



# MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry zur Identifizierung von Mikroorganismen in der pharmazeutischen Produktion: Methodenentwicklung zur Erstellung einer Datenbank für die Identifizierung und Unterscheidung von Produktionsstämmen unter Berücksichtigung GMP relevanter Aspekte“

verfasst von / submitted by

Andreas Schöller B.Sc.

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of  
Master of Science(M.Sc.)

Wien, 2018 / Vienna 2018

Studienkennzahl lt. Studienblatt /  
degree programme code as it appears on  
the student record sheet:

A 066862

Studienrichtung lt. Studienblatt /  
degree programme as it appears on  
the student record sheet:

Chemie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Christopher Gerner



## **DANKSAGUNG**

Zu Beginn möchte ich mich bei Boehringer Ingelheim RCV GmbH & Co KG für die interessante Aufgabenstellung und die Möglichkeit zur Erstellung dieser Masterarbeit bedanken. Es war mir eine Freude bei einem so renommierten Unternehmen, in einer praxisnahen und professionellen Umgebung an einem aktuellen wissenschaftlichen Thema arbeiten zu dürfen.

Besonders möchte ich Frau Ing. Korina Urlan-Boksan für die gute Zusammenarbeit, die Leitung sowie die Organisation dieses Projektes danken.

Spezieller Dank gebührt außerdem Frau DI (FH) Germaine Buchmüllner und Herrn Mag. Antonio Cabrera, die mich sowohl beim praktischen Arbeiten, als auch bei der Diskussion theoretischer Fragestellungen durch wissenschaftliches Fachwissen und konstruktive Kritik unterstützt haben.

Weiterer Dank gilt außerdem allen weiteren Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Mikrobiologie in der biopharmazeutischen Qualitätskontrolle von Boehringer Ingelheim RCV & Co KG, die mich in allen praktischen Belangen unterstützt und durch ihren positiven Teamgeist und ihr Wissen stets gefordert und motiviert haben.

Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Christopher Gerner möchte ich für die hervorragende Betreuung und die kompetente Beratung bei allen wissenschaftlichen Fragestellungen danken.

Ein spezieller Dank gilt Herrn Mag. pharm. Martin Mähr, welcher mir durch seine jahrelange Unterstützung einen Studienabschluss erst ermöglichte und mich stets motivierte, das Studium der Chemie fortzusetzen und letzten Endes abzuschließen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Lebensgefährtin Verena Schallgruber sowie meiner Familie bedanken, die stets mit viel Geduld und Verständnis auch in schwierigen Zeiten an meiner Seite standen.



## INHALTSVERZEICHNIS

|         |                                                       |    |
|---------|-------------------------------------------------------|----|
| 1.      | EINLEITUNG.....                                       | 1  |
| 2.      | ZIEL und ZWECK.....                                   | 2  |
| 3.      | AKZEPTANZKRITERIEN .....                              | 2  |
| 4.      | MESSPRINZIP .....                                     | 4  |
| 4.1.    | Einführung.....                                       | 4  |
| 4.2.    | Ionisierung.....                                      | 6  |
| 4.2.1.  | Matrix.....                                           | 7  |
| 4.2.2.  | Targetplatte .....                                    | 8  |
| 4.2.3.  | Primäre Bildung von Ionen .....                       | 9  |
| 4.2.4.  | Sekundäre Bildung von Ionen in der MALDI-Wolke .....  | 10 |
| 4.3.    | Analysator .....                                      | 12 |
| 4.4.    | Detektor .....                                        | 14 |
| 5.      | MATERIALIEN und METHODEN .....                        | 15 |
| 5.1.    | Material .....                                        | 15 |
| 5.1.1.  | Verwendete Mikroorganismen.....                       | 15 |
| 5.1.1.1 | <i>Escherichia coli</i> .....                         | 16 |
| 5.1.1.2 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....                  | 16 |
| 5.1.2.  | Verwendete Nährmedien.....                            | 17 |
| 5.1.2.1 | TSA – Trypton Soja Agar:.....                         | 17 |
| 5.1.2.2 | RA - Rambach .....                                    | 18 |
| 5.1.2.3 | LB – Luria Bertani Agar.....                          | 18 |
| 5.1.2.4 | R2+B1.....                                            | 19 |
| 5.1.3.  | Verwendetes Equipment und Verbrauchsgüter.....        | 20 |
| 5.1.3.1 | Equipment.....                                        | 20 |
| 5.1.3.2 | Verbrauchsgüter.....                                  | 20 |
| 5.1.3.3 | Verwendete Chemikalien.....                           | 20 |
| 5.1.4.  | Software .....                                        | 21 |
| 5.1.4.1 | flexControl.....                                      | 21 |
| 5.1.4.2 | flexAnalysis .....                                    | 21 |
| 5.1.4.3 | MALDI Biotyper Offline Classification (MBT OC).....   | 21 |
| 5.1.4.4 | MALDI Biotyper Realtime Classification (MBT RTC)..... | 22 |
| 5.1.4.5 | Data Integrity .....                                  | 22 |
| 5.2.    | Methoden.....                                         | 22 |

|         |                                                                                      |    |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.2.1.  | Inokulation .....                                                                    | 22 |
| 5.2.2.  | Inkubation .....                                                                     | 22 |
| 5.2.3.  | Extraktion.....                                                                      | 23 |
| 5.2.4.  | Belegung der Targetplatte mit Probe .....                                            | 24 |
| 5.2.5.  | Kalibration .....                                                                    | 24 |
| 5.2.5.1 | IVD Bacterial Test Standard.....                                                     | 25 |
| 5.2.6.  | Messung der Proben.....                                                              | 25 |
| 5.2.7.  | Preprocessing .....                                                                  | 25 |
| 5.2.8.  | Processing .....                                                                     | 26 |
| 6.      | ERGEBNISSE .....                                                                     | 27 |
| 6.1.    | Rohdaten.....                                                                        | 27 |
| 6.2.    | Prozessierte Daten .....                                                             | 43 |
| 6.3.    | Zeitverhalten der Intensität.....                                                    | 52 |
| 6.4.    | Konzentrationsverhalten der Intensität.....                                          | 53 |
| 6.5.    | Überprüfung der erstellten Datenbank für <i>Escherichia coli</i> .....               | 56 |
| 6.5.1.  | Überprüfung der Testdatensätze mit restriktiven Akzeptanzkriterien .....             | 58 |
| 6.5.2.  | Überprüfung der Testdatensätze mit unveränderten Akzeptanzkriterien .....            | 63 |
| 6.6.    | Überprüfung der selbst erstellten Datenbank mit <i>Pseudomonas fluorescens</i> ..... | 65 |
| 6.7.    | Vermessung von Plasmid Extrakten.....                                                | 69 |
| 6.8.    | Erstellung eines phylogenetischen Baums mittels 16S Full Gene Sequencing.....        | 70 |
| 7.      | SCHLUSSFOLGERUNG .....                                                               | 72 |
| 7.1.    | Conclusio.....                                                                       | 72 |
| 7.2.    | Ausblick.....                                                                        | 73 |
| 8.      | ANLAGEN / REFERENZEN.....                                                            | 74 |
| 8.1.    | Zusammenfassung .....                                                                | 74 |
| 8.2.    | Abstract .....                                                                       | 74 |
| 8.3.    | Abbildungsverzeichnis: .....                                                         | 75 |
| 8.4.    | Tabellenverzeichnis:.....                                                            | 75 |
| 8.5.    | Formelverzeichnis: .....                                                             | 76 |
| 8.6.    | Literaturverzeichnis:.....                                                           | 76 |

## **ABKÜRZUNGEN**

BI RCV – Boehringer Ingelheim Regional Center Vienna

MBT OC – MALDI Biotyper Offline Classification

MBT RTC – MALDI Biotyper Real Time Classification

FDA – Food and Drug Administration

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use

AGES – Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit

AMG – Österreichisches Arzneimittelgesetz

MSP – Main Spectra (Synonym für Fingerprint)

MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization

TOF – Time Of Flight

MS – Massspectrometry

HCCA –  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymethylsäure

DHB – 2,5-Dihydroxybenzoesäure

HPA – Hydroxypicolinsäure

SA – Sinapinsäure

PIE – Pulsed Ion Extraction

ATCC – American Type Culture Collection

MM – Meselson Matthew

PAL – Peptidoglycan associated lipoprotein

TSA – Trypton Soja Agar

RA – Rambach Agar

LB – Luria Bertani Agar

BTS – Bacterial Test Standard

GUI – Graphic User Interface

IVD – In Vitro Diagnostics

JP – Japanese Pharmacopoeia

UV/VIS – Ultraviolet/Visible

S/N – Signal to Noise

## **BEGRIFFE**

Glycerinkultur: Eine Glycerinkultur ist eine Keimsuspension mit einer bestimmten Keimzahl. Die Keime wurden in Casobouillon hochgezüchtet und mit Glycerin versetzt. Dieses übernimmt hierbei eine Rolle als Zellschutz, da es sich im Keim statt Wasser einlagert und selbst bei niedrigen Temperaturen nicht gefriert, sondern lediglich seine Viskosität verändert. Dies ermöglicht das Lagern von Mikroorganismen zur Stammhaltung und stellt sicher, dass im Falle einer Reaktivierung des Keimes (Inkubation) genügend Zellen überleben, um Kolonien zu bilden.

Zur Stammhaltung erstellte Lösung aus 100 mL Stammkultur (lyophilisierter Keim in geeignetem Nährmedium) + 20 mL Glycerin. Es resultiert dabei eine Lösung mit ca. 17% Glycerin insgesamt, welche bei -70 °C praktisch unbegrenzt haltbar ist.

Schrägagarkultur: Eine Schrägagarkultur ist ein, auf einem Nährmedium angezüchteter Stamm, welcher verteilt über die schräge Oberfläche des Agars wächst. Sie wird aus einer Glycerinkultur angefertigt indem ein Ösenabstrich in einem sterilen Schrägagarröhrchen (Mit festem Nährmedium gefülltes und verschraubbares Glasfläschchen, welches beim Aushärten des Mediums schräg gelagert wurde um die Oberfläche des Agars zu vergrößern) durchgeführt wird. Sie hat den Vorteil gegenüber einer Glycerinkultur, dass die Mikroorganismen ohne Zusatz von Konservierungsmitteln als Lebendkultur gehalten werden können und beim Reaktivieren der Keime weniger Verluste stattfinden. Diese ist bei 2-8 °C für 4 Wochen lang haltbar, danach muss eine weitere Subkultur angelegt werden.

Stamm-Ebene: Die generelle Nomenklatur (Taxonomie) der Klassifizierung von Mikroorganismen endet bei der Bestimmung einer Species. Darüber hinaus ist bekannt, dass verschiedene Species durch unterschiedliche Variationen in ihrem Genom in verschiedene „strains“, also Stämme eingeordnet werden können, obwohl sie zur selben Species gehören. Die Bezeichnung Stamm-Ebene bezeichnet hierbei eine Identifikation auf dieser Ebene.

Plasmid-Ebene: Darüber hinaus ist es möglich, Mikroorganismen die derselben Species und demselben Stamm angehören auf einer weiteren Ebene darunter zu klassifizieren. Hierbei handelt es sich entweder um eine Variation des eigenen Genoms, oder eine Veränderung, die durch das Einbringen von artifizieller DNA, in Form eines gesplíceten Plasmides verursacht wird. Die Bezeichnung Plasmid-Ebene bezeichnet hierbei eine Identifikation auf dieser Ebene.

## 1. EINLEITUNG

Die aktuelle Datenbank (Version 7.0.0.0) des Gerätes (Bruker Daltonik microflex LT) kann die Stämme bis auf Spezies Ebene identifizieren, jedoch gibt es keine Unterscheidung der Stämme untereinander. Boehringer Ingelheim RCV nutzt *Escherichia coli* als Expressionssystem zur Produktion biopharmazeutischer Produkte, deshalb wurde dieser Mikroorganismus für die Etablierung eines Schemas zur Erstellung von Datenbankeinträgen verwendet, mit dem Vorhaben, die bereits existierende Datenbank von Bruker Daltonik zu erweitern. In weiterer Folge wurden auch andere Mikroorganismen zur Überprüfung verwendet. Die Anzucht erfolgte gemäß der etablierten Methode um eine der Routineanalytik entsprechende und durchführbare Prozedur zur gewährleisten. Sämtliche bei der Auswertung von Analysenergebnissen relevanten Geräteparameter wurden unverändert übernommen und es wurde nur die vom Hersteller empfohlene Software zur Aufbereitung der Daten verwendet.

Für das Erstellen von Datenbankeinträgen musste eine neue Prozedur etabliert werden, welche sowohl sicherstellt, dass die neuen Einträge in der Datenbank repräsentativ für einzelne Produktionsstämme sind, als auch qualitativ von hoher Güte (Wiederholbarkeit und Präzision). Zur Erstellung der Prozedur wurde eine Evaluierung mit verschiedenen Produktionsstämmen durchgeführt, in der die wichtigsten Parameter (Nährmedium, Inkubationszeit, Anpassung der Peak-Detektionsparameter relative Häufigkeit und die Anzahl der im MSP resultierenden Peaks) überprüft und optimiert wurden.

Dies erforderte eine alternative Vorgehensweise im Vergleich zu Routinemessungen. In der Betriebsanleitung des Gerätes wird auf das Programm MBT OC nur insofern eingegangen, dass damit im MBT RTC gemessene Daten wieder aufgerufen, abermals identifiziert und ein Analysenbericht gedruckt werden kann. Sämtliche weitere Funktionen des Programmes wurden den mitgelieferten Handbüchern und einer mitgelieferten Anleitung entnommen. Zur Abdeckung statistischer Eventualitäten und um den Auflagen verschiedener regulatorischer Autoritäten (z.B. FDA, ICH, AGES, etc.) zu entsprechen, wurde beschlossen, dass ein Datenbankeintrag aus 6 biologischen Replikaten, welche an 2 verschiedenen Tagen vermessen wurden und unter Berücksichtigung der von Bruker Daltonik vorgeschlagenen Qualitätskriterien für Spektren zur Erstellung von Standard-MSP's zu verwenden.

## **2. ZIEL und ZWECK**

Ziel ist die Etablierung der Identifizierung von Produktionsstämmen und die Entwicklung einer Prozedur zur Erstellung von Datenbankeinträgen, welche für die Gesamtheit aller Parameter repräsentativ ist.

Des Weiteren wurde die Signalstabilität in der Keimidentifizierung mittels MALDI-TOF-MS unter Einfluss unterschiedlicher Bedingungen in der Vorgeschichte der Probe (verschiedene Nährmedien/Alter der Kultur) untersucht.

Außerdem sollte mittels des experimentellen Setups gezeigt werden, ob eine Unterscheidung zwischen den Produktionsstämmen mit Plasmid und den Produktionsstämmen ohne Plasmid möglich ist, indem beide wie eigene Stämme behandelt werden.

## **3. AKZEPTANZKRITERIEN**

Wie in den Tabellen in Abbildung 1 ersichtlich ist, wird die Güte einer Identifikation mittels eines sogenannten Log-Scores angegeben. Dieser berechnet sich anhand der Übereinstimmung eines MSP's welches aus einem Spektrum einer unbekannten Probe berechnet wird mit einer Datenbank, welche aus Standard-MSP's besteht. Der Log-Score kann Werte zwischen 0 und 3 annehmen, je höher die Zahl, desto besser die Identifikation.

Nach der hinterlegten Standard Methode (MBT\_AutoX), welche in der Routine-Analytik verwendet wird, stellen sich die Akzeptanzkriterien wie folgt dar:

- Eine als sehr wahrscheinlich geltende Identifikation auf Spezies-Ebene (+++) erfordert einen Log-Score  $> 2,3$ .
- Eine als sicher geltende Identifikation auf Genus-Ebene (++) erfordert einen Log-Score  $> 2,0$  und  $< 2,3$  und kann als mögliche Identifizierung auf Spezies-Ebene beurteilt werden.
- Eine mögliche Identifizierung auf Genus-Ebene (+) erfordert einen Wert  $> 1,7$  und  $< 2,0$ . Ab einem  $< 1,7$  ist die Identifikation unzuverlässig (-).

Des Weiteren wird die Konsistenz, also wie plausibel das Ergebnis einer Identifikation ist, in drei Kategorien angegeben:

- Ist der beste Treffer grün (+++ oder ++) und folgende grüne Treffer von derselben Spezies und/oder folgende gelbe (+) Treffer zumindest vom selben Genus spricht man von der Konsistenz A (Spezies-Konsistenz).
- Gibt es keine Übereinstimmung der Folgetreffer auf Spezies-Ebene sondern nur auf Genus-Ebene (egal ob grün oder gelb) spricht man von Konsistenz B (Genus-Konsistenz).
- Ist weder eine Übereinstimmung der Folgetreffer auf Spezies noch auf Genus übereinstimmend spricht man von Konsistenz C (keine Konsistenz).

Für dieses Projekt werden für Analysenzwecke vergleichbar mit der Routineanalytik dieselben Akzeptanzkriterien gewählt ( $> 2,0$ ), welche nach den Angaben von Bruker Daltonik empfohlen werden. Lediglich bei der Überprüfung des Testdatensatzes während der Evaluierung wurden strengere Akzeptanzkriterien von Log-Scores  $> 2,3$  akzeptiert.

### Meaning of Score Values

| Range         | Description                                                  | Symbols | Color  |
|---------------|--------------------------------------------------------------|---------|--------|
| 2.300 - 3.000 | highly probable species identification                       | (+++)   | green  |
| 2.000 - 2.299 | secure genus identification, probable species identification | (++)    | green  |
| 1.700 - 1.999 | probable genus identification                                | (+)     | yellow |
| 0.000 - 1.699 | not reliable identification                                  | (-)     | red    |

### Meaning of Consistency Categories (A - C)

| Category | Description                                                                                                                                                                                                                      |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (A)      | Species Consistency: The best match was classified as 'green' (see above). Further 'green' matches are of the same species as the first one. Further 'yellow' matches are at least of the same genus as the first one.           |
| (B)      | Genus Consistency: The best match was classified as 'green' or 'yellow' (see above). Further 'green' or 'yellow' matches have at least the same genus as the first one. The conditions of species consistency are not fulfilled. |
| (C)      | No Consistency: Neither species nor genus consistency (Please check for synonyms of names or microbial mixture).                                                                                                                 |

**Abbildung 1 Akzeptanzkriterien**

Obwohl man bei der Analysenmethode durchaus von einer heuristischen Herangehensweise sprechen könnte (die Methode bedient sich einer Top-Down-Proteomics basierten Identifikation von Mikroorganismen, bei der nur ein Massenbereich von 2000 bis 20000 Da vermessen wird), zeigen jahrelange Forschung auf diesem Gebiet und neueste Erkenntnisse[1], dass unter bestimmten Bedingungen konsistente Ergebnisse mit sehr hohem Wahrheitsgehalt auch bei einem derart nahen Verwandtschaftsverhältnis resultieren können.

## 4. MESSPRINZIP

### 4.1. Einführung

Bereits in den frühen 1960er Jahren wurden die Grundsteine der heutzutage häufig verwendeten massenspektrometrischen Analysenmethode MALDI-TOF zur Charakterisierung von Biomolekülen gelegt. Zu dieser Zeit wurden vor allem die Kopplung von Laser-gestützter Ionisierung mit verschiedensten MS-Analysatoren und die Verwendung verschiedener Laser getestet. Wie sich in den 1970er Jahren herausstellte war die Kopplung von Laser desorption/ionisation mit einem Time of Flight Spektrometer eine vielversprechende Variante in der sich der Ionisierungsprozess (gepulste Laser-Schüsse) mit dem Analysenprozess (Flugzeiten von Molekül-Ionen) perfekt ergänzten und für die Analytik von Biopolymeren etablierte[2].

Der Begriff „Matrix assisted laser desorption/ionisation“ wurde erstmals im Jahr 1985 durch Michael Karas, Doris Bachmann und Franz Hillenkamp geprägt, als ihnen bei ihren Experimenten zum Einfluss der Laserwellenlänge auf die Ionisierung von Peptiden und Dipeptiden der Zusammenhang zwischen der Ionisierbarkeit von Alanin in An- und Abwesenheit von Tryptophan auffiel. Tryptophan wurde in diesem Zusammenhang erstmals als „Matrix“ bezeichnet und der Ionisierungsvorgang als „Matrix assistiert“, da das Vorhandensein von Tryptophan die Ionisierbarkeit von Alanin bei einem Zehntel der sonst dafür notwendigen Bestrahlungsstärke ermöglichte[3].



Abbildung 2 Bruker microflex LT

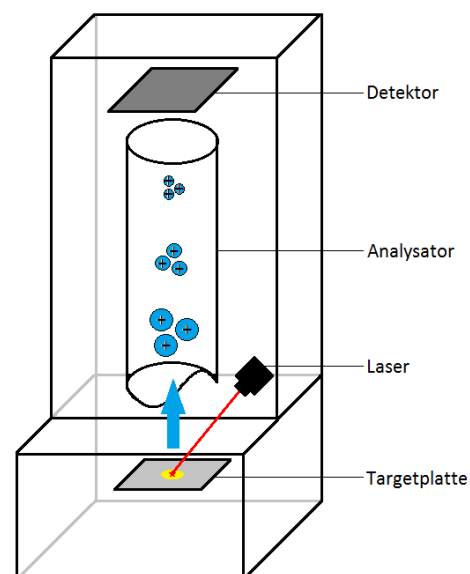


Abbildung 3 Schematischer Aufbau MALDI-TOF

Ein weiterer Durchbruch in diesem Bereich gelang Koichi Tanaka 1988 als er demonstrierte, dass eine Ionisierung von Biomolekülen selbst bei einer Größe von 100000 Da möglich ist, wenn die dafür entsprechenden experimentellen Bedingungen erfüllt werden (Matrix und Laser) [4]. Im Jahr 2002 wurde er dafür mit einem Teil des Nobel-Preises in Chemie geehrt.

Die Übertragung der Energie von Matrix-Molekülen auf nicht absorbierende Moleküle in einem diskreten Zeitintervall (1-100 ns) produziert dabei Ionenpakete die anschließend mit einer bestimmten Energie (1-30 kV) in einem statischen elektrischen Feld beschleunigt werden bis sie zur Feld-freien Zone gelangen (TOF-Flugrohr 0,1-3m). Durch die unterschiedliche Größe der ionisierten Moleküle resultieren verschiedene Flugzeiten und die Molekül-Ionen kommen zu unterschiedlichen Zeiten am Detektor an.

Die unter bestimmten Umständen erzeugten Massenspektren von ganzen Zellen eines Mikroorganismus bzw. Extrakten von diesem generieren ein stabiles Spektrum aus Signalen, welches wiederholbar und charakteristisch ist. Dieses besteht in einem Massebereich von 2000 bis 20000 Da hauptsächlich aus ribosomalen und regulatorischen Proteinen. Da diese ubiquitär sind und in allen lebenden Zellen abundante Komponenten darstellen (konserviert), erlaubt ein Vergleich dieser Spektren nicht nur eine Unterscheidung von Mikroorganismen sondern auch ihre phylogenetische Einordnung[5]. Studien von Arnold et al. konnten zeigen, dass mittels MALDI-TOF 55 von 56 existierenden subunit Proteinen von Ribosomen aus *Escherichia coli* K-12 inklusive ihrer posttranslationalen Modifikationen darstellbar und identifizierbar sind[6].

Diese Eigenschaften machten die MALDI-TOF basierte Identifikation von Mikroorganismen zu einer heute vielfach verwendeten Methoden in der klinischen Mikrobiologie, da sie nicht nur zuverlässig in der Aussagekraft, sondern auch kostengünstig und zeitsparend im Vergleich zu anderen Analysenmethoden ist[7]. Die ständige Weiterentwicklung durch das Erweitern von Datenbanken und das Optimieren und Homogenisieren von Extraktionsprozeduren machen die Methode zu einer sehr gefragten und aktuell verfolgten Analysenmethode[8]. Beispielsweise wurden eigen Extraktionsprotokolle für gram-positive Bakterien[9], gram-negative Bakterien[10] oder auch für Schimmel[11] entwickelt.

## 4.2. Ionisierung

Die Ionisierungsmethode MALDI ist gut erforscht, da seit mittlerweile mehr als 40 Jahren Bestrebungen zur Aufklärung eines genauen Mechanismus angestellt werden. Sie ist sehr beliebt, wenn es um die Analyse von großen Biomolekülen (Proteine, Nucleinsäuren, Biopolymere, etc.) geht, da es eine der weichsten Ionisierungsmethoden (kaum Fragmentierung) ist, die bis dato verwendet werden. Auf Grund der Komplexität des Vorganges und der Tatsache, dass nicht nur ein Mechanismus, sondern vielmehr das Zusammenspiel mehrerer Vorgänge, die zum Teil auch konzertiert ablaufen, konnte bis heute kein allgemein gültiger Mechanismus gefunden werden[12].

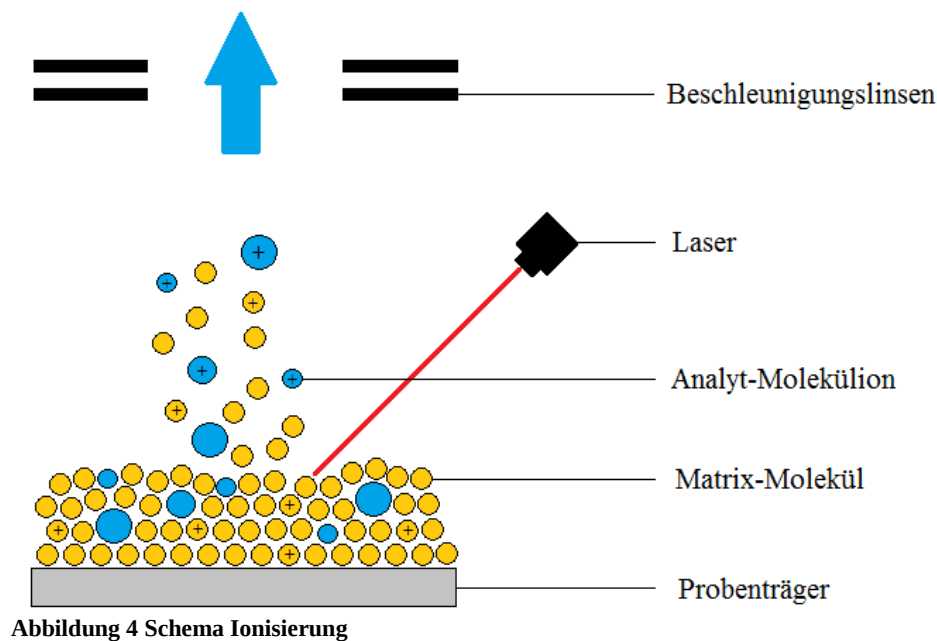


Abbildung 4 Schema Ionisierung

Prinzipiell werden bei MALDI Analyt-Ionen erzeugt, indem der Analyt mit einer Matrix co-kristallisiert und anschließend unter Vakuum (ca.  $3,7 \times 10^{-7}$  mbar) mit einem Laser beschossen wird. Dabei kommt es zur Ausbildung einer sogenannten MALDI-Wolke, welche sowohl Matrix- und Analyt-Moleküle, als auch Cluster in verschiedenen Größen und Zusammensetzungen aus diesen beinhaltet[13]. Währenddessen absorbieren die Matrix-Moleküle die Laser-Energie wodurch sie angeregt und zum Teil ionisiert werden, aber auch Protonen auf Analyt-Moleküle übertragen. Durch das angelegte Beschleunigungspotential werden die gebildeten Ionen in Richtung TOF-Analysator beschleunigt und aus der Wolke herausgerissen. Die Vorgänge, welche zur Bildung von Ionen führen können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Primäre Bildung von Ionen und Sekundäre Bildung von Ionen in

der MALDI-Wolke. Eine ebenso bedeutsame Rolle im Ionisierungsprozess nehmen Matrix und das Aufbringen der Probe und ebendieser ein[14].

#### 4.2.1. Matrix

Je nach Probentyp werden bei UV-MALDI-Methoden verschiedene Matrices verwendet. Eine geeignete Matrix sollte im verwendeten Wellenlängenbereich absorbieren und ein eher geringes Molekulargewicht aufweisen. Bei der hier angewandten Methode wird beispielsweise mit  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxyzimtsäure (HCCA) kokristallisiert, da sich diese als hervorragende Matrix zum Ionisieren von kleinen Proteinen und Peptiden herausgestellt hat. Einer der Vorteile von HCCA und ihren Derivaten gegenüber anderen Matrices ist die geringere Flüchtigkeit im Vakuum bei Raumtemperatur.[15] 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) kann beispielsweise für die Analyse von Peptiden (< 10 kDa), Nucleotiden, Oligonukleotiden oder auch Oligosacchariden eingesetzt werden. Ein Vorteil dieser Matrix ist der breitgefächerte Einsatzbereich[16].

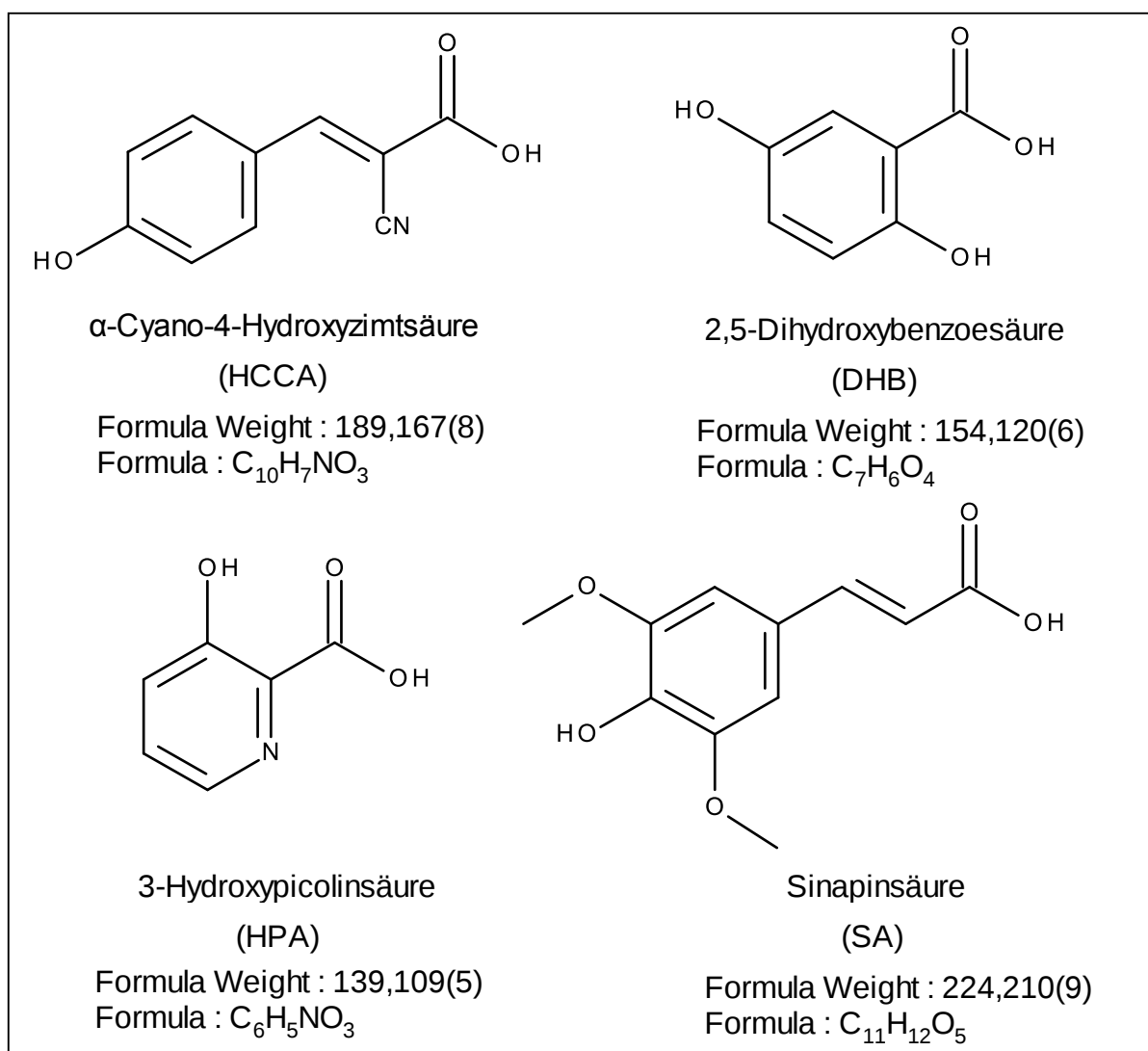


Abbildung 5 UV-MALDI-Matrices für verschiedene Probentypen bei 337 nm Laserwellenlänge

Zur Analyse von Oligonukleotiden eignet sich 3-Hydroxypicolinsäure (HPA) am besten da sie im Gegensatz zu anderen Matrices weniger Energie auf die Analyt-Moleküle überträgt und dadurch die sonst häufig auftretende Fragmentierung von Oligonukleotiden im Ionisierungsprozess vermindert[17]. Die letzte angeführte Matrix ist Sinapinsäure (SA) eignet sich sehr gut für Proteine, da sie im Vergleich zu anderen Matrices eine bessere Massen-Auflösung in diesem Bereich durch reduzierte photochemische Adduktbildung aufweist[18]. Alle aufgeführten Matrices sind in Abbildung 5 dargestellt und können bei einer Laserwellenlänge von 337 nm zur Ionisierung verwendet werden.

#### 4.2.2. Targetplatte

Das gezielte Auftragen der Probe und der Matrix ist ein unumgänglicher und kritischer Teil der Probenvorbereitung bei der „Dried Droplet“-Methode, welche hier angewendet wird. Nur wenn beide Schritte richtig durchgeführt werden kann eine homogene Verteilung der Matrix und eine homogene Schichtdicke des Kokristallisates sichergestellt werden. Hat die Matrix-Lösung nicht die optimale Konzentration kommt es zu einer nicht homogenen Verteilung und zur Bildung von Ringen („coffee rings“) im Trocknungsprozess[19]. Zur einfacheren Handhabung wurden von Bruker Targetplatten entwickelt, die das Größenverhältnis einer genormten Microtiterplatte mit 96 Wells, wie sie beispielsweise bei der Durchführung von Immuno-Assays verwendet wird, in dem Verhältnis 1:4 entspricht. Sie besteht aus poliertem Edelstahl und kann wiederverwendet werden. Durch die mit Laser gefrästen Target-Bereiche wird das Auftragen von 1  $\mu$ L Lösung erleichtert und es resultieren symmetrische Tropfen.

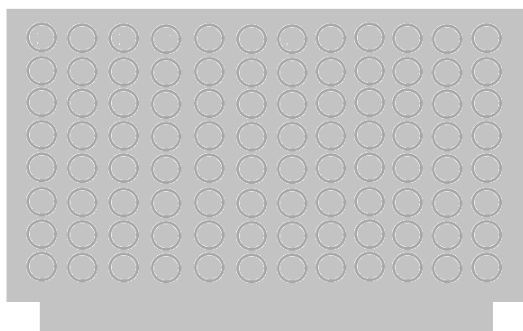


Abbildung 6 Targetplatte schematisch

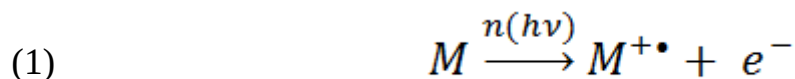


Abbildung 7 Targetplatte

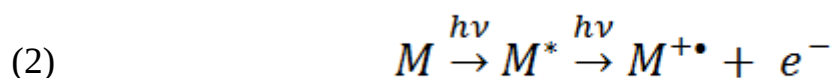
Im Folgenden wird auf einige der im Ionisierungsprozess ablaufenden Vorgänge eingegangen. Das Symbol M in den Formeln beschreibt hierbei nicht wie sonst in der Massenspektrometrie üblich ein Molekül sondern ein Matrix-Molekül während das Symbol A ein Analyt-Molekül beschreibt. Diese Unterscheidung ist zwingend notwendig, wenn die Ionisierungsprozesse erläutert werden, da sich einige Prozesse ausschließlich auf Matrix-Moleküle beziehen. Da es sich um eine Übersicht handelt kann nicht im Detail auf alle Prozesse eingegangen werden und es wird nur eine Auswahl an Theorien aufgeführt. Diese sind nach aktueller Meinung definitiv Teil des Ionisierungsprozesses und wurden über verschiedene Experimente nachgewiesen[20].

