigen Zuverlässigkeitstests für alle vier SNP PCR-Produkte sind zusammenfassend in Tabelle 2 dargestellt. Die Amplifikation der untersuchten

Genombereiche aus Zellproben und aufgereinigter DNA war unter Verwendung des etablierten Protokolles stets erfolgreich.

Der Verdau des SNPb Amplikons führte zu widersprüchlichen Ergebnissen und schlug im Falle der ECH0100 Zellproben in allen Testläufen fehl. Auch wenn dieser Test unter Verwendung aufgereinigter DNA-Templates in den Kontrollen regelmäßig verlässliche Ergebnisse lieferte, ist folglich eine Testung von Zellproben ohne weitere Aufreinigung der DNA mit diesem Ansatz nicht durchführbar.

Die Analyse des SNPc Amplikons lieferte reproduzierbare Ergebnisse. Die Restriktion der ECH0100 Zellprobe mit RE II war in allen Fällen erfolgreich, allerdings in keinem der Durchläufe vollständig. Ein unvollständiger Verdau wurde jedoch teilweise auch im Falle der ECH0100 Positivkontrolle beobachtet, und die Abgrenzung zum WT war eindeutig möglich, da das entsprechende WT-Amplikon in allen Fällen unverdaut blieb.

Tabelle 2 Auswertung der Restriktionsanalyse der SNP PCR-Produkte der Durchläufe 1-3

Amplikon	Template	Enzym	Erwartete Fragmente (bp)	Zellprobe			Positivkontrolle		
				1	2	3	1	2	3
SNPb	Unverdautes PCR-Produkt	-	317	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	ECH0100	RE I	209 + 112	✗	✗	✗	✓	✓	✓
	WT	RE I	317	-	-	-	✓	✓	✓
SNPc	Unverdautes PCR-Produkt	-	328	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	ECH0100	RE II ^{a)}	167 + 163	✓ ^{a)}	✓ ^{a)}	✓ ^{a)}	✓	✓ ^{a)}	✓
	WT	RE II	328	-	-	-	✓	✓	✓
SNPe	Unverdautes PCR-Produkt	-	924	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	ECH0100	RE III ^{a)}	404 + 523	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	WT	RE III	924	-	-	-	✓	✓	✓
SNPf	Unverdautes PCR-Produkt	-	514	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	ECH0100	RE IV ^{a)}	102 + 416	✓	(✓) ^{b)}	✓	✓	(✓) ^{b)}	✓
	WT	RE IV	-	-	-	-	✓	✓	✓

✓: Erfolgreich, ✗: Nicht erfolgreich, -: Nicht getestet

^{a)} Unvollständiger Verdau

^{b)} Template überwiegend unverdaut

Die Restriktion des SNPe Amplikons aus ECH0100 Zell- und DNA-Proben mit RE III war ebenfalls in allen Fällen erfolgreich, das WT-Amplikon blieb dagegen stets unverdaut. Ein kleiner Anteil des Amplikons der ECH0100 Zellprobe blieb häufig unverdaut, das gleiche Muster war jedoch auch im Falle der ECH0100 DNA-Kontrolle zu beobachten.

Ein ähnliches Ergebnis wie beim SNPc und beim SNPe Amplikon wurde mit der Restriktionsanalyse des SNPf Amplikons erzielt. Die ECH0100 Amplikons wurden von RE IV zumindest zu einem gewissen Grad in die erwarteten Fragmente geschnitten, während das WT-Amplikon unverdaut blieb. Die Restriktionseffizienz für ECH0100 Zellproben und DNA-Kontrollen war in allen Fällen gleich, es konnte jedoch nicht geklärt werden, aus welchem Grund kein vollständiger Verdau erreicht wurde im Gegensatz zu den Versuchen während der Assay-Etablierung.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass drei von vier getesteten SNP-Restriktionsanalysen unter Verwendung von Zellproben die erwarteten Ergebnisse erzielten und daher zur eindeutigen Identifizierung des ECH0100 Stammes herangezogen werden können (SNPc, SNPe und SNPf). Die erzielten Ergebnisse wurden zudem durch Sequenzierung der verwendeten Amplikons bestätigt und sind daher als repräsentativ anzusehen. Der Assay auf Grundlage von SNPb ist nicht zuverlässig bei Verwendung unaufgereinigten Zellmaterials und sollte daher nur bei Vorhandensein von gereinigter DNA angewendet werden.

Im Falle von SNPc und SNPf erfolgt der Verdau des PCR-Amplikons häufig nur unvollständig und ein intaktes Amplikon der WT-Kontrolle ist in diesem Zusammenhang notwendig, um eine zweifelsfreie Zuordnung einer unbekanntes Zellprobe zu dem WT oder dem ECH0100 Stamm zu ermöglichen. Insgesamt sind die drei verwendeten Tests als sich ergänzend zu betrachten und sollten immer gemeinsam durchgeführt werden. Gesetzt den Fall, dass widersprüchliche Ergebnisse erzielt werden und einer der Assays von dem Ergebnis der anderen abweicht, ist in jedem Fall eine Sequenzierung der fraglichen Amplikons durchzuführen, um die Identität der untersuchten Zellprobe festzustellen.

3. Vergleichende mikroskopische Untersuchungen

Ein zweiter Schwerpunkt des Förderprojektes stellte die vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchung des ECH0100 Stammes und des Wildtyps (WT) dar. Dabei sollten Unterschiede in verschiedenen Wachstumsstadien identifiziert werden, in Hinblick auf die allgemeine Zellmorphologie, die Ausbildung von Zellanhängen und die Akkumulation von Speicherstoffen. Hierfür wurde ein breites Spektrum an verschiedenen Mikroskopie- und Präparationsmethoden eingesetzt: Licht- und Elektronenmikroskopie, Negativkontrastierung mit Uranylacetat inklusive Aufwuchsversuchen auf kohlebeschichteten Goldgrids, Einbettung der Zellen in Kunstharze für Ultradünnschnitte und Gefrierätzung. Abbildung 10A-H gibt einen Überblick über die verwendeten Methoden.

Aufgrund des variablen Erscheinungsbildes (lange und kurze Stäbchen, Abbildung 10A und B) beider *Methanothermobacter (M.)* Kulturen, wurde ein „Time course Experiment“ durchgeführt. Dieser Versuch sollte u.a. Aufschluss darüber geben, ob die Zelllänge und weitere morphologische Merkmale einer Kultur mit einer bestimmten Wachstumsphase korrelieren.

Dabei wurde das Wachstum beider Stämme überwacht und es wurden jeweils Proben aus der logarithmischen und aus der katalytischen Phase entnommen. Diese Proben wurden sowohl negativkontrastiert als auch chemisch fixiert, um zur Herstellung von Ultradünnschnitten (Abbildung 10C, D, E und F) zu dienen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3 Morphologische Charakterisierung des Wildtyp- und des ECH0100 Stammes in logarithmischer und katalytischer Wachstumsphase.

	Wachstumsphase	Pseudomurein Schicht	Morphologie	Einschlüsse	Zellanhänge
Wildtyp	log Phase	15 nm	Breite 650 nm Länge 5 µm	Runde Einschlüsse in 15% der Zellen (20 nm)	Kurze Fimbrien (6 nm) Längere Strukturen (10-12 nm)
	katalytische Phase	15 nm	Breite 650 nm Länge 5µm	Runde (30-80 nm) bis elongierte (170-60 nm) Einschlüsse in 46% der Zellen; 1-3 pro Zelle	Kurze Fimbrien (6 nm) Längere Strukturen (10-12 nm)
ECH0100	log Phase	15 nm	Breite 650 nm Länge 5 µm	Runde Einschlüsse in 20% der Zellen	Kurze Fimbrien (6 nm) Längere Strukturen (10-12 nm)
	katalytische Phase	15 nm	Breite 650 nm Länge 5 µm	Runde Einschlüsse in 27% der Zellen, (30-80 nm); 1-2 pro Zellen	Kurze Fimbrien (6 nm) Längere Strukturen (10-12 nm)

Im Zuge der Negativkontrastierung (Abbildung 10C und D) und der konventionellen Einbettung (Abbildung 10E und F) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Stämmen in der jeweiligen Wachstumsphase detektiert werden. Auch wurde kein Zusammenhang zwischen Wachstumsphase und Zelllängen erkannt. Die Zellen beider

