

# **<sup>13</sup>C-Metabolomanalyse in L-Threoninproduzenten**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Nadine Stein**

aus

Hamburg

Gutachter:

Prof. Dr. Bernward Bisping

Prof. Dr. Ralf Takors

Tag der Disputation:

16.07.2010

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen wurden nicht verwendet, die den benutzten wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Nadine Stein

## Summary

The methods developed in this research enable the detection of the labelling directly in the anabolic intra cellular metabolites and it has been possible to investigate the labelling distribution by LC-ESI-MS/MS. The selective measurement method fulfils the criteria for complex biological samples and is validated according to DIN 32 645. It allows the delicate acquisition of 25 intra cellular anabolic metabolites. The analytes are accurately separated without prior derivatisation within 37 min (basic amino acids 65 min) and are detected by Mass Spectrometry. This method has been applied in analysing the cytoplasmic extracts of various biological systems e.g. bacteria, mammals and plants.

Subsequently, the adaptation of the developed method for quantification of  $^{13}\text{C}$ -labelled cytoplasmic metabolites is demonstrated. The systematic approach of different quantifying strategies shows significant distinctions between the concentrations of various metabolites present. Methods like internal standard and isotope dilution are ideal for samples with dilution factors 2-20 in order to neutralise the samples matrix effects. It also demonstrates that  $\text{U}^{13}\text{C}_4$ -aspartate is an appropriate internal standard for the quantification of various amino acids present in the sample. The isotope dilution technique, where each metabolite has its own analog, even improves the correlation between concentration and MS-response of the analytes and further broadens the calibration range of the method. It is also shown that the time consuming standard addition method is only necessary for the measurement of trace amounts. Alternatively such samples can be further concentrated and quantified using internal standards. An external calibration is appropriate for the quantification of dilute samples ( $\geq 1:20$ ) as the measurement is hardly influenced by matrix effects.

Preparation of the sample is of utmost importance for “quantitative” metabolome analysis. If the metabolic state at the sampling point is not conserved during sample preparation, it is impossible to capture the momentary metabolic conditions. Studies comparing sampling procedures, with and without quenching of the cellular metabolism, show that a rapid inactivation of enzyme activity is essential to maintain the metabolic state of the sample. Various methods have been considered for the extraction of intra cellular metabolites in this research. The results for chloroform disruption are less error-prone, show less matrix effects and the extraction of the majority of metabolites is more effective than for other methods tested. Resulting losses during extraction are estimated from standards (sugar phosphates, organic acids and amino acids). Meanwhile chloroform treatment is established as a standard preparation procedure for the extraction of metabolites from bacteria as well as mammals (Wiendahl et al. 2006).

In order to understand the phenotypic effects of genetically modified *E. coli* strains at metabolome level, various L-threonine producers are compared with *E. coli* wild type MG

1655. The intra cellular pool sizes are compared in the exponential growth phase of several fed-batch fermentations. As described in the literature, metabolite pools in *E. coli* wild type are subject to regulation, resulting in adjusted pool sizes. In contrast, threonine biosynthesis of production strains is genetically modified, causing accumulation of certain intermediates. Especially, homoserine was found to accumulate in threonine producing *E. coli* BKIIM. Based on these results homoserine kinase is over expressed in strain *E. coli* PthrB. The resulting optimised mutant reflects the change at genome level in the intra cellular pool sizes. In addition to an increased L-threonine concentration the genetic modification also has an unexpected effect on peripheral product metabolism.

In addition to regular fed-batch experiments,  $^{13}\text{C}$ -labelling experiments were carried out on metabolically stationary and isotopically instationary conditions using labelled Glucose ( $\text{U}^{13}\text{C}_6$ -Glucose) as substrate. Alteration in the isotopic state of the culture did not influence the substrate saturation of the organism, hence one can assume that metabolic fluxes are constant over the duration of the labelling period. It has been possible, for the first time, to gain insight into cytoplasmic production processes, under industrial fed-batch conditions. Applying the developed techniques, allows a time resolved illustration of the labelling incorporation, thus labelling dynamics directly in the intra cellular pools can be detected under *in vivo* conditions. Despite the fact that both threonine producers investigated carry the same threonine operon, many differences can be derived from the raw data already. With the exception of the amino acids alanine, aspartate and asparagine, one of the strains shows a much faster reaction on the  $^{13}\text{C}$ -pulse. This applies to the cytoplasmic distribution and the flux via the central metabolism, but especially to threonine biosynthesis. While one of the *E. coli* threonine producers shows a rapid accumulation of intra cellular aspartate, the other presents the fastest kinetics in the alanine pool. Besides threonine biosynthesis, the preference seems to lie on glutamate biosynthesis and especially the transaminase reactions in one of the strains. In summary, it can be derived that central metabolism (substrate uptake) and threonine biosynthesis are fundamentally different in both L-threonine producers. To be able to characterise the strains completely, further studies of the enrichment dynamics and additional metabolites are necessary. A systems biological approach, covering metabolome, genome and transcriptome analysis, may lead to a deeper understanding of threonine degradation and expression of certain enzymes under aerobic conditions.