#### 4.2.3. Primäre Bildung von Ionen

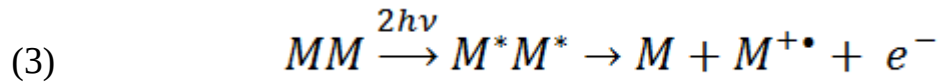
Einer der ersten Vorschläge zur primären Bildung von Ionen lieferte Ehring 1992 mit dem Modell der Photoionisation, bei dem davon ausgegangen wird, dass die hauptverantwortliche Spezies für die Bildung von Analyt-Ionen das kationische Matrix-Molekül-Ion-Radikal ( $M^{+\bullet}$ ) ist, welches durch die Aufnahme der Laser-Energie zustande kommt[21].



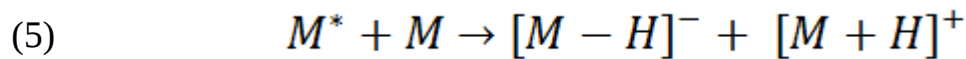
Wie viele Photonen für die Ionisierung notwendig sind hängt hauptsächlich vom Ionisierungspotential der Matrix ab. Messungen der Matrix DHB legen nahe, dass zwei Photonen involviert sind, wobei das erste Photon eine Anregung des Matrix-Moleküls in den  $S_1$  Zustand bewirkt und das zweite Photon das Herauslösen des Elektrons und damit die Entstehung des Radikals verursacht[22].



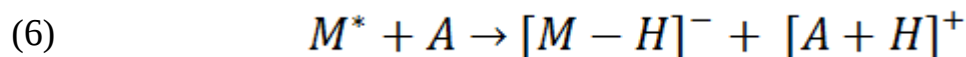
Eine andere Erklärung ist die Übertragung von Energie zwischen zwei angeregten Matrix-Molekülen durch das sogenannte „Energy pooling“. Hierbei überträgt eines der angeregten Moleküle im  $S_1$  Zustand die Energie auf ein anderes im gleichen Zustand, wodurch ein nicht-angeregtes Molekül und ein Molekül in einem höher angeregten  $S_n$  Zustand entsteht. Dieses kann entweder ein weiteres Molekül im  $S_1$  Zustand anregen, oder über thermische Ionisation ein primäres Ion generieren[23, 24].



„Excited state proton transfer“ (ESPT) ist eine weitere Theorie für die Bildung von primären Ionen. Dabei wird angenommen, dass ein über „single photon ionization“ angeregtes Molekül ein Proton an ein anderes Molekül überträgt (Matrix- oder Analyt-Molekül) und damit ein primäres Ion generiert. Auslöser ist hierbei die höhere Azidität von gebundenen Protonen welche durch die Anregung ausgelöst wird[25].



oder



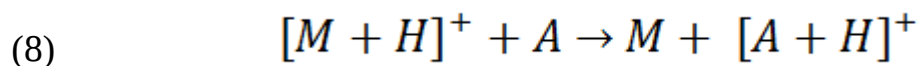
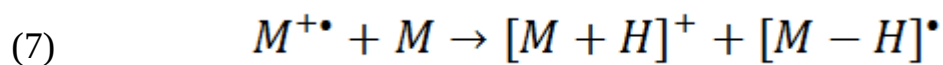
Als letzte Theorie sei der „Cluster Ionization“-Prozess angeführt. Dieser beruht auf der Annahme, dass im Kristall aus Matrix- und Analyt-Molekülen bereits geladene Analyt-Ionen vorliegen, welche beim Ionisieren der Matrix durch den Laser-Beschuss in Form von Clustern desorbiert werden. Diese Cluster haben unterschiedliche Größen und führen über mehrere Abspalt-prozesse von neutralen Matrix-Molekülen zu den geladenen Analyt-Molekülen[26].

#### 4.2.4. Sekundäre Bildung von Ionen in der MALDI-Wolke

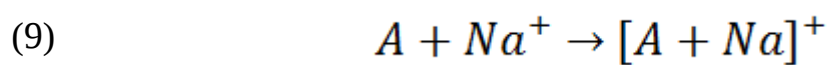
In der entstehenden MALDI-Wolke kommt es zu Gasphasen-Reaktionen bei denen ausgehend von den Primär-Ionen (meist Matrix-Ionen) Analyt-Ionen erzeugt werden. Dies kann auf verschiedene Arten und Weisen geschehen, etwa durch Gas-Phasen-Protonen-Transfer oder durch Gas-Phasen-Kationisierung.

Beim Gas-Phasen-Protonen-Transfer findet zuerst die Bildung einer protonierten Matrix-Species ausgehend von dem Primär-Ion  $M^{+\bullet}$  mit einem neutralen Matrix-Molekül statt. Anschließend überträgt das resultierende  $[M+H]^+$ -Ion sein Proton auf ein neutrales Analyt-Molekül und erzeugt so das entsprechende Analyt-Quasimolekül-Ion. Diese Reaktion ist

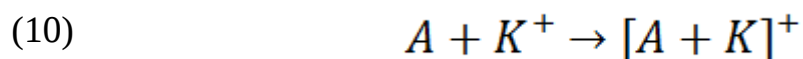
thermodynamisch oft begünstigt da die Protonen-Affinitäten von Matrices im Regelfall niedriger sind als die von Peptiden und Proteinen[27].



Die Gas-Phasen-Kationisierung stellt ein weiteres Phänomen dar, welches bei MALDI-Experimenten beobachtet und benutzt werden kann. Dabei kommt es durch Reaktion von Analyt-Molekülen mit Kationen in der Gas-Phase zur Ausbildung von einfach-geladenen Molekül-Ionen. Sie entstehen meistens beim Vorhandensein von Alkali-Metall-Ionen wie  $\text{Li}^+$   $\text{Na}^+$  oder  $\text{K}^+$  aber auch bei  $\text{Ag}^+$  oder  $\text{NH}_4^+$ . Das ubiquitäre Vorhandensein von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  erfordert in den meisten Fällen keine Zugabe von Kationisierungsreagenzien. Ihr Massen-Shift kann zur Identifizierung des protonierten Analyt-Ions eingesetzt werden[28, 29].



oder



### 4.3. Analysator

Abbildung 8 zeigt den schematischen Aufbau des Time of Flight (TOF)-Analysators. Wie auf der Abbildung zu erkennen ist gliedert sich der Aufbau in zwei Hauptsegmente. Im ersten Segment (d) befinden sich die drei Elektroden P1, P2 und G. Wobei die Elektrode P1 als Probenträger fungiert. In diesem Segment findet die Ionisierung statt, bei der alle ionisierbaren Moleküle mit einer Initialgeschwindigkeit von ca. 700 m/s [30] in alle Raumrichtungen geschleudert werden und die entstandenen Ionen zur Elektrode G mit einem konstanten elektrischen Feld von ca. 20 kV beschleunigt werden. Abhängig von ihrer Initialposition und Initialgeschwindigkeit würden dabei auch Moleküle mit dem gleichen Masse zu Ladungs-Verhältnissen zu unterschiedlichen Zeitpunkten an der Elektrode G ankommen und im Endeffekt eine Signalverbreiterung und einen Verlust von Auflösung bei der Detektion führen.

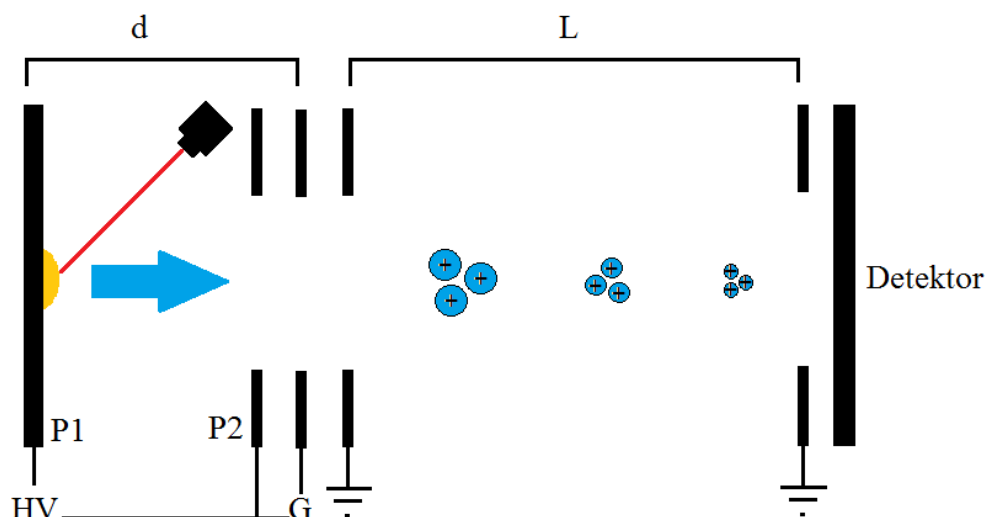


Abbildung 8 Schematischer Aufbau eines TOF-Analysators

Deshalb wird die sogenannte „pulsed ion extraction“ (PIE) angewandt. Hierbei wird einige 100 ns nach dem Laser-Beschuss für 130 ns ein Potential zwischen den beiden Elektroden P1 und P2 angelegt, bevor die Ionen-Pakete die Elektrode G erreichen. Dieses zusätzlich gepulste elektrische Feld bewirkt eine Art Kompression des Ionen-Paketes weil auf Ionen in der Nähe der Elektrode P1 eine größere Kraft wirkt als auf Ionen in der Nähe von Elektrode P2 (Gradient)[31]. Anschließend kommen die Molekül-Ionen in den feldfreien Bereich, indem sie durch ihre resultierende Geschwindigkeit nach ihrem  $m/z$ -Verhältnis aufgeteilt werden. Da alle Ionen netto gesehen dieselbe Energie im Beschleunigungsprozess aufgenommen haben bewegen sich kleinerer Ionen schneller als größere.

Das Prinzip des Time of Flight-Analysators beruht auf der Beschleunigung geladener Teilchen mit der Ladungszahl  $z$  in einem elektrischen Feld der Feldstärke  $eV$  und der anschließenden Zeitmessung auf einer feldfreien Flugstrecke im Vakuum. Da die resultierende Geschwindigkeit der Teilchen nur vom Beschleunigungspotential und der Ladungszahl abhängt, wirken auf alle Ionen (bei gleicher Ladungszahl) dieselbe Energie, welche zum Teil als kinetische Energie absorbiert wird[32]:

$$(11) \quad E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2 = zeV$$

$E_{kin}$ .....kinetische Energie [J]  
 $m$ .....Masse [kg]  
 $v$ .....Ionen Geschwindigkeit [m/s]  
 $z$ .....Ladungszahl [ ]  
 $eV$ .....Beschleunigungs-Potential [V]

Die resultierende Geschwindigkeit  $v$  ist dabei abhängig von der zurückgelegten Strecke  $D$  und der dafür benötigten Zeit  $t$ :

$$(12) \quad v = \frac{D}{t}$$

$v$ .....Ionen Geschwindigkeit [m/s]  
 $D$ .....Distanz [m]  
 $t$ .....Zeit [s]

Da sowohl das Beschleunigungspotential als auch die Flugstrecke konstant sind, kann durch einsetzen und umformen der Gleichungen nach der Messgröße  $t$  aufgelöst werden:

$$(13) \quad t = D \sqrt{\frac{m}{2zeV}}$$

$t$ .....Zeit [s]  
 $D$ .....Distanz [m]  
 $m$ .....Masse [kg]  
 $z$ .....Ladungszahl [ ]  
 $eV$ .....Beschleunigungs-Potential [V]

Gleichung (14) illustriert, dass die Flugzeit eines geladenen Teilchens im feldfreien Raum direkt proportional zu seinem Masse-Ladungsverhältnis ist:

$$(14) \quad t \propto \frac{m}{z}$$

$t$ .....Zeit [s]  
 $m$ .....Masse [kg]  
 $z$ .....Ladungszahl [ ]

Folglich haben kleinere Ionen kürzere Flugzeiten als größere Ionen und es findet eine Auftrennung nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis statt. Sind nur einfach geladene Teilchen vorhanden erfolgt die Auftrennung nach ihrer Masse[33].

#### 4.4. Detektor

Die entstandenen Ionen werden mittels eines „micro channel plate detectors“ (MCP) detektiert. Ein MCP ist eine Art Sekundärelektronenmultiplier (SEM) bei dem Millionen einzelner SEM's in einer porösen Platte elektrisch parallel verbunden sind. Jeder einzelne fungiert dabei als Vervielfacher und die entstehenden Signale werden am Ende der Channels gleichzeitig registriert. Das Prinzip der Detektion ist dabei folgendes: Jeder einzelne Channel besteht aus einer Doppelschicht an Coatings. Die äußere Schicht besteht im Normalfall aus Glas oder einem anderen nicht leitendem Material (Resistor) während die innere Schicht aus einer Halbleiter-Materialschicht besteht. Wird nun Hochspannung angelegt ( $> 1000\text{ V}$ ) und die innere Schicht von einem Kation getroffen schlägt dieses ein Sekundär-Elektron aus der Halbleiterschicht welches eine Kaskade auslöst bei der bei jedem Auftreffen eines weiteren Sekundär-Elektrons aus der Halbleiterschicht geschlagen werden. Damit kommt es zur Amplifizierung des Signals und einzelne Ionen können hochaufgelöst detektiert werden[34].

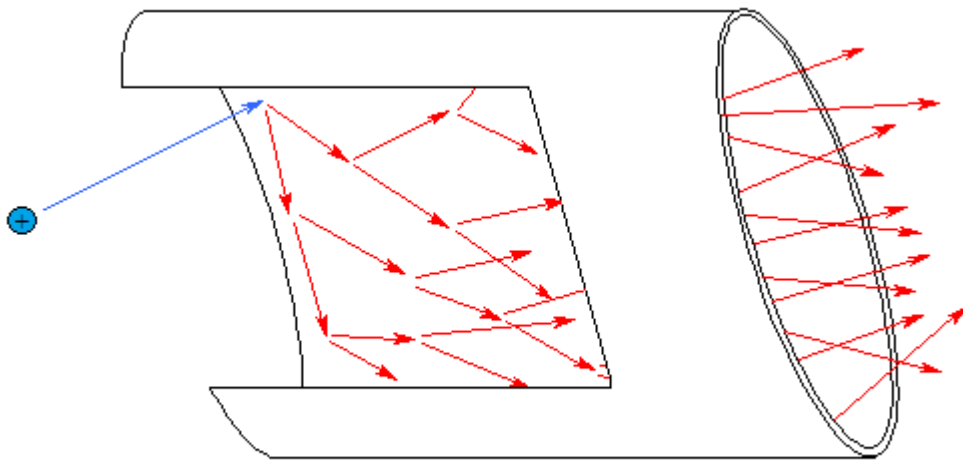


Abbildung 9 Querschnitt eines Microchannels

Abbildung 9 zeigt ein eintreffendes Ion (blau) welches beim Aufschlagen auf die Halbleiterschicht des Microchannels Sekundärelektronen (rot) erzeugt. Durch die ausgelöste Kaskade kommt es ca. zu einer Amplifizierung des Signals um den Faktor 10.

## 5. MATERIALIEN und METHODEN

### 5.1. Material

#### 5.1.1. Verwendete Mikroorganismen

Im ersten Experiment wurden ausschließlich Stämme von *Escherichia coli* verwendet. Bei weiteren Versuchen wurden auch *Pseudomonas fluorescens* Stämme in die Datenbank integriert. Für die Erstellung von Datenbankeinträgen wurden ausschließlich Kulturen ausgehend von Schrägagarkulturen verwendet.

Tabelle 1 Verwendete Mikroorganismen

| Teststamm                                        | Hersteller         | Herstellungsdatum | Keimnummer |
|--------------------------------------------------|--------------------|-------------------|------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739                | Eigene Herstellung | 19.10.2017        | 01-AS      |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1                 | Eigene Herstellung | 19.10.2017        | 02-AS      |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1 mit Plasmid     | Eigene Herstellung | 19.10.2017        | 03-AS      |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000                 | Eigene Herstellung | 07.11.2017        | 04-AS      |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000 mit Plasmid     | Eigene Herstellung | 07.11.2017        | 05-AS      |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> MB101             | Eigene Herstellung | 14.11.2017        | 06-AS      |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> MB101 mit Plasmid | Eigene Herstellung | 14.11.2017        | 07-AS      |
| <i>Escherichia coli</i> DH5α Kan                 | Eigene Herstellung | 28.11.2017        | 08-AS      |
| <i>Escherichia coli</i> W3110 Ton A mit Plasmid  | Eigene Herstellung | 18.12.2017        | 09-AS      |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3)              | Eigene Herstellung | 18.12.2017        | 10-AS      |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 mit Plasmid        | Eigene Herstellung | 18.12.2017        | 11-AS      |
| <i>Escherichia coli</i> HMS 174 (DE3)            | Eigene Herstellung | 18.12.2017        | 12-AS      |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM 50090         | Eigene Herstellung | 08.01.2018        | 13-AS      |

#### 5.1.1.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* gehört zur Familie der Enterobacteriaceae und ist ein gramnegatives stäbchenförmiges Bakterium das vor allem im Verdauungstrakt von Säugetieren verbreitet, aber auch im Boden und im Wasser überleben kann. Es gilt als einer der am besten charakterisierten Mikroorganismen weltweit. Es wurde nach seinem Entdecker Theodor Escherich benannt der es 1886 aus einer menschlichen Stuhlprobe isolierte. Es wird seit über einem Jahrhundert verwendet um biologische Vorgänge in Mikroorganismen aufzuklären und zu verstehen[35]. Durch die gesammelten Daten und dem Wissen, welches sich zu Fragestellungen der Systembiologie über diesen Mikroorganismus angehäuft hat, ist eine rasche Entwicklung und Adaption von Produktionsstämmen möglich. Diese Möglichkeiten machten *Escherichia coli* zu einem Modellorganismus im Metabolomic Engineering[36].

Umso weniger verwunderlich ist es, dass dieser Organismus auch der meist verwendete bei biotechnologischen Produktionen ist und bereits bei einer Vielzahl von Chemikalien oder anderen Zielverbindungen als Host verwendet wurde. Grund hierfür sind seine attraktiven Eigenschaften: Schnelle Wachstumsraten, durchführbare Fermentation bei hoher Zelldichte, niedrige Produktionskosten, genaue Kenntnis über den Metabolismus sowie ausgereiftes genetisches Werkzeug und Wissen zur Manipulation bzw. Optimierung von Produktionsstämmen[37, 38].

#### 5.1.1.2 *Pseudomonas fluorescens*

*Pseudomonas fluorescens* gehört zur Familie der Pseudomonadaceae und ist ebenso wie *Escherichia coli* ein gramnegatives stäbchenförmiges Bakterium. Es ist ubiquitär verbreitet und sowohl an Lebensräume innerhalb von Säugetieren als auch außerhalb angepasst. Dabei helfen ihm seine extrem vielseitigen metabolischen Fähigkeiten. Er toleriert pH Werte zwischen 4 und 8 sowie Temperaturen zwischen 4° und 32° C (Nicht-Säugetier Isolat) bis hin zu 37°C (Säugetier Isolat)[39].

Zusätzlich zu seiner Toleranz gegenüber verschiedenen Bedingungen ist er ungewöhnlich gut geeignet für Hochexpressionssysteme, in denen er teilweise bessere Ausbeuten liefert als *Escherichia coli*. Ein Grund hierfür ist vor allem die Exkretion des produzierten Produktes in den periplasmatischen Raum der Zelle, oder gar in den Extrazellulärraum, was die anschließende Aufreinigung des Produktes erheblich erleichtert[40].

### 5.1.2. Verwendete Nährmedien

Zur Überprüfung der Signalstabilität und Reproduzierbarkeit der Signale wurden unterschiedliche Nährmedien verwendet, um ein möglichst breites Spektrum an Bedingungen zu simulieren.

**Tabelle 2 Verwendete Nährmedien**

| Medien                       | Hersteller         |
|------------------------------|--------------------|
| TSA - Trypcase Soja Bouillon | Bio Merieux        |
| RA – Rambach Agar            | Eigene Herstellung |
| LB – Luria Bertani Agar      | Eigene Herstellung |
| R2+B1 Medium                 | Eigene Herstellung |
| R2+B1 + 50 µg/mL Ampicillin* | Eigene Herstellung |

\*Konzentration und Antibiotikum wurden lt. der produktspezifischen internen Vorschrift ausgesucht

#### 5.1.2.1 TSA – Trypton Soja Agar:

TSA ist ein nicht-selektives Universal-Medium, welches genügend Nährstoffe bietet um das Wachstum einer Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen zu ermöglichen. Das Medium enthält die durch enzymatischen Verdau mittels Trypsin entstandenen Peptone aus Casein und Sojabohnen-Mehl, welche eine gute Aminosäure- und Stickstoffquelle darstellen, die von vielen Mikroorganismen genutzt werden kann. Natriumchlorid erhält das osmotische Gleichgewicht. Zur Neutralisierung von Desinfektionsmittel- Resten an der Oberfläche enthält das Medium eine spezielle Kombination aus Reagenzien: Sojalezithin, Polysorbat 80 und L-Histidin zur Neutralisation von Aldehyden und Phenolen, Natriumthiosulfat zur Neutralisation von Halogenbestandteilen.

Zusammensetzung\*:

|                                            |         |
|--------------------------------------------|---------|
| Caseinpepton (Rind).....                   | 15,0 g  |
| Sojapepton.....                            | 5,0 g   |
| Hefeextrakt.....                           | 6,0 g   |
| Natriumchlorid.....                        | 5,0 g   |
| Natriumpyruvat.....                        | 2,0 g   |
| Sojalezithin.....                          | 0,7 g   |
| Polysorbat 80 (Tween 80).....              | 5,0 g   |
| Natriumthiosulfat, 5 H <sub>2</sub> O..... | 0,05 g  |
| L-Histidin.....                            | 1,0 g   |
| Agar.....                                  | 15 g    |
| Gereinigtes Wasser.....                    | 1000 mL |

pH 7,3

\*biomerieux, REF 43 811, 43 819

### 5.1.2.2 RA - Rambach

RA wird verwendet um *Salmonella spp.* nachzuweisen. Das Medium unterstützt das Wachstum von *Enterobacteriaceae*. Das zugesetzte Natriumdesoxycholat inhibiert das Wachstum grampositiver Bakterien. Propylenglykol ermöglicht die Unterscheidung zwischen *Salmonella spp.* und anderen gram negativen Bakterien. Dabei verstoffwechseln *Salmonellae* das Propylenglykol zur Milchsäure und in Kombination mit einem pH-Indikator kommt es zu einer Rotfärbung. Zur Unterscheidung zwischen anderen Laktose positiven coliformen Bakterien und *Salmonella spp.* enthält das Medium ein Chromogen, welches  $\beta$ -galactosidase Aktivität durch blau-grün Färbung anzeigt. Andere gramnegative Bakterien wie zum Beispiel *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella typhi* or *S. paratyphi A* bilden eine farblose bzw. gelblich gefärbte Kolonien[41].

#### Zusammensetzung\*:

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| Pepton.....              | 8 g/L    |
| Natriumchlorid.....      | 5 g/L    |
| Natriumdesoxycholat..... | 1 g/L    |
| Chromogen Mix.....       | 1,5 g/L  |
| Propylenglycol.....      | 10,5 g/L |
| Agar-Agar.....           | 15 g/L   |
| pH 7,1-7,5               |          |

\*Merck Technical Data Sheet 1. 07500.0001 / 1.07500.0002 / 1.07500.0003

### 5.1.2.3 LB – Luria Bertani Agar

LB ist ein Komplexmedium, welches erstmals 1951 von Giuseppe Bertani für Studien des lysogenen Zyklus am Beispiel von *Escherichia coli* verwendet wurde. Ursprünglich enthielt das Nährmedium zusätzlich Glucose, welche bei moderneren Formen dieses Mediums nicht mehr zum Einsatz kommt. Trypton (durch enzymatischen Abbau mittels Trypsin erhaltene Peptone) stehen als Aminosäurequelle zur Verfügung, während der Hefe-Extrakt Vitamine und Spurenelemente zu Verfügung stellen soll. Durch den Zusatz von Natriumchlorid wird das osmotische Gleichgewicht erhalten[42].

#### Zusammensetzung:

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Trypton.....            | 10,0 g  |
| Hefe Extrakt.....       | 5,0 g   |
| Natriumchlorid.....     | 10,0 g  |
| Agar.....               | 20,0 g  |
| Gereinigtes Wasser..... | 1000 mL |
| pH 7,0 $\pm$ 0,2        |         |

#### 5.1.2.4 R2+B1

R2+B1 ist ein, an LB angelehntes Nährmedium. Es unterscheidet sich lediglich im Anteil an Trypton und Hefe-Extrakt, sowie dem Zusatz von 1% Thiamin Lösung.

Zusammensetzung:

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Trypton.....            | 20,0 g  |
| Hefe Extrakt.....       | 10,0 g  |
| Natriumchlorid.....     | 10,0 g  |
| Agar.....               | 15,0 g  |
| Gereinigtes Wasser..... | 1000 mL |
| 1% Thiamin-HCl* .....   | 1,0 mL  |

pH 7,0 ± 0,2

\* Thiamin-HCl wird erst nach dem Autoklavieren dem temperierten Agar zugesetzt.

### 5.1.3. Verwendetes Equipment und Verbrauchsgüter

#### 5.1.3.1 Equipment

Tabelle 3 Equipment

| Equipment                                | Hersteller        |
|------------------------------------------|-------------------|
| Laminar Flow HERA SAFE KS                | Thermo Scientific |
| Brutschrank 32,5 °C ± 2,5 °C             | Binder            |
| Brutschrank 37 °C ± 1,0 °C               | Binder            |
| Brutschrank 30 °C ± 1,0 °C               | Binder            |
| Biotyper microflex LT                    | Bruker Daltonik   |
| Centrifuge 5424                          | Eppendorf         |
| elektr. Kolbenhubpipette Xplorer 10 µL   | Eppendorf         |
| elektr. Kolbenhubpipette Xplorer 100 µL  | Eppendorf         |
| elektr. Kolbenhubpipette Xplorer 300 µL  | Eppendorf         |
| elektr. Kolbenhubpipette Xplorer 1000 µL | Eppendorf         |

andere:

Vortexer

Bunsenbrenner

#### 5.1.3.2 Verbrauchsgüter

Sterile Impfösen 1+10 µL (Biosiama)

Präzisionswischtücher (Kimberly-Clark)

Pipettenspitzen 10+1000 µL (Eppendorf)

Sterile Filter-Pipettenspitzen 100+300 µL (VWR)

Sterile Handschuhe (Sempermed)

Sterile Ärmelschoner (Lohmann und Rauscher)

Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 mL (Eppendorf)

#### 5.1.3.3 Verwendete Chemikalien

Tabelle 4 Verwendete Chemikalien

| Reagenz                               | Hersteller         |
|---------------------------------------|--------------------|
| Acetonitril (ACN)                     | Honeywell          |
| Ameisensäure (AS)                     | Honeywell          |
| Ethanol, absolut (EtOH)               | Merck              |
| 70% Ethanol                           | VWR                |
| Trifluoressigsäure (TFA)              | Honeywell          |
| Standardlösungsmittel* (SLM)          | Honeywell          |
| gereinigtes Wasser (H <sub>2</sub> O) | Eigene Herstellung |
| BTS-Standard lyophilisiert            | Bruker             |
| HCCA lyophilisiert                    | Bruker             |
| 70% Ameisensäure-Lsg.                 | Eigene Herstellung |
| HCCA Lösung                           | Eigene Herstellung |
| BTS-Standardlösung                    | Eigene Herstellung |

\*Standardlösungsmittel (50% ACN, 47,5% H<sub>2</sub>O, 2,5% TFA)

#### **5.1.4. Software**

Die hier angeführten Programme wurden im Rahmen des Compass 1.4 Software-Paketes mit dem Gerät erworben und sind in der Routineanalytik etabliert und in der internen Betriebsanleitung dargestellt. Es wurde ausschließlich diese Software zur Bearbeitung und Auswertung von Daten verwendet, sämtliche GMP-relevanten Einstellungen wurden dabei nicht verändert. Das Vorgehen beim Erstellen von Datenbankeinträgen wurde von Bruker Daltonik geschult, die hierzu erhaltenen Informationen und Dokumente wurden ebenfalls verwendet.

##### **5.1.4.1 flexControl**

Das Programm flexControl steuert alle Parameter die für den Messvorgang benötigt werden und ist für die Aquisition von Daten notwendig. Es liefert Informationen bezüglich des Status einzelner Komponenten wie zum Beispiel dem des Sample Carriers, der Detektion oder der generellen Spektrometer Eigenschaften. Über den AutoExecute-Reiter können Messungen durchgeführt und über das Graphical User Interface (GUI) überwacht werden. Messungen mit der Methode MBT\_AutoX generieren dabei die Rohdaten, also unbehandelte Massenspektren.

##### **5.1.4.2 flexAnalysis**

Mit flexAnalysis wird die Überprüfung der Spektren durchgeführt. Es ist ein Programm, das nur zur Analyse bereits erhaltener Rohdaten verwendet werden kann (es können damit keine Messungen durchgeführt werden). Das gesamte Preprocessing der Rohdaten wird mit diesem Programm durchgeführt. Hierzu muss die Methode MBT Standard ausgewählt werden und anschließend eine Kurvenglättung und eine Basislinienkorrektur durchgeführt werden. Beide Prozesse dienen lediglich der besseren Darstellung der Spektren. Die Kurvenglättung reduziert dabei Rauschen und verbessert das S/N-Verhältnis und damit die Auflösung. Die Basislinienkorrektur bewirkt, dass das Spektrum entlang der y-Achse (Intensität) korrigiert wird und entfernt die durch das Vorliegen von Untergrundrauschen erhöhte Basislinie.

##### **5.1.4.3 MALDI Biotyper Offline Classification (MBT OC)**

MBT OC ist die Software welche verwendet wird um MSP's zu berechnen, Datenbanken zu kreieren sowie diese zu verwalten und das gesamte Sub-typing mittels Subtyping-MSP,

PCA (Principal Component Analysis) oder CCI (Composite Correlation Index)-Analysis durchzuführen. Es hat keinerlei Einfluss auf die Routineanalytik (dieses Programm wird nicht verwendet).

#### **5.1.4.4 MALDI Biotyper Realtime Classification (MBT RTC)**

MBT RTC ist das routinemäßig verwendete Messprogramm für Identifizierungen. Es ist darauf ausgelegt schnell und einfach Proben gegen eine vorhandene Datenbank abzugleichen und eine schnelle und zuverlässige Identifizierung zu erhalten. Alle damit durchgeführten Messungen werden in einem eigenen Ordner gespeichert („MaldiBiotyperRealTimeClassification“), welcher schreibgeschützt ist und auch das Löschen von Daten verhindert.

#### **5.1.4.5 Data Integrity**

Um sicher zu stellen, dass alle Messungen für Forschungszwecke nicht mit denen der Routineanalytik vermischt werden, wurde im Unterordner „MSP creation“ ein Ordner „Datenbankerweiterung Produktionsstämme“ erstellt, in dem sämtliche Messungen gespeichert werden. Da alle Routinemessungen mit dem Programm MBT RTC durchgeführt werden, und dieses einen eigenen Speicherort hinterlegt hat, ist ein Vermischen der Daten ausgeschlossen. Kalibrationsmessungen werden wie bereits erwähnt im MBT RTC durchgeführt, weshalb die Daten anschließend zu Dokumentationszwecken in den „Datenbankerweiterung Produktionsstämme“-Unterordner „BTS Kalibrierung“ kopiert werden müssen.

### **5.2. Methoden**

#### **5.2.1. Inokulation**

Die ausgewählten Mikroorganismen werden unter sterilen Bedingungen mittels Ösenabstrich (1 µL Impföse) aus Schrägagarkulturen bzw. aus Glycerinkulturen auf die Nährmedien übertragen.

#### **5.2.2. Inkubation**

Je nach Nährmedium wurden unterschiedliche Inkubationstemperaturen verwendet. Die Inkubationsdauer wurde beim ersten Experiment mit 11 Tagen für alle Nährmedien

festgesetzt, damit nach gewissen Zeitabständen (1, 4, 6 und 11 Tagen) Messungen durchgeführt werden konnten.

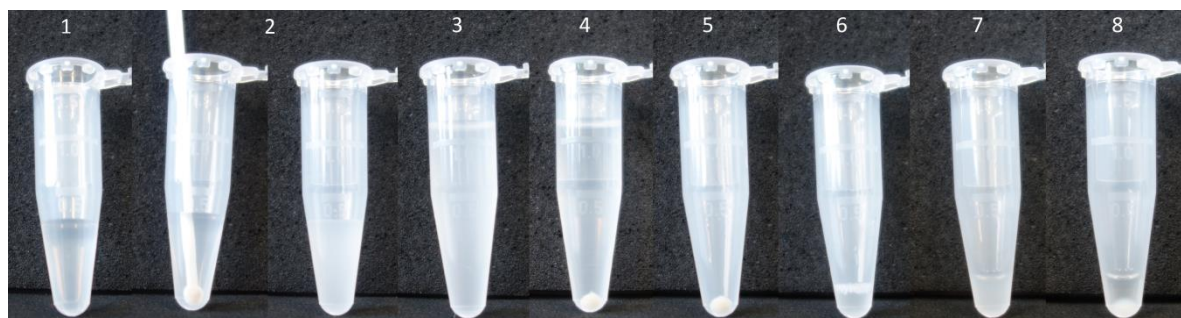
**Tabelle 5 Inkubationsbedingungen**

| Nährmedium                  | Temperatur       |
|-----------------------------|------------------|
| TSA                         | 32,5 °C ± 2,5 °C |
| RA                          | 37,0 °C ± 1,0 °C |
| LB                          | 37,0 °C ± 1,0 °C |
| R2+B1                       | 37,0 °C ± 1,0 °C |
| R2+B1 + 50 µg/mL Ampicillin | 37,0 °C ± 1,0 °C |

### 5.2.3. Extraktion

Zur Erstellung der Datenbankeinträge wurde ausschließlich die bereits etablierte Vorbereitung des Keim-Materials mittels Ameisensäure Extraktion, welche von Bruker Daltonik empfohlen wird, verwendet. Es wurde dabei folgender Maßen vorgegangen:

1. 300 µL deionisiertes Wasser werden in ein Eppendorfgefäß vorgelegt.
2. Eine 1 µL Impföse wird verwendet um biologisches Material in das Eppendorfgefäß zu transferieren. Anschließend wurde das Keim-Material durch wiederholtes aufziehen mit einer Pipette homogenisiert.
3. 900 µL Ethanol wurden hinzugefügt und gründlich vermischt.
4. Bei maximaler Geschwindigkeit (15000 rpm) für 2,5 min abzentrifugiert, Überstand verworfen, nochmals zentrifugiert und das restliche Ethanol vorsichtig mit einer Pipette entfernt, ohne dabei das Pellet zu verletzen.
5. Pellet bei Raumtemperatur 2-3 min trocknen lassen.
6. 30 µL 70%ige Ameisensäure zum Pellet hinzugefügt und durch Pipettieren homogenisiert.
7. 30 µL Acetonitril hinzugefügt und vorsichtig vermischt.
8. Bei maximaler Geschwindigkeit (15000 rpm) für 2,5 min abzentrifugiert, damit sich das Material zu einem Pellet formte.



**Abbildung 10 Ablauf der Ameisensäure Extraktionsmethode**

Der Überstand enthält nun hauptsächlich ribosomale Proteine und wird als Probe vermessen. Größere Proteine werden durch den Zusatz von Acetonitril auf Grund ihrer größeren Oberfläche denaturiert und ausgefällt.