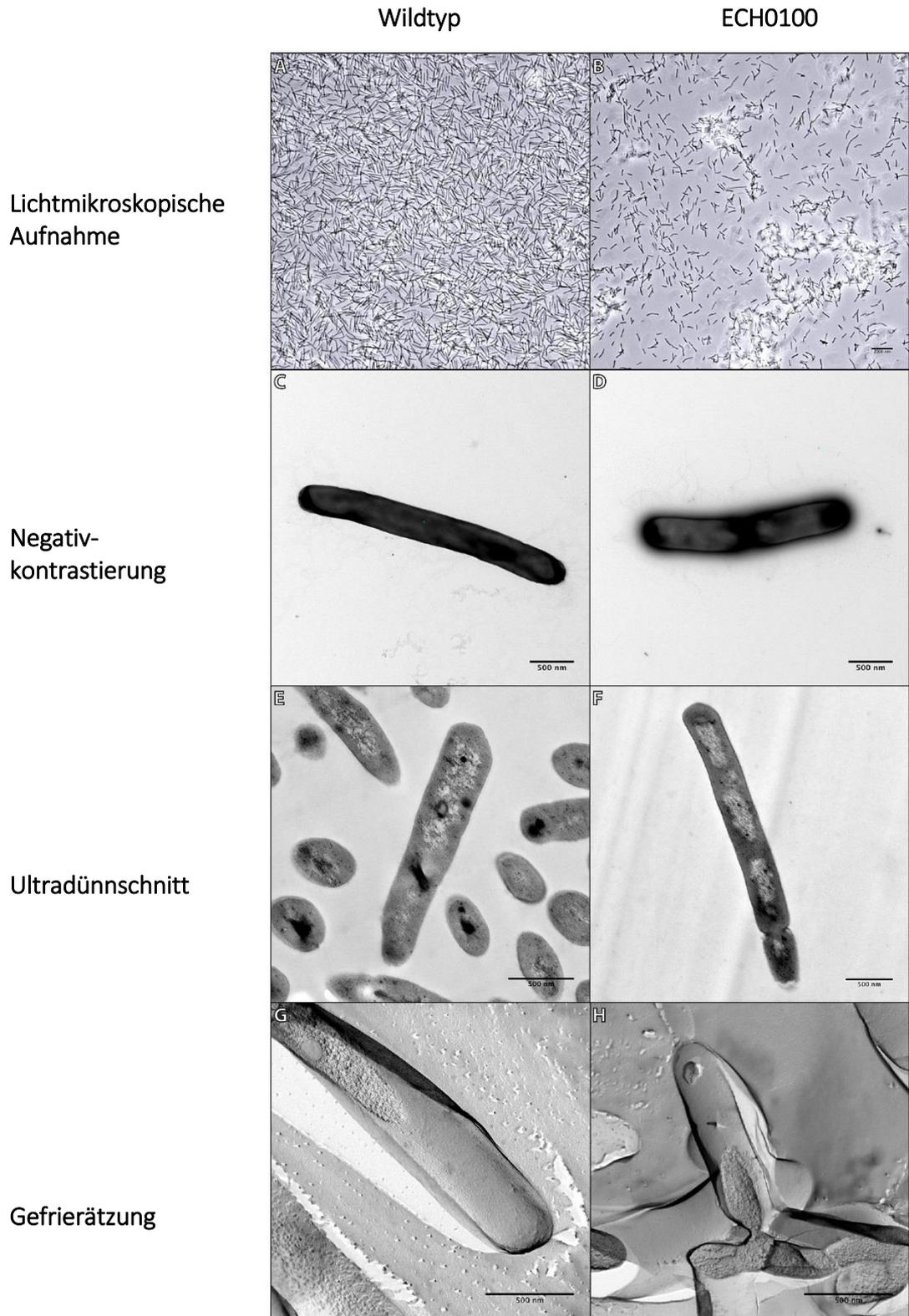


Abbildung 10 Mikroskopische Untersuchungen des WT (A, C, E, G) und des ECH0100 Stammes (B, D, F, G) mit verschiedenen Präparationsmethoden. A und B: Lichtmikroskopische Aufnahme. C und D: Negativ Kontrastierung. E und F: Ultradünnschnitte chemisch fixierter Zellen. G und H: Gefrierätzung.

Stämme waren im Durchschnitt 650 nm breit und 5 µm lang (siehe auch Zeikus&Wolfe, 1972). Gelegentlich wurden Zellen beobachtet, die bis zu 15 µm lang waren und Netzwerke ausbildeten (Abbildung 11A). Außerdem wiesen beide Stämme zwei Typen von Zellanhängen auf: Kurze Strukturen mit einem Durchmesser von 6-7 nm, bei denen es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Fimbrien handelt (siehe auch Thoma et al., 2008; Sarbu, 2013), und längere Strukturen mit 10-12 nm Durchmesser, welche archaeele Flagellen darstellen dürften (beschrieben von Thoma et al., 2008, Abbildung 11B und C).

Die Pseudomureinschicht beider Stämme war durchschnittlich 15 nm dick und es wurden intrazelluläre Einschlüsse gefunden. Aufgrund der hohen Affinität des verwendeten Kontrastmittels Uranylacetat zu Phosphatgruppen handelt es sich möglicherweise um Polyphosphat Einschlüsse. Diese sind innerhalb der Mikroorganismen weit verbreitet (Scherer und Böhm, 1983) und dienen als Speicher- und Reservestoffe.

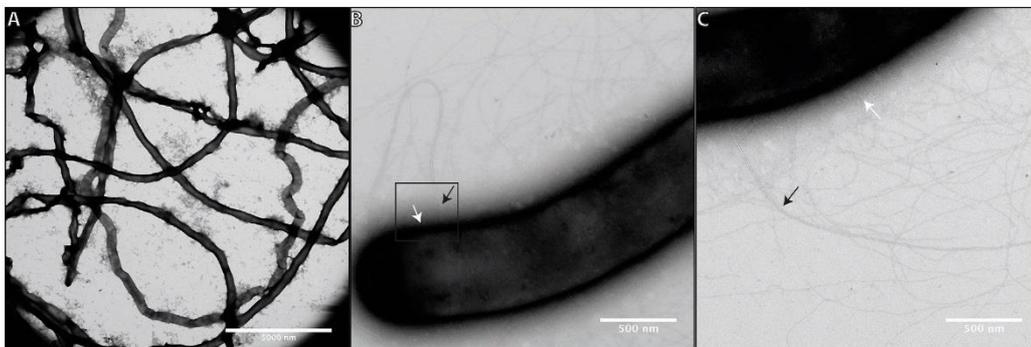


Abbildung 11 Negativkontrastierungen von *M. thermoautotrophicus*. A: Lange Zellen die ein Netzwerk ausbilden. B und C: Zelle mit zwei Typen von Zellanhängen. Schwarze Pfeile Zellanhänge von 10-12 nm Durchmesser, weiße Pfeile: Fimbrien von 6 nm Durchmesser (C Ausschnitt aus B).

Basierend auf diesen ersten Beobachtungen zur Ultrastruktur mit konventionellen Methoden wurden Zellen beider Stämme zusätzlich mittels moderner Kryotechniken präpariert. Kryopräparationsmethoden sind deutlich aufwendiger, bringen jedoch den Vorteil einer hervorragenden ultrastrukturellen Erhaltung mit sich.

Im Verlauf des Projekts wurden beide Stämme hochdruckgefroren, gefriersubstituiert und in ein Kunstharz eingebettet. Abbildung 12 zeigt eine *M. thermoautotrophicus* Zelle (Stamm ECH0100), die mit dieser Methode präpariert wurde. Die Ultrastruktur der Zelle ist sehr gut erhalten, was an der gleichmäßigen Textur des Cytoplasmas und an der Membranerhaltung (Doppelmembranen erkennbar) zu sehen ist. An einem Zellpol befindet sich ein elektronendichter, rundlicher Einschluss, bei dem es sich vermutlich um Polyphosphat handelt.

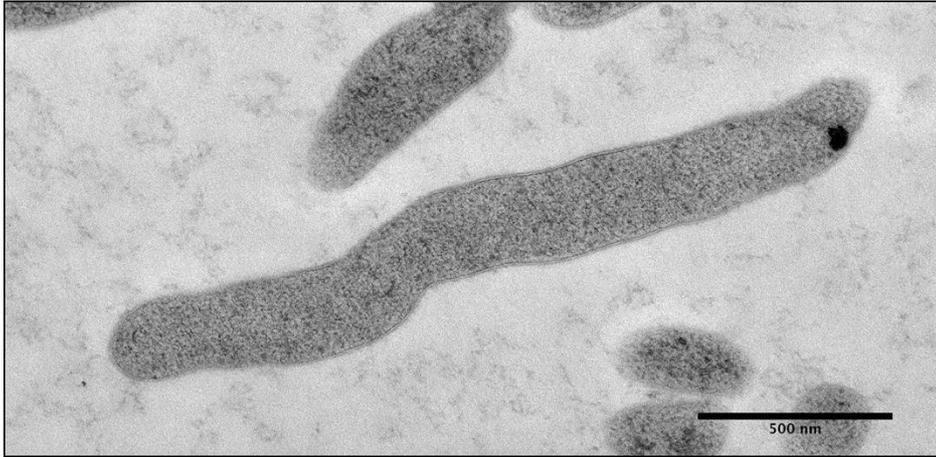


Abbildung 12 Ultradünnschnitt von *M. thermotrophicus*. Zellen wurden hochdruckgefroren, gefriersubstituiert und in Epon812 eingebettet. Beachtenswert ist die sehr gut erhaltene Ultrastruktur.

Weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen umfassten die Aufzucht von Zellen auf kohlebeschichteten Goldgrids mit anschließender Negativkontrastierung (Abbildung 13) und Gefrierätzungen (Abbildung 10 G und H).

Aufwuchsversuche auf kohlebeschichteten Goldgrids zeigten, dass Zellen beider Stämme auf festen Oberflächen dazu tendieren Netzwerke auszubilden und die Zellen untereinander durch einen Typ Zellanhänge in Kontakt stehen. Zudem konnte anhand der Aufwuchsversuche in Teilbereichen eine biofilmartige Substanz festgestellt werden (Abbildung 13).