In order to detect differences in the labelling dynamics, evaluation with two statistic software tools (time series analysis and Cross Correlation) is carried out. The Cross Correlation analysis processes the raw data graphically, so that  $^{13}\text{C}$ -labelling dynamics and flux directions can easily be interpreted optically, hence it can be derived that under production conditions glycolysis outweighs gluconeogenesis. A comparison of the intra cellular states of both *E. coli* L-threonine producers investigated, show significant differences in product metabolism (e.g. L-threonine breakdown to glycine and conversion of the enzyme homoserine kinase). Therefore, it is confirmed that, the methods developed in this research reveal limiting reaction steps in the pathway. The applied techniques are not limited to biosynthesis of amino acids only, but can equally be applied to other metabolic pathways.

The results obtained from this research are consistent with the state of knowledge on bacterial metabolic networks. The developed and presented methods can be applied to map metabolic pathways relevant to industrial production processes. The labelling experiments show that the  $^{13}\text{C}_6$ -glucose pulse, fast sampling, sample preparation and metabolome analysis can be successfully applied to illustrate genetic modifications in the metabolome of *E. coli*. Gene regulatory effects can be excluded within the first seconds of the labelling experiments conducted in this research. Therefore, it is possible to derive *in vivo* enzyme kinetics from intra cellular pool sizes and labelling information within the first 10-40 s. Thus, mathematically very complex instationary  $^{13}\text{C}$ -metabolic flux analysis is not necessary to locate promising targets for Metabolic Engineering. The approaches and opportunities described are not limited to the analysis of bacterial metabolism, but can also be used for analysis of intermediates in mammalian and plant cells. The product under investigation is not only limited to amino acids. The techniques can equally be applied to investigate other production processes, e.g. secondary metabolites of precursors such as amino acids, organic acids, and carbohydrates or aromatic metabolites e.g. shikimate - phytochemicals e.g. terpenes (aroma or synthetic chemicals), alkaloids, steroids, glycosides, ployketides, prostaglandins, pyrimidines (pharmaceuticals) and vitamins (food). The natural variations of metabolic activities in comparable fermentations should be averaged by multiple cultivations. The application of these methods to products of higher molecular weight such as peptides or proteins is also conceivable and deserves future research.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Prof. Dr. Ralf Takors, ehemaliger Leiter der Fermentationsgruppe, und seinem Nachfolger Dr. Marco Oldiges für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe und die interessante Aufgabenstellung, danken. Außerdem für die Betreuung der Arbeit und die Diskussionsbereitschaft sowie Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Christian Wandrey, ehemaliger Leiter des Instituts für Biotechnologie 2 der Forschungszentrum Jülich GmbH, für die Schaffung exzellenter Arbeitsbedingungen.

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Bernward Bisping, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg, für die freundliche Übernahme des Referates.

Für die gute Zusammenarbeit, das gute Arbeitsklima sowie für viele hilfreiche Anregungen bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie 2, insbesondere bei der Arbeitsgruppe Fermentation. Mein besonderer Dank gilt Pia Makus für die Analyse vieler HPLC Proben. Insbesondere möchte ich mich bei Karsten Grönke, Silke Bode, Christiane Wiendahl, Petra Geilenkirchen, Bianca Klein, Aljosha Wahl, Stephan Noack, Marianne Hess und Horst Kiehl für die Unterstützung bedanken.

Allen Betreuern bei der Degussa AG, besonders Prof. Dr. Ralf Takors und Dr. Mechthild Rieping, gilt großer Dank für die Kooperation, die Stellung des interessanten Themas, die Bereitstellung der *E. coli* Stämme und die fruchtbaren Diskussionen.

Für die tatkräftige Unterstützung möchte ich den Diplomanden Salome Lussem und Tina Radespiel für