#### 5.2.4. Belegung der Targetplatte mit Probe

1  $\mu\text{L}$  des Überstandes welcher bei der Ameisensäure Extraktion resultiert wurde auf eine MALDI-Targetplatte pipettiert und bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Anschließend wurde der Spot innerhalb 1 Stunde mit 1  $\mu\text{L}$  HCCA-Lösung (10mg/mL) überzogen und bei Raumtemperatur trocknen gelassen.

Von jeder Probe wurden beim ersten Experiment 12 Spots (1 Reihe) je 3 Mal (Drei aufeinander folgende Messungen) vermessen ( $12 \times 3 = 36$  Spektren), wobei jedes Einzelspektrum bereits ein Summenspektrum aus 120 Laser-Schüssen ( $3 \times 40$  an randomisierten Stellen mit einer Laser-Intensität zwischen 30% und 40%) darstellt. In weiterer Folge wurde für die Erstellung von MSP's festgelegt, dass pro Probe und Tag 9 Spots 3 Mal vermessen werden (Jedes biologische Replikat wurde 3 Mal aufgetragen und 3 Mal vermessen).

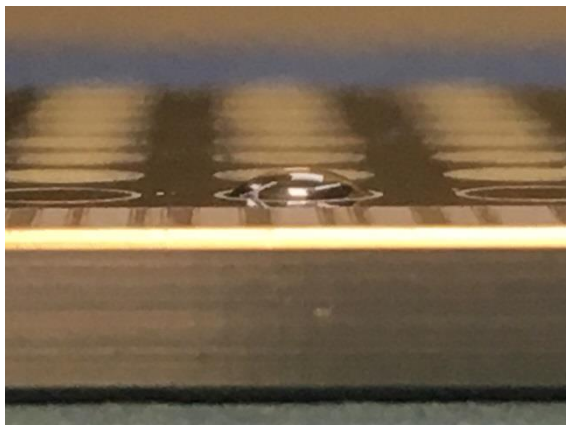


Abbildung 11 Aufgetragener Spot seitlich

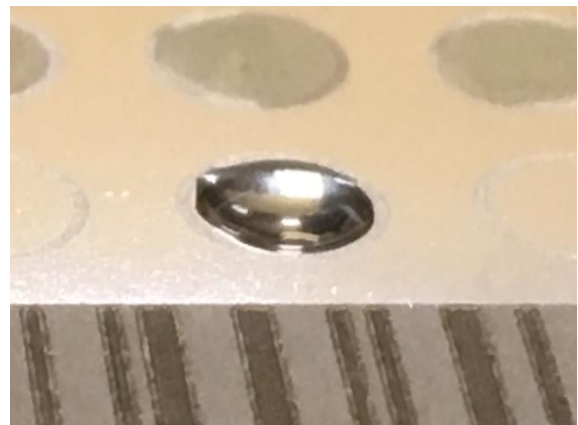


Abbildung 12 Aufgetragener Spot von oben

#### 5.2.5. Kalibration

Vor jeder Messung muss das Gerät kalibriert werden. Hierzu wird eine separate Messung im Programm MBT RTC gestartet und mit der Identifizierung des IVD Bacterial Test-Standards begonnen. Da vor jeder Messung in diesem Programm automatisch eine Kalibrationsmessung mit anschließender Validierung der Messparameter durchgeführt wird, kann diese Messung als Kalibration für alle Folgemessungen herangezogen werden. Die Dokumentation erfolgt über den Analysenreport, welcher anschließend ausgedruckt wird.

### 5.2.5.1 IVD Bacterial Test Standard

Der In Vitro Diagnostic Bacterial Test Standard (IVD BTS) ist ein externer Standard, der auf dieselbe Targetplatte wie die zu vermessene Probe aufgetragen wird. Da er mit jedem Projekt mitaufgetragen wird, wird jedes Mal vor dem Messen der ersten Probe eine neue Kalibrierung durchgeführt, die den aktuellen Bedingungen entspricht. Er enthält einen präparierten Extrakt des *Escherichia coli* – Stammes DH5  $\alpha$ . Dieser weist charakteristische Peptid- und Proteinprofile in MALDI-TOF MS-Spektren auf. Zusätzlich wurden von Bruker Daltonik, zur Erweiterung der Obergrenze des Massenbereichs zwei zusätzliche Proteine zugesetzt. Der Standard deckt einen Massenbereich von 3,6 – 17 kDa ab. Als Kalibrierpunkte mit einer Massentoleranzgrenze von  $\pm 300$  ppm werden folgende Massen herangezogen:

Tabelle 6 Kalibrierpunkte des IVD BTS\*

| Protein                       | Referenzmasse (mittlere Masse) | Toleranzbereich $\pm 300$ ppm |
|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| RL29 [M+2H] <sup>2+</sup>     | 3637,8 Da                      | 3636,7 Da – 3638,8 Da         |
| RS32 [M+H] <sup>+</sup>       | 5096,8 Da                      | 5095,3 Da – 5098,3 Da         |
| RS34 [M+H] <sup>+</sup>       | 5381,4 Da                      | 5379,8 Da – 5383,0 Da         |
| RS33meth [M+H] <sup>+</sup>   | 6255,4 Da                      | 6253,5 Da – 6257,3 Da         |
| RL29 [M+H] <sup>+</sup>       | 7274,5 Da                      | 7272,3 Da – 7276,7 Da         |
| RS19 [M+2H] <sup>+</sup>      | 10300,1 Da                     | 10297,0 Da – 10303,2 Da       |
| RNAse A [M+H] <sup>+</sup>    | 13683,2 Da                     | 13679,1 Da – 13687,3 Da       |
| Myoglobin [M+2H] <sup>+</sup> | 16952,3 Da                     | 1647,2 Da – 16957,4 Da        |

\*Gebrauchsanweisung IVD Bacterial Test Standard REF 8290190

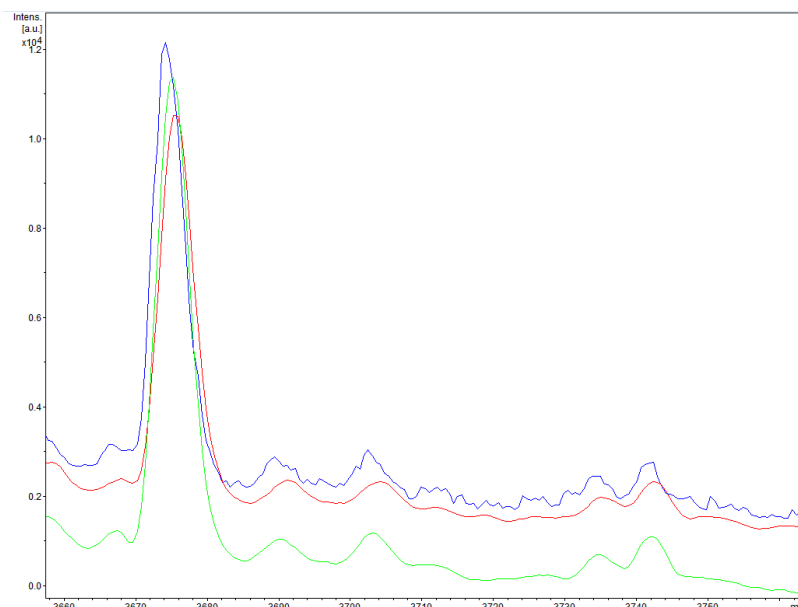
### 5.2.6. Messung der Proben

Sobald sämtliche Spots getrocknet sind kann die Targetplatte in das Gerät gelegt werden und ins Vakuum überführt werden (IN/OUT-Taste am Gerät). Sämtliche Messungen zur Erstellung eines Datenbankeintrags wurden mit dem Programm flexControl und der Methode „AutoXecute“ ausgeführt.

### 5.2.7. Preprocessing

Beim Preprocessing wird der vorhandene Roh-Datensatz (54 Spektren bei der Erstellung von Datenbankeinträgen) einer Kurvenglättung („Smoothing“) via Savitzky Golay-Funktion unterworfen. Anschließend wird eine Basislinienkorrektur („Baseline Subtraction“) durchgeführt, bei der von allen Spektren eine Funktion abgezogen wird, die eine Basislinie annähert (Basislinien werden angeglichen). Anschließend werden jene Spektren aussortiert, die auffällige Peaks, Ausreißer oder Null-Linien beinhalten. Die verbliebenen Spektren

werden nun in 1000 Da Schritten auf ihren Peakshift kontrolliert. Eine Differenz von 500 ppm ist hierbei erlaubt (für ein bestimmtes  $m/z$ -Verhältnis dürfen unterschiedliche Spektren maximal einen Unterschied von 500 ppm aufweisen). Das Preprocessing ist nun abgeschlossen und erlaubt die Speicherung der bearbeiteten Spektren sowie die Erstellung von Peaklisten.



**Abbildung 13 Preprocessing: unbehandelt (blau), mit Kurvenglättung (rot) und mit Kurvenglättung und Basislinienkorrektur**

### 5.2.8. Processing

Der bereits bearbeitete Datensatz wird nun zur Erstellung eines MSPs verwendet (Main Spectrum), welches ein Linienspektrum darstellt, das in allen Einzelmessungen enthalten ist (Fingerprint). Dabei sind die  $m/z$ -Werte und deren Intensität für jeden Organismus einzigartig und können deshalb für die Identifikation herangezogen werden. Im Zuge der Optimierung wurde die ursprünglich verwendete Methode zur Erstellung von MSP's adaptiert. In der ursprünglichen Version (Bio Typer MSP Creation Standard Method) wurde ein Minimum an relativer Häufigkeit in den Spektren vorhandener Peaks bei 25 % angesetzt (damit ein Peak für die Berechnung eines MSP's herangezogen wird muss er in mindestens 25% aller Spektren vorkommen) mit einer gewünschten Peak-Anzahl von 70 bei einer Spektrenanzahl von mindestens 20. In der optimierten Version muss ein Peak in mindestens 80% der Spektren vertreten sein, damit er zur Berechnung herangezogen wird. Die maximale gewünschte Peak-Anzahl wurde auf 80 und die Spektrenanzahl auf 30 erhöht.

## 6. ERGEBNISSE

### 6.1. Rohdaten

Insgesamt wurden beim ersten Versuch 1728 (576/Stamm) Spektren aufgezeichnet. Dabei wurden drei verschiedene Bakterienstämme von *Escherichia coli* in vier verschiedenen Nährmedien zu vier verschiedenen Zeitpunkten vermessen. Jede Probe wurde 12-mal vermessen und anschließend der Überprüfung der Qualitätskriterien unterworfen.

Im Folgenden werden alle Zeitverläufe in der Rohversion dargestellt. Dabei wurde für jeden Spektrensatz ( $12 \cdot 3 = 36$  Spektren) eine repräsentative Messung ausgewählt (Kontrolle der Qualitätskriterien in FlexControl) und dargestellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass alle Spektren mit gleicher Skalierung auf x- und y-Achse für jede Zeitreihe dargestellt werden um Intensitätsunterschiede sichtbar zu machen.

Für die Erstellung eines Datenbankeintrages wurden die Daten aus dem ersten Versuch Spektrensatz ( $12 \cdot 3 = 36$  Spektren) verwendet. Hierbei wurde auf Grund der Ergebnisse (siehe 6.3 und 6.4) beschlossen, TSA als Nährmedium und eine Inkubationszeit von einem Tag für die Erstellung von Datenbankeinträgen festzulegen (Abnahme der Spektrenqualität über die Zeit, deutliche Unterschiede bei Intensität und Anzahl der Peaks bei unterschiedlichen Nährmedien).

Nach neueren Erkenntnissen wurde beschlossen, mehrere biologische Replikate für die Erstellung von Datenbankeinträgen zu verwenden. Beim zuvor verwendeten Schema wird letztendlich nur ein biologisches Replikat vermessen, was die statistischen Eventualitäten nicht ausreichend abdeckt.

Das AMG (§ 28 Allgemeine Voraussetzungen) schreibt eine Mindestanzahl von drei biologischen Replikaten vor, während das japanische Arzneibuch (Japanese Pharmacopoeia, JP) 6 Replikate fordert. Als erste Annäherung wurden vier Replikate vermessen, wobei der jeweilige Keim aus vier verschiedenen Kulturen auf ein und demselben Nährmedium nach derselben Inkubationszeit entnommen und separat extrahiert wird. Der neue Spektrensatz enthält wieder insgesamt 36 Spektren, dabei wird jedes biologische Replikat dreimal als Triplikat vermessen ( $4 \cdot 3 \cdot 3 = 36$  Spektren).

Da die zweite Annäherung mit vier Replikaten eine deutliche Verbesserung der Ergebnisse bei einer Routinemäßigen Analyse brachte, wurde das Schema abermals optimiert. Die

finale Prozedur involviert nicht nur eine größere Anzahl an biologischen Replikaten (6), es inkludiert außerdem die Wiederholbarkeit des Verfahrens, da nun an zwei unterschiedlichen Tagen gemessen wird. Der neue Spektrensatz enthält insgesamt 54 Spektren, dabei wird jedes biologische Replikat dreimal als Triplikat an 2 unterschiedlichen Tagen vermessen ( $(2 \cdot (3 \cdot 3 \cdot 3)) = 54$  Spektren). Von diesen 54 Spektren werden 30 ausgewählt die den Qualitätskriterien entsprechen (siehe 5.2.7) und mit der optimierten Methode (siehe 5.2.8) prozessiert.

Abbildung 14 zeigt den schematischen Aufbau des finalen Spektrensatzes zur Erstellung von Datenbankeinträgen.

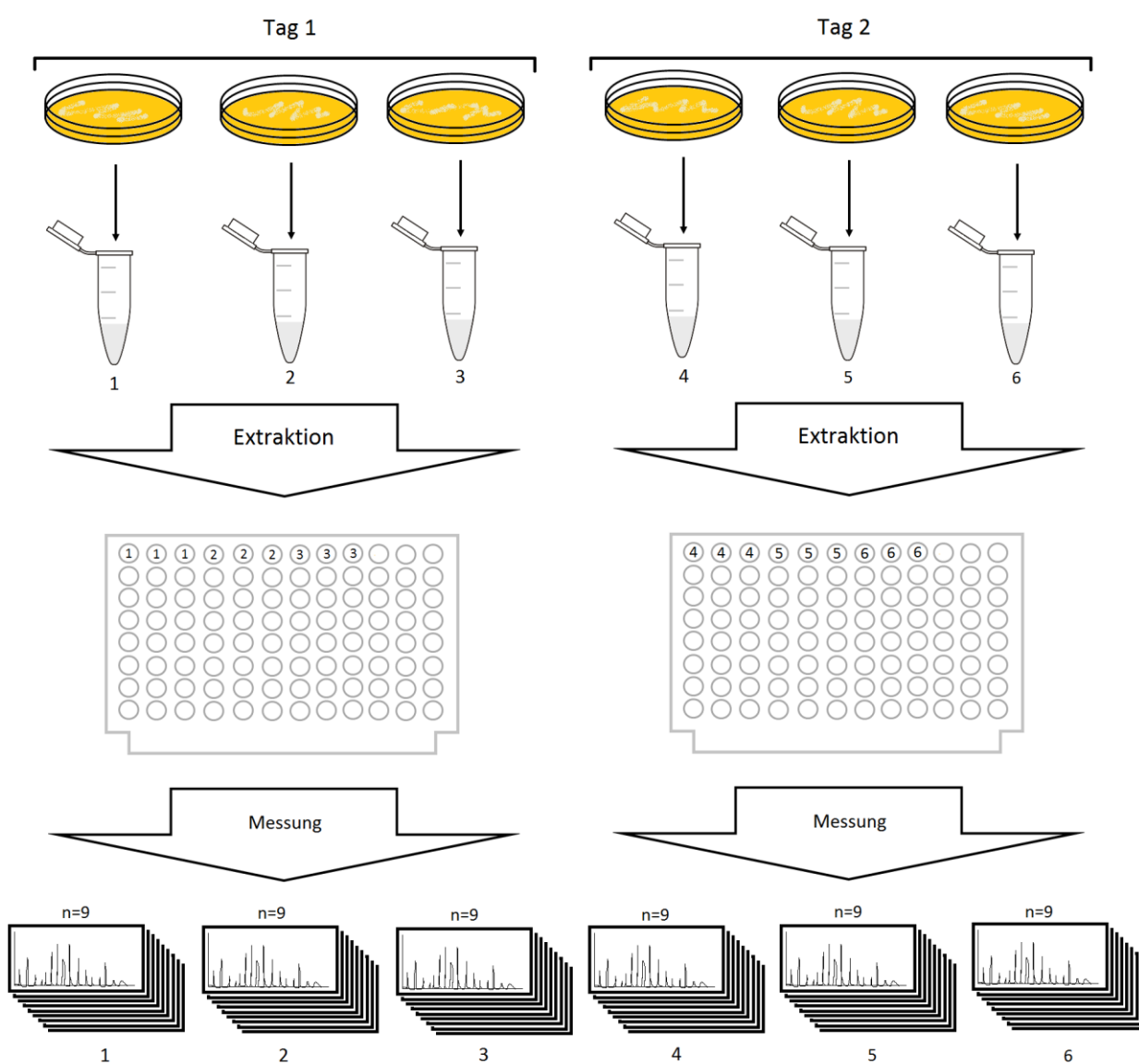


Abbildung 14 Spektrensatz zur Erstellung von Datenbankeinträgen

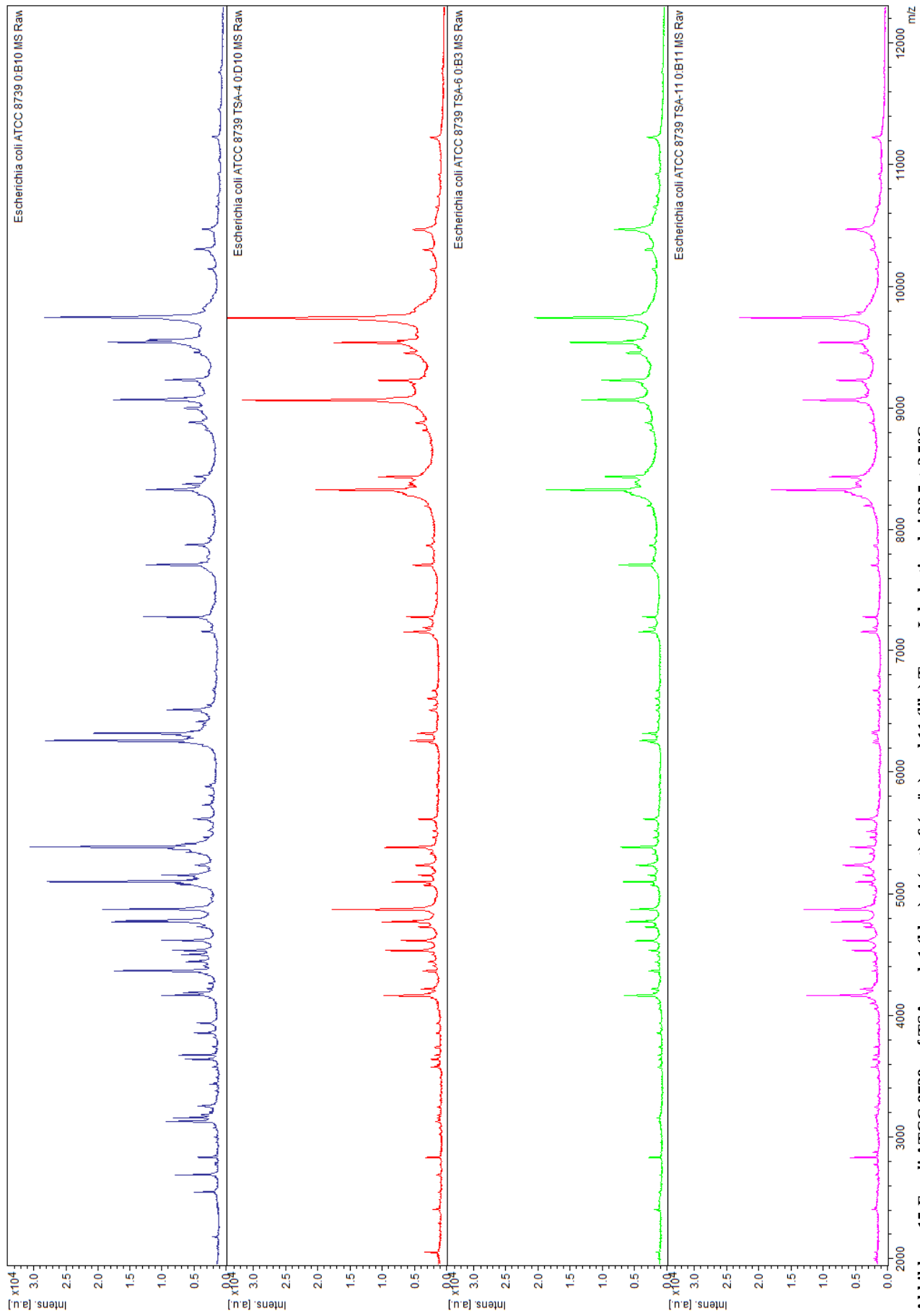


Abbildung 15 *E. coli* ATCC 8739 auf TSA nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei  $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$

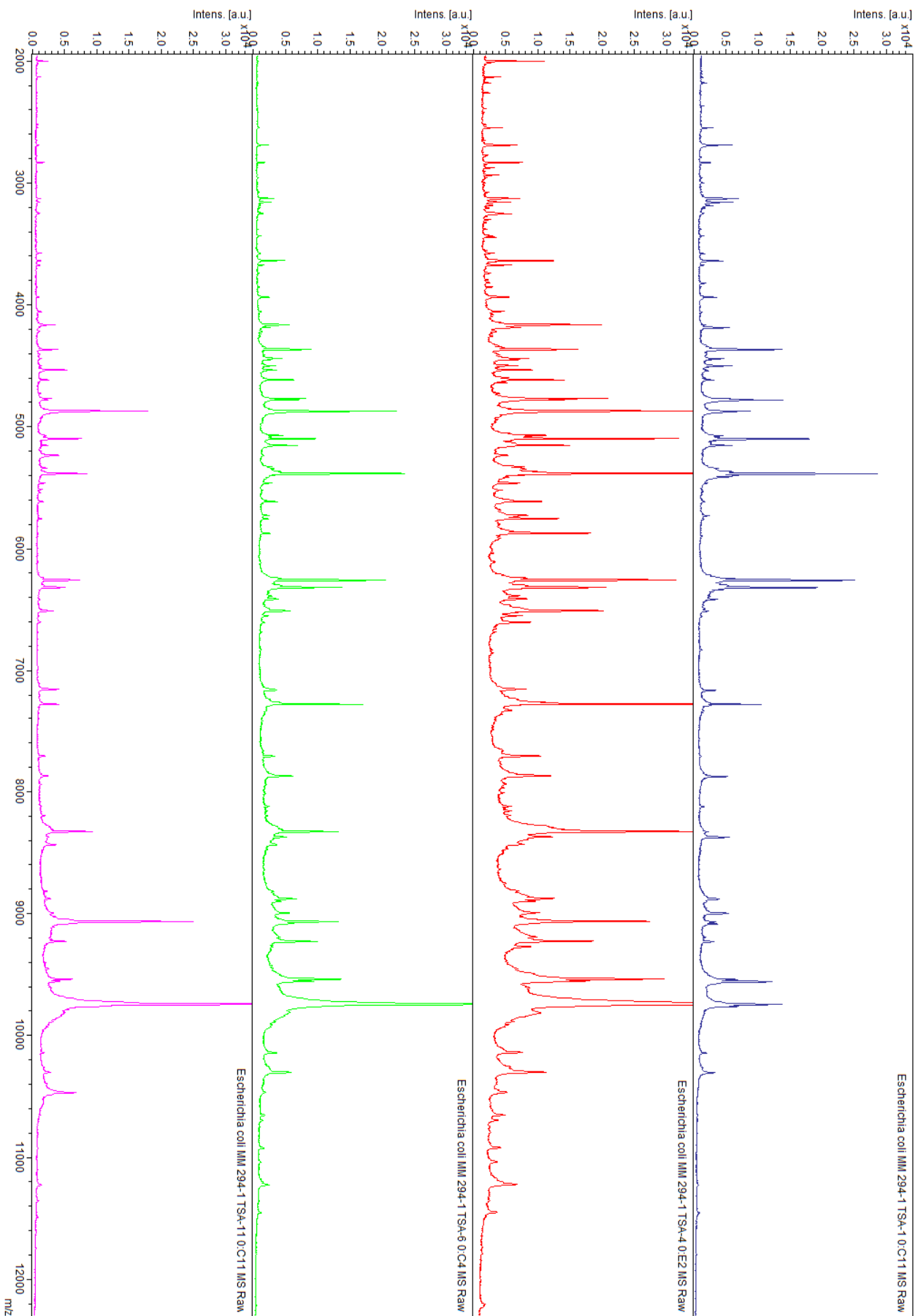
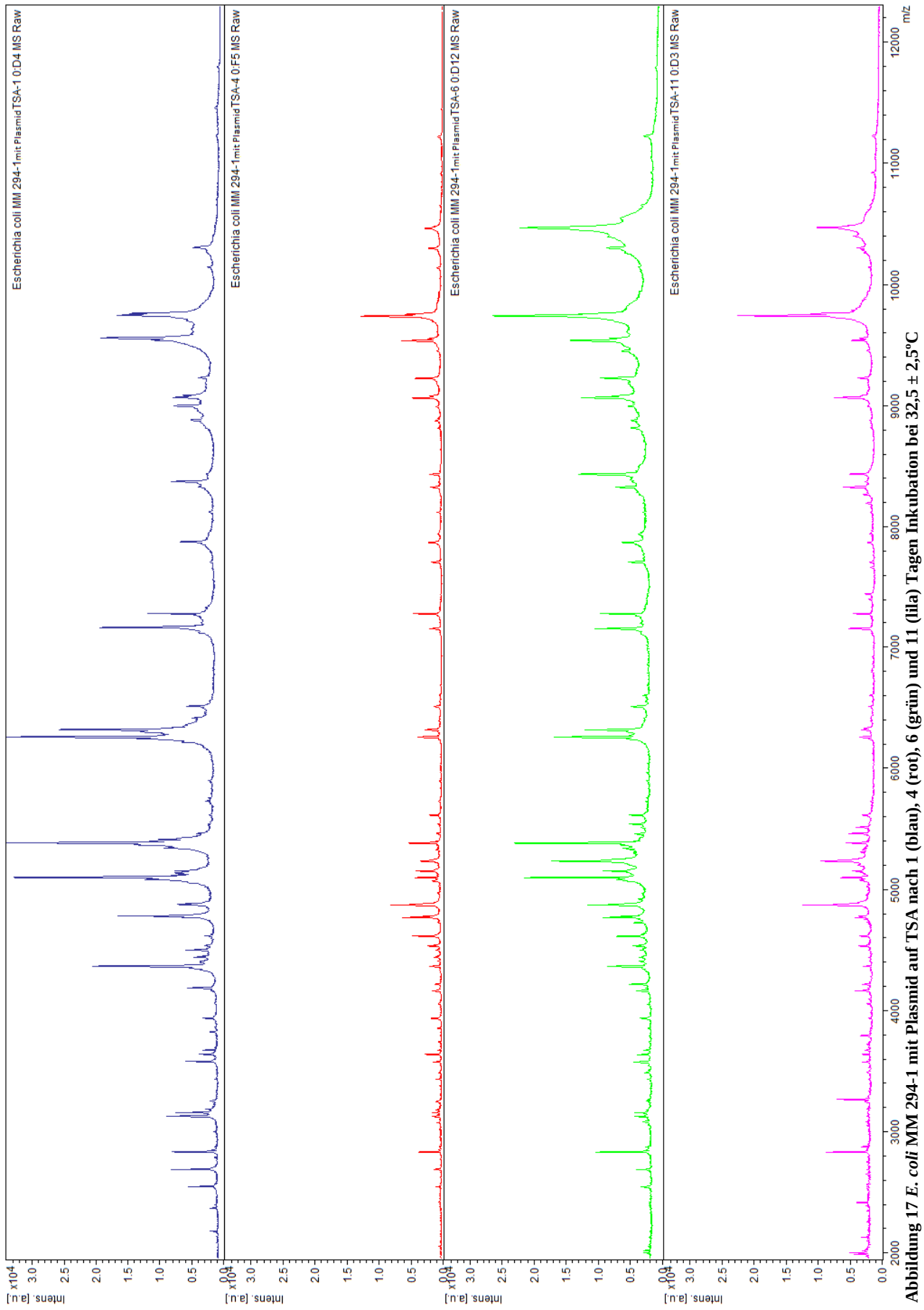


Abbildung 16 *E. coli* MM 294-1 auf TSA nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün), und 11 (lila) Tagen Inkubation bei 32,5 ± 2,5°C



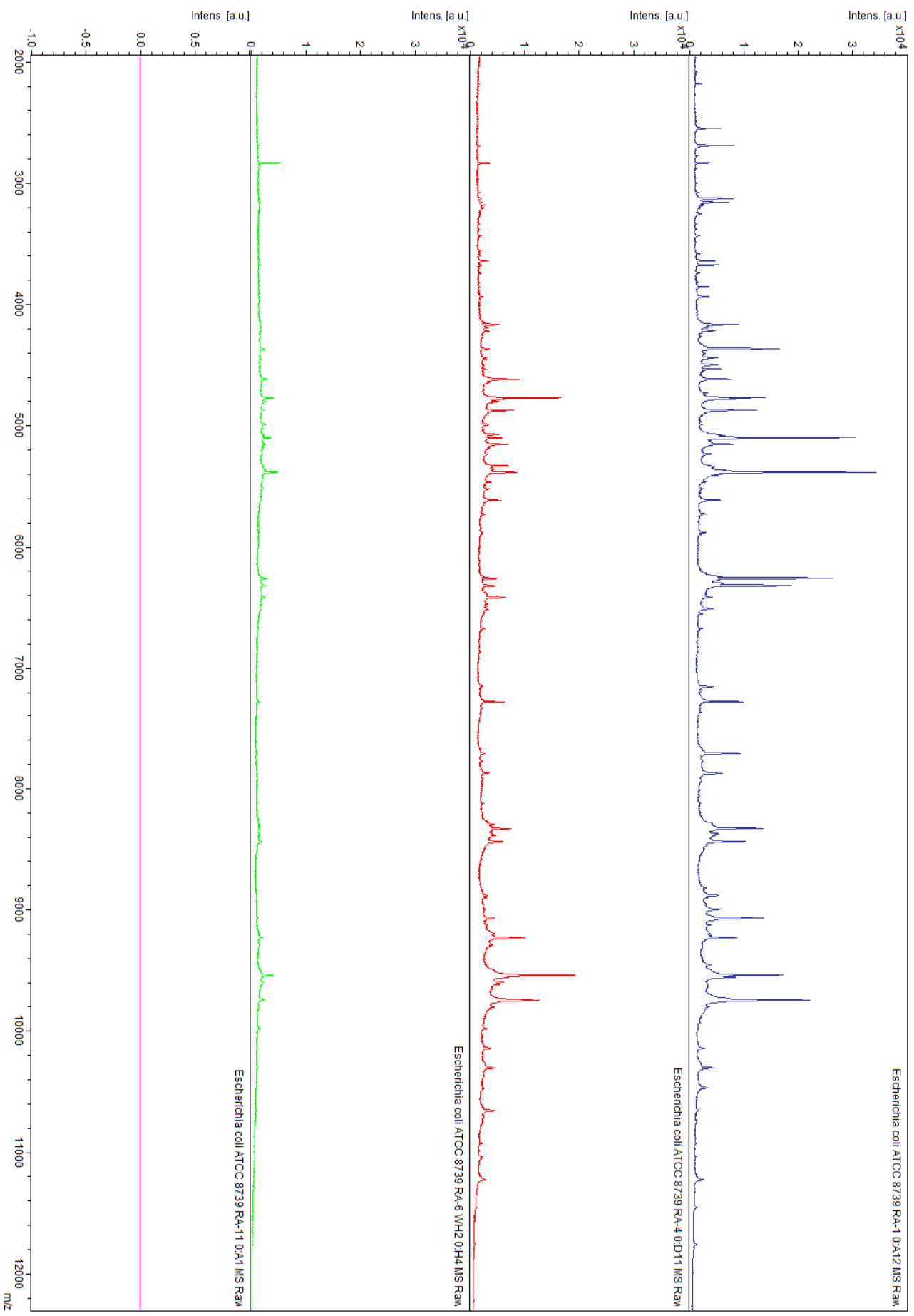


Abbildung 18 *E. coli* ATCC 8739 auf RA nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei  $37 \pm 1^\circ\text{C}$

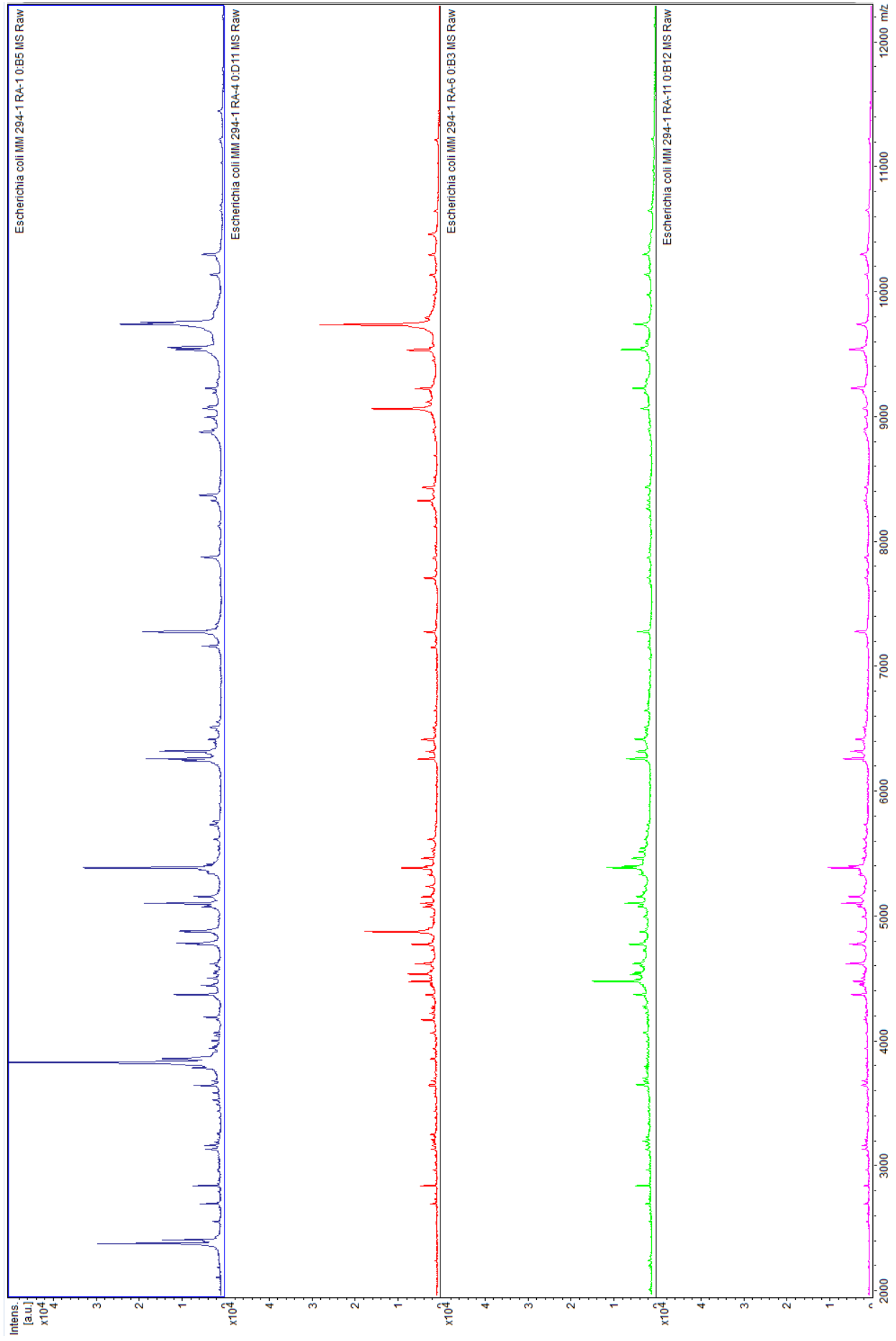


Abbildung 19 *E. coli* MM 294-1 auf RA nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei  $37 \pm 1^\circ\text{C}$