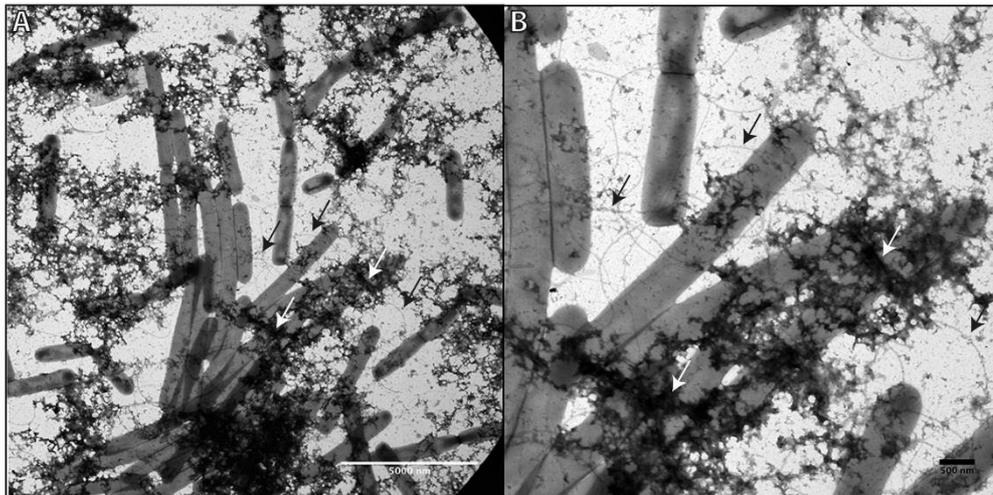


Abbildung 13 Negativkontrastierung von auf Goldgrids gewachsenen *M. thermotrophicus* Zellen. Die Zellen stehen durch Zellanhänge miteinander in Kontakt (schwarze Pfeile). Auf den Zellen und in direkter Umgebung der Zellen findet man eine bisher noch nicht identifizierte extrazelluläre Substanz (weiße Pfeile)

Mithilfe von Gefrierätzversuchen sollte das Vorhandensein eines S-layers bei beiden Stämmen überprüft werden. Als S-layer bezeichnet man kristalline Schichten aus meist monomolekularen Proteinen oder Glykoproteinen, die von vielen Bakterien und Archaeen auf ihrer Zellwand ausgebildet werden. Unterschiede in den Oberflächenstrukturen beider Stämme würden sich sehr gut als Grundlage für einen Biomarker-Assay eignen. Die Existenz eines S-Layers konnte mit dieser Methode jedoch nicht bestätigt werden, allerdings eignete sie sich gut zur Darstellung der unterschiedlichen Zellanhänge.

Allerdings konnten in zwei anderen Experimenten Hinweise auf die Existenz eines S-layers gefunden werden. Dabei handelt es sich einerseits um Ultradünnschnitte chemisch fixierter *Methanothermobacter* Zellen, andererseits um negativkontrastierte Suspensionspräparate, die im Verlauf von S-layer Aufreinigungsversuchen angefertigt wurden. Auf dem Ultradünnschnitt von chemisch fixierten *M. thermoautotrophicus* Zellen (Stamm ECH0100) wurden an mehreren Stellen Strukturen sichtbar, die auf der Cytoplasmamembran aufgelagert erschienen und ein sehr ebenmäßiges Erscheinungsbild zeigten (vgl. Abb. 14, Pfeil). Vergleiche mit Ultradünnschnitten von anderen Organismen, welche ebenfalls einen S-layer im Längsschnitt darstellen, erhärteten diesen Verdacht (vgl. z. Bsp. Sleytr & Beveridge, 1999). Eine genauere Analyse ergab, dass diese ‚Hüllstruktur‘ aus mehreren nebeneinander gesetzten Einheiten zu bestehen scheint, da in regelmäßigen Abständen von ca. 8-9 nm dunkle Abgrenzungslinien zwischen den einzelnen Proteinmonomeren erkannt werden können. Bei diesen Abgrenzungslinien könnte es sich um eine Struktur handeln, welche auch als ‚stalk‘ bezeichnet wird und welche die einzelnen S-layer Proteinmonomere in der Membran verankert.

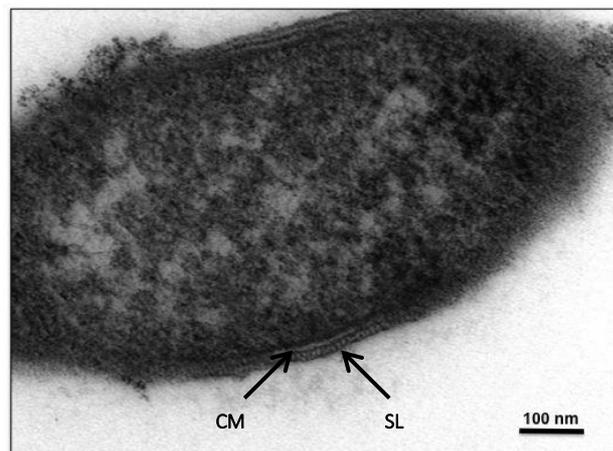


Abbildung 14 Ultradünnschnitt einer chemisch fixierten *M. thermoautotrophicus* Zelle (ECH0100) mit potentieller S-layer Struktur, CM: Cytoplasmamembran, SL: potentielle S-layer Struktur.

Ein weiterer Hinweis auf die Existenz eines S-layers fand sich in Präparaten, welche beim Versuch der S-layer Isolation mittels Zellyse und Solubilisierung mit Detergenzien anfielen (Abb. 15). Auch in diesen Aufnahmen ist eine Struktur erkennbar, die aus regelmäßig angeordneten Proteinen aufgebaut ist, die jedoch nicht die gesamte Zelloberfläche bedeckt. Der regelmäßige Aufbau, die Größe der Proteinmonomere sowie die Organisation der Proteine untereinander lassen darauf schließen, dass es sich hier mit großer Wahrscheinlichkeit um eine S-layer Struktur handelt.

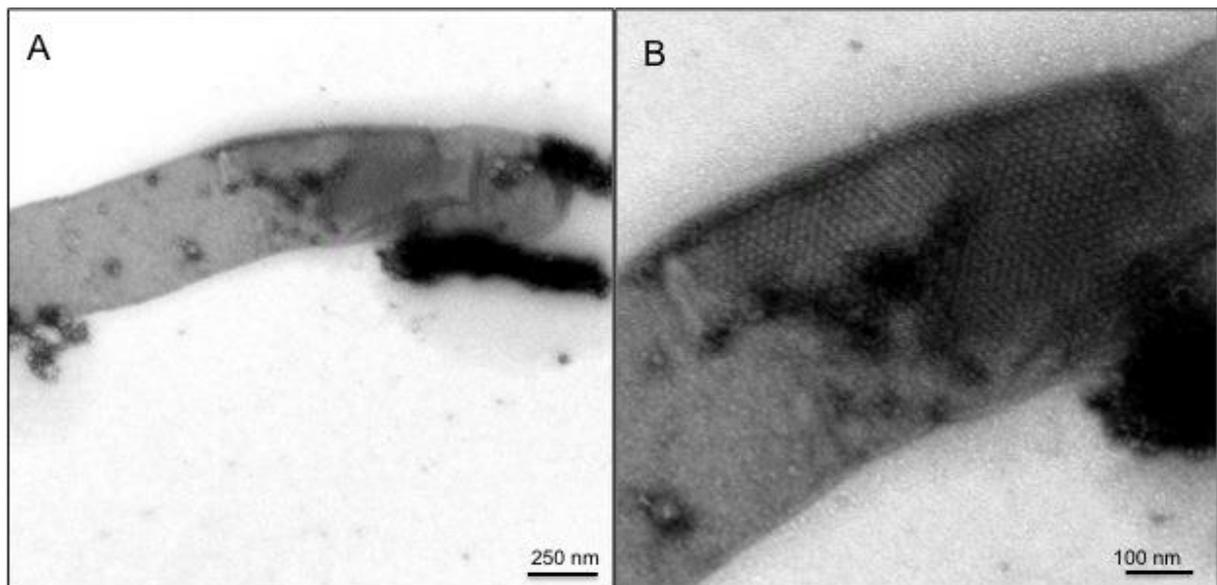


Abbildung 15 Negativkontrastierung einer Zellhülle von *M. thermautotrophicus* nach S-layer Isolationsprotokoll, A: Übersichtsaufnahme; B: vergrößerter Ausschnitt des Bereichs mit S-layer Struktur aus Abb. A.

4. Vergleichende Transkriptomanalyse

Für die vergleichende Transkriptomanalyse im Rahmen des WP 1.2 wurden parallele Wachstumsversuche durchgeführt. Um die größtmögliche Vergleichbarkeit zwischen den Bedingungen im Bioreaktor herzustellen, wurden der WT und der ECH0100-Stamm parallel in zwei Reaktoren der gleichen Bauart zur selben Zeit unter möglichst identischen Bedingungen angezogen und Proben für die Transkriptomanalyse zu gleichen Zeitpunkten genommen. Von beiden Stämmen wurden an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen während der katalytischen Wachstumsphase Proben genommen, zudem von der ECH0100-Kultur mehrere Proben während der exponentiellen Wachstumsphase. Gleichzeitig wurde von der Firma IMGGM Laboratories GmbH eine Methode zur Isolation der vollständigen RNA aus *Methanothermobacter*-Zellen entwickelt, und später die aufwendige Aufreinigung und Sequenzierung der RNA-Extrakte unserer drei Probensets durchgeführt.

Im Zuge der sich anschließenden vergleichenden Analyse von WT- und ECH0100-Transkriptom wurde besonderes Augenmerk auf solche Transkripte gelegt, deren korrespondierende Proteine später als mögliche Targets in dem zu entwickelnden Proteinmarkerassay dienen könnten. Es stellte sich jedoch heraus, dass kein Transkript im ECH0100 detektiert wurde, das ausschließlich dort vorhanden war und nicht im WT. Gleichwohl war auffallend, dass eine große Zahl von Genen differentiell reguliert zu sein scheint. Eine Hauptidee der Studie war, dass eine ganze Reihe von Genen, die direkt in die Methanogenese involviert sind, hochtranskribiert ist und im Verhältnis im ECH0100 öfter vorhanden ist als im WT. Die hochregulierten Gene sind dabei in fast sämtliche Schritte des zentralen Methanogenese-Stoffwechselweges involviert. Die relativen Abundanzen dieser Transkripte lagen im ECH0100 bei RPKM-Werten ($\text{RPKM} = \frac{\text{Reads of specific gene transcript}}{\text{gene-length (Kb)} \times \text{total number of mapped-reads (in Million)}}$) in drei- bis fünfstelliger Höhe. Gleichzeitig waren sie 4-7fach

erhöht im Verhältnis zu den entsprechenden Werten im WT, was auf eine deutliche Hochregulierung der für die Methanogenese benötigten Proteine im ECH0100 hindeutete. Außerdem wurden mit ORF265 und ORF278 zwei Gene als hochreguliert identifiziert, die eine Sequenzvariation auf DNA-Ebene beinhalten.

5. Massenspektrometrische Analyse zur Biomarkeridentifizierung

In WP 2.2 wurde eine massenspektrometrische Analyse des Proteoms von ECH0100 im Vergleich zum Wildtypstamm (WT) durchgeführt. Zielsetzung war das Auffinden von signifikanten Unterschieden in der Proteinzusammensetzung beider Stämme, die eine Herstellung von Antikörpern und im nächsten Schritt deren Einsatz in einem Biomarkerassay zur eindeutigen Unterscheidung von ECH0100 und dem Wildtypstamm ermöglichen sollte.

Zur Untersuchung der Proteinzusammensetzung wurden verschiedene Methoden des Zellaufschlusses getestet. Das beste Ergebnis konnte dabei durch eine alternierende Behandlung der Zellen mit Ultraschall und Fastprep24 erreicht werden. Bereits nach 5 Zyklen 5-minütiger Inkubation der Zellen im Ultraschallbad und anschließender Präparation mittels Fastprep24 (40 Sekunden) zeigten die Zellen bei lichtmikroskopischer Kontrolle einen ausreichenden Zellaufschluss. In einer elektronenmikroskopischen Betrachtung konnten so gut wie keine ganzen Zellen mehr detektiert werden (vgl. Abb. 16).

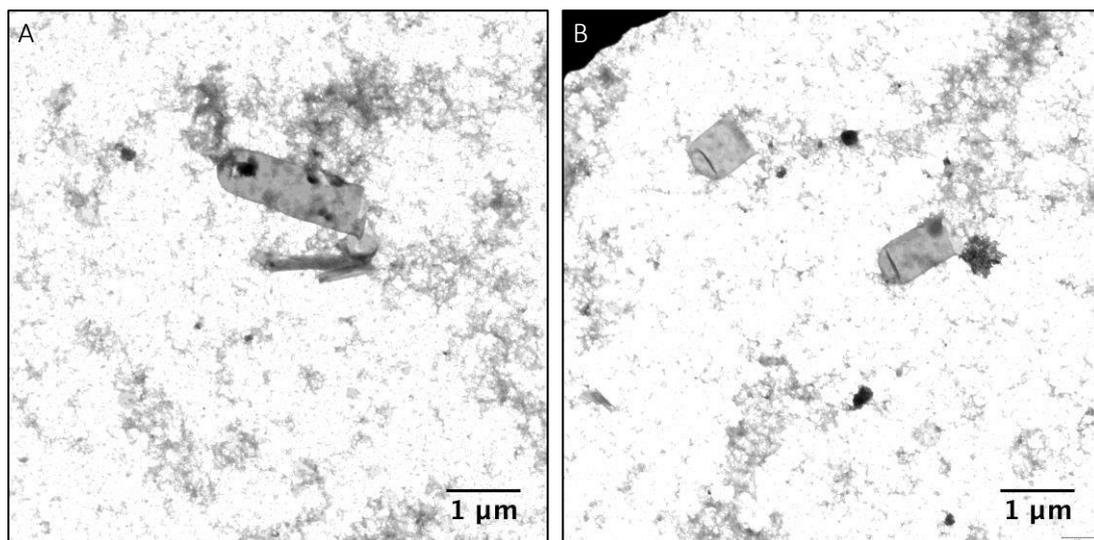


Abbildung 16 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von ECH0100 (A) und Wildtyp (B) nach Aufschluss mittels Ultraschallbad und FastPrep24, Negativ Kontrastierung

Im Anschluss an den Zellaufschluss wurde der Rohextrakt von ECH0100 bzw. WT in lösliche (= cytoplasmatische) bzw. unlösliche (= membranassoziierte) Fraktionen aufgeteilt. Die Proteine der unlöslichen Fraktion wurden durch Solubilisierung mit verschiedenen Detergenzien (Triton X, SDS, Tween 20, Tween 80, DDM) aus der Membran gelöst und mittels SDS-Page aufgetrennt. Nach einer Anfärbung der Proteine mittels Coomassie- oder Silberfärbung wurde das Bandenmuster sich entsprechender Fraktionen von ECH0100 und WT verglichen. Besonderes Augenmerk wurde auf sich unterscheidende Banden gelegt. Ein Beispiel einer derartigen Auftrennung ist in Abb. 17 dargestellt.

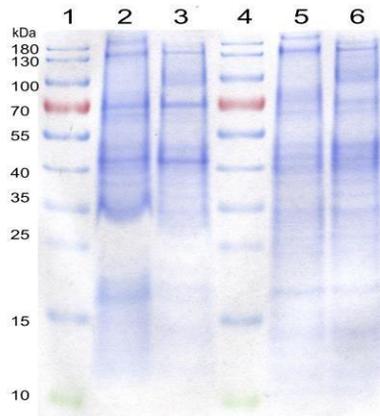


Abbildung 17 Proteinbandenmuster einer 10% SDS-PAGE, Färbung: Coomassie; Spur 1 und 4: Proteinstandard; Spur 2: Wildtyp, unlösliche Fraktion, Solubilisierung der Proteine mit 1% Tween 80; Spur 3: ECH0100, unlösliche Fraktion, Solubilisierung der Proteine mit 1% Tween 80; Spur 5: Wildtyp, unlösliche Fraktion, Solubilisierung der Proteine mit 1% DDM; Spur 6: ECH0100, unlösliche Fraktion, Solubilisierung der Proteine mit 1% DDM

Insgesamt zeigten sich die Proteinbandenmuster von ECH0100 und WT recht identisch, dennoch konnten einzelne Banden identifiziert werden, die bei einem der beiden Stämme nicht auftauchten bzw. in ihrer Intensität sehr unterschiedlich waren.

Dabei handelte es sich um Banden bei 180, 100, 76, 50 und 34 kDa, welche bei ECH0100 auftraten und um eine Bande bei 200 kDa, welche beim Wildtypstamm identifiziert werden konnte. Diese Banden wurden direkt aus dem Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung wurden mittels der Software MaxQuant ausgewertet. Ein Auszug der Ergebnisse ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4 zeigt, dass aus den massenspektrometrischen Daten keine eindeutige Zuordnung eines Proteins zu einer Gelbande möglich ist. In jeder der analysierten Gelbanden waren mehrere Proteine mit teilweise ähnlichen Intensitäten vorhanden. Zudem konnten nur selten Proteinfragmente identifiziert werden, welche als einzigartig für ECH0100 bzw. den Wildtypstamm angesehen werden können. Unter Einbeziehung aller zur Verfügung stehenden Daten (Genom, Proteom, Strukturvorhersage, Lokalisationsvorhersage) wurde die Entscheidung getroffen, Antikörper gegen die Proteine der ORFs 1541 und 1456 sowie Ganzzellantikörper gegen intakte ECH0100-Zellen zu generieren.

Tabelle 4 Ergebnis der Auswertung (Auszug) der massenspektrometrischen Untersuchung der Proteinbanden bei 180, 200, 76 bzw. 74, 100, 50 und 34 kDa von ECH0100 (ECHO) und Wildtyp (WT) mittels MaxQuant, Darstellung der Gesamtintensität der einzelnen Peptide im Vergleich zur Gesamtintensität