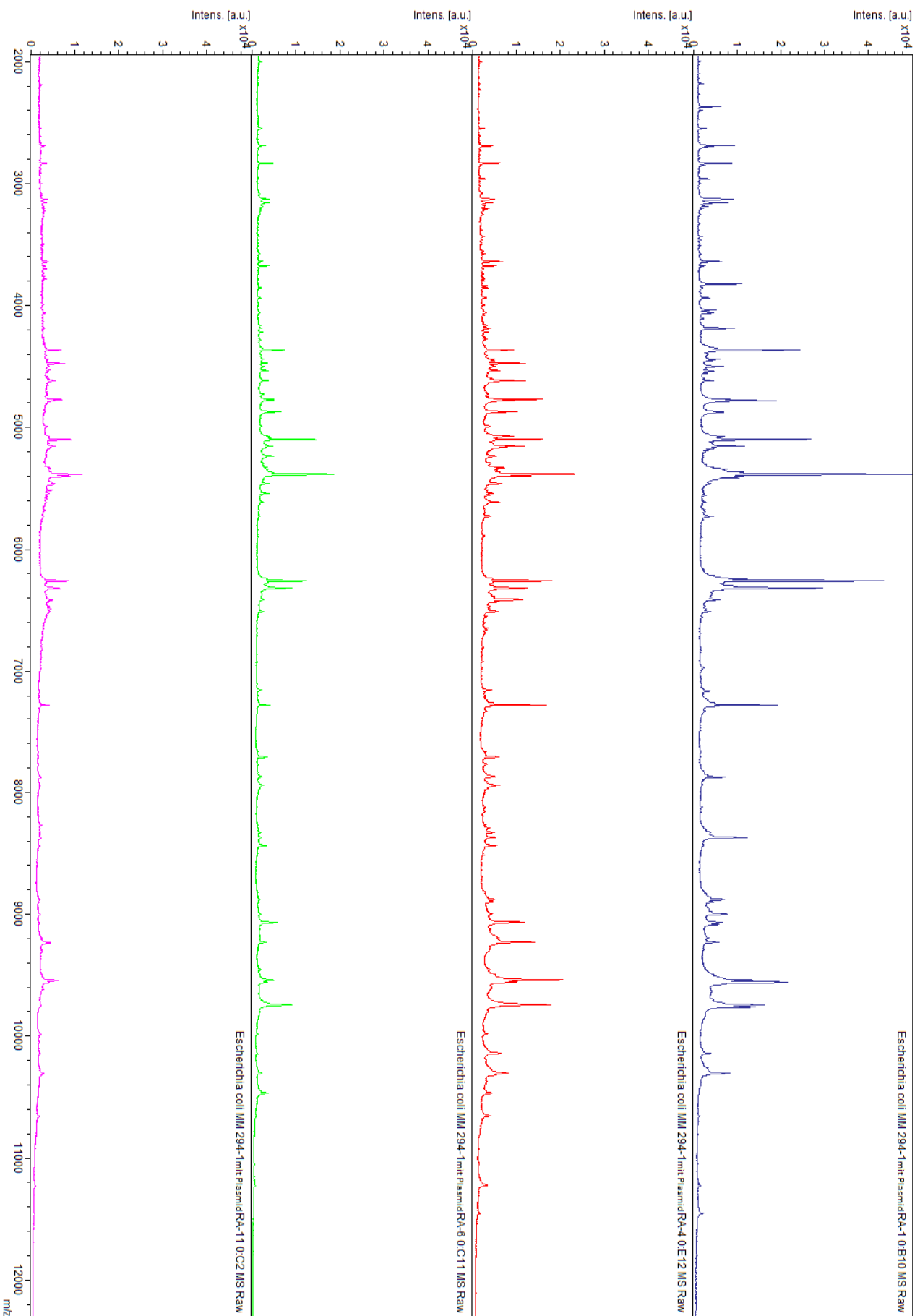


Abbildung 20 *E. coli* MM 294-1 mit Plasmid auf RA nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei 37 ± 1°C

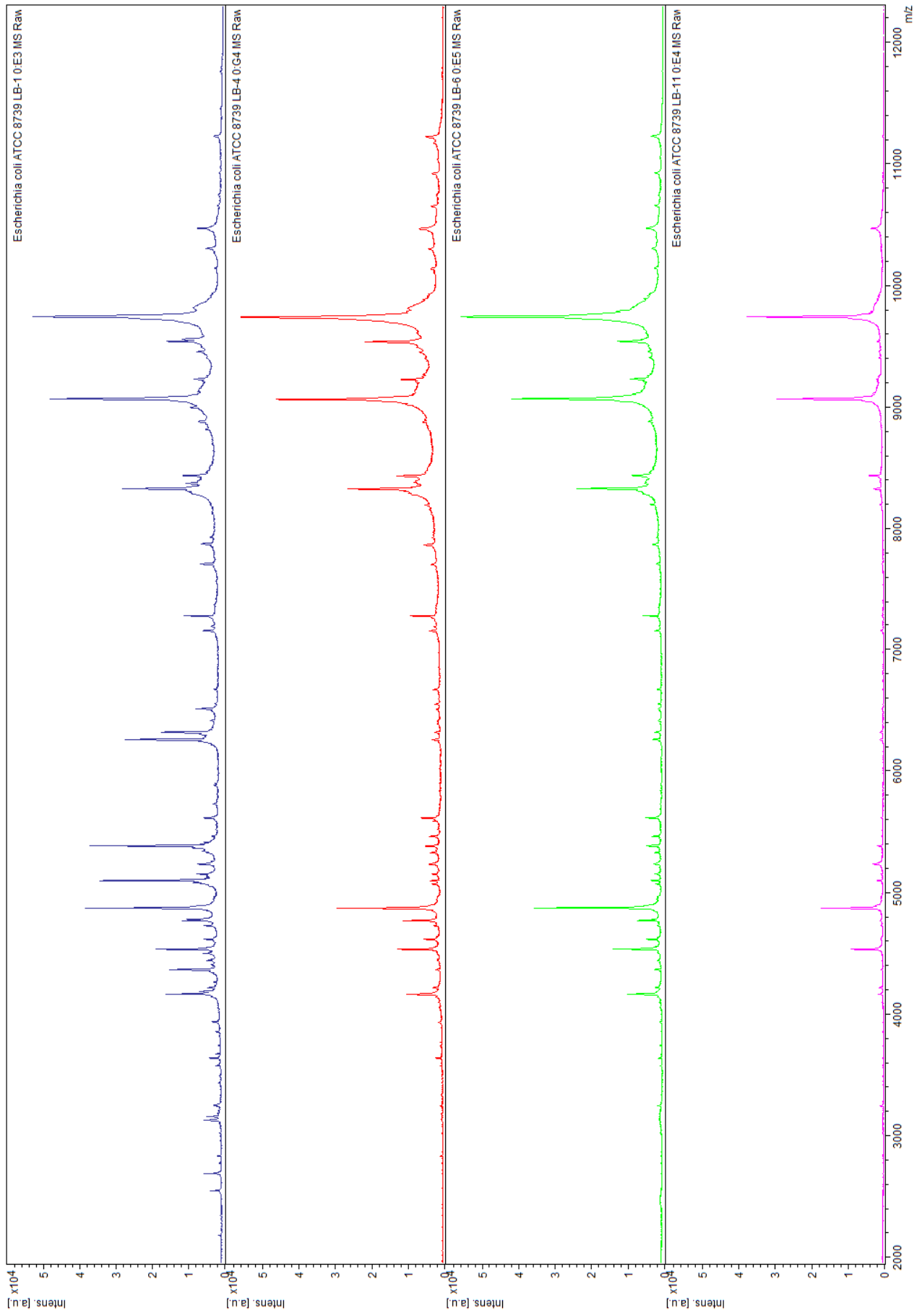
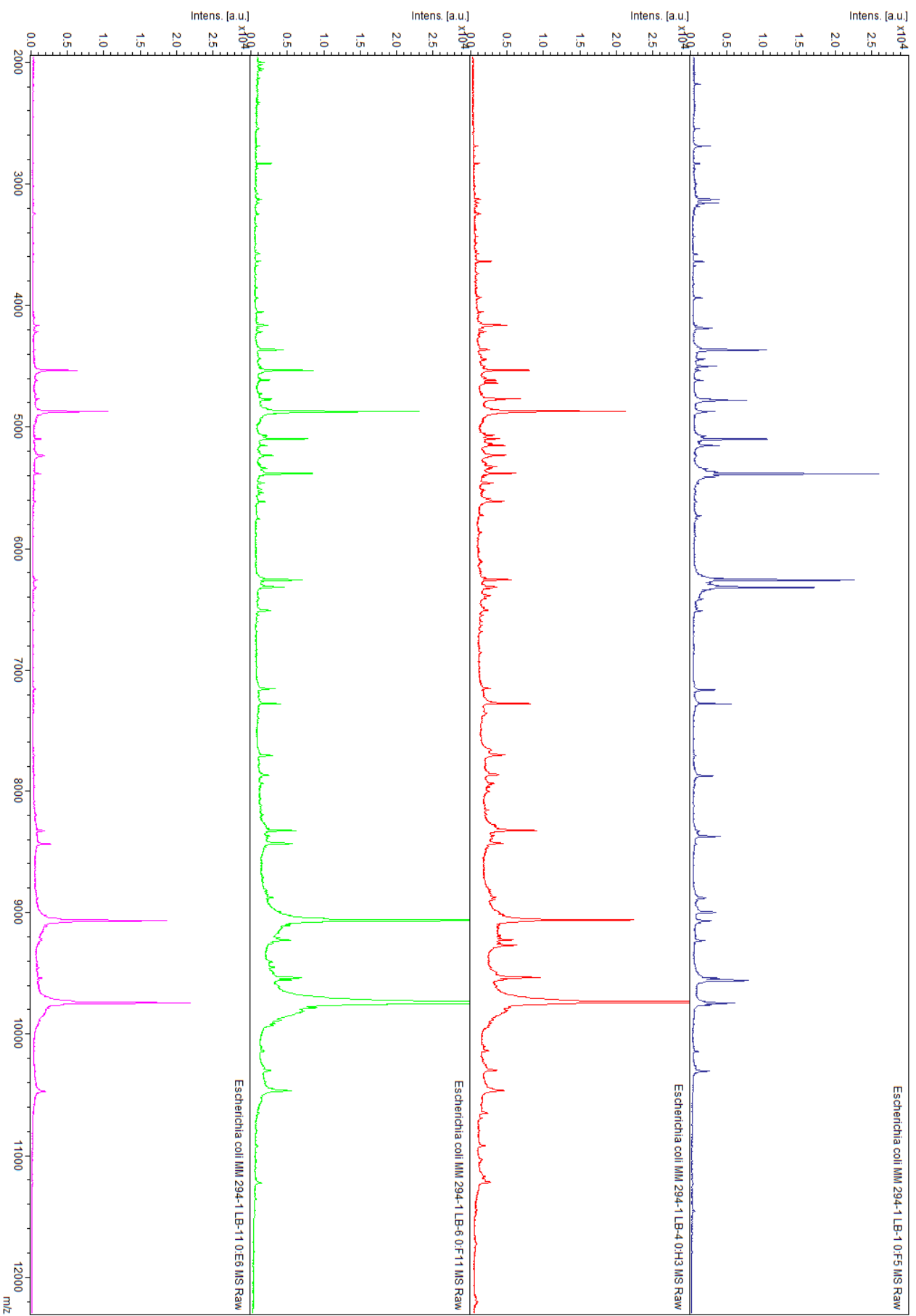
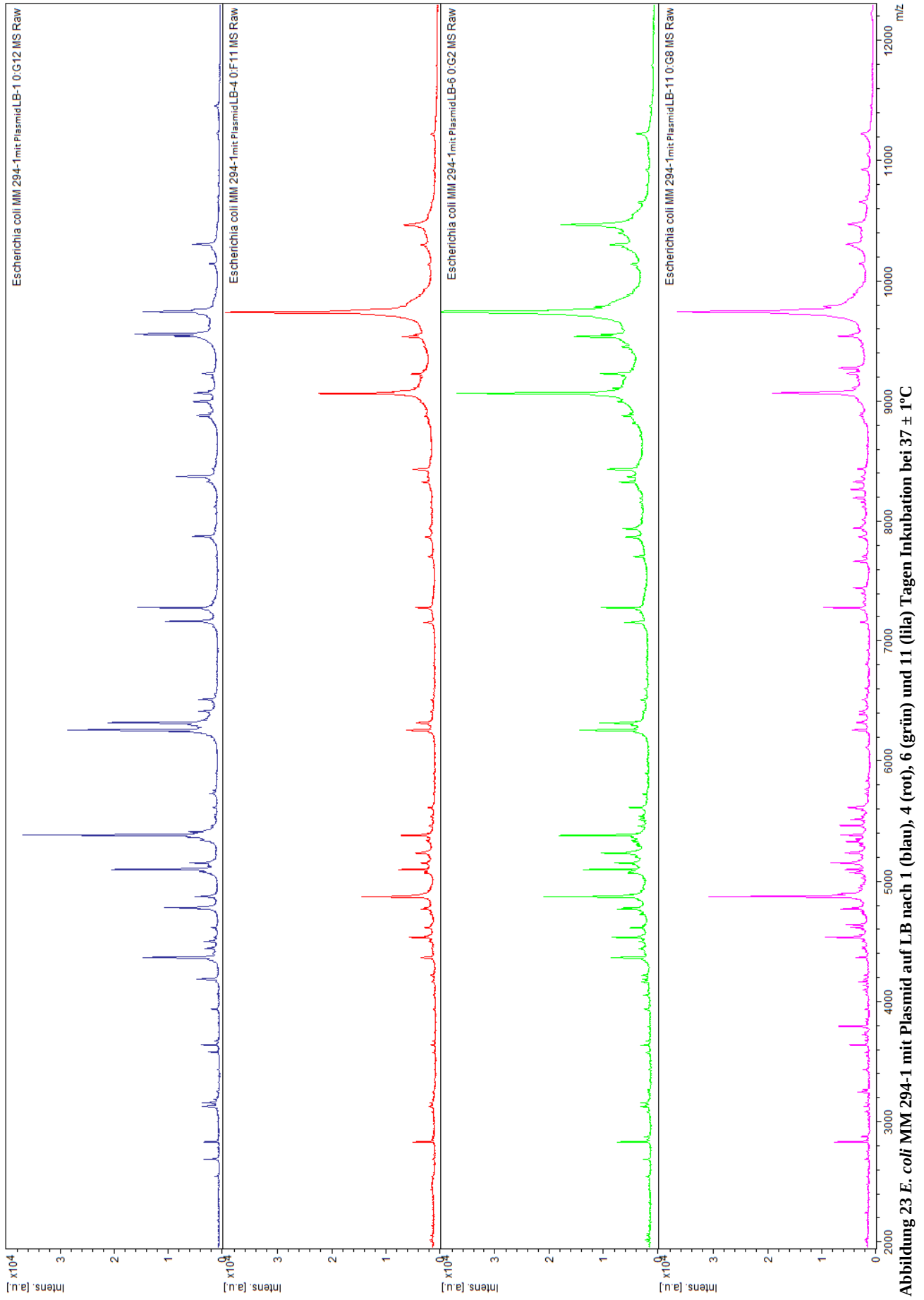


Abbildung 21 *E. coli* ATCC 8739 auf LB nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei 37 ± 1°C





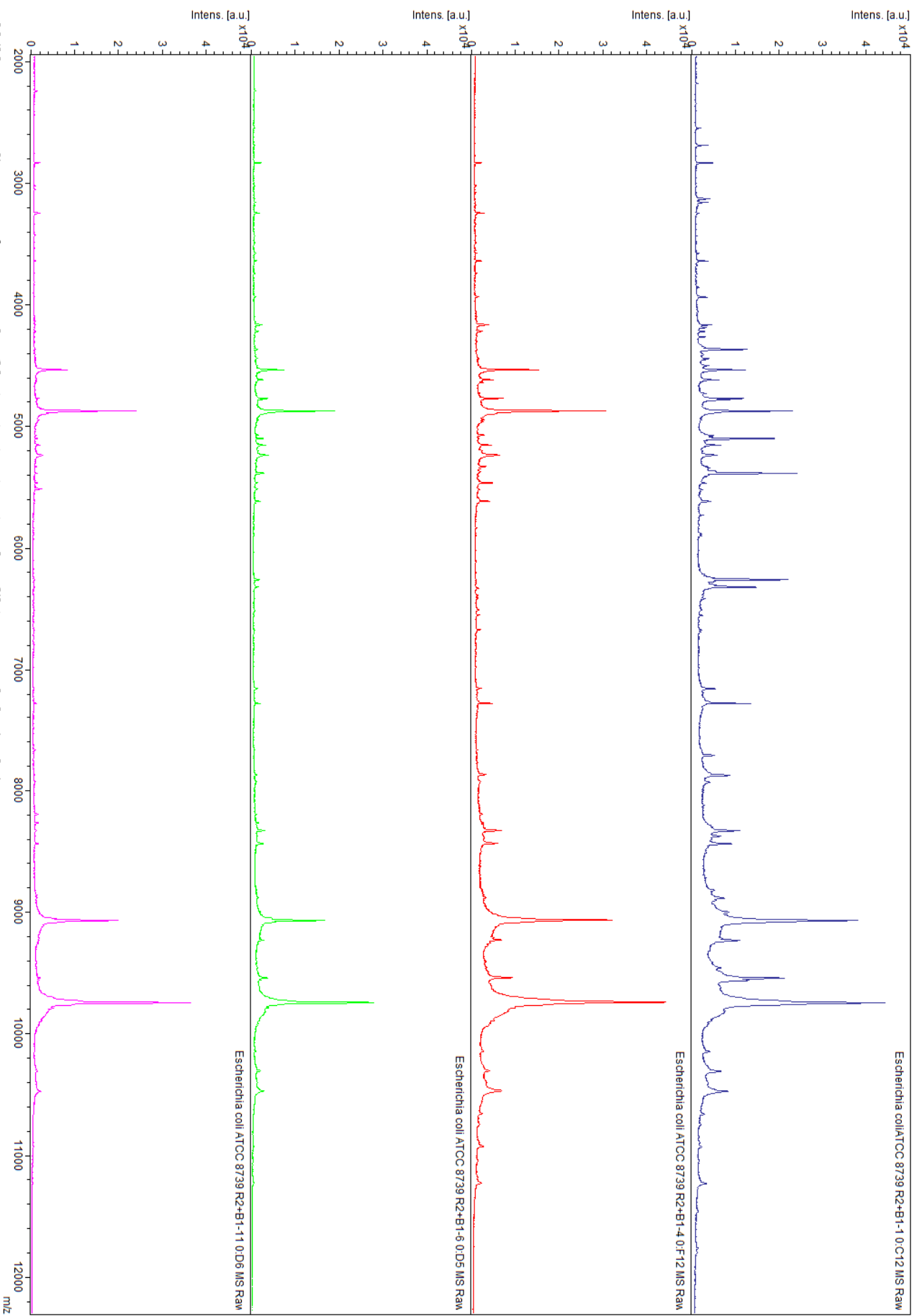


Abbildung 24 *E. coli* ATCC auf R2+B1 nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei  $37 \pm 1^\circ\text{C}$

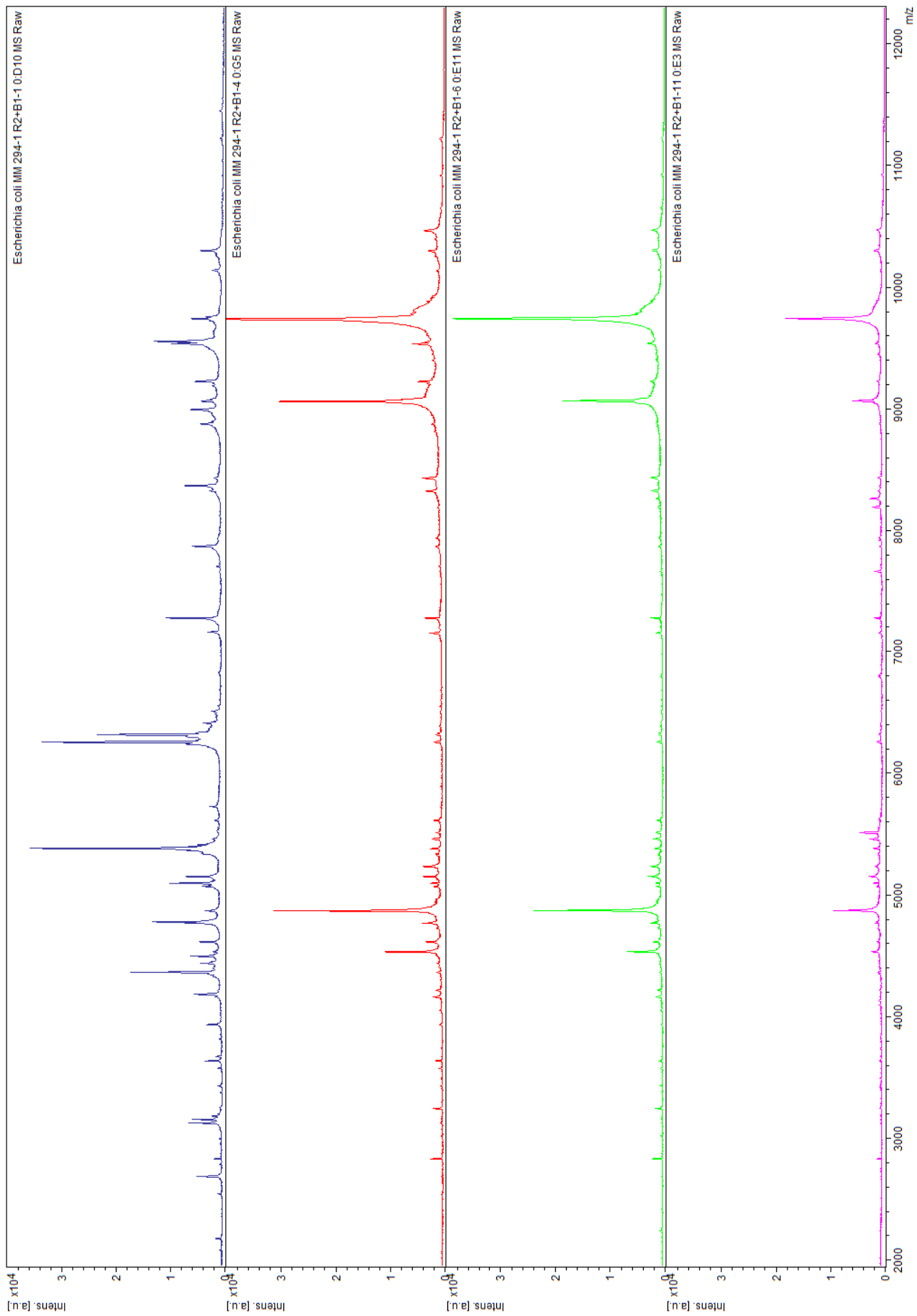


Abbildung 25 *E. coli* MM 294-1 auf R2+B1 nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei  $37 \pm 1^\circ\text{C}$

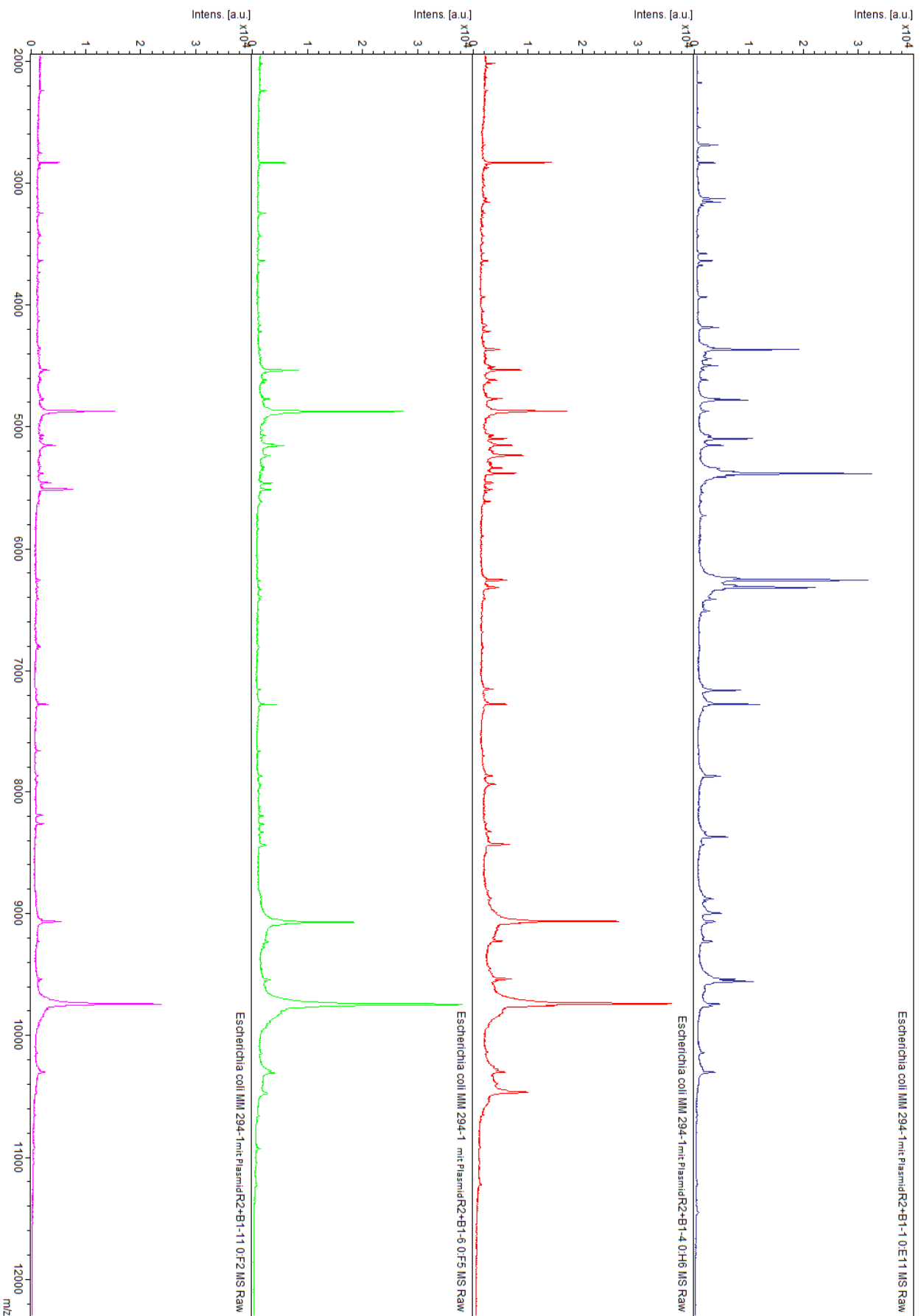


Abbildung 26 *E. coli* MM 294-1 mit Plasmid auf R2+B1 nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei 37 ± 1°C

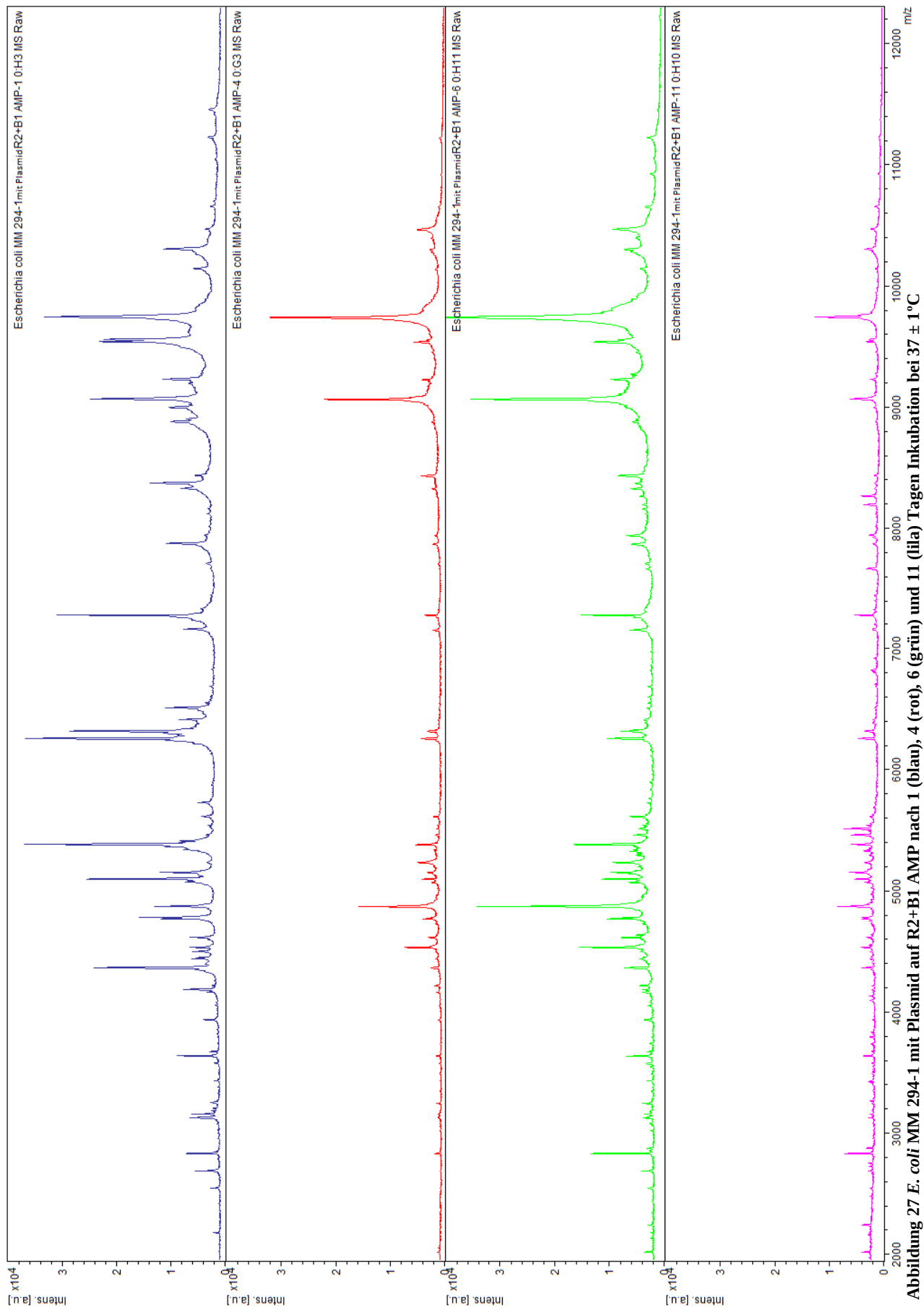


Abbildung 27 *E. coli* MM 294-1 mit Plasmid auf R2+B1 AMP nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei  $37 \pm 1^\circ\text{C}$

Wie in den Gegenüberstellungen zu sehen ist verändern sich die Intensität und die Intensitätsverteilungen der Signale. Teilweise kommt es dabei nur zu einer Änderung, teilweise gehen Signale dabei ganz verloren. Ursachen für die generelle Abnahme der Intensität über die Zeit könnten an Schwankungen bei der Extraktionsmethode liegen oder, was wahrscheinlicher ist, an der abnehmenden Anzahl lebender Zellen in der Probe. Durch die längere Inkubationszeit und dem schnellen Generationswechsel wird bei der Probennahme mit jedem späteren Zeitpunkt mehr totes Zellmaterial entnommen, welches wiederum durch Abbauprozesse ein anderes Proteom als eine lebende Zelle aufweist. Diese Veränderungen legen nahe, einen möglichst frühen Zeitpunkt (1 Tag Inkubation) zur Erstellung von Datenbankeinträgen zu verwenden. Zur korrekten Identifizierung wäre es daher auch notwendig, alle Proben die mit der Datenbank verglichen werden sollen, demselben Inkubationszeitraum zu unterwerfen. Diese Erkenntnisse sind konsistent mit Beobachtungen, die von Williams et al. bei einer Studie im Jahr 2003 gemacht wurden. Die Arbeitsgruppe untersuchte den Einfluss experimenteller Parameter auf die Qualität der erhaltenen Spektren und kam unter Anderem zu dem Schluss, dass die Inkubationszeit einen starken Einfluss auf die Reproduzierbarkeit von Spektren aufweist[43].

Aus unterschiedlichen Nährmedien resultieren des Weiteren leicht unterschiedliche Spektren (andere Zusammensetzung des Proteoms), was durch das unterschiedliche Nahrungsangebot und verschiedene Wachstumsbedingungen zurückzuführen sein könnte, da diese Faktoren einen starken Einfluss auf den Stoffwechsel des Bakteriums haben. Obwohl es erwiesener Maßen Signalmuster gibt, die nährmedienunabhängig reproduzierbar sind, stellt sich die Frage, ob die Anzahl davon ausreichend ist und die variierende Intensität keinen zu großen Störfaktor darstellt[44]. Da das Unterscheiden auf Plasmid-Ebene vor Allem von verschiedenen Intensitätsverhältnissen abhängt, wäre es sinnvoll, ein bestimmtes Medium auszuwählen, auf dem die Datenbankeinträge erstellt werden und sämtliche Proben der Routineanalytik auf dem gleichen Medium zu inkubieren.

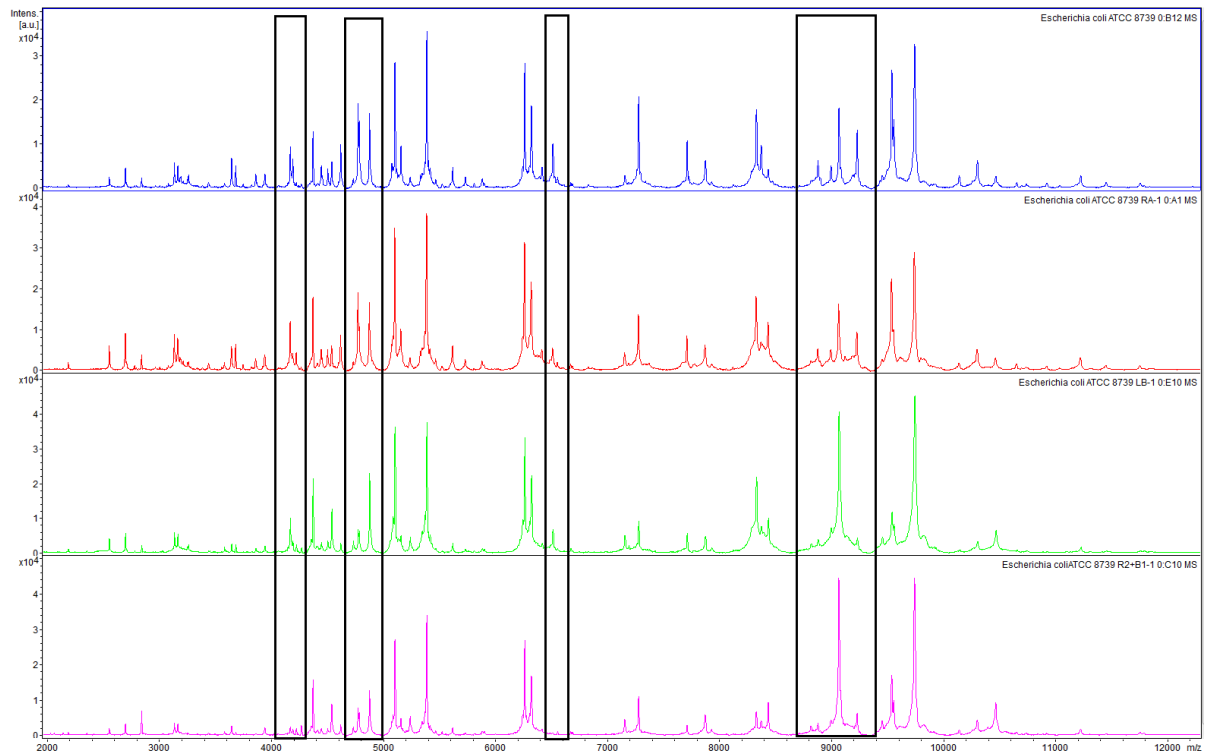


Abbildung 28 *E. coli* ATCC 8739 nach einem Tag Inkubation auf TSA, RA, LB und R2+B1

Die in Abbildung 28 markierten Bereiche illustrieren einen Nährmedien-abhängigen Intensitätsunterschied, welcher teilweise bis zum Verschwinden der Signale im Rauschen führt. Von links nach rechts:  $m/z$  ca. 4200 Peak bei R2+B1 mit deutlich geringerer Intensität,  $m/z$  ca. 4900 Intensitätsverteilung zweier Peaks bei TSA und RA ca. 1:1 bei LB 1:3 und bei R2+B1 1:2,  $m/z$  ca. 6500 deutlich geringere Intensität bei RA und LB gegenüber TSA und kein Signal bei R2+B1,  $m/z$  ca. 9200 deutlich höhere Intensität bei LB und R2+B1 als bei TSA und RA dafür deutlich verringerte Intensität des benachbarten Peaks.