Summe - Quotient Intensity	ECHO 180	WT 180	ECHO 200	WT 200	ECHO 76	WT 74	ECHO 100	WT 100	ECHO 50	WT 50	ECHO 100	WT 100	ECHO 76	WT 74	WT 50 /	ECHO 50	ECHO 34	WT 34 /
Spaltenbeschriftungen	CP01	CP02	CP03	CP04	CP05	CP06	CP07	CP08	CP09	CP10	CP11	CP12	CP13	CP14	CP15	CP16	CP17	CP18
Zeilenbeschriftungen																		
ORF1007_Genome_ECH0100									1.62E-01	1.71E-03							1.66E-04	
Peptide 1									1.62E-01	1.71E-03							1.66E-04	
ORF102_Genome_ECH0100									5.33E-04	8.27E-05						6.20E-04		
Peptide 2									5.33E-04	8.27E-05						6.20E-04		
ORF1033_Genome_ECH0100																	1.03E-03	1.85E-04
Peptide 3																	4.68E-04	
Peptide 4																	1.61E-04	
Peptide 5																	4.01E-04	1.85E-04
ORF1044_Genome_ECH0100																	2.02E-04	
Peptide 6																	2.02E-04	
ORF1045_Genome_ECH0100	3.12E-04																	
Peptide 7	3.12E-04																	
ORF105_Genome_ECH0100									4.06E-04									
Peptide 8									4.06E-04									
ORF1066_Genome_ECH0100	3.12E-05			3.87E-05														
Peptide 9	1.95E-05			3.87E-05														
Peptide 10	1.17E-05			3.87E-05														
ORF1089_Genome_ECH0100	8.55E-06																	
Peptide 11	8.55E-06																	
ORF1098_Genome_ECH0100																2.40E-05		
Peptide 12																2.40E-05		
ORF1112_Genome_ECH0100									4.54E-04									
Peptide 13									4.54E-04									
ORF1117_Genome_ECH0100									6.74E-04							6.05E-04		
Peptide 14									3.50E-04							6.05E-04		
Peptide 15									3.24E-04									
ORF1123_Genome_ECH0100								1.49E-04										
Peptide 16								1.49E-04										
ORF1125_Genome_ECH0100						1.16E-05			1.73E-02	9.61E-04					7.16E-04	4.60E-03	5.37E-04	1.41E-04
Peptide 17									4.68E-04	1.26E-04					1.05E-04	2.82E-04		
Peptide 18									1.67E-03	1.78E-04					1.57E-04	5.20E-04		1.54E-05
Peptide 19									1.70E-03						5.71E-05	6.04E-04		
Peptide 20									4.22E-04							4.79E-04		
Peptide 21						1.16E-05												
Peptide 22									3.48E-03							1.60E-03		
Peptide 23									3.05E-04	5.98E-05								
Peptide 24									9.36E-04	4.38E-04							2.31E-04	5.13E-05
Peptide 25									6.43E-04						2.21E-04	1.89E-04		
Peptide 26									9.97E-04	7.70E-05					6.96E-05			
Peptide 27									3.02E-03	1.59E-05						2.52E-04		

Linke Spalte, schwarz hinterlegt: Open Reading Frames

Linke Spalte, ohne Hinterlegung: zugehörige, in massenspektrometrischer Analyse identifizierte Peptidfragmente

Erste Zeile, blau hinterlegt: analysierte Gelbande aus Coomassie gefärbtem SDS-Gel

Erste Zeile, orange hinterlegt: analysierte Gelbande aus Silber gefärbtem SDS-Gel

CP1-CP18: Bezeichnung der analysierten Gelbanden

6. Rekombinante Herstellung der weiteren Proteine für die Immunisierung

Bei den Proteinen der ORFs 1456 und 1541, gegen welche ebenfalls Antikörper generiert werden sollten, handelt es sich einerseits um ein CRISPR-assoziiertes Protein, andererseits um einen Teil eines für die Methanogenese relevanten Proteinkomplexes. Das CRISPR-assoziierte Protein stellt dabei ein Ziel dar, welches in der massenspektrometrischen Auswertung mehrmals unabhängig voneinander ausschließlich im ECH0100 identifiziert werden konnte. Zudem handelt es sich bei diesem Vertreter um ein Protein, das im ECH0100 im Vergleich zum Wildtypstamm hochreguliert vorliegt (Ergebnis der Transkriptomanalyse). Das Methanogenese-Protein konnte zwar in der massenspektrometrischen Untersuchung auch im WT-Stamm identifiziert werden, dennoch ist es zur Herstellung von Antikörpern geeignet, da auch in diesem Fall die Transkriptomanalyse eine klare Hochregulierung im ECH0100 zeigte.

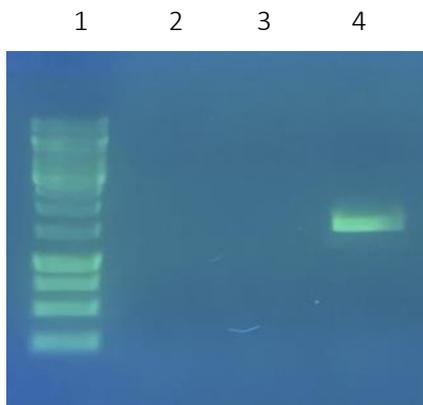


Abbildung 18 Ergebnis PCR Blunt End Ansatz, Spur 1: 1 kb ladder, Spur 2: Annealingtemp. 56,5°C, Spur 3: Annealingtemp. 57,5°C, Spur 4: Annealingtemp. 58,5°C

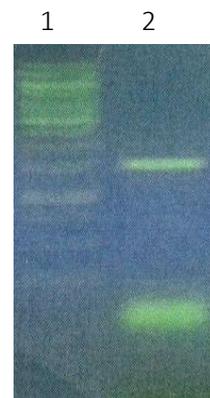


Abbildung 19 Ergebnis PCR Sticky End Ansatz, Spur 1: 1 kb ladder, Spur 2: Annealingtemp. 60°C

Im Fall der rekombinanten Herstellung des Proteins des ORF 1541 (in folgendem als 1541-Protein bezeichnet) wurden zunächst Primer für eine Blunt End als auch für eine Sticky End Klonierung designt. Im Anschluss wurden PCRs mit ca. 50 ng genomischer DNA als Template bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt, um die optimalen Annealingtemperaturen der Primer zu ermitteln. Alle PCRs wurden standardmäßig mit einer Phusion Polymerase nach Herstellerangaben durchgeführt. Im Falle des Blunt End Ansatzes konnte eine optimale Annealingtemperatur bei 58,5 °C, im Fall der Sticky End Klonierung (Schnittstellen mit Enden für RE II und HindIII) eine optimale Annealingtemperatur von 60°C ermittelt werden (vgl. Abb. 18 und 19).

Das PCR Produkt der Blunt End Klonierung konnte auf einer Höhe von ca. 1600 bp detektiert werden, das PCR Produkt der Sticky End Klonierung zeigt ebenfalls eine Laufhöhe von ca. 1600 bp, was mit den zuvor berechneten theoretischen Werten für das PCR Produkt übereinstimmte. Im nächsten Schritt wurden beide PCR-Produkte mit den entsprechenden Enzymen verdaut (EcoRV bzw. RE II und HindIII) und das verdaute PCR Produkt aufgereinigt.

Parallel erfolgte eine Transformation des Expressionsvektors pET29b in chemisch kompetente NEB5 α Zellen. Nach der Aufreinigung des Plasmids erfolgte auch an dieser Stelle ein Verdau mit den

entsprechenden Enzymen (EcoRV bzw. RE II und HindIII) und eine Dephosphorylierung der DNA-Enden um eine Religation des Vektors zu verhindern.

Lagen sowohl das verdaute PCR Produkt als auch der verdaute Vektor in ausreichender Konzentration vor, erfolgte eine Ligation der beiden DNA-Fragmente, gefolgt von einer Transformation des Ligationsansatzes in chemisch kompetente NEB5 α Zellen. Leider konnten aus keinem Ansatz, auch bei diversen Variationen der Bedingungen (DNA-Konz., Inkubationszeiten etc.), positive Klone selektiert werden.

Auch die rekombinante Herstellung des Proteins des ORF 1456 verlief unzufriedenstellend. So konnte bei diesem Ansatz noch nicht einmal ein PCR-Produkt erhalten werden.

In beiden Fällen wären weitere Versuche und Variationen der Parameter notwendig, um die Proteine der ORFs erfolgreich exprimieren zu können. Aus Zeitgründen war dies innerhalb der Laufdauer dieses Projektes leider nicht mehr möglich.

7. Immunochemische Analysen mittels rabbit-anti-ECH0100 Antikörper (Ganzzellantikörper)

Im Laufe dieser Arbeit wurden polyklonale Ganzzellantikörper gegen ECH0100 bei der Firma Davids Biotechnologie GmbH (Regensburg) bestellt. Zu diesem Zweck wurde ein extra von dieser Firma entwickelter Immunisierungskit verwendet, der sicherstellt, dass die Oberflächenantigene der Zellen optimal dem Immunsystem präsentiert werden. Anschließend wurden Kaninchen mit den so aufgearbeiteten Zellen immunisiert.

Durch Immunisierung mit ECH0100-Zellen erzeugte Ganzzellantikörper haben den Vorteil, dass polyklonale Antikörper gegen sämtliche auf der Oberfläche der Zelle exprimierte Proteine generiert werden. Dies schließt auch Proteine ein, die eventuell nur zu einem geringen Ausmaß in der Zelle exprimiert werden und somit einer gelchromatographischen Auswertung nicht zugänglich sind. Wie Tabelle 4 nahelegt, werden bei diesem Ansatz allerdings auch Antikörper gegen Proteine generiert, welche im Wildtypstamm vorhanden sind, da sich beide Proteinmuster stark ähneln. Um dennoch spezifische Antikörper gegen ECH0100 zu erhalten, war als weitere Aufreinigung eine nachträgliche Immunpräzipitation mit Zellextrakt des Wildtyps vorgesehen. Antikörper gegen Epitope, die sowohl im Wildtyp als auch im ECH0100 Stamm vorhanden sind, werden dabei vom ECH0100-Ganzzellantikörper erkannt und gebunden, dagegen liegen Antikörper, welche nur für ECH0100 spezifisch sind, weiterhin ungebunden in der Lösung vor. Auf diese Weise ist es prinzipiell möglich spezifische von unspezifischen Antikörpern durch eine einfache Zentrifugation zu trennen.