## 6.2. Prozessierte Daten

Zur genaueren Analyse der Zeitreihe wurden Mittelwertspektren und MSP's (MBT AutoX) berechnet und miteinander verglichen. Da die Berechnung der Mittelwertspektren sehr viel Zeit in Anspruch nimmt, wurde beschlossen vorerst eine genauere Analyse von *Escherichia coli* ATCC 8739 auf dem Nährmedium TSA durchzuführen. Dazu wurden die, nach der Qualitätskontrolle verbliebenen Spektren einzeln als Tabelle in Excel importiert und der Mittelwert der Intensitäten gebildet. Das resultierende Spektrum enthält dabei die gesamte Information aller Einzelspektren und ermöglicht eine deutlichere Gegenüberstellung mehrerer Spektren zur gleichen Zeit. Des Weiteren kann es für die Identifizierung von Biomarkern herangezogen werden in dem Mittelwertspektren unterschiedlicher Stämme miteinander verglichen werden.

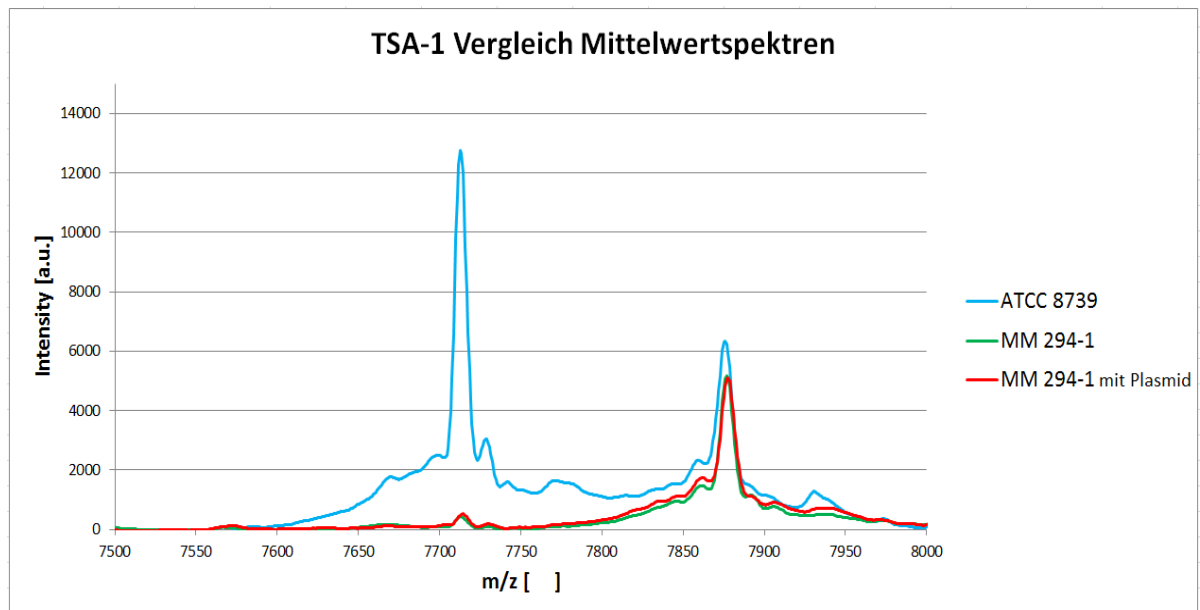


Abbildung 29 Mittelwertspektren von *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* MM 294-1 und *E. coli* MM 294-1 mit Plasmid

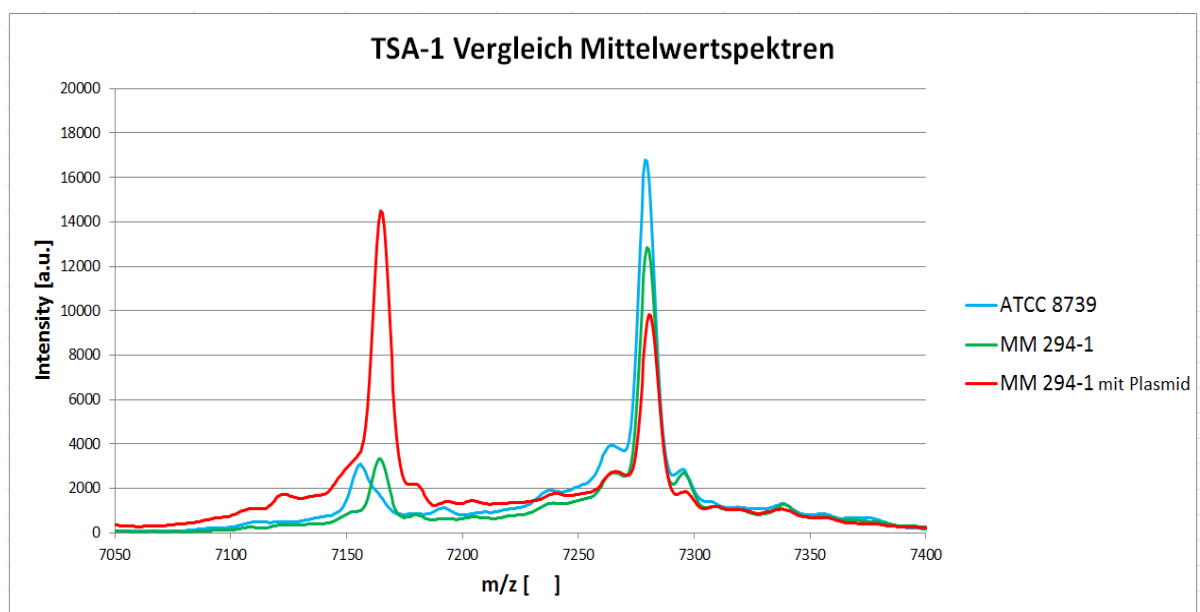


Abbildung 30 Mittelwertspektren von *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* MM 294-1 und *E. coli* MM 294-1 mit Plasmid

Abbildung 29 zeigt bei  $m/z$  ca. 7710 Da eine deutlich höhere Intensität bei *E. coli* ATCC 8739 im Vergleich zu *E. coli* MM 294-1 und *E. coli* MM 294-1 mit Plasmid bei einer vergleichbaren Intensität des benachbarten Peaks ( $m/z$  7871; RL31) für alle drei Keime. Abbildung 30 zeigt bei  $m/z$  ca. 7158 (RL35) eine deutlich höhere Intensität bei *E. coli* MM 294-1 mit Plasmid als bei den beiden anderen ( $m/z$  7273; RL29).

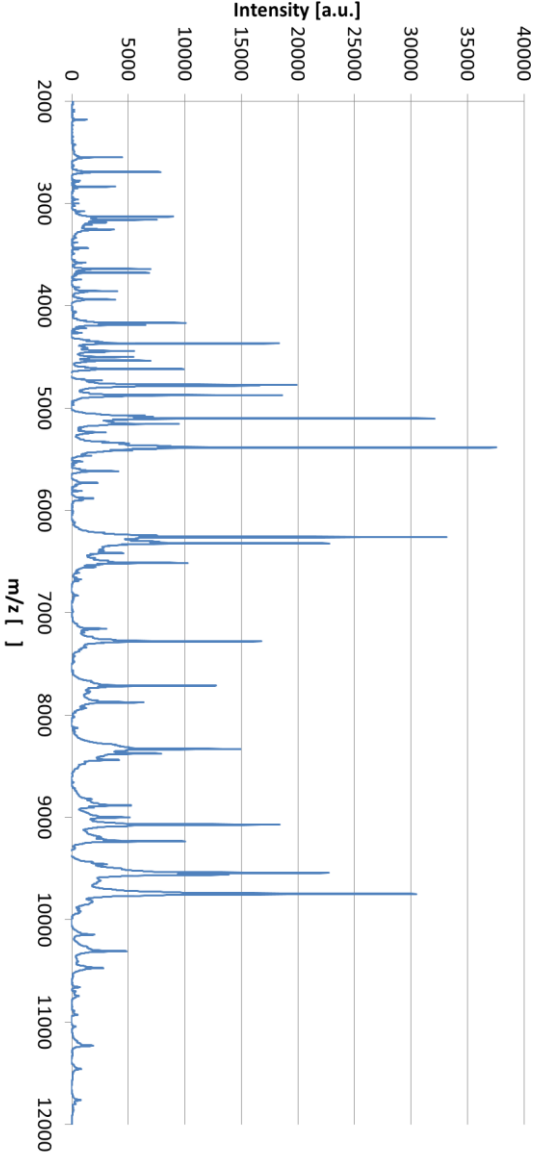
Die  $m/z$  Werte der entsprechenden ribosomalen Proteine der großen Subunit des Ribosoms von *Escherichia coli* K-12 wurden aus einer Tabelle von Arnold et al. entnommen[6]. Studien von Suarez et al. zeigten, dass es Variation von ein und demselben Protein innerhalb verschiedener Stämme geben kann und dass auch diese zur Identifikation eingesetzt werden können[45].

Obwohl die Suche nach Biomarkern eine vielversprechende Möglichkeit zur Optimierung der Unterscheidung bei sehr eng miteinander verwandten Mikroorganismen darstellt[46], konnte dieser Ansatz nicht weiterverfolgt werden. Auf Grund der fehlenden Option der manuellen Bearbeitung von erstellten MSP's in der Software von Bruker Daltonik und der mangelnden Umsetzbarkeit einer Alternative war es nicht möglich und auch nicht sinnvoll diesem Konzept in dieser Arbeit nachzugehen.

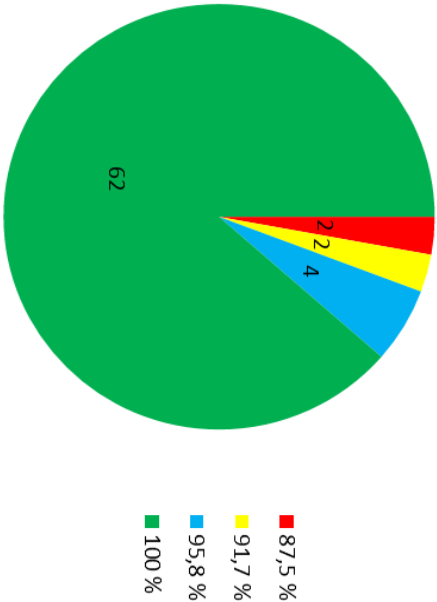
Mittelwertspektrum, MSP und relative Häufigkeit

- 24 Spektren nach der Qualitätskontrolle
- Signale > 10000 a.u. = 16
- Signale > 5000 a.u. = 31
- Mittlere relative Intensität 20,16 %
- Mittlere relative Häufigkeit 99,17 %

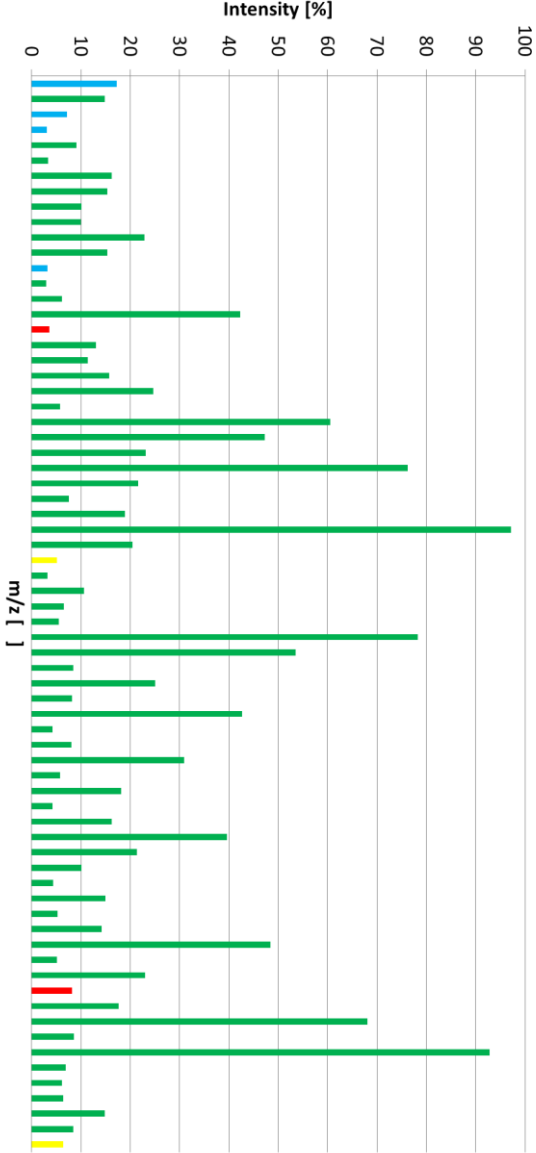
***Escherichia coli* ATCC 8739 TSA 1 Tag**



**Frequency [%]**

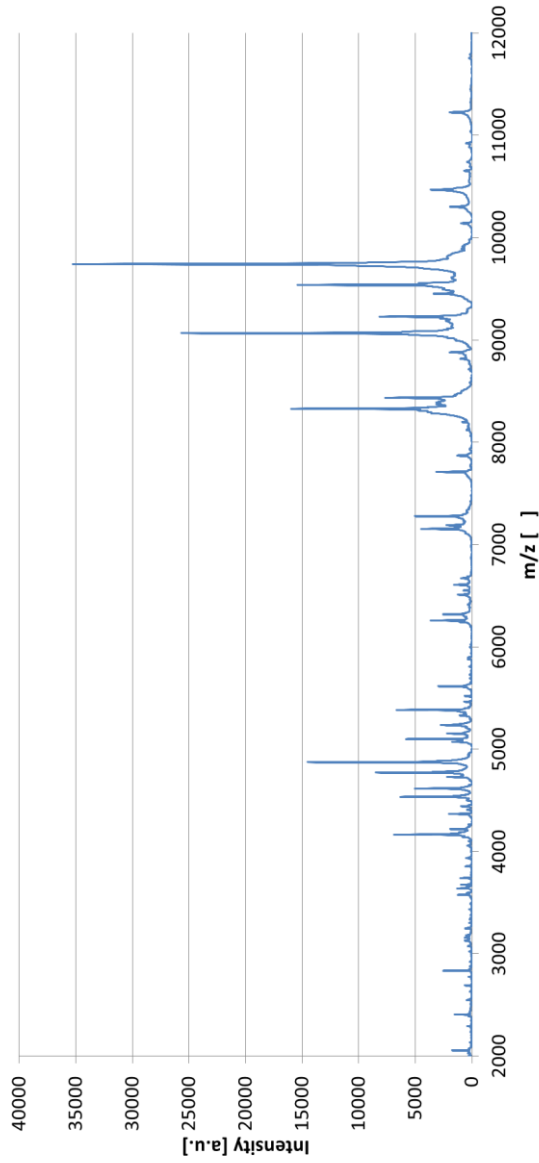


**MSP *Escherichia coli* ATCC 8739 TSA 1 Tag**



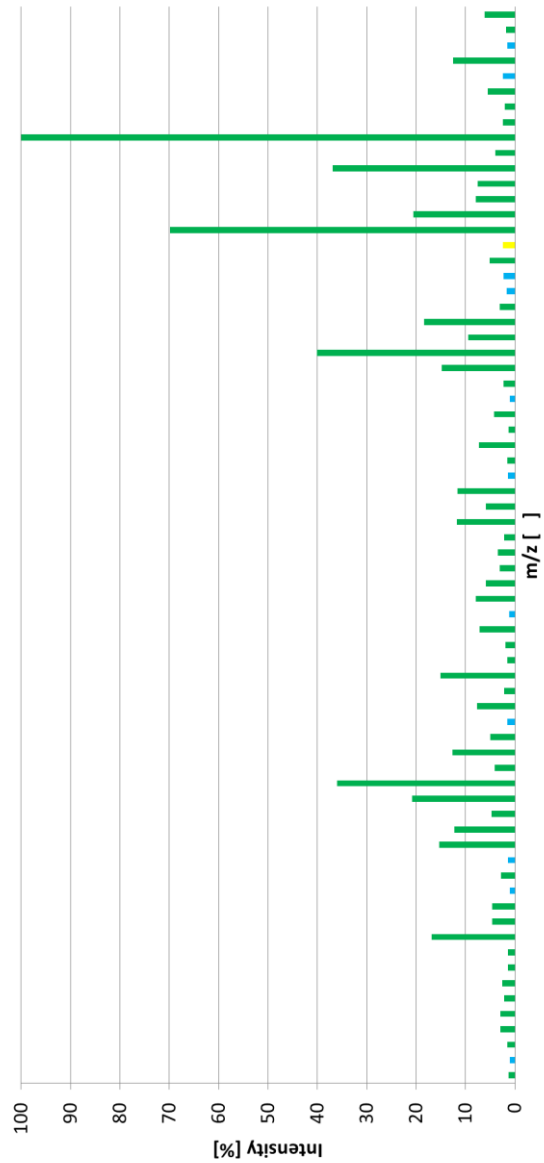
## Mittelwertspektrum, MSP und relative Häufigkeit

### *Escherichia coli* ATCC 8739 TSA 4 Tage

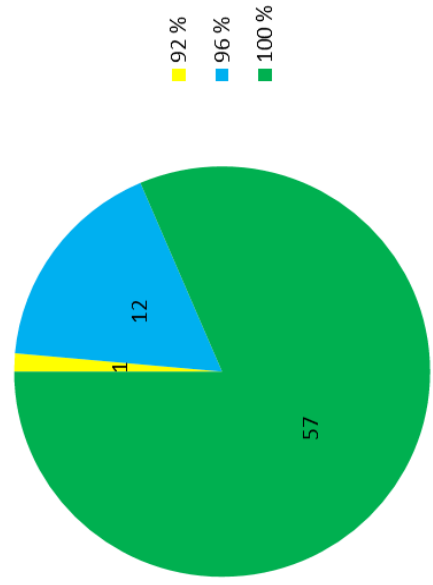


- 25 Spektren nach der Qualitätskontrolle
- Signale > 10000 a.u. = 5
- Signale > 5000 a.u. = 14
- Mittlere relative Intensität 9,24 %
- Mittlere relative Häufigkeit 99,20 %

### MSP *Escherichia coli* ATCC 8739 TSA 4 Tage



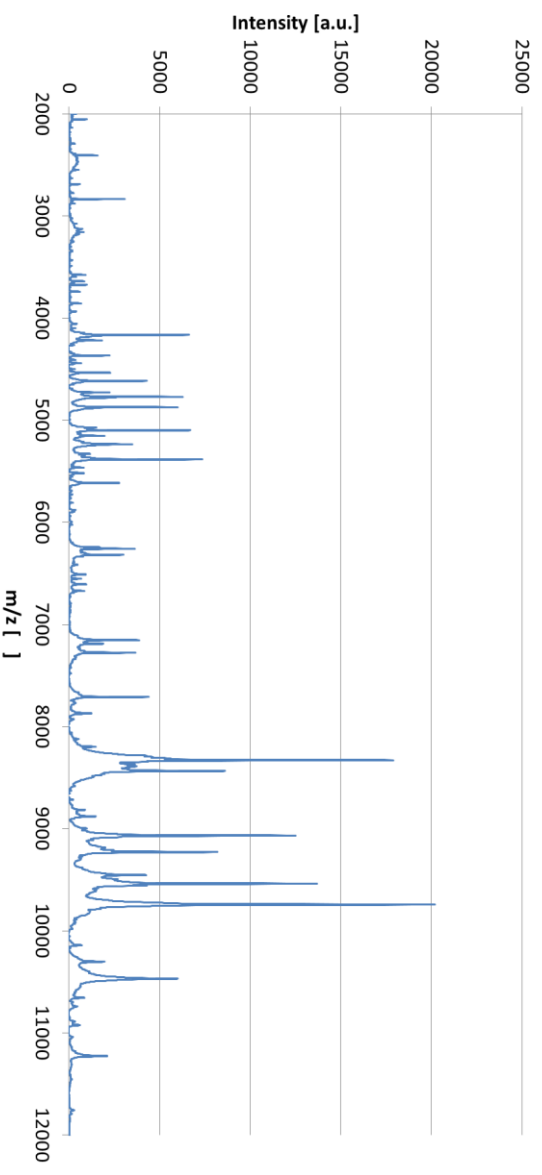
### Frequency [%]



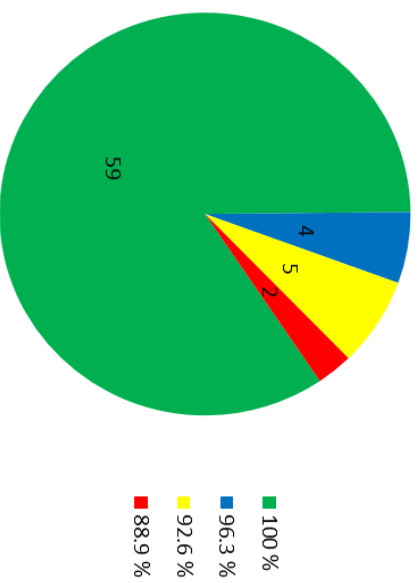
## Mittelwertspektrum, MSP und relative Häufigkeit

- 27 Spektren nach der Qualitätskontrolle
- Signale > 10000 a.u. = 4
- Signale > 5000 a.u. = 12
- Mittlere relative Intensität 14,14 %
- Mittlere relative Häufigkeit 98,94 %

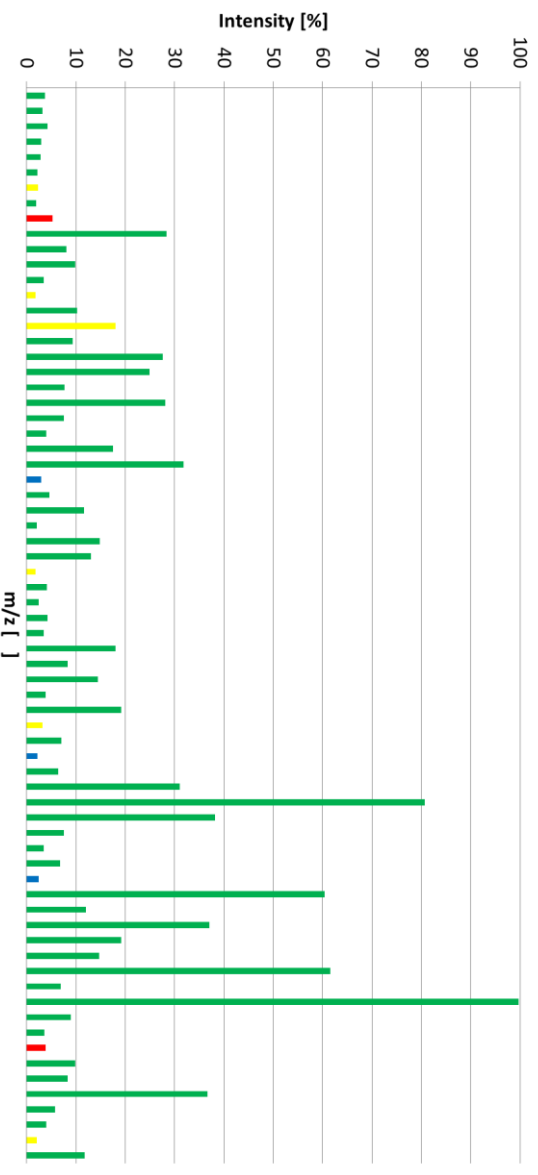
### *Escherichia coli* ATCC 8739 TSA 6 Tage



### Frequency [%]

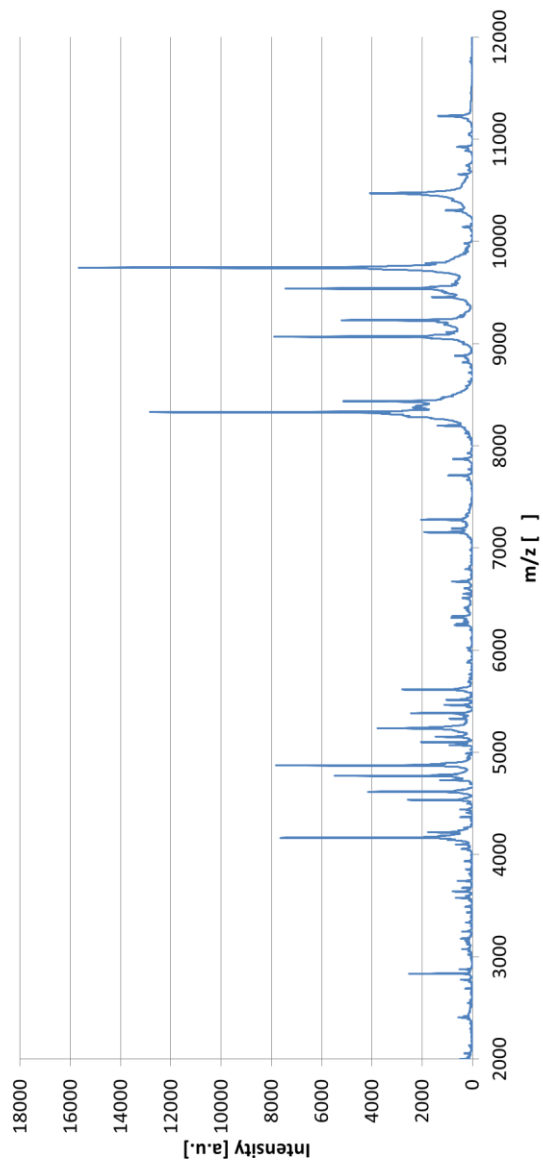


### MSP *Escherichia coli* ATCC 8739 TSA 6 Tage



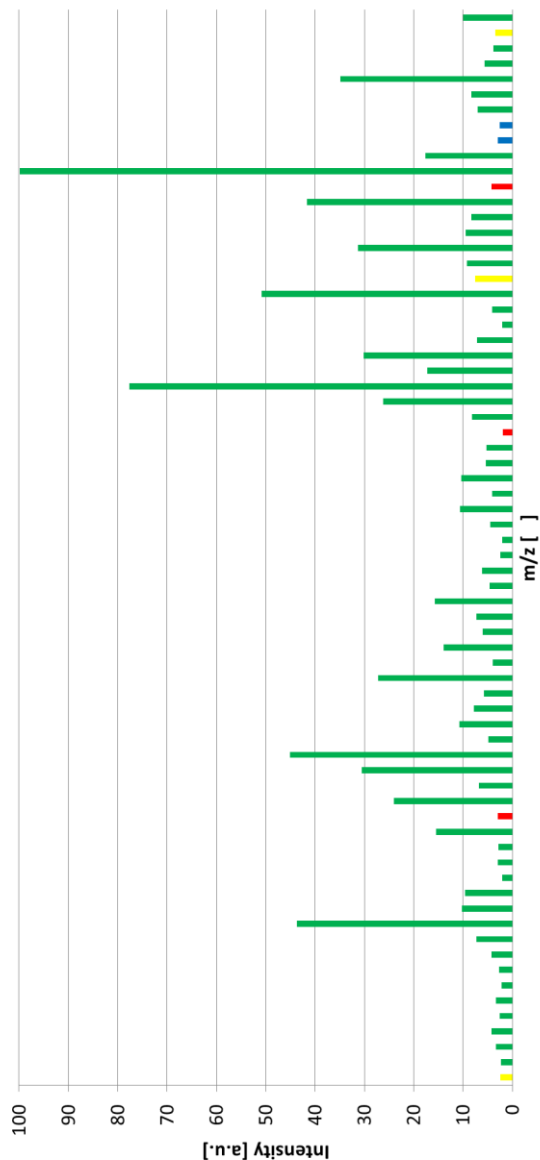
## Mittelwertspektrum, MSP und relative Häufigkeit

### *Escherichia coli* ATCC 8739 TSA 11 Tage

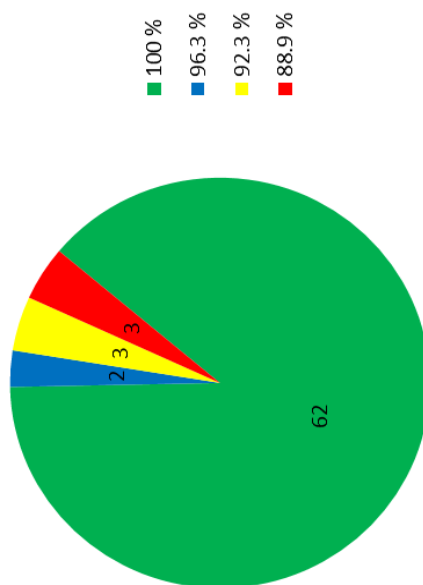


- 27 Spektren nach der Qualitätskontrolle
- Signale > 10000 a.u. = 2
- Signale > 5000 a.u. = 9
- Mittlere relative Intensität 13,17 %
- Mittlere relative Häufigkeit 99,10 %

### MSP *Escherichia coli* ATCC 8739 TSA 11 Tage

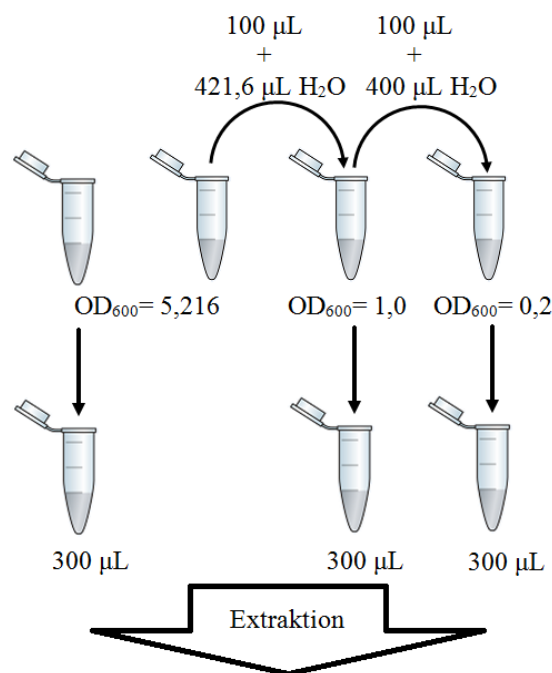


### Frequency [%]



Anhand des Beispiels *Escherichia coli* ATCC 8739 wurden Mittelwertspektren für die auf TSA gezüchteten Kulturen für jeden einzelnen Messzeitpunkt (1, 4, 6 und 11 Tage Inkubation) und ein MSP berechnet. Anhand unterschiedlicher Parameter wurde versucht, die Qualität zu beurteilen. Obwohl bei allen Messungen ungefähr die gleiche Menge an Zellmaterial entnommen wurde (1µL Impföse), nimmt die Intensität über längere Inkubationszeiten ab. Dies könnte vor Allem bei einer Sub-Typing Identifizierung Probleme mit sich bringen da hier hauptsächlich Peaks mit geringerer relativer Intensität von Bedeutung sind und diese eventuell nicht mehr als Peaks identifiziert werden (S/N). Der Vergleich der MSP's zeigt, dass die mittlere relative Intensität der in den MSP's vertretenen Peaks nach einem Tag (20,16%) deutlich höher ist, als nach mehreren Tagen (9,24% nach 4 Tagen). Das bedeutet, dass sich der Intensitätsverlust für die Erstellung von MSP's nach längerer Inkubationszeit auch auf die Auswahl der Peaks auswirkt. Bei der „Frequency“, also der mittleren relativen Häufigkeit der Peaks (nicht jeder Peak im MSP ist auch in allen Spektren enthalten bzw. wird als Peak detektiert S/N Threshold= 600 a.u.) gibt es keine nennenswerten Unterschiede (98,94% - 99,20%). Wahrscheinlich hat der Algorithmus zur Erstellung der MSP's einen Grenzwert für die maximale Unsicherheit bzw. die relative Häufigkeit hinterlegt und reduziert bei einem zu ungenauen Wert die Anzahl der ausgewählten Peaks.

Auch wenn sich die Zusammensetzung der MSP's nicht wesentlich verändert, kommt es im Laufe der Zeit zu drastischen Veränderungen in der Intensität. Die Inkubationsdauer spielt eine wichtige Rolle und muss berücksichtigt werden. Zur Erstellung von Datenbankeinträgen sollten daher nur Proben verwendet werden die möglichst kurz, zum Beispiel über einen Tag inkubiert wurden.



**Abbildung 31 Verdünnungsexperiment zur Ermittlung des Einflusses der Konzentration auf die Intensität**

Zur Überprüfung des Einflusses der entnommenen Zellmenge auf die Spektrenqualität wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, bei dem bei zwei unterschiedlichen Kulturen (*E.coli* ATCC 8739 aus Schräggärkultur und *E.coli* MM 294-1 aus Glycerinkultur) auf TSA inokuliert und nach einem Tag Inkubation miteinander verglichen wurden. Hierzu wurde eine 1µL Impföse voll an Zellmaterial entnommen und in 300 µL H<sub>2</sub>O suspendiert. Die erhaltene Lösung wurde am UV/VIS Photometer bei  $\lambda = 600 \text{ nm}$  vermessen. Anschließend wurde ein Äquivalent entnommen und auf einen geeigneten Konzentrationsbereich verdünnt (1:8) damit die Absorbanz im validierten Bereich zwischen 0 und 1 liegt.

**Tabelle 7 optische Dichte verschiedener Lösungen bei 1µL entnommenem Zellmaterial in 300 µL H<sub>2</sub>O**

| Teststamm                         | OD <sub>600</sub> [rel. Int.] 1:8 | OD <sub>600</sub> [rel. Int.] |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 | 0,6520                            | 5,216                         |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1  | 0,2910                            | 2,328                         |

Ausgehend von diesen Werten wurden Lösungen mit OD<sub>600</sub>=1 und OD<sub>600</sub>=0,2 (unter Annahme eines linearen Zusammenhanges zwischen Zellmasse und optischer Dichte) von beiden Teststämmen zubereitet, extrahiert und mittels MALDI-TOF MS vermessen (3 Konzentrationen/2 Spots pro Konzentration/3 Messungen pro Spot = 18 Spektren). Beim Herstellen der Verdünnungen wurde darauf geachtet, beide Verdünnungen aus der gemessenen Lösung herzustellen. Jede Lösung hatte vor Beginn der Extraktion ein Volumen von 300 µL.

### 6.3. Zeitverhalten der Intensität

Da zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen wurde und die Kalibration des Standards gemäß der internen Arbeitsvorschrift täglich durchgeführt wurde, musste zur Gegenüberstellung der Mittelwertspektren eine Korrektur an der x-Achse (m/z) durchgeführt werden (Im Zuge der Kalibration werden die Messpunkte an den Standard BTS angepasst). Hierzu wurden alle Folgemessungen auf die Messpunkte des Spektrums nach einem Tag Inkubationszeit kalibriert.

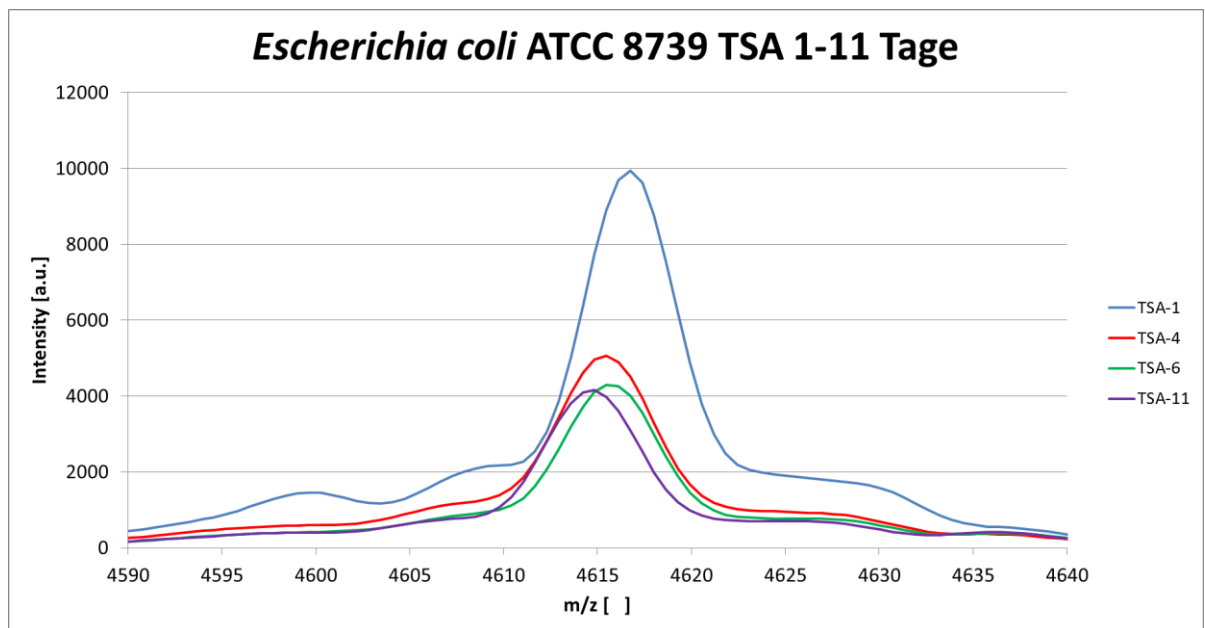


Abbildung 32 *Escherichia coli* ATCC 8739 im Zeitverlauf auf TSA Ausschnitt bei m/z 4616

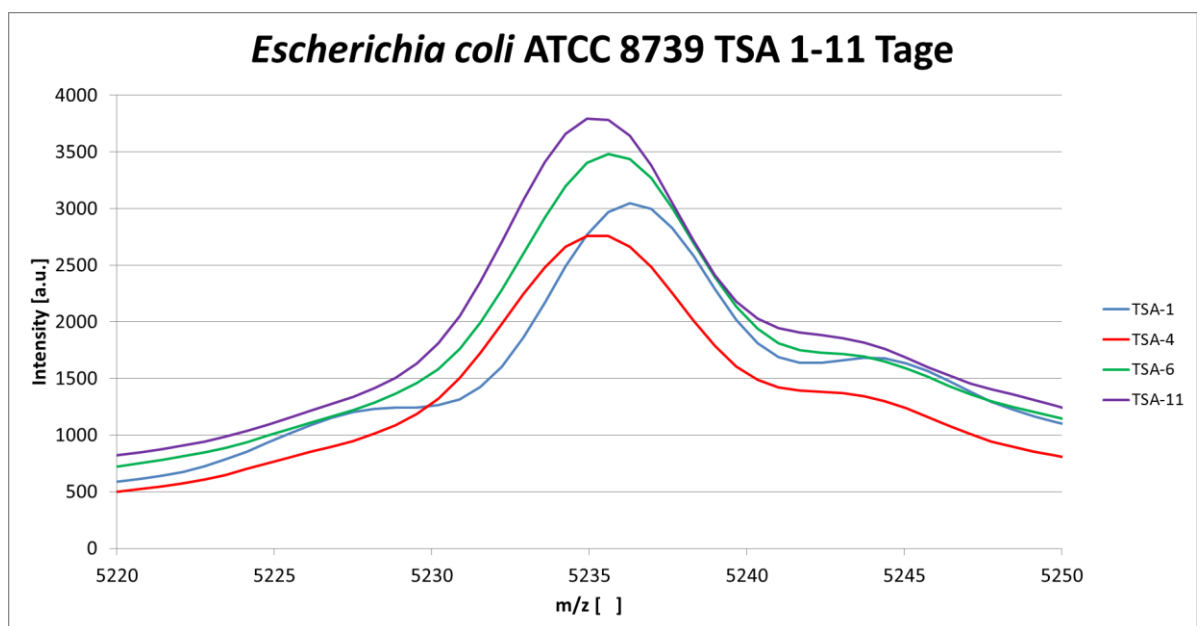


Abbildung 33 *Escherichia coli* ATCC 8739 im Zeitverlauf Ausschnitt m/z 5235

Abbildung 32 zeigt ein Beispiel bei dem die zu erwartende Intensitätsänderung über dargestellt wird (TSA-1 > TSA-4 > TSA-6 > TSA-11), während Abbildung 33 ein anderes

Beispiel darstellt bei dem die Intensitätsänderung auf keinen Zusammenhang zwischen Alter und Intensität schließen lässt (TSA-11 > TSA-6 > TSA-1 > TSA-4). Ein genereller Zusammenhang ist somit auszuschließen und hängt von dem betrachteten Protein ab.

#### 6.4. Konzentrationsverhalten der Intensität

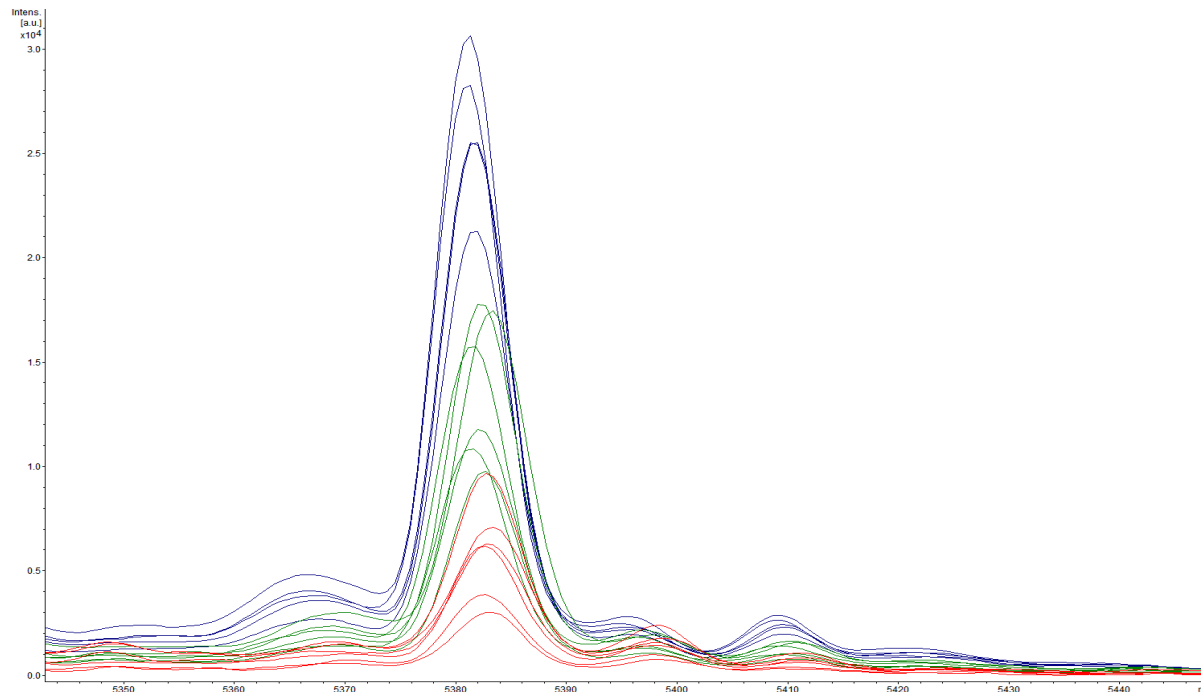


Abbildung 34 *E.coli* ATCC 8739 mit OD<sub>600</sub> = 5,216 (blau) 1 (grün) und 0,2 (rot) bei m/z 5384 Da

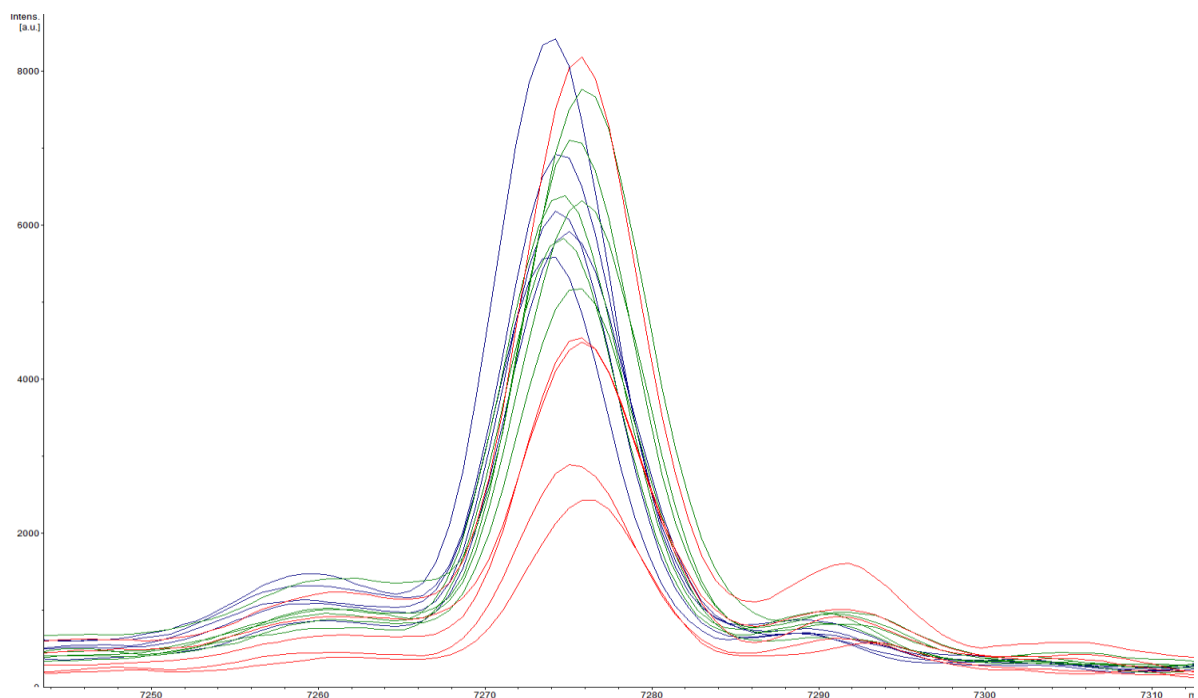


Abbildung 35 *E.coli* ATCC 8739 mit OD<sub>600</sub> = 5,216 (blau), 1 (grün) und 0,2 (rot) bei m/z 7275

Wie auf Abbildung 34 zu sehen ist nimmt die Intensität des Signals mit fallender Konzentration ab. Hervorzuheben ist hierbei, dass auch bei einer sehr starken Verdünnung

von 1:25 (bezogen auf die Ursprungskonzentration) die niedrigste Intensität des Peaks noch über 2500 a.u. aufweist und somit als Signal verwertbar ist. Abbildung 35 verdeutlicht, dass dieses Verhalten nicht bei allen Signalen auftritt, in diesem Fall hat die 1:25 Verdünnung annähernd die gleiche Intensität wie die Ursprungslösung.

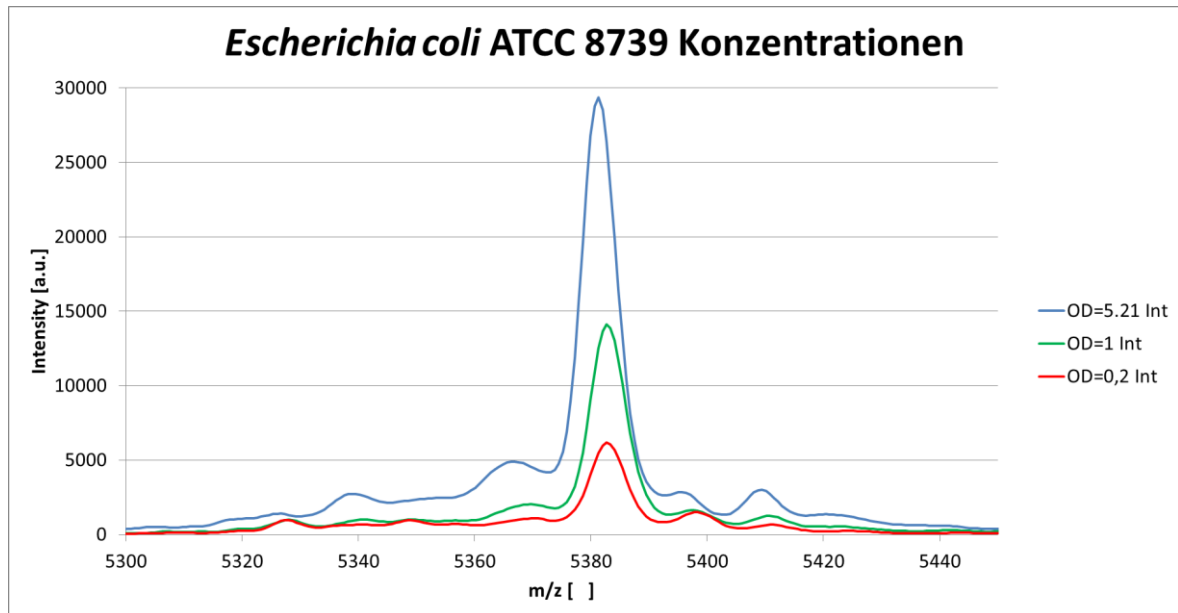


Abbildung 36 *E.coli* ATCC 8739 mit  $OD_{600} = 5,216$  (blau) 1 (grün) und 0,2 (rot) bei  $m/z$  5384 Mittelwert

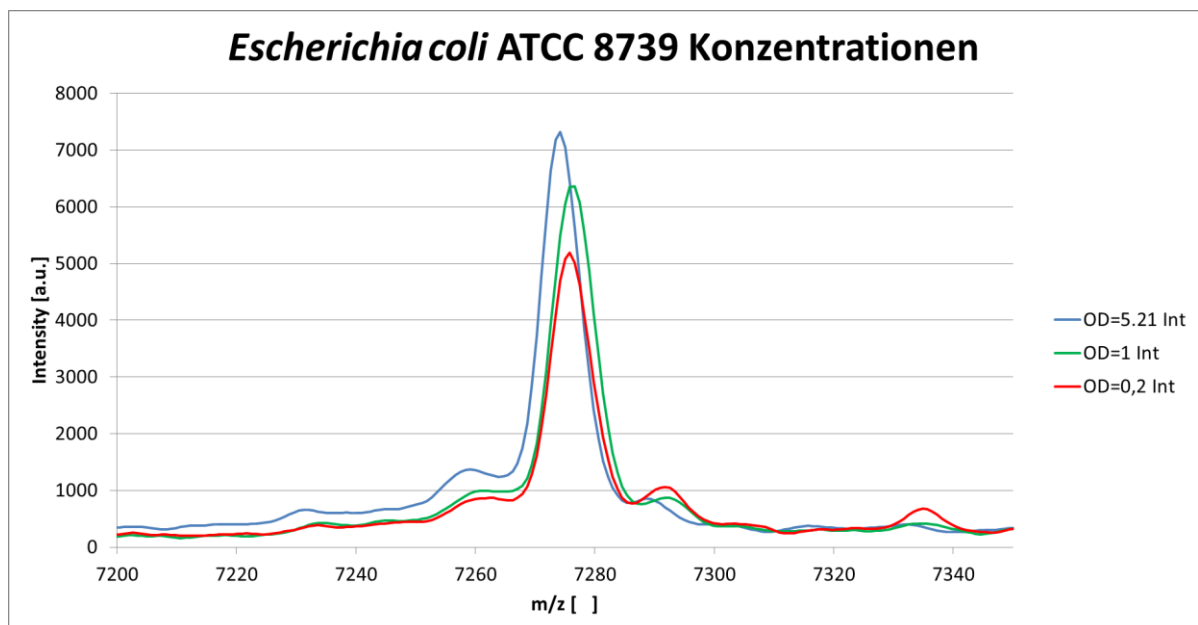


Abbildung 37 *E.coli* ATCC 8739 mit  $OD_{600} = 5,216$  (blau), 1 (grün) und 0,2 (rot) bei  $m/z$  7275 Mittelwert

Abbildung 36 und Abbildung 37 zeigen die Mittelwerte von Abbildung 34 und Abbildung 35. Hier sind die Unterschiede in der Intensität noch deutlicher zu sehen. Wie Abbildung 36 illustriert hat der Mittelwert der  $OD_{600}=1$  Messungen noch ca. die Hälfte der Intensität der Ursprungslösung,

während der Mittelwert der  $OD_{600} = 0,2$  nur noch ca. ein Sechstel der Ursprungsintensität aufweist. In diesem Bild ist auch gut zu erkennen, dass der benachbarte Peak ( $m/z$  ca. 5410) bei  $OD_{600} = 5,216$  noch deutlich als Peak erkennbar ist und bei  $OD_{600} = 0,2$  nicht.

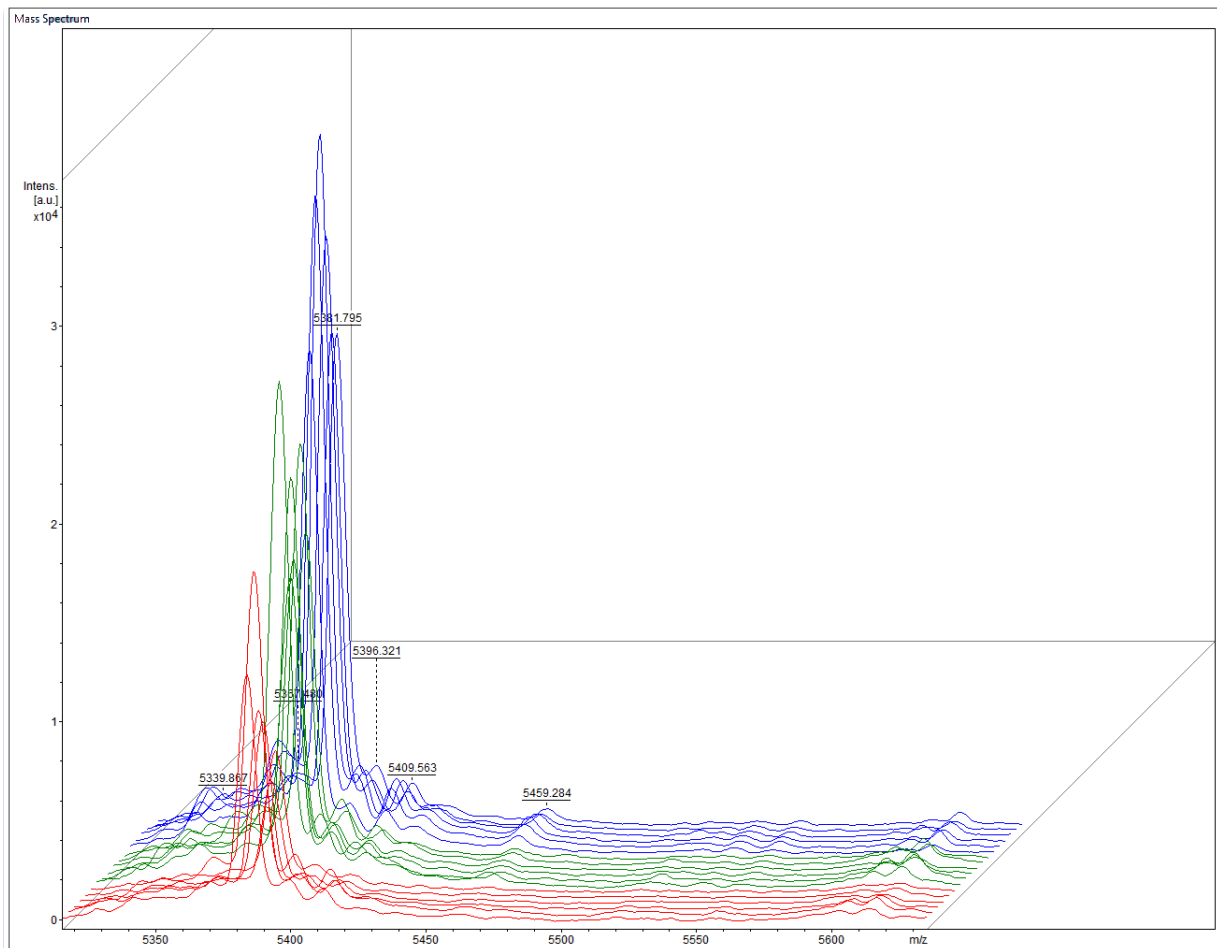


Abbildung 38 *E.coli* MM 294-1 mit  $OD_{600} = 2,328$  (blau), 1 (grün) und 0,2 (rot) bei  $m/z$  7275

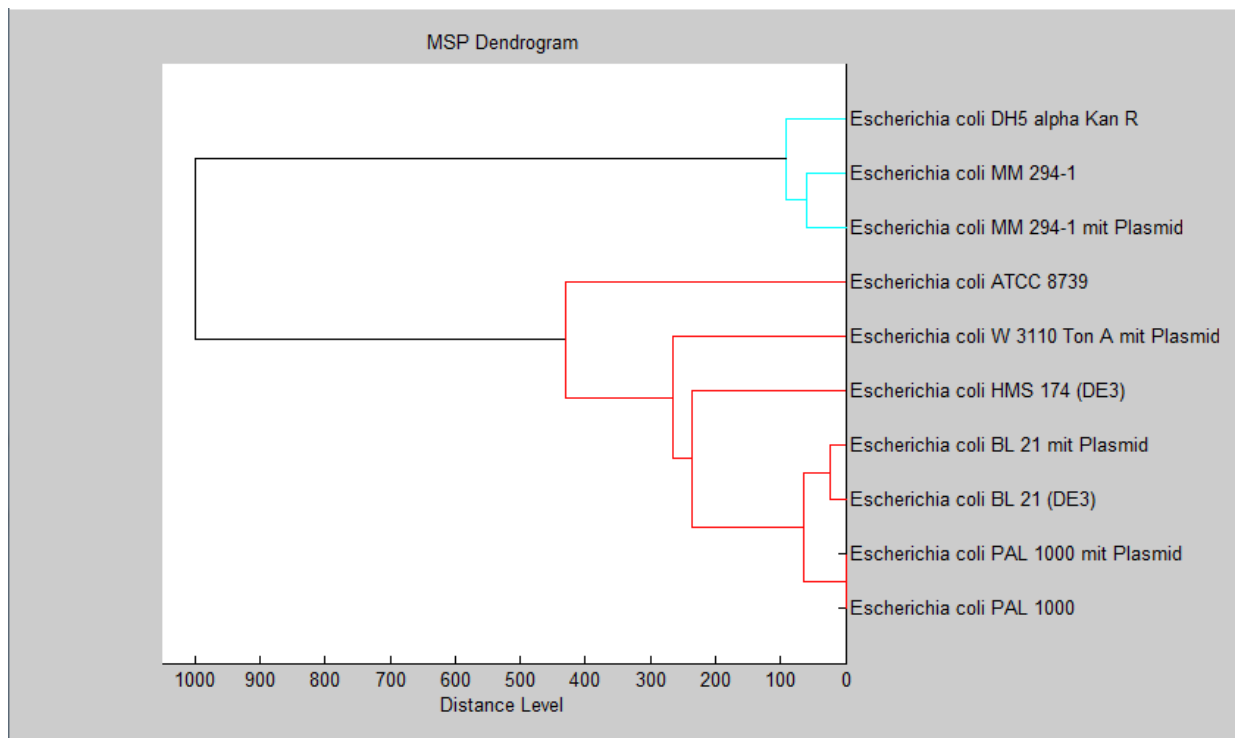
Abbildung 38 verdeutlicht noch einmal die Abnahme der Intensität bis zum Verschwinden des Signals im Rauschen ( $m/z$  ca. 5459). Die vorliegenden Daten lassen insgesamt den Rückschluss zu, dass das Verhältnis zwischen eingesetztem Zellmaterial und zugesetztem Extraktionsmittel (30  $\mu$ L AS + 30  $\mu$ L ACN) Spektren ergeben, welche in einem aussagekräftigen Bereich anzusiedeln sind (kein Informationsverlust bei akzeptablem Signal/Rauschverhältnis).

### 6.5. Überprüfung der erstellten Datenbank für *Escherichia coli*

Anhand des Datensatzes des ersten Experiments (siehe 6.3) wurde zuerst eine Datenbank für die *Escherichia coli* Stämme 01-AS, 02-AS und 03-AS für sämtliche gemessenen Nährmedien (TSA, RA, LB, R2+B1) erstellt. Dabei wurde für jeden Keim und jedes Nährmedium ein eigenes MSP kreiert ( $3 \times 4 = 12$  MSP's) welches auch alle Messzeitpunkte enthielt (1, 4, 6 und 11 Tage Inkubation). Einerseits um zu überprüfen, ob nicht nur eine Identifikation des Organismus sondern auch eine Zuordnung zum Nährmedium möglich ist. Andererseits sollte dabei auch überprüft werden, inwiefern es überhaupt möglich ist, Plasmid-tragende von nicht-Plasmid-tragenden zu unterscheiden. Dieser Versuch stellte sich als erfolglos heraus. Auf Grund der hohen Variabilität des Datensatzes und der großen Anzahl von MSP's war eine Zuordnung nicht möglich bzw. resultierten meist falsch positive Ergebnisse (ATCC 8739 wurde zum Beispiel als MM-294-1 mit einem Log-Score von 2,548 identifiziert) und die Identifizierung war somit unzuverlässig.

Nachdem beschlossen worden war, nur noch ein Nährmedium für alle Einträge zu verwenden und die Inkubationszeit auf ein Maximum von einem Tag zu limitieren, besserten sich die Ergebnisse drastisch. Die Optimierung des Schemas zur Erstellung von Datenbankeinträgen verbesserte die Ergebnisse nochmals, sodass nach vier biologischen Replikaten bei 5 verschiedenen Keimen (01-AS bis 05-AS) bereits Ergebnisse mit einer Trefferquote von 73% erzielt werden konnten (171207-1133-1011002759).

In weiterer Folge wurden 5 weitere Stämme in die Datenbank integriert, sodass die Datenbank insgesamt 10 verschiedene *Escherichia coli* Stämme enthält. Obwohl die Qualitätskriterien noch nicht hinreichend und zufriedenstellend erfüllt werden, konnte bereits ein Dendrogramm berechnet werden, welches den Verwandtschaftsgrad der Stämme realistisch wiedergibt (Abbildung 39). Anzumerken ist hierbei, dass Plasmid tragender und nicht Plasmid tragender Stamm immer am selben Ast eingegliedert werden und die MSP's einen Unterschied (Distance Level > 0) aufweisen. Eine Ausnahme ist hierbei der Stamm PAL 1000, bei dem beide Stämme ident sind (Distance Level =0). Des Weiteren ist zu sehen, dass die MSP's in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden können, welche eindeutig voneinander unterschieden werden können (Distance Level=1000). So sind die Stämme DH5- $\alpha$  und MM294-1 vom Rest eindeutig unterscheidbar.



**Abbildung 39 MSP-Dendrogramm von Escherichia coli-Stämmen**

### 6.5.1. Überprüfung der Testdatensätze mit restriktiven Akzeptanzkriterien

In weiterer Folge wurden drei Testdatensätze aller 10 *Escherichia coli* Stämme erstellt. Hierzu wurde ein biologisches Replikat jedes Stammes aus Schrägagarkulturen auf TSA für einen Tag bei  $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden Extrakte als Referenz und als unbekannte Proben (Probe von anderem Analytiker gezogen, Extraktion selbst durchgeführt) vorbereitet und sowohl im MBT RTC unter Routinebedingungen, als auch mittels FlexControl in Form von Triplikaten und als Summenspektren vermessen. Es wurden zwei verschiedene Akzeptanzkriterien definiert.

Auf Plasmid-Ebene: Eine Messung wurde als erfolgreiche Identifizierung gewertet, wenn der erste Treffer der Datenbank (Top-Hit) ident mit der Probe war, ist dies nicht der Fall wurde die Messung als negativ bewertet.

Auf Stamm-Ebene: Eine Messung wurde als erfolgreiche Identifizierung gewertet, wenn der erste Treffer der Datenbank entweder ident, oder vom selben Stamm wie die Probe war.

Im Folgenden werden die Resultate in Tabellenform präsentiert. Zur Veranschaulichung wurden für jeden Datenbankeintrag prozentuelle Werte für positive Resultate berechnet.

**Tabelle 8 Testdatensatz 1 zur Überprüfung der Datenbank von *Escherichia coli* Stämmen (RTC)**

| Teststamm                                       | Keimnummer | Ergebnis*      | Ergebnis**     |
|-------------------------------------------------|------------|----------------|----------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739               | 01-AS      | 6/6 (100 %)    | 6/6 (100 %)    |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1                | 02-AS      | 4/6 (66,6 %)   | 10/12 (83,3 %) |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1 mit Plasmid    | 03-AS      | 2/6 (33,3 %)   |                |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000                | 04-AS      | 3/6 (50,0 %)   | 11/12 (91,6 %) |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000 mit Plasmid    | 05-AS      | 2/6 (33,3 %)   |                |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ Kan        | 08-AS      | 4/6 (66,6 %)   | 4/6 (66,6 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> W3110 Ton A mit Plasmid | 09-AS      | 4/6 (66,6 %)   | 4/6 (66,6 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3)             | 10-AS      | 1/6 (16,6 %)   | 10/12 (83,3 %) |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 mit Plasmid       | 11-AS      | 4/6 (66,6 %)   |                |
| <i>Escherichia coli</i> HMS 174 (DE3)           | 12-AS      | 1/6 (16,6 %)   | 1/6 (16,6 %)   |
| gesamt                                          |            | 31/60 (51,6 %) | 46/60 (76,6 %) |

\*auf Plasmid-Ebene, \*\* auf Stamm-Ebene

**Tabelle 9 Testdatensatz 1 zur Überprüfung der Datenbank von *Escherichia coli* (FlexControl)**

| Teststamm                                       | Keimnummer | Ergebnis*        | Ergebnis**       |
|-------------------------------------------------|------------|------------------|------------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739               | 01-AS      | 18/18 (100 %)    | 18/18 (100 %)    |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1                | 02-AS      | 15/18 (83,3 %)   | 29/36 (80,5 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1 mit Plasmid    | 03-AS      | 7/18 (38,8 %)    |                  |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000                | 04-AS      | 7/18 (38,8 %)    | 33/36 (91,6 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000 mit Plasmid    | 05-AS      | 6/18 (33,3 %)    |                  |
| <i>Escherichia coli</i> DH5α Kan                | 08-AS      | 16/18 (88,8 %)   | 16/18 (88,8 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> W3110 Ton A mit Plasmid | 09-AS      | 9/18 (50,0 %)    | 9/18 (50,0 %)    |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3)             | 10-AS      | 5/18 (27,7 %)    | 33/36 (91,6 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 mit Plasmid       | 11-AS      | 15/18 (83,3 %)   |                  |
| <i>Escherichia coli</i> HMS 174 (DE3)           | 12-AS      | 8/18 (44,4 %)    | 8/18 (44,4 %)    |
| gesamt                                          |            | 106/180 (58,8 %) | 146/180 (81,1 %) |

\*auf Plasmid-Ebene, \*\* auf Stamm-Ebene

**Tabelle 10 Testdatensatz 2 zur Überprüfung der Datenbank von *Escherichia coli* (RTC)**

| Teststamm                                       | Keimnummer | Ergebnis*      | Ergebnis**     |
|-------------------------------------------------|------------|----------------|----------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739               | 01-AS      | 6/6 (100 %)    | 6/6 (100 %)    |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1                | 02-AS      | 3/6 (50,0 %)   | 12/12 (100 %)  |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1 mit Plasmid    | 03-AS      | 5/6 (83,3 %)   |                |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000                | 04-AS      | 2/6 (33,3 %)   | 11/12 (91,6 %) |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000 mit Plasmid    | 05-AS      | 3/6 (50,0 %)   |                |
| <i>Escherichia coli</i> DH5α Kan                | 08-AS      | 6/6 (100 %)    | 6/6 (100 %)    |
| <i>Escherichia coli</i> W3110 Ton A mit Plasmid | 09-AS      | 2/6 (33,3 %)   | 2/6 (33,3 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3)             | 10-AS      | 1/6 (16,6 %)   | 10/12 (83,3 %) |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 mit Plasmid       | 11-AS      | 3/6 (50,0 %)   |                |
| <i>Escherichia coli</i> HMS 174 (DE3)           | 12-AS      | 3/6 (50,0 %)   | 3/6 (50,0 %)   |
| gesamt                                          |            | 34/60 (56,6 %) | 50/60 (83,3 %) |

\*auf Plasmid-Ebene, \*\* auf Stamm-Ebene

**Tabelle 11 Testdatensatz 2 zur Überprüfung der Datenbank von *Escherichia coli* (FlexControl)**

| Teststamm                                       | Keimnummer | Ergebnis*        | Ergebnis**       |
|-------------------------------------------------|------------|------------------|------------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739               | 01-AS      | 17/18 (94,4 %)   | 17/18 (94,4 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1                | 02-AS      | 12/18 (66,6 %)   | 35/36 (97,2 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1 mit Plasmid    | 03-AS      | 14/18 (77,7 %)   |                  |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000                | 04-AS      | 9/18 (50,0 %)    | 34/36 (94,4 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000 mit Plasmid    | 05-AS      | 3/18 (16,6 %)    |                  |
| <i>Escherichia coli</i> DH5α Kan                | 08-AS      | 15/18 (83,3 %)   | 15/18 (83,3 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> W3110 Ton A mit Plasmid | 09-AS      | 6/18 (33,3 %)    | 6/18 (33,3 %)    |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3)             | 10-AS      | 1/18 (5,5 %)     | 30/36 (83,3 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 mit Plasmid       | 11-AS      | 6/18 (33,3 %)    |                  |
| <i>Escherichia coli</i> HMS 174 (DE3)           | 12-AS      | 7/18 (38,8 %)    | 7/18 (38,8 %)    |
| gesamt                                          |            | 122/180 (67,7 %) | 144/180 (80,0 %) |

\*auf Plasmid-Ebene, \*\* auf Stamm-Ebene

**Tabelle 12 Testdatensatz 3 zur Überprüfung der Datenbank von *Escherichia coli* (RTC)**

| Teststamm                                       | Keimnummer | Ergebnis*      | Ergebnis**     |
|-------------------------------------------------|------------|----------------|----------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739               | 01-AS      | 6/6 (100 %)    | 6/6 (100 %)    |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1                | 02-AS      | 5/6 (83,3 %)   | 12/12 (100 %)  |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1 mit Plasmid    | 03-AS      | 6/6 (100 %)    |                |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000                | 04-AS      | 4/6 (66,6 %)   | 7/12 (58,3 %)  |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000 mit Plasmid    | 05-AS      | 1/6 (16,6 %)   |                |
| <i>Escherichia coli</i> DH5α Kan                | 08-AS      | 2/6 (33,3 %)   | 2/6 (33,3 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> W3110 Ton A mit Plasmid | 09-AS      | 5/6 (83,3 %)   | 5/6 (83,3 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3)             | 10-AS      | 1/6 (16,6 %)   | 11/12 (91,6 %) |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 mit Plasmid       | 11-AS      | 3/6 (50,0 %)   |                |
| <i>Escherichia coli</i> HMS 174 (DE3)           | 12-AS      | 3/6 (50,0 %)   | 3/6 (50,0 %)   |
| gesamt                                          |            | 36/60 (60,0 %) | 46/60 (76,6 %) |