7.1. Test des Antikörpers über Western Blots

In einem ersten Schritt wurde der Ganzzellantikörper (in Folgendem rabbit-anti-ECH0100) mittels Western Blot auf eine Reaktion mit *M. thermotrophicus* Wildtyp bzw. ECH0100 und einem anderen methanogenen Stamm, *Methanomassilicoccus luminyensis*, getestet. Das Ergebnis ist in Abbildung 20 dargestellt.

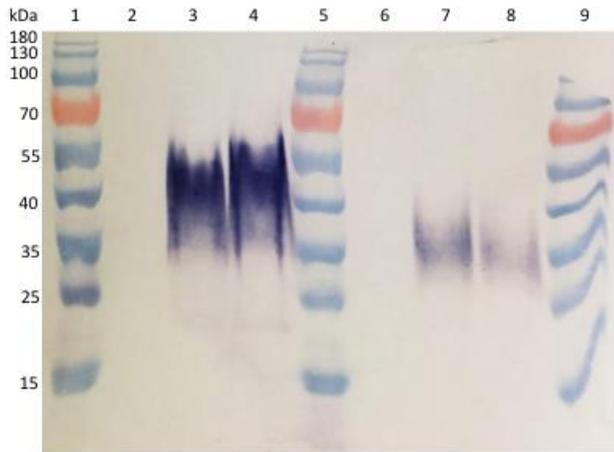


Abbildung 20 Western Blot mit Ganzzellextrakt (unterschiedliche Proteinmengen in Spuren 2-4 bzw. 6-8), prim. Antikörper rabbit-anti-ECH0100 1:10.000, sek. Antikörper goat-anti-rabbit + alkalische Phosphatase 1:25.000; Spuren 1,5 und 9: prestained protein ladder, Spur 2 und 6: Zellextrakt *Methanomassilicoccus luminyensis*, Spur 3 und 7: Zellextrakt *M. thermautotrophicus* WT, Spur 4 und 8: Zellextrakt ECH0100

Es ist deutlich zu erkennen, dass der Ganzzellantikörper sowohl Epitope des Wildtyps als auch des ECH0100 Stammes erkennt. In beiden Fällen können Banden auf gleicher Höhe bei ca. 40 und 35 kDa detektiert werden, wobei bei den Spuren 3 und 4 von einer Überladung des Gels ausgegangen werden kann. Epitope in dem anderen methanogenen Stamm *M. luminyensis* werden nicht erkannt. Das Ergebnis macht deutlich, dass eine weitere Aufreinigung des Antikörpers notwendig war, um eine Kreuzreaktion mit dem WT-Stamm zu minimieren bzw. zu beseitigen. Diese erfolgte wie oben beschrieben mittels einer Affinitätsreinigung unter Verwendung von Wildtypzellen.

Leider konnte eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit Wildtyp-Epitopen auch durch diese Aufreinigung nicht beseitigt werden (vgl. Abb. 21, 22). Um dies zu erreichen, wären möglicherweise umfangreichere Aufreinigungsschritte notwendig gewesen, die aus Zeitgründen allerdings nicht mehr durchgeführt werden konnten.

In einem nächsten Schritt wurde überprüft, ob der generierte Ganzzellantikörper wenigstens spezifisch gegen die Art *Methanothermobacter thermautotrophicus* gerichtet ist, oder ob noch Kreuzreaktionen mit anderen Archaeen auftreten. Dies wurde mittels Western Blot getestet, bei dem neben Zellextrakt von *Methanothermobacter thermautotrophicus* WT bzw. ECH0100 auch Zellextrakte von diversen anderen Methanogenen bzw. Archaeen aufgetragen wurden, die im Labor AG Prof. Klingl verfügbar waren. Dies waren *Metanococcus jannaschii*, *Mc. thermolyticus*, *Mc. aeolicus*, *Mc. vannielii*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Methanopyrus kandleri*, *Pyrococcus furiosus*, *Methanothermobacter wolfei*, *M. marburgensis* sowie zwei thermophilen Fermenterproben aus kommerziellen Biogasanlagen. *M. marburgensis* stellte dabei den nächsten Verwandten zu *M. thermautotrophicus* dar (Wasserfallen et al.). Das Ergebnis zeigen die Abbildungen 21 und 22.

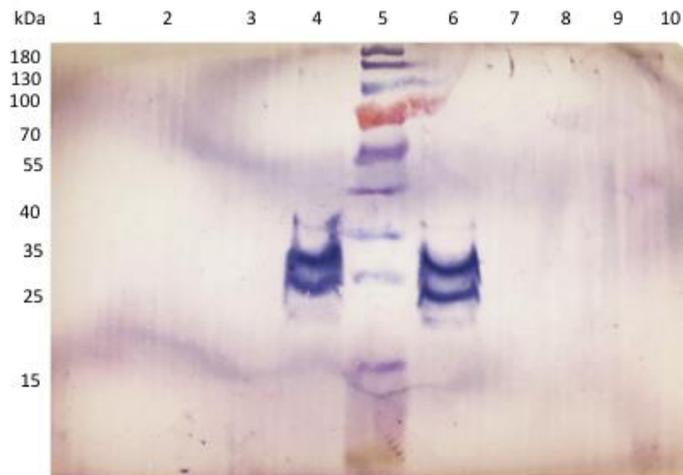


Abbildung 21 Western Blot mit Ganzzellextrakt, prim. Antikörper rabbit-anti-ECH0100 (affinitätsgereinigt) 1:10.000, sek. Antikörper goat-anti-rabbit + alkalische Phosphatase 1:25.000; Spur 1: *Mc. jannaschii*, Spur 2: *Mc. thermolyticus*, Spur 3: *Mc. aeolicus*, Spur 4: ECH0100, Spur 5: prestained protein ladder, Spur 6: *M. thermautotrophicus* Wildtyp, Spur 7: *Mc. vanniellii*, Spur 8: *A. fulgidus*, Spur 9: *M. kandleri*, Spur 10: *P. furiosus*.

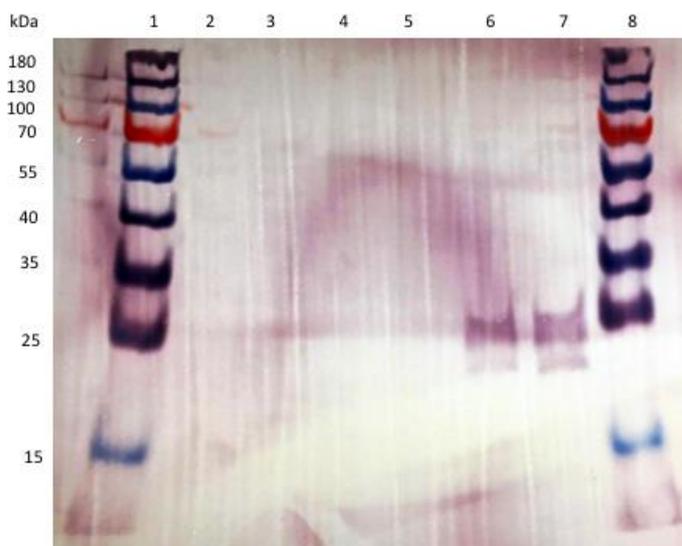


Abbildung 22 Western Blot mit Ganzzellextrakt, prim. Antikörper rabbit-anti-ECH0100 (affinitätsgereinigt) 1:10.000, sek. Antikörper goat-anti-rabbit + alkalische Phosphatase 1:25.000; Spur 1 und 8: prestained protein ladder, Spur 2: *M. wolfeii*, Spur 3: *M. marburgensis*, Spur 4: Fermenterprobe 1 (50°C), Spur 5: Fermenterprobe 2 (52°C) Spur 6: *M. thermoautotrophicus* Wildtyp, Spur 7: ECH0100.

Abb. 21 und 22 zeigen deutlich, dass der verwendete Antikörper nur Epitope erkennt, die entweder von *M. thermautotrophicus* WT bzw. ECH0100 stammen. Epitope von eng verwandten Arten, wie *M. marburgensis* oder *M. wolfeii* werden nicht erkannt, ebenso wenig wie Epitope von weiter entfernt verwandten Euryarchaea. Dies lässt an sich auf eine hohe Spezifität des rabbit-anti-ECH0100 Antikörpers schließen, allerdings eignet er sich durch das Erkennen von beiden Spezies nicht zur definitiven Unterscheidung beider Organismen.

7.2. Identifikation der vom Ganzzellantikörper markierten Banden im Western Blot

Da im Western Blot spezifisch zwei Banden vom Ganzzellantikörper erkannt wurden, war es von großem Interesse diese Banden zu identifizieren, um eventuell nähere Anhaltspunkte über die Zellhülle von *M. thermotrophicus* Wildtyp bzw. ECH0100 zu erlangen. Zu diesem Zweck wurden parallel zum Western Blot SDS-Gele verwendet, die analog zu den Gelen des Western Blots beladen wurden, welche allerdings lediglich Silber- bzw. Coomassie gefärbt wurden. Die Banden, die denen des Western Blots entsprachen, wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht. Dabei handelte es sich um Banden bei Laufhöhen von 24 und 27 kDa, welche sowohl in den Ansätzen mit den ECH0100 Zellen, als auch in den Ansätzen mit den Zellen des Wildtyps auftraten. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software MaxQuant.