\*auf Plasmid-Ebene, \*\* auf Stamm-Ebene

**Tabelle 13 Testdatensatz 3 zur Überprüfung der Datenbank von *Escherichia coli* (FlexControl)**

| Teststamm                                       | Keimnummer | Ergebnis*        | Ergebnis**       |
|-------------------------------------------------|------------|------------------|------------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739               | 01-AS      | 18/18 (100 %)    | 18/18 (100 %)    |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1                | 02-AS      | 16/18 (88,8 %)   | 36/36 (100 %)    |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1/ mit Plasmid   | 03-AS      | 17/18 (94,4 %)   |                  |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000                | 04-AS      | 14/18 (77,7 %)   | 26/36 (72,2 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000 mit Plasmid    | 05-AS      | 3/18 (16,6 %)    |                  |
| <i>Escherichia coli</i> DH5α Kan                | 08-AS      | 6/18 (33,3 %)    | 6/18 (33,3 %)    |
| <i>Escherichia coli</i> W3110 Ton A mit Plasmid | 09-AS      | 10/18 (55,5 %)   | 10/18 (55,5 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3)             | 10-AS      | 4/18 (22,2 %)    | 35/36 (97,2 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 mit Plasmid       | 11-AS      | 10/18 (55,5 %)   |                  |
| <i>Escherichia coli</i> HMS 174 (DE3)           | 12-AS      | 7/18 (38,8 %)    | 7/18 (38,8 %)    |
| gesamt                                          |            | 105/180 (58,3 %) | 138/180 (76,6 %) |

\*auf Plasmid-Ebene, \*\* auf Stamm-Ebene

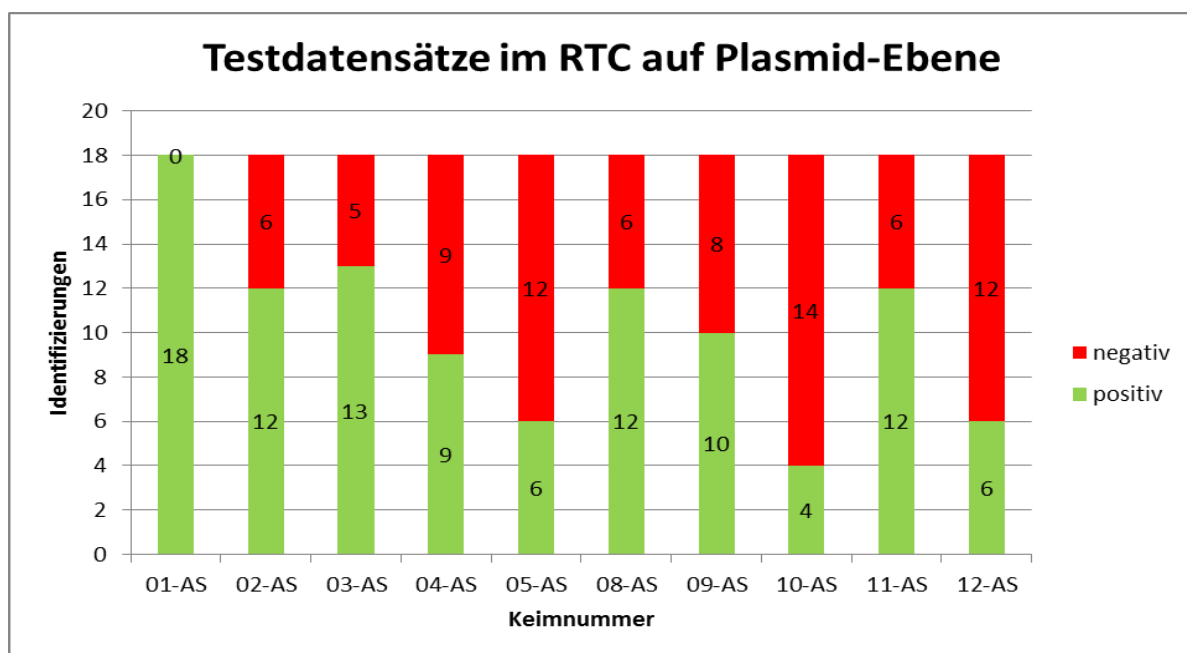


Abbildung 41 Diagramm aller Testdatensätze auf Plasmid-Ebene (RTC)

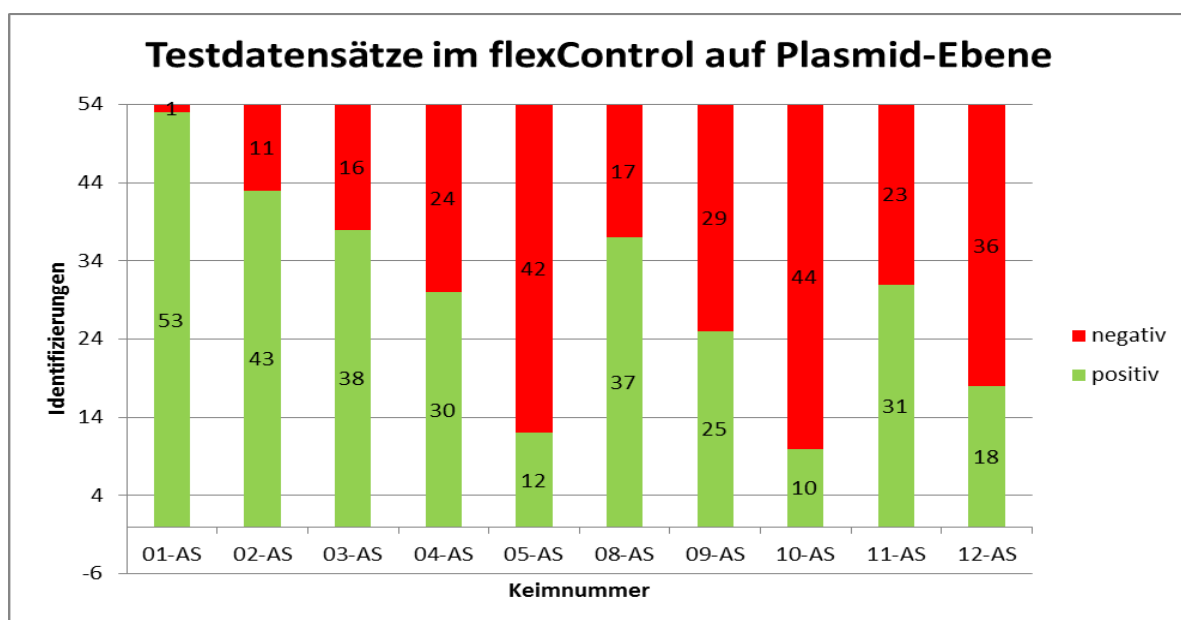


Abbildung 42 Diagramm aller Testdatensätze auf Plasmid-Ebene (flexControl)

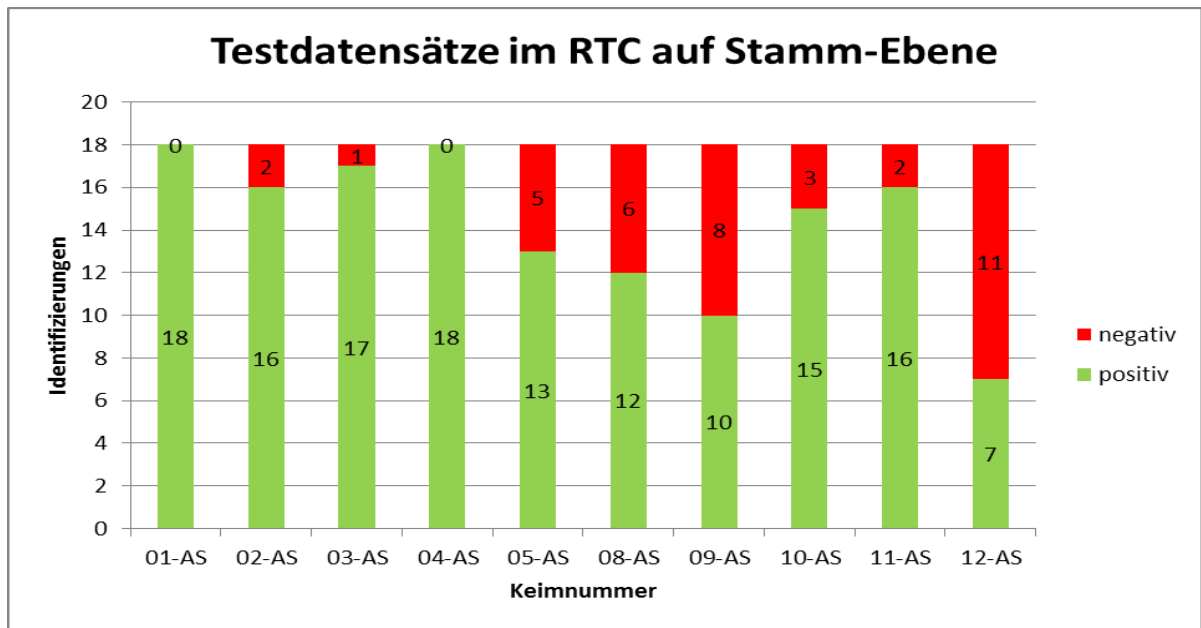


Abbildung 43 Diagramm aller Testdatensätze auf Stamm-Ebene (RTC)

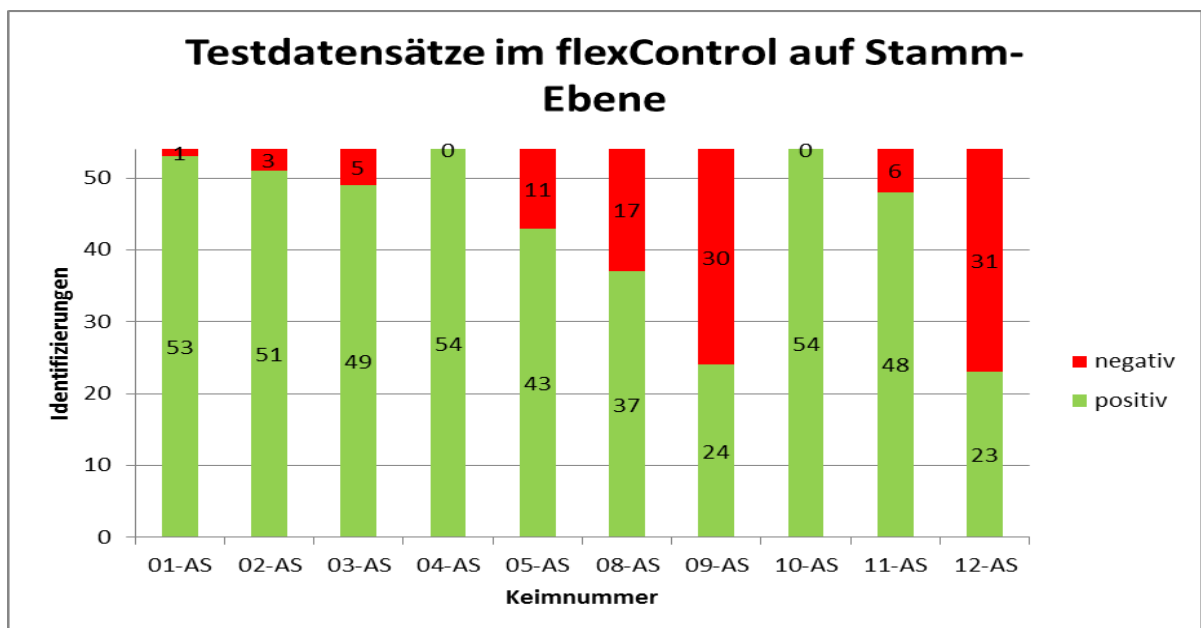


Abbildung 44 Diagramm aller Testdatensätze auf Stamm-Ebene (flexControl)

## 6.5.2. Überprüfung der Testdatensätze mit unveränderten Akzeptanzkriterien

**Tabelle 14 Testdatensatz 1 zur Überprüfung von Escherichia coli (RTC) Standard-Methode Bruker**

| Teststamm                                       | Keimnummer | Ergebnis*      | Ergebnis**     |
|-------------------------------------------------|------------|----------------|----------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739               | 01-AS      | 6/6 (100 %)    | 6/6 (100 %)    |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1                | 02-AS      | 3/6 (50,0 %)   | 8/12 (66,6 %)  |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1 mit Plasmid    | 03-AS      | 4/6 (66,6 %)   |                |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000                | 04-AS      | 1/6 (16,6 %)   | 11/12 (91,6 %) |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000 mit Plasmid    | 05-AS      | 1/6 (16,6 %)   |                |
| <i>Escherichia coli</i> DH5α Kan                | 08-AS      | 4/6 (66,6 %)   | 4/6 (66,6 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> W3110 Ton A mit Plasmid | 09-AS      | 2/6 (33,3 %)   | 2/6 (33,3 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3)             | 10-AS      | 2/6 (33,3 %)   | 11/12 (91,6 %) |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 mit Plasmid       | 11-AS      | 3/6 (33,3 %)   |                |
| <i>Escherichia coli</i> HMS 174 (DE3)           | 12-AS      | 4/6 (66,6 %)   | 4/6 (66,6 %)   |
| gesamt                                          |            | 30/60 (50,0 %) | 46/60 (76,6 %) |

\*auf Type-Strain Ebene, \*\* auf Stamm-Ebene

**Tabelle 15 Testdatensatz 1 zur Überprüfung von Escherichia coli (FlexControl) Standard-Methode Bruker**

| Teststamm                                       | Keimnummer | Ergebnis*        | Ergebnis**       |
|-------------------------------------------------|------------|------------------|------------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739               | 01-AS      | 18/18 (100 %)    | 18/18 (100 %)    |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1                | 02-AS      | 13/18 (72,2 %)   | 29/36 (80,5 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1 mit Plasmid    | 03-AS      | 16/18 (88,8 %)   |                  |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000                | 04-AS      | 7/18 (38,8 %)    | 36/36 (100 %)    |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000 mit Plasmid    | 05-AS      | 8/18 (44,4 %)    |                  |
| <i>Escherichia coli</i> DH5α Kan                | 08-AS      | 17/18 (94,4 %)   | 17/18 (94,4 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> W3110 Ton A mit Plasmid | 09-AS      | 8/18 (44,4 %)    | 8/18 (44,4 %)    |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3)             | 10-AS      | 8/18 (44,4 %)    | 34/36 (94,4 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 mit Plasmid       | 11-AS      | 12/18 (66,6 %)   |                  |
| <i>Escherichia coli</i> HMS 174 (DE3)           | 12-AS      | 15/18 (83,3 %)   | 15/18 (83,3 %)   |
| gesamt                                          |            | 122/180 (67,7 %) | 157/180 (87,2 %) |

\*auf Type-Strain Ebene, \*\* auf Stamm-Ebene

**Tabelle 16 Testdatensatz 2 zur Überprüfung von Escherichia coli (RTC) Standard-Methode Bruker**

| Teststamm                                       | Keimnummer | Ergebnis*      | Ergebnis**     |
|-------------------------------------------------|------------|----------------|----------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739               | 01-AS      | 6/6 (100 %)    | 6/6 (100 %)    |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1                | 02-AS      | 3/6 (50,0 %)   | 11/12 (91,6 %) |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1 mit Plasmid    | 03-AS      | 5/6 (83,3 %)   |                |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000                | 04-AS      | 3/6 (50,0 %)   | 12/12 (100 %)  |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000 mit Plasmid    | 05-AS      | 1/6 (16,6 %)   |                |
| <i>Escherichia coli</i> DH5α Kan                | 08-AS      | 6/6 (100 %)    | 6/6 (100 %)    |
| <i>Escherichia coli</i> W3110 Ton A mit Plasmid | 09-AS      | 0/6 (0 %)      | 0/6 (0 %)      |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3)             | 10-AS      | 2/6 (33,3 %)   | 11/12 (91,6 %) |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 mit Plasmid       | 11-AS      | 2/6 (33,3 %)   |                |
| <i>Escherichia coli</i> HMS 174 (DE3)           | 12-AS      | 1/6 (16,6 %)   | 1/6 (16,6 %)   |
| gesamt                                          |            | 29/60 (48,3 %) | 47/60 (78,3 %) |

\*auf Type-Strain Ebene, \*\* auf Stamm-Ebene

**Tabelle 17 Testdatensatz 2 zur Überprüfung von Escherichia coli (FlexControl) Standard-Methode Bruker**

| Teststamm                                       | Keimnummer | Ergebnis*       | Ergebnis**       |
|-------------------------------------------------|------------|-----------------|------------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739               | 01-AS      | 16/18 (88,8 %)  | 16/18 (88,8 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1                | 02-AS      | 1/18 (5,5 %)    | 34/36 (94,4 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1 mit Plasmid    | 03-AS      | 15/18 (83,3 %)  |                  |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000                | 04-AS      | 6/18 (33,3 %)   | 34/36 (94,4 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000 mit Plasmid    | 05-AS      | 2/18 (11,1 %)   |                  |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ Kan        | 08-AS      | 18/18 (100 %)   | 18/18 (100 %)    |
| <i>Escherichia coli</i> W3110 Ton A mit Plasmid | 09-AS      | 3/18 (16,6 %)   | 3/18 (16,6 %)    |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3)             | 10-AS      | 8/18 (44,4 %)   | 35/36 (97,2 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 mit Plasmid       | 11-AS      | 7/18 (33,3 %)   |                  |
| <i>Escherichia coli</i> HMS 174 (DE3)           | 12-AS      | 11/18 (61,1 %)  | 11/18 (61,1 %)   |
| gesamt                                          |            | 87/180 (48,3 %) | 151/180 (83,8 %) |

\*auf Type-Strain Ebene, \*\* auf Stamm-Ebene

**Tabelle 18 Testdatensatz 3 zur Überprüfung von Escherichia coli (RTC) Standard-Methode Bruker**

| Teststamm                                       | Keimnummer | Ergebnis*      | Ergebnis**     |
|-------------------------------------------------|------------|----------------|----------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739               | 01-AS      | 6/6 (100 %)    | 6/6 (100 %)    |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1                | 02-AS      | 2/6 (33,3 %)   | 11/12 (91,6 %) |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1 mit Plasmid    | 03-AS      | 6/6 (100 %)    |                |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000                | 04-AS      | 3/6 (50,0 %)   | 8/12 (66,6 %)  |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000 mit Plasmid    | 05-AS      | 3/6 (50,0 %)   |                |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ Kan        | 08-AS      | 2/6 (33,3 %)   | 2/6 (33,3 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> W3110 Ton A mit Plasmid | 09-AS      | 5/6 (83,3 %)   | 5/6 (83,3 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3)             | 10-AS      | 1/6 (16,6 %)   | 12/12 (100 %)  |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 mit Plasmid       | 11-AS      | 4/6 (66,6 %)   |                |
| <i>Escherichia coli</i> HMS 174 (DE3)           | 12-AS      | 4/6 (66,6 %)   | 4/6 (66,6 %)   |
| gesamt                                          |            | 35/60 (58,3 %) | 48/60 (80,0 %) |

**Tabelle 19 Testdatensatz 3 zur Überprüfung von Escherichia coli (flexControl Standard-Methode Bruker**

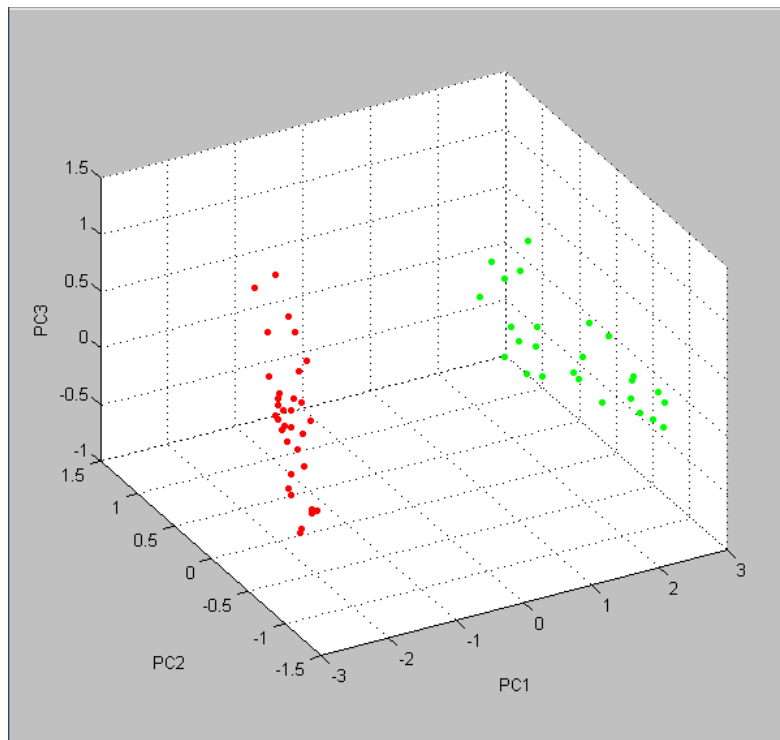
| Teststamm                                       | Keimnummer | Ergebnis*       | Ergebnis**       |
|-------------------------------------------------|------------|-----------------|------------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739               | 01-AS      | 17/18 (94,4 %)  | 17/18 (94,4 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1                | 02-AS      | 9/18 (50,0 %)   | 35/36 (97,2 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1 mit Plasmid    | 03-AS      | 16/18 (88,8 %)  |                  |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000                | 04-AS      | 8/18 (44,4 %)   | 27/36 (75,0 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000 mit Plasmid    | 05-AS      | 4/18 (22,2 %)   |                  |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ Kan        | 08-AS      | 8/18 (44,4 %)   | 8/18 (44,4 %)    |
| <i>Escherichia coli</i> W3110 Ton A mit Plasmid | 09-AS      | 12/18 (66,6 %)  | 12/18 (66,6 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3)             | 10-AS      | 6/18 (33,3 %)   | 34/36 (94,4 %)   |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 mit Plasmid       | 11-AS      | 4/18 (22,2 %)   |                  |
| <i>Escherichia coli</i> HMS 174 (DE3)           | 12-AS      | 10/18 (55,5 %)  | 10/18 (55,5 %)   |
| gesamt                                          |            | 94/180 (52,2 %) | 143/180 (79,4 %) |

#### 6.6. Überprüfung der selbst erstellten Datenbank mit *Pseudomonas fluorescens*

Schon der erste Versuch mit *Pseudomonas fluorescens* zeigte wesentliche Unterschiede in der Ausprägung der Spektren zwischen Plasmid tragendem Stamm und Stamm ohne Plasmid. Als Nährmedium wurde wie bei späteren Experimenten mit *Escherichia coli* TSA mit einer Inkubationszeit von einem Tag gewählt. Da im Laufe der Versuche mit *Escherichia coli* beschlossen wurde, die Anzahl an biologischen Replikaten, welche zur Erstellung eines Datenbankeintrages verwendet werden, auf vier zu erhöhen, wurde als zweites Experiment das neue Datenbankeintrags-Erstellungsprozedere angewandt ( $4 \times 3 \times 3 = 36$  Spektren). Dieser Versuch wurde genutzt, um einen neuen Datenbankeintrag zu erstellen und die Wiederholbarkeit der unterschiedlichen Spektren zu überprüfen.

Als weiteres Überprüfungsexperiment wurden Proben gewählt, die aus einer laufenden Plasmid-Stabilitäts-Analyse auf dem Selektiv-Nährmedium M9 durchgeführt wurde. Positiv- und Negativgruppe wurden hierbei von einer anderen Person markiert. Anschließend wurden zwei biologische Replikate jeder Gruppe (+/-) der Ameisensäure-Extraktionsprozedur unterworfen und einerseits wie in der Routineanalytik im MBT RTC (gegen die selbst erstellte Datenbank inklusive der von Bruker kreierten Datenbank) und andererseits als technisches Triplikat mittels flexControl zur genaueren Analyse der Spektren vermessen. Eine Identifizierung war auf Spezies ebene möglich, eine Unterscheidung zwischen Plasmid tragendem Stamm und Stamm ohne Plasmid jedoch nicht.

Da aus Vorversuchen mit *Escherichia coli* bereits bekannt war, dass verschiedene Keime auf unterschiedlichen Nährmedien unterschiedliche Spektren generieren, wurden die Proben auf TSA überimpft und für einen Tag bei  $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Parallel dazu wurden Referenzstämme aus der Stammhaltung in Form von Glycerin-Kulturen herangezogen und ebenfalls auf TSA überimpft und bei  $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$  für einen Tag inkubiert. Die Proben wurden extrahiert und im gleichen Modus wie am Tag zuvor vermessen (MBT RTC und flexControl). Dieses Mal war eine Unterscheidung von Plasmid-tragendem Stamm und Stamm ohne Plasmid eindeutig möglich. Dieses Experiment zeigte ebenfalls, dass es für eine Identifikation auf Strain-Ebene notwendig sein wird, die Keime auf demselben Nährmedium zu inkubieren von dem der Datenbankeintrag erstellt wurde.



**Abbildung 45 PCA Clusteranalyse von *Pseudomonas fluorescens* MB 101 unbekannte Proben und Referenzproben mit und ohne Plasmid**

Wie auf Abbildung 45 zu sehen ist, wird der gesamte Datensatz in 2 Cluster eingeteilt (hierarchische Clusteranalyse, distance measure correlation, Linkage algorithm average). Die unbekannten Proben wurden dabei jeweils mit einer Referenzprobe in einen Cluster eingeordnet, was einerseits das Übereinstimmen mit der Referenz und andererseits die Unterscheidbarkeit der Stämme insgesamt veranschaulicht.

Die großen Unterschiede in den Spektren zwischen *Pseudomonas fluorescens* mit Plasmid und ohne Plasmid lassen sich eventuell auf die Natur des eingeschleusten Plasmides zurückführen. Da das Plasmid mit einem Knock-out Gen gespliced ist, welches die Biosynthese von Uracil (eine Nucleobase in der RNA) unterbindet. Wird der Keim auf einem Nährmedium inkubiert, welches kein zusätzliches Uracil zur Verfügung stellt, ist der Organismus gezwungen ein anderes Proteom auszubilden.

Zur weiteren Bestätigung wurden die beiden Stämme und ein zusätzlicher Stamm (*Pseudomonas fluorescens* DSM 50090) dem finalen Schema zur Erstellung von Datenbankeinträgen (siehe Abbildung 14) unterworfen und in einer Kontroll-Messung überprüft. Dieses Experiment sollte zum einen zeigen, dass die Wiederholbarkeit der Messungen unter qualitativ anspruchsvollen Bedingungen ausreicht um verlässliche und

akkurate Ergebnisse zu erhalten und zum anderen zeigen, dass die Unterscheidung zwischen Plasmid-tragendem und nicht Plasmid-tragendem Stamm auch funktioniert, wenn die Datenbank erweitert wird. Hierzu wurden alle drei Stämme auf TSA für einen Tag bei 32,5°C ± 2,5°C inkubiert, extrahiert und vermessen. Es wurden jeweils 2 biologische Replikate drei Mal gespottet und als technisches Triplikat vermessen. Zur Überprüfung wurden von einem anderen Analytiker unbekannte Proben für jeden Stamm gezogen und mit den Referenzstämmen der Extraktionsprozedur unterworfen und im gleichen Schema vermessen. Abbildung 46 veranschaulicht, wie präzise eine Identifikation unter den gewählten Bedingungen vorgenommen werden kann (blau: Standard-MSP, grün: gute Übereinstimmung, orange: mäßige Übereinstimmung und rot: keine Übereinstimmung).

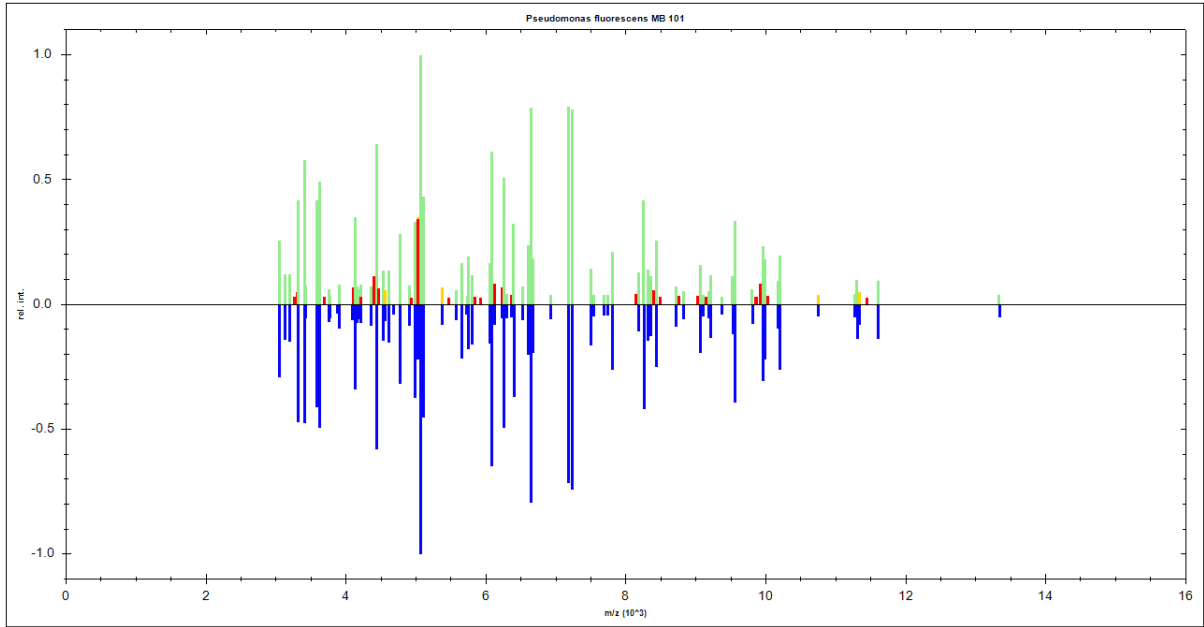


Abbildung 46 Identifikation einer unbekannten Probe als *Pseudomonas fluorescens* MB 101 (Log-Score: 2,809)

Aus insgesamt 81 Spektren wurden 80 bei der Primär-Identifikation korrekt identifiziert (98,76 %). In der Sekundär-Identifizierung auf Sub-Typing-Ebene wurden 81 von 81 (100 %) korrekt identifiziert.

| Mb | Detected Species                                  | Log(Score) | Mb | Detected Species                                  | Log(Score) |
|----|---------------------------------------------------|------------|----|---------------------------------------------------|------------|
|    | <i>Pseudomonas fluorescens</i> MB 101             | 2.539      |    | <i>Pseudomonas fluorescens</i> MB 101 mit Plasmid | 2.297      |
|    | <i>Pseudomonas fluorescens</i> MB 101 mit Plasmid | 2.531      |    | <i>Pseudomonas fluorescens</i> MB 101             | 2.234      |
|    | <i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM 50090          | 1.940      |    | <i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM 50090          | 0.975      |
|    | <i>Pseudomonas</i> sp 057 Galv13 NFI              | 1.293      |    | <i>Pseudomonas protegens</i> DSM 19095T DSM       | <0         |
|    | <i>Pseudomonas protegens</i> DSM 19095T DSM       | 1.246      |    |                                                   |            |
|    | <i>Pseudomonas</i> sp 107 Neb26 NFI               | 1.186      |    |                                                   |            |
|    | <i>Pseudomonas</i> sp B153 UFL                    | 1.165      |    |                                                   |            |
|    | <i>Pseudomonas quariconensis</i> 8382_2010 IMHM   | 1.141      |    |                                                   |            |
|    | <i>Pseudomonas segetis</i> DSM 18913T DSM         | 1.085      |    |                                                   |            |
|    | <i>Enterobacter coli</i> ATCC 35218 CHB           | 1.022      |    |                                                   |            |

Abbildung 47 Primär-Identifizierung

Abbildung 48 Sekundär-Identifizierung

Alle 27 unbekannten Proben konnten in der Primär-Identifikation korrekt zugeordnet werden. Die falsch identifizierte Probe war eine Referenzmessung bei der 2 von 3 Messungen richtig zugeordnet werden konnten. Vermutlich war die Intensität bei dieser Messung auf Grund zu hoher Ionenausbeute bei der Ionisierung derart hoch, dass die Zuordnung davon beeinflusst wurde. Bei der Sekundär-Identifizierung (bei der deckungsgleiche Peaks nicht bei der Zuordnung verwendet werden) war die Identifizierung jedenfalls korrekt.

Auch die PCA-Cluster-Analyse (hierarchische Clusteranalyse, distance measure correlation, Linkage algorithm average) zeigt eindeutige Ergebnisse und eine klare Unterscheidbarkeit der drei *Pseudomonas fluorescens* Stämme. Abbildung 49 zeigt sämtliche Messungen und teilt den Datensatz deutlich sichtbar in 3 verschiedene Cluster (rot: *Pseudomonas fluorescens* MB 101 mit Plasmid, grün: *Pseudomonas fluorescens* MB 101 und gelb: *Pseudomonas fluorescens* DSM 50090).

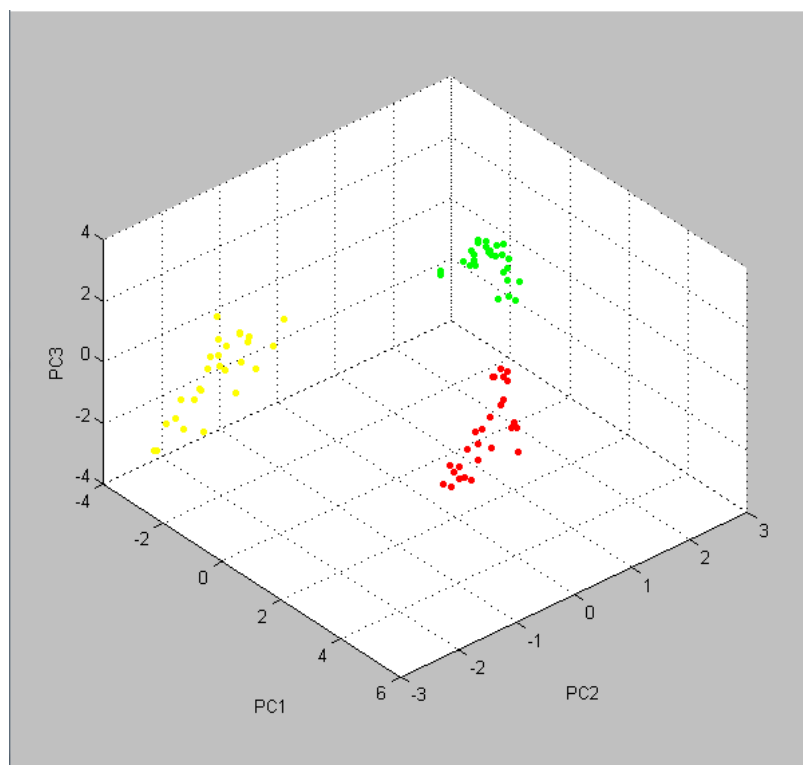


Abbildung 49 PCA-Clusteranalyse von *Pseudomonas fluorescens*

Das MSP-Dendrogramm zeigt eine realistische und zu erwartende Nähe der Verwandtschaft zwischen den drei Stämmen. Dabei werden die beiden MB 101 Stämme als sehr nahe verwandt (Distance Level < 100) eingeordnet und sind entfernt verwandt (Distance Level = 1000) mit dem DSM 50090 Stamm derselben Spezies.