Die Kandidaten mit der größten Signalintensität in der massenspektrometrischen Untersuchung sind Proteine, deren Lokalisation als cytoplasmatisch vorhergesagt wurde. Angesichts der Verwendung ganzer Zellen für die Immunisierung ist entweder von einer Verunreinigung der Ganzzellprobe mit cytoplasmatischen Proteinen auszugehen (z.B. durch geplatzte Zellen) oder Überlagerung der angefärbten Proteinbanden mit vielen weiteren Proteinen der gleichen Laufhöhe aus dem Gesamtzellextrakt im SDS-PAGE. Eine eindeutige Zuordnung des Antikörpers zu Zielmolekülen auf der Zelloberfläche war hierdurch nicht möglich.

Die wahrscheinlichste Zuordnung sowohl des 24 als auch des 27 kDa Proteins ist zum Protein Mth_159 gegeben, einem Peroxiredoxin. Dabei handelt es sich um eine Thiol-spezifische Peroxidase, die die Reduktion von H₂O₂ zu Wasser und Alkoholen katalysiert und somit eine Rolle beim Schutz der Zelle vor oxidativem Stress spielt. Dieses Protein weist eine theoretische Größe von 23 kDa auf und wird als cytoplasmatisch lokalisiert vorhergesagt.

Ein weiterer Hit, allerdings mit einer um 50% niedrigeren Wahrscheinlichkeit ist ein Methanogenese-Protein. Dieses Protein weist eine theoretische Größe von 33 kDa auf und wird als ebenfalls als cytoplasmatisch lokalisiert angegeben.

7.3. Test des Antikörpers über Immunmarkierung an Ultradünnschnitten

Neben Western Blots wurde der rabbit-anti-ECH0100 Antikörper auch über Immunmarkierungen an Ultradünnschnitten untersucht. Zu diesem Zweck wurden sowohl *M. thermotrophicus* WT, ECH0100 als auch die beiden nächsten Verwandten *M. marburgensis* und *M. wolfei* über Hochdruckgefrierung fixiert, gefriersubstituiert, ultradünn geschnitten und mittels Immunmarkierung mit den rabbit-anti-ECH0100 Antikörper (affinitätsgereinigt) markiert. Die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchung sind in folgenden Abbildungen dargestellt.

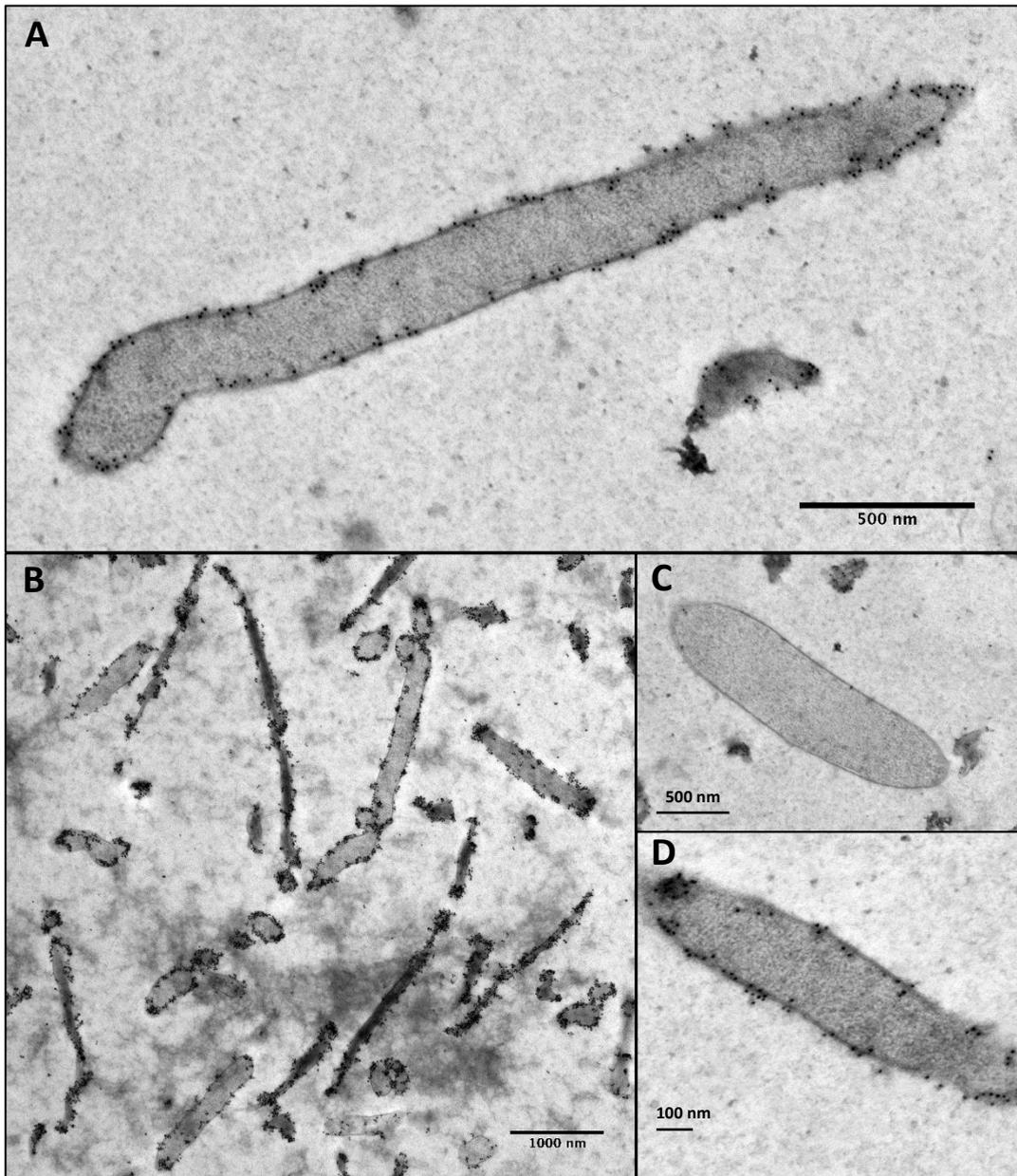


Abbildung 23 Immunmarkierung von ECHO100 Zellen nach Cryofixierung, Gefriersubstitution, Einbettung und Ultramikrotomie mit rabbit-anti-ECHO100 (affinitätsgereinigt) als prim. AK, A: prim. AK 1:100, sek. AK goat-anti-rabbit IgG + 10 nm Gold 1:50; B, C und D: prim. AK 1:100, sek. AK goat-anti-rabbit IgG + ultra small Gold 1:50, Silberverstärkung 30 Min.

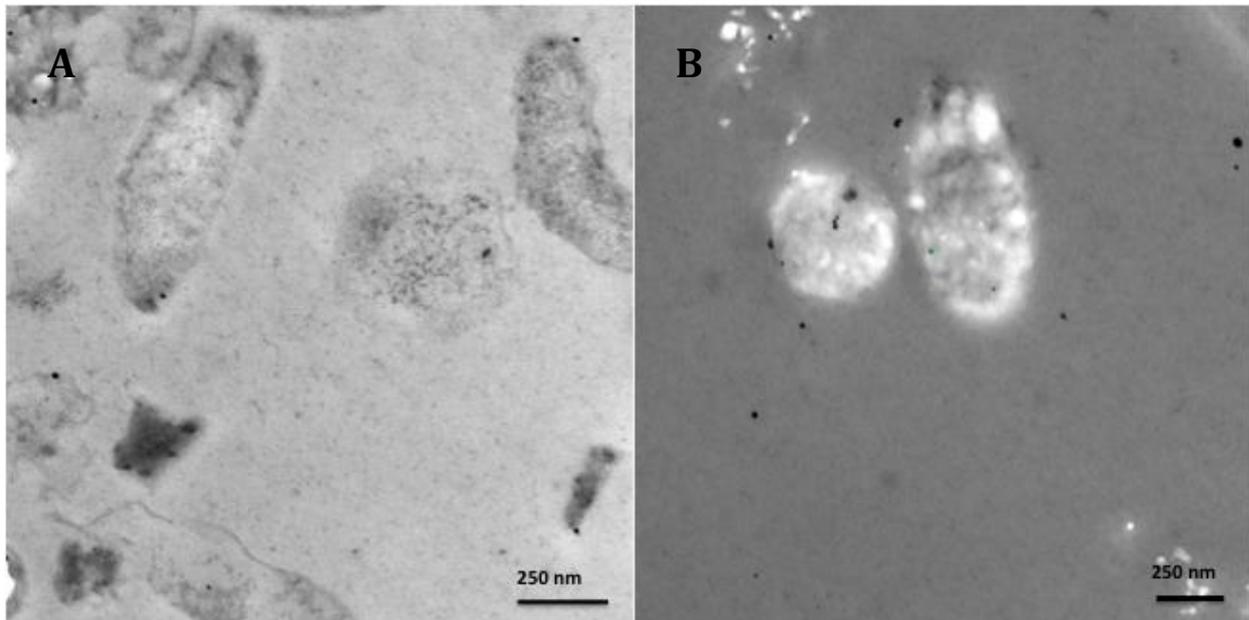


Abbildung 24 Immunmarkierung von *M. wolfei* (Abb. A) und *M. marburgensis* (Abb. B) Zellen nach Cryofixierung, Gefriersubstitution, Einbettung und Ultramikrotomie mit rabbit-anti-ECH0100 (affinitätsgereinigt) als prim. AK, prim. AK 1:50, sek. AK goat-anti-rabbit IgG + ultra small Gold 1:50, Silberverstärkung 30 Min.

Abb. 23 zeigt eine Immunmarkierung von ECH0100 Zellen mit dem rabbit-anti-ECH0100 Antikörper (affinitätsgereinigt). Dabei kann klar erkannt werden, dass hochspezifisch nur Epitope der Hülle erkannt und markiert werden. Die komplette äußere Hülle der Zellen ist gleichmäßig markiert, Antikörpersignale im inneren der Zelle sind nur in sehr geringem Maße zu verzeichnen. Zudem ist so gut wie keine Hintergrundverschmutzung erkennbar, was auf eine grundsätzlich gute Qualität des Antikörpers hinweist. Da es sich bei der ECH0100 Kultur um keine Reinkultur im strengen Sinne handelt und bei der Probenahme und -behandlung keine strikt sterilen Bedingungen eingehalten wurden, konnten auch immer wieder artfremde Organismen als Kontamination gefunden werden (vgl. Abb. 23 C), die ebenfalls keinerlei Markierungen aufwiesen und als interne Kontrolle dienen können.

In Abb. 24 ist eine Immunmarkierung mit identisch präparierten *M. wolfei* und *M. marburgensis* Zellen dargestellt, bei welcher der primäre Antikörper doppelt so konzentriert wie im Experiment mit *M. thermotrophicus* eingesetzt wurde. Eine spezifische Immunmarkierung ist nicht zu erkennen. So zeigen die Zellen von *M. wolfei* überhaupt keine, die von *M. marburgensis* nur eine sehr schwache Markierung, die mit der Hintergrundmarkierung gleichzusetzen ist. Diese Ergebnisse bestätigen das Ergebnis der Western Blot Analysen und lassen auf eine hohe Spezifität des Antikörpers für die Art *M. thermotrophicus* schließen.

Die Ergebnisse der immunologischen Ansätze mit dem Ganzzellantikörper sind teilweise widersprüchlich. So zeigen die Immunmarkierungen an Ultradünnschnitten eine eindeutige Markierung von Epitopen der Zellhülle von *M. thermotrophicus*, wohingegen die massenspektrometrischen Auswertungen auf Proteine hindeuten, welche cytoplasmatisch lokalisiert sind. Am wahrscheinlichsten ist es, dass die Banden, die für die massenspektrometrische Auswertung ausgeschnitten wurden, nicht exakt den Banden entsprechen, die im Western Blot spezifisch von dem

Antikörper markiert wurden. Die Auswahl der Banden erfolgte bei dieser Methode rein dadurch, dass die Laufhöhe der markierten Banden im Western Blot am Standard abgeschätzt wurde, und dieses Ergebnis auf das Coomassie- bzw. silbergefärbte SDS-Gel übertragen wurde. Dabei ist zu bedenken, dass ein Antikörper hochspezifisch auch geringe Mengen des Antigens erkennen und markieren kann, auch wenn dieses eventuell so gering konzentriert vorliegt, dass es mit konventionellen Färbemethoden im SDS-Gel nicht detektierbar ist. Wird somit eine Gelbande für die Massenspektroskopie im SDS-Gel ausgeschnitten, die nur minimal über oder unter der im Western Blot markierten Bande liegt, erhält man eine falsche Zuordnung des Proteins.

Diskussion und Fazit

Als Grundlage für die Entwicklung eines molekularen Tests zur Feststellung der Stammidentität wurde das Genom vom ECH0100-Stamm mithilfe des PacBio-Verfahrens sequenziert. Durch Alignments mit bereits vorhandenen Sequenzdaten des WT konnten 28 Basenvariationen detektiert werden, die im weiteren Verlauf des Projektes zur Entwicklung eines PCR-basierten Stammidentifizierungsassays herangezogen wurden, da sich keine Targets anboten, die einfacher zu detektieren waren.

Um zusätzlich Kandidaten für die Auswahl mehrerer Biomarker zu erhalten, die sich durch einen Antikörper spezifisch nur im ECH0100 nachweisen lassen würden, nicht jedoch im WT, wurde die spezifische Genexpression von WT und ECH0100 auf Transkriptomebene untersucht. Darüber hinaus wurde das Gesamtproteom der beiden Stämme analysiert und unter Heranziehung vielfältiger ultrastruktureller Techniken der Versuch unternommen, eindeutige zelluläre Marker zu identifizieren.

Die Analyse der Transkriptomdaten ergab, dass eine ganze Reihe von Genen, die direkt in die Methanogenese involviert sind, im ECH0100 hochtranskribiert sind im Verhältnis zum WT. Gleichwohl stellte sich heraus, dass kein Transkript im ECH0100 detektiert wurde, welches ausschließlich dort vorhanden war und nicht im WT. Die Auswertung der massenspektrometrischen Daten wurde dadurch erschwert, dass keine eindeutige Zuordnung eines Proteins zu einer Gelbande gelang und nur selten Proteinfragmente identifiziert wurden, welche einzig im ECH0100-Datensatz detektiert wurden.

Für die Entwicklung des Antikörper-Assays wurden unter Zugrundelegung aller verfügbaren Ergebnisse zwei Proteintargets ausgewählt. Die Klonierung und Expression der Zielproteine, die für die Gewinnung von Antikörpern nötig gewesen wäre, verlief jedoch ergebnislos. Daher wurden durch Immunisierung mit ganzen Zellen zusätzlich Antikörper gegen unbekannte Oberflächenmarker von ECH0100 Zellen generiert, die den Biokatalysator spezifisch erkennen und gegen andere Methanogene abzugrenzen vermögen. Mittels SDS-PAGE wurde nachgewiesen, dass keine Reaktion gegen Gesamtzellextrakte nahe verwandter Organismen wie *M. marburgensis* oder *M. wolfei* erfolgt und es sich daher um sehr spezifische Zielstrukturen von ECH0100 handelt. Die Lokalisation der detektierten Biomarker auf der Zelloberfläche wurde mithilfe der Immunogold-Färbetechnik nachgewiesen. Eine Unterscheidung zwischen ECH0100 und dem WT war mit dieser Technik dagegen nicht möglich trotz mehrfacher Präzipitation des Serums gegen intakte WT-Zellen vor der eigentlichen Verwendung des Antikörpers.

Zum eindeutigen Nachweis von ECH0100 durch Abgrenzung vom WT-Stamm wurde deshalb ein Nachweis auf genetischer Ebene entwickelt, der auf die Detektion von sogenannten „Single Nucleotide

Polymorphisms“ (SNPs) abzielt. Durch Amplifikation der entsprechenden Genabschnitte mittels PCR und anschließender Sanger-Sequenzierung konnte das Vorhandensein der charakteristischen DNA-Marker nachgewiesen werden. Um den Assay dahingehend zu vereinfachen, dass eine Auswertung ohne Sequenzierung der Basenfolge erfolgen kann, wurde ein Assay zum selektiven Restriktionsverdau an der Position des Basenaustauschs für vier verschiedene SNPs entwickelt. Die Auswertung erfolgt in diesem Fall direkt über die Analyse des Bandenmusters auf einem Agarosegel: das Vorhandensein der ECH0100-spezifischen DNA-Sequenz führt jeweils zur Spaltung der Amplikons in zwei Fragmente definierter Größe, während das Vorhandensein der WT-spezifischen Sequenz die Spaltung verhindert.

Nachdem der Assay für alle vier SNPs mithilfe von aufgereinigten Proben genomischer DNA etabliert worden war, wurde schließlich die Verwendung von Zellproben als Ausgangsmaterial für die Amplifikation der Genabschnitte getestet und die Zuverlässigkeit des Assays bewertet. Drei von vier in dieser Weise generierten Amplikons wurden während mehrfach wiederholter, unabhängiger Testreihen zuverlässig von dem eingesetzten Restriktionsenzym geschnitten. Der Restriktionsverdau der ECH0100 Amplikons aus Zellproben verlief häufig nur unvollständig, daher ist eine WT-Kontrolle bei jedem Testlauf miteinzuschließen, um eine eindeutige Abgrenzung zwischen ECH0100 und WT zu ermöglichen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass aufgrund der Ähnlichkeit der Stämme der Nachweis des Biokatalysators, und die dafür nötige Abgrenzung des ECH0100 Stammes vom WT nicht auf Proteinebene erfolgen konnte, sondern den Nachweis spezifischer genetischer Marker erfordert. Der zur Qualitätskontrolle im „Power-to-Gas“-Verfahren der Electrochaea GmbH hierzu entwickelte PCR-Assay, der die kombinierte Testung von drei Biomarkern einschließt, erlaubt eine zuverlässige Aussage über die Stammidentität einer getesteten Zellprobe und wird zukünftig routinemäßig für den Nachweis von ECH0100 eingesetzt.

Literatur:

Sarbu, C (2013): Untersuchung der Mth60-Fimbrien von *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. Dissertation, Universität Regensburg.

Scherer, PA and Böhm HP (1983): Ultrastructural investigation of 12 *Methanosarcinae* and related species grown on methanol for occurrence of polyphosphatelike inclusions. *Can. J. Microbiol.* 29:1190-99.

Sleytr, UB and Beveridge TJ (1999): Bacterial S-Layers. *Trends Microbiol.* 7:253-60.

Thoma, C; Frank, M; Rachel, R; Schmid, S; Näther, D; Wanner, G and Wirth, R (2008): The Mth60 fimbriae of *Methanothermobacter thermoautotrophicus* are functional adhesins. *Environ. Microbiol.* 10:2785-95.

Zeikus, JG and Wolfe RS (1972): *Methanobacterium thermoautotrophicus* sp. nov., an anaerobic, autotrophic, extreme thermophile. *J. Bacteriol.* 109:707-15.

Huang, Q., Baum, L., Fu, W.-L. (2010). Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis. *Clinical laboratory* 56/3-4, 149–152.