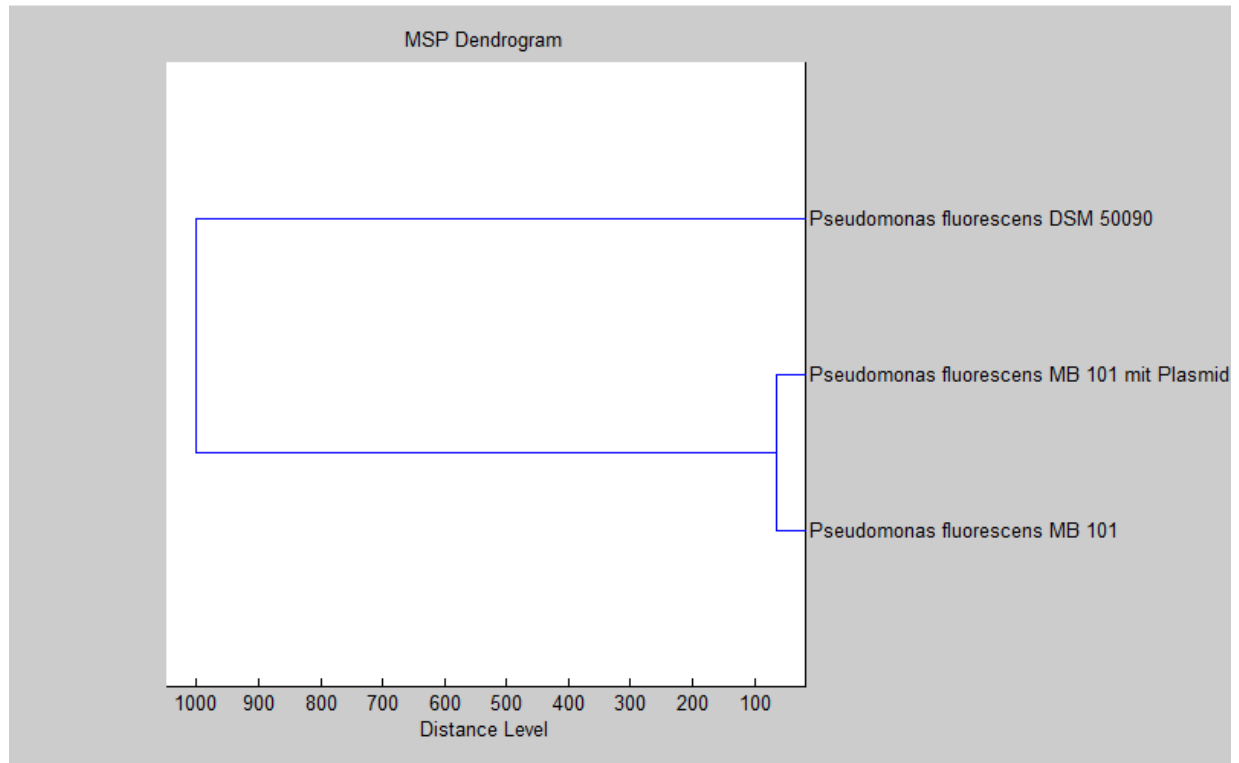


Abbildung 50 MSP-Dendrogramm von *Pseudomonas fluorescens*

## 6.7. Vermessung von Plasmid Extrakten

Tabelle 20 Vermessene Plasmid Extrakte

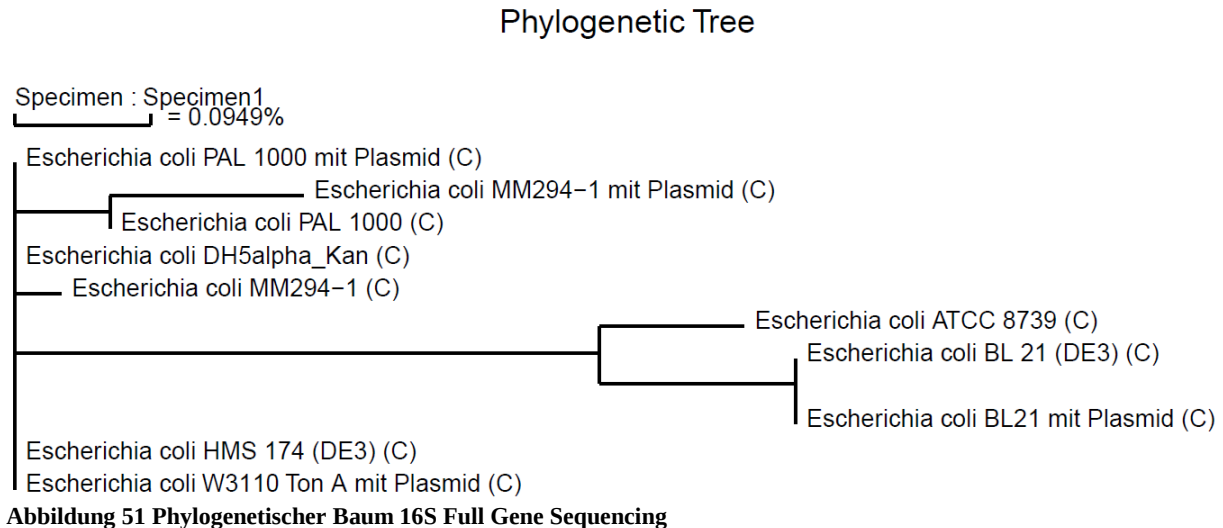
| Teststamm         | Keimnummer | Ergebnis    |
|-------------------|------------|-------------|
| 33 Drug Substance | 33-DS      | keine Peaks |
| 33 MWCB PC        | 33-WCB     | keine Peaks |
| 08 WCB            | 08-WCB     | keine Peaks |

Zur Überprüfung, ob bei der Ameisensäure-Extraktionsmethode auch DNA-Fragmente in einer ähnlichen Größenordnung mit extrahiert werden und ein Signal produzieren, wurden drei Plasmid-Extrakte extrahiert und vermessen. Es wurde dasselbe Extraktionsschema mit den gleichen Reagenzien durchgeführt. Die einzige Abweichung war eine längere Zentrifugation der Proben nach dem Zusatz von Ethanol. Anders als bei der Prozedur mit Keimmaterial wurde das reine DNA-Material bei diesem Schritt ausgefällt (Ethanol-Präzipitation). Obwohl sich die Proben ähnlich wie Keimmaterial Proben verhielten, kam es zu keinen Peaks im Spektrum. Bei der Extraktion entstehen mit der verwendeten Matrix keine Molekül-Ionen im Massenbereich 2000-20000 Da. Das Vorliegen eines Plasmid reicht also weder aus, noch spielt seine physische

Anwesenheit eine Rolle für eine Identifizierung mittels MALDI-TOF in diesem Massenbereich mit HCCA. Vielmehr spielen die Produkte nach der Transkription des Plasmides eine Rolle. Einerseits sind sie Teil des Proteoms und andererseits werden diese Proteine, vorausgesetzt sie haben eine ähnliche Größe, auch mit erfasst.

Russel et al. haben zu einer ähnlichen Fragestellung 2007 ein Protokoll für die Detektion von Plasmid-Insertion in *Escherichia coli* mittels MALDI-TOF veröffentlicht. Dieses basiert auf der Detektion von  $\beta$ -Lactamase (Verantwortlich für die Resistenz gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wie z.B. Ampicillin) und wird mit einer Mischung aus SA und HCCA als Matrix durchgeführt. Außerdem erfordert es einen Enzymverdau der Probe mittels Trypsin vor der Messung und einen größeren Massenbereich ( $m/z$   $\beta$ -Lactamase  $[M+H]^+$  28907). Es wird einerseits direkt das Enzym bzw. das korrespondierende Molekül-Ion detektiert und andererseits die durch den Trypsin-Abbau entstandenen Peptide[47]. Durch die geänderten Parameter ist eine Umsetzung des Protokolls in den laufenden Routinebetrieb nicht möglich.

## 6.8. Erstellung eines phylogenetischen Baums mittels 16S Full Gene Sequencing



Zum Vergleich mit dem MSP-Dendrogramm (siehe 6.5) wurde ein 16s rDNA Full-Gene Sequencing aller 10 sich in der Datenbank befindlichen *Escherichia coli*-Stämme durchgeführt. Zum einen ist diese Methode im Moment die Referenzmethode zur routinemäßigen Bestimmung von phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen und zum anderen wird diese Methode als sicher und zuverlässig eingestuft[48].

**Tabelle 21 relative Unterschiede in Prozent in der Genom-Sequenz der 16S Untereinheit aller *E. coli* Stämme**

| Teststamm                                       | Keimnummer | Unterschied [%] |
|-------------------------------------------------|------------|-----------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739               | 01-AS      | 0,52320         |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1                | 02-AS      | 0,03270         |
| <i>Escherichia coli</i> MM 294-1 mit Plasmid    | 03-AS      | 0,20601         |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000                | 04-AS      | 0,06540         |
| <i>Escherichia coli</i> PAL 1000 mit Plasmid    | 05-AS      | 0               |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ Kan        | 08-AS      | 0               |
| <i>Escherichia coli</i> W3110 Ton A mit Plasmid | 09-AS      | 0               |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3)             | 10-AS      | 0,55917         |
| <i>Escherichia coli</i> BL 21 mit Plasmid       | 11-AS      | 0,55917         |
| <i>Escherichia coli</i> HMS 174 (DE3)           | 12-AS      | 0               |

Wie jede Analysenmethode hat auch das 16s rDNA Full-Gene Sequencing eine Auflösungsgrenze, weshalb eine Klassifikation auf Spezies-Ebene zwar oft möglich ist aber eine Unterscheidung der Stämme untereinander nicht. Übereinstimmungen ab 90% gelten dabei als eng verwandt, als sicher identifiziert Ergebnisse ab 99 %[49]. Alle Proben wurden mit einer Ähnlichkeit der Genomsequenz von > 99,4% zur Referenz identifiziert. Wie Anhand der relativen Unterschiede in Tabelle 21 zu erkennen ist, waren bei 4 Stämmen keine Unterscheidung vom Referenzstamm *Escherichia coli* W 3110 mit dieser Methode möglich (16s Subunit ist ident; Match=100 %). Bei 02-AS und 04-AS konnte ein Unterschied < 0,1 % festgestellt werden. Bei 03-AS konnte ein Unterschied von ca. 0,2 % der Genomsequenz festgestellt werden. Nur bei drei Stämmen (01-AS, 10-AS und 11-AS) konnte ein Unterschied zum Referenzstamm von > 0,5 % festgestellt werden.

Hervorzuheben ist, dass mit dieser Methode generell keine Unterscheidung auf Plasmid-Ebene möglich ist (das hinzugefügte Plasmid wird bei der PCR nicht amplifiziert und daher nicht vermessen). Obwohl die Spezies Identifizierung in allen Fällen richtig war, ist der Unterschied der Genomsequenz zu gering um eine klare Unterscheidung zu ermöglichen. Interessant ist, dass dennoch ein Unterschied zwischen Plasmid tragendem Stamm und nicht-Plasmid tragendem Stamm vorliegt (Unterschied 02-AS zu 03-AS = 0,17% oder 04-AS zu 05-AS = 0,07 %).

Das über MALDI-TOF generierte MSP-Dendrogramm ist nicht deckungsgleich mit den erhaltenen Ergebnissen mittel 16s-Full Gene Sequencing. Beim MSP-Dendrogramm wurden 02-AS,03-AS und 08-AS in einen Cluster eingeteilt und wiesen eine eindeutige Unterscheidbarkeit auf (Distance-Level= 1000), während beim 16s-Full Gene Sequencing 01-AS, 10-AS und 11-AS einen Cluster bilden, also am ehesten von den anderen Stämmen unterscheidbar waren (Unterschied der Gensequenz ca. 0,5%).

## 7. SCHLUSSFOLGERUNG

### 7.1. Conclusio

Die Erstellung der Datenbank konnte mit einer Identifizierung auf Stamm-Ebene von 79,2 % und einer Identifizierungsrate von 61,6% auf Plasmid-Ebene für die ausgewählten zehn Stämme von *Escherichia coli* erfolgreich durchgeführt werden. Die Erstellung von zusätzlichen Einträgen aus drei Stämmen *Pseudomonas fluorescens* mit einer Identifizierungsrate von 98,8 % konnte ebenfalls realisiert werden.

Des Weiteren ist es gelungen, eine Prozedur zur Erstellung von Datenbankeinträgen zu entwickeln, welche in einer relativ kurzen Zeit (3 Tage) das Erstellen und Integrieren von repräsentativen MSP's in die Datenbank zulässt. Es konnte gezeigt werden, dass Prozedur nicht Spezies gebunden ist, es könnten damit also Datenbankeinträge für verschiedenste Keimarten generiert werden. Durch die Erkenntnisse aus den Versuchen konnte außerdem gezeigt werden, dass sich der durchschnittliche Log-Score bei einer Identifizierung durch die Anpassung der experimentellen Parameter (Inkubationszeit, Nährmedium, entnommene Keimmenge und Extraktionsvolumina) verbessert (von 2,0 bis 2,4 auf 2,5 bis 2,8) und bei einer erfolgreichen Identifizierung aussagekräftiger ist.

Die Prozedur zur Erstellung von Datenbankeinträgen stellt einen in der Routineanalytik durchführbaren Prozess dar, welcher sich unter Einhaltung der gültigen GMP-Reglementierung problemlos im laufenden Betrieb eingliedern lässt und auch den Ansprüchen an Data Integrity genügt. Die durchschnittlichen Identifizierungsraten erlauben den Schluss, dass eine Identifizierung auf Stamm-Ebene bei *Escherichia coli*- Stämmen möglich und bei einer entsprechenden Anzahl von Messungen (Triplikate) auch aussagekräftig ist. Der erforderliche Zeitaufwand zur Vermessung einer Probe würde sich auf ca. einen Tag belaufen (durch die Überimpfung des Keimmaterials auf TSA).

Da eine Unterscheidung auf Plasmid-Ebene mit der erstellten Datenbank nur zu 61,1% erfolgreich war, können Ergebnisse auf diesem Akzeptanzkriterien-Niveau nicht als aussagekräftig eingestuft werden maximal einen Hinweis auf das Vorliegen oder die Abwesenheit eines Plasmides darstellen.

## 7.2. Ausblick

Um eine Unterscheidung auf Plasmid-Ebene zu ermöglichen sind weitere Experimente und eine Anpassung des Prozesses in der Routineanalytik erforderlich. Da die Ausprägung des Proteoms nährmedienabhängig ist und jeder Keim der mit einem Plasmid gespliced wurde immer auch ein Antibiotika-Resistenz-Gen trägt, wäre die Ausnutzung dieses Mechanismus von Vorteil. Es könnten beispielsweise Datenbankeinträge von Plasmid-tragenden *Escherichia coli* Stämmen erstellt werden und in einer separaten Datenbank abgelegt werden. Diese müssten nach den Erkenntnissen dieser Arbeit ebenfalls ein charakteristisches und reproduzierbares Proteinprofil aufweisen, welches sich von den Datenbankeinträgen basierend auf dem Nährmedium TSA unterscheidet.

Würde nun beim Überimpfen eines Keimes in der Routineanalytik auf TSA parallel auf einem Antibiotika-Nährmedium angeimpft werden, könnte mit der ersten Analyse über die TSA Datenbank der Stamm des Keimes aufgeklärt werden und über eine zweite Analyse ob ein Plasmid vorliegt. Wächst der Keim auf dem Antibiotika-Nährmedium und wurde als Produktionsstamm identifiziert, muss er ebenfalls das Plasmid enthalten, da er sonst keine Resistenz gegenüber dem im Nährmedium enthaltenen Antibiotikum aufweisen würde. Idealerweise sollte die zweite Analyse dann auch ein gültiges Analysenergebnis ausgeben.

Außer über Workaround – Methoden, welche sich auch anderer Mechanismen bedienen (Antibiotika-Resistenz), wird eine direkte Erfassung von Information über das Vorliegen eines Plasmides im Produktionsstamm mit diesem Massenspektrometer und dieser Extraktionsmethode nicht möglich sein, auch wenn ähnliches bereits bei einem anderen Gerät mit einer anderen Methode erreicht wurde (direkte Detektion von Antibiotika-Resistenz-Markern mittels MALDI-TOF)[50].

## **8. ANLAGEN / REFERENZEN**

### **8.1. Zusammenfassung**

Die Keimidentifizierung mittels Matrix assisted laser desorption ionization time of flight massspectrometry (MALDI-TOF MS) auf Spezies Ebene ist bei Boehringer Ingelheim RCV bereits etabliert und wird routinemäßig durchgeführt. Dabei werden die vermessenen Proben mit einer Datenbank der Firma Bruker Daltonik abgeglichen (verifiziert) und Ergebnisse auf Spezies-Ebene erhalten. Durch Erweitern der Datenbank um die Produktionsstämme aus der biopharmazeutischen Fermentation könnte die Analysenmethode auf dieser Ebene des Gesamtprozesses der Routineanalytik bereits Ergebnisse auf Stamm-Ebene liefern (verifizierbar).

Die Erstellung der Datenbank konnte mit einer Identifizierung auf Stamm-Ebene von 79,2 % und einer Identifizierungsrate von 61,6% auf Plasmid-Ebene für die ausgewählten zehn Stämme von *Escherichia coli* erfolgreich durchgeführt werden. Die Erstellung von zusätzlichen Einträgen aus drei Stämmen *Pseudomonas fluorescens* mit einer Identifizierungsrate von 98,8 % konnte ebenfalls realisiert werden.

### **8.2. Abstract**

The identification of microorganisms via matrix assisted laser desorption/ionization on species level is already established at Boehringer Ingelheim RCV and is executed routinely. According to the procedure the measured samples will be compared to a database of the company Bruker Daltonik (verified) and generates results on species level. Extension of the existing Database by adding production strains of the biopharmaceutical fermentation provides the possibility of generating results on strain level within this state of the whole analytic procedure (verifiable).

Creation of an internal database could be realized successfully with an identification rate of 79,2% on strain level and of 61,6 % on plasmid level for ten different production strains of *Escherichia coli*. The creation of an additional database containing three different strains of *Pseudomonas fluorescens* with an identification rate of 98,8 % could be performed successfully as well.

### 8.3. Abbildungsverzeichnis:

|                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1 Akzeptanzkriterien .....                                                                                                                              | 3  |
| Abbildung 2 Bruker microflex LT .....                                                                                                                             | 4  |
| Abbildung 3 Schematischer Aufbau MALDI-TOF .....                                                                                                                  | 4  |
| Abbildung 4 Schema Ionisierung .....                                                                                                                              | 6  |
| Abbildung 5 UV-MALDI-Matrices für verschiedene Probenotypen bei 337 nm Laserwellenlänge .....                                                                     | 7  |
| Abbildung 6 Targetplatte schematisch .....                                                                                                                        | 8  |
| Abbildung 7 Targetplatte .....                                                                                                                                    | 8  |
| Abbildung 8 Schematischer Aufbau eines TOF-Analysators .....                                                                                                      | 12 |
| Abbildung 9 Querschnitt eines Microchannels .....                                                                                                                 | 14 |
| Abbildung 10 Ablauf der Ameisensäure Extraktionsmethode .....                                                                                                     | 23 |
| Abbildung 11 Aufgetragener Spot seitlich .....                                                                                                                    | 24 |
| Abbildung 12 Aufgetragener Spot von oben .....                                                                                                                    | 24 |
| Abbildung 13 Preprocessing: unbehandelt (blau), mit Kurvenglättung (rot) und mit Kurvenglättung und Basislinienkorrektur .....                                    | 26 |
| Abbildung 14 Spektrensatz zur Erstellung von Datenbankeinträgen .....                                                                                             | 28 |
| Abbildung 15 <i>E. coli</i> ATCC 8739 auf TSA nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ .....              | 29 |
| Abbildung 16 <i>E. coli</i> MM 294-1 auf TSA nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün), und 11 (lila) Tagen Inkubation bei $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ .....              | 30 |
| Abbildung 17 <i>E. coli</i> MM 294-1 mit Plasmid auf TSA nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ .....   | 31 |
| Abbildung 18 <i>E. coli</i> ATCC 8739 auf RA nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .....                   | 32 |
| Abbildung 19 <i>E. coli</i> MM 294-1 auf RA nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .....                    | 33 |
| Abbildung 20 <i>E. coli</i> MM 294-1 mit Plasmid auf RA nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .....        | 34 |
| Abbildung 21 <i>E. coli</i> ATCC 8739 auf LB nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .....                   | 35 |
| Abbildung 22 <i>E. coli</i> MM 294-1 auf LB nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .....                    | 36 |
| Abbildung 23 <i>E. coli</i> MM 294-1 mit Plasmid auf LB nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .....        | 37 |
| Abbildung 24 <i>E. coli</i> ATCC auf R2+B1 nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .....                     | 38 |
| Abbildung 25 <i>E. coli</i> MM 294-1 auf R2+B1 nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .....                 | 39 |
| Abbildung 26 <i>E. coli</i> MM 294-1 mit Plasmid auf R2+B1 nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .....     | 40 |
| Abbildung 27 <i>E. coli</i> MM 294-1 mit Plasmid auf R2+B1 AMP nach 1 (blau), 4 (rot), 6 (grün) und 11 (lila) Tagen Inkubation bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ..... | 41 |
| Abbildung 28 <i>E. coli</i> ATCC 8739 nach einem Tag Inkubation auf TSA, RA, LB und R2+B1 .....                                                                   | 43 |
| Abbildung 29 Mittelwertspektren von <i>E. coli</i> ATCC 8739, <i>E. coli</i> MM 294-1 und <i>E. coli</i> MM 294-1 mit Plasmid .....                               | 44 |
| Abbildung 30 Mittelwertspektren von <i>E. coli</i> ATCC 8739, <i>E. coli</i> MM 294-1 und <i>E. coli</i> MM 294-1 mit Plasmid .....                               | 44 |
| Abbildung 31 Verdünnungsexperiment zur Ermittlung des Einflusses der Konzentration auf die Intensität .....                                                       | 51 |
| Abbildung 32 <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 im Zeitverlauf auf TSA Ausschnitt bei m/z 4616 .....                                                               | 52 |
| Abbildung 33 <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 im Zeitverlauf Ausschnitt m/z 5235 .....                                                                           | 52 |
| Abbildung 34 <i>E. coli</i> ATCC 8739 mit $\text{OD}_{600} = 5,216$ (blau) 1 (grün) und 0,2 (rot) bei m/z 5384 Da .....                                           | 53 |
| Abbildung 35 <i>E. coli</i> ATCC 8739 mit $\text{OD}_{600} = 5,216$ (blau), 1 (grün) und 0,2 (rot) bei m/z 7275 .....                                             | 53 |
| Abbildung 36 <i>E. coli</i> ATCC 8739 mit $\text{OD}_{600} = 5,216$ (blau) 1 (grün) und 0,2 (rot) bei m/z 5384 Mittelwert .....                                   | 54 |
| Abbildung 37 <i>E. coli</i> ATCC 8739 mit $\text{OD}_{600} = 5,216$ (blau), 1 (grün) und 0,2 (rot) bei m/z 7275 Mittelwert .....                                  | 54 |
| Abbildung 38 <i>E. coli</i> MM 294-1 mit $\text{OD}_{600} = 2,328$ (blau), 1 (grün) und 0,2 (rot) bei m/z 7275 .....                                              | 55 |
| Abbildung 39 MSP-Dendrogramm von <i>Escherichia coli</i> -Stämmen .....                                                                                           | 57 |
| Abbildung 40 Phylogenetischer Baum 16S-RNA Full Gene Sequencing .....                                                                                             | 57 |
| Abbildung 41 Diagramm aller Testdatensätze auf Plasmid-Ebene (RTC) .....                                                                                          | 61 |
| Abbildung 42 Diagramm aller Testdatensätze auf Plasmid-Ebene (flexControl) .....                                                                                  | 61 |
| Abbildung 43 Diagramm aller Testdatensätze auf Stamm-Ebene (RTC) .....                                                                                            | 62 |
| Abbildung 44 Diagramm aller Testdatensätze auf Stamm-Ebene (flexControl) .....                                                                                    | 62 |
| Abbildung 45 PCA Clusteranalyse von <i>Pseudomonas fluorescens</i> MB 101 unbekannte Proben und Referenzproben mit und ohne Plasmid .....                         | 66 |
| Abbildung 46 Identifikation einer unbekannten Probe als <i>Pseudomonas fluorescens</i> MB 101 (Log-Score: 2,809) .....                                            | 67 |
| Abbildung 47 Primär-Identifizierung .....                                                                                                                         | 67 |
| Abbildung 48 Sekundär-Identifizierung .....                                                                                                                       | 67 |
| Abbildung 49 PCA-Clusteranalyse von <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....                                                                                          | 68 |
| Abbildung 50 MSP-Dendrogramm von <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....                                                                                             | 69 |
| Abbildung 51 Phylogenetischer Baum 16S Full Gene Sequencing .....                                                                                                 | 70 |

### 8.4. Tabellenverzeichnis:

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1 Verwendete Mikroorganismen .....                                                                              | 15 |
| Tabelle 2 Verwendete Nährmedien .....                                                                                   | 17 |
| Tabelle 3 Equipment .....                                                                                               | 20 |
| Tabelle 4 Verwendete Chemikalien .....                                                                                  | 20 |
| Tabelle 5 Inkubationsbedingungen .....                                                                                  | 23 |
| Tabelle 6 Kalibrierpunkte des IVD BTS .....                                                                             | 25 |
| Tabelle 7 optische Dichte verschiedener Lösungen bei 1µL entnommenem Zellmaterial in 300 µL H <sub>2</sub> O .....      | 51 |
| Tabelle 8 Testdatensatz 1 zur Überprüfung der Datenbank von <i>Escherichia coli</i> Stämmen (RTC) .....                 | 58 |
| Tabelle 9 Testdatensatz 1 zur Überprüfung der Datenbank von <i>Escherichia coli</i> (FlexControl) .....                 | 59 |
| Tabelle 10 Testdatensatz 2 zur Überprüfung der Datenbank von <i>Escherichia coli</i> (RTC) .....                        | 59 |
| Tabelle 11 Testdatensatz 2 zur Überprüfung der Datenbank von <i>Escherichia coli</i> (FlexControl) .....                | 59 |
| Tabelle 12 Testdatensatz 3 zur Überprüfung der Datenbank von <i>Escherichia coli</i> (RTC) .....                        | 60 |
| Tabelle 13 Testdatensatz 3 zur Überprüfung der Datenbank von <i>Escherichia coli</i> (FlexControl) .....                | 60 |
| Tabelle 14 Testdatensatz 1 zur Überprüfung von <i>Escherichia coli</i> (RTC) Standard-Methode Bruker .....              | 63 |
| Tabelle 15 Testdatensatz 1 zur Überprüfung von <i>Escherichia coli</i> (FlexControl) Standard-Methode Bruker .....      | 63 |
| Tabelle 16 Testdatensatz 2 zur Überprüfung von <i>Escherichia coli</i> (RTC) Standard-Methode Bruker .....              | 63 |
| Tabelle 17 Testdatensatz 2 zur Überprüfung von <i>Escherichia coli</i> (FlexControl) Standard-Methode Bruker .....      | 64 |
| Tabelle 18 Testdatensatz 3 zur Überprüfung von <i>Escherichia coli</i> (RTC) Standard-Methode Bruker .....              | 64 |
| Tabelle 19 Testdatensatz 3 zur Überprüfung von <i>Escherichia coli</i> (flexControl) Standard-Methode Bruker .....      | 64 |
| Tabelle 20 Vermessene Plasmid Extrakte .....                                                                            | 69 |
| Tabelle 21 relative Unterschiede in Prozent in der Genom-Sequenz der 16S Untereinheit aller <i>E. coli</i> Stämme ..... | 71 |

## 8.5. Formelverzeichnis:

|           |    |
|-----------|----|
| (1).....  | 9  |
| (2).....  | 9  |
| (3).....  | 10 |
| (4).....  | 10 |
| (5).....  | 10 |
| (6).....  | 10 |
| (7).....  | 11 |
| (8).....  | 11 |
| (9).....  | 11 |
| (10)..... | 11 |
| (11)..... | 13 |
| (12)..... | 13 |
| (13)..... | 13 |
| (14)..... | 13 |

## 8.6. Literaturverzeichnis:

1. McLean, K., et al., *Rapid and robust analytical protocol for E. coli STEC bacteria subspecies differentiation using whole cell MALDI mass spectrometry*. Talanta, 2018. **182**: p. 164-170.
2. Hillenkamp, F., et al., *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers*. Analytical Chemistry, 1991. **63**(24): p. 1193A-1203A.
3. Karas, M., D. Bachmann, and F. Hillenkamp, *Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules*. Analytical Chemistry, 1985. **57**(14): p. 2935-2939.
4. Tanaka, K., et al., *Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1988. **2**(8): p. 151.
5. Welker, M. and E.R.B. Moore, *Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology*. Systematic and Applied Microbiology, 2011. **34**(1): p. 2-11.
6. Arnold, R.J. and J.P. Reilly, *Observation of Escherichia coli Ribosomal Proteins and Their Posttranslational Modifications by Mass Spectrometry*. Analytical Biochemistry, 1999. **269**(1): p. 105-112.
7. Angeletti, S., *Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology*. Journal of Microbiological Methods, 2017. **138**: p. 20-29.
8. Rodriguez-Temporal, D., et al., *Impact of updating the MALDI-TOF MS database on the identification of nontuberculous mycobacteria*. Journal of Mass Spectrometry, 2017. **52**.
9. TeKippe, E.M., et al., *Optimizing Identification of Clinically Relevant Gram-positive Organisms Using the Bruker Biotyper MALDI-TOF MS System*. Journal of Clinical Microbiology, 2013.
10. Ford, B.A. and C.-A.D. Burnham, *Optimization of Routine Identification of Clinically Relevant Gram-Negative Bacteria Using MALDI-TOF MS and the Bruker Biotyper*. Journal of Clinical Microbiology, 2013.
11. Sanguinetti, M. and B. Posteraro, *Identification of Molds by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry*. Journal of Clinical Microbiology, 2017. **55**(2): p. 369-379.
12. Knochenmuss, R., *MALDI and Related Methods: A Solved Problem or Still a Mystery?* Mass Spectrometry, 2013. **2**(Special\_Issue): p. S0006-S0006.
13. Karas, M. and R. Krüger, *Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism*. Chemical Reviews, 2003. **103**(2): p. 427-440.
14. Zenobi, R. and R. Knochenmuss, *Ion formation in MALDI mass spectrometry*. Mass Spectrometry Reviews, 1998. **17**(5): p. 337-366.

15. Beavis, R.C., T. Chaudhary, and B.T. Chait,  *$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry*. *Organic Mass Spectrometry*, 1992. **27**(2): p. 156-158.
16. Strupat, K., M. Karas, and F. Hillenkamp, *2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption—ionization mass spectrometry*. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 1991. **111**: p. 89-102.
17. Haff, L., et al., *Oligonucleotide analysis by MALDI-MS*. *Analysis*, 1998. **26**(10): p. 26-30.
18. Beavis, R.C., B.T. Chait, and H.M. Fales, *Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1989. **3**(12): p. 432-435.
19. Gabriel, S.J., et al., *Matrix Segregation as the Major Cause for Sample Inhomogeneity in MALDI Dried Droplet Spots*. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 2014. **25**(8): p. 1356-1363.
20. Knochenmuss, R., *Ion formation mechanisms in UV-MALDI*. *The Analyst*, 2006. **131**: p. 966-86.
21. Ehring, H., M. Karas, and F. Hillenkamp, *Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry*. *Organic Mass Spectrometry*, 1992. **27**(4): p. 472-480.
22. Karbach, V. and R. Knochenmuss, *Do single matrix molecules generate primary ions in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1998. **12**(14): p. 968-974.
23. Lin, H.Y., et al., *Is energy pooling necessary in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization?* *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2014. **28**(1): p. 77-82.
24. Karbach, V. and R. Knochenmuss, *Do single matrix molecules generate primary ions in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1998. **12**(14): p. 968-974.
25. Huang, Y. and D.H. Russell, *Photochemistry and proton transfer reaction chemistry of selected cinnamic acid derivatives in hydrogen bonded environments*. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 1998. **175**(1): p. 187-204.
26. Krüger, R. and M. Karas, *Formation and fate of ion pairs during MALDI analysis: anion adduct generation as an indicative tool to determine ionization processes*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2002. **13**(10): p. 1218-1226.
27. Harrison, A.G., *The gas-phase basicities and proton affinities of amino acids and peptides*. *Mass Spectrometry Reviews*, 1997. **16**(4): p. 201-217.
28. Erb, W.J., S.D. Hanton, and K.G. Owens, *A study of gas-phase cationization in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006. **20**(14): p. 2165-2169.
29. Chang, W.C., et al., *Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mechanism revisited*. *Analytica Chimica Acta*, 2007. **582**(1): p. 1-9.
30. Beavis, R.C. and B.T. Chait, *Velocity distributions of intact high mass polypeptide molecule ions produced by matrix assisted laser desorption*. *Chemical Physics Letters*, 1991. **181**(5): p. 479-484.
31. Brown, R.S. and J.J. Lennon, *Mass Resolution Improvement by Incorporation of Pulsed Ion Extraction in a Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Linear Time-of-Flight Mass Spectrometer*. *Analytical Chemistry*, 1995. **67**(13): p. 1998-2003.
32. Clark, A.E., et al., *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2013. **26**(3): p. 547-603.
33. Standing, K.G. and M.L. Vestal, *Time-of-flight mass spectrometry (TOFMS): From niche to mainstream*. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2015. **377**: p. 295-308.

34. Gys, T., *Micro-channel plates and vacuum detectors*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment, 2015. **787**: p. 254-260.
35. Hufnagel, D.A., W.H. DePas, and M.R. Chapman, *The Biology of the Escherichia coli Extracellular Matrix*. Microbiology spectrum, 2015. **3**(3): p. 10.1128/microbiolspec.MB-0014-2014.
36. Adamczyk, P.A. and J.L. Reed, *Escherichia coli as a model organism for systems metabolic engineering*. Current Opinion in Systems Biology, 2017. **6**: p. 80-88.
37. Chen, X., et al., *Metabolic engineering of Escherichia coli: A sustainable industrial platform for bio-based chemical production*. Biotechnology Advances, 2013. **31**(8): p. 1200-1223.
38. Singha, T.K., et al., *Efficient genetic approaches for improvement of plasmid based expression of recombinant protein in Escherichia coli: A review*. Process Biochemistry, 2017. **55**: p. 17-31.
39. Scales, B.S., et al., *Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the Pseudomonas fluorescens Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans*. Clinical Microbiology Reviews, 2014. **27**(4): p. 927-948.
40. Charles H. Squires, H.W.T., *Pseudomonas fluorescens -A robust manufacturing platform*. Speciality Chemicals Magazine, 2004.
41. Rambach, A., *New plate medium for facilitated differentiation of Salmonella spp. from Proteus spp. and other enteric bacteria*. Applied and Environmental Microbiology, 1990. **56**(1): p. 301-303.
42. Bertani, G., *STUDIES ON LYSOGENESIS I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 1951. **62**(3): p. 293-300.
43. Williams, T.L., et al., *Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003. **14**(4): p. 342-351.
44. Valentine, N., et al., *Effect of Culture Conditions on Microorganism Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71**(1): p. 58-64.
45. Suarez, S., et al., *Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory*. Journal of Microbiological Methods, 2013. **94**(3): p. 390-396.
46. Hajduk, J., J. Matysiak, and Z.J. Kokot, *Challenges in biomarker discovery with MALDI-TOF MS*. Clinica Chimica Acta, 2016. **458**: p. 84-98.
47. Russell, S.C., N. Edwards, and C. Fenselau, *Detection of Plasmid Insertion in Escherichia coli by MALDI-TOF Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(14): p. 5399-5406.
48. Welker, M., *Proteomics for routine identification of microorganisms*. PROTEOMICS, 2011. **11**(15): p. 3143-3153.
49. Janda, J.M. and S.L. Abbott, *16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls*. Journal of Clinical Microbiology, 2007. **45**(9): p. 2761-2764.
50. Hart, P.J., et al., *A method for the detection of antibiotic resistance markers in clinical strains of Escherichia coli using MALDI mass spectrometry*. Journal of Microbiological Methods, 2015. **111**: p. 1-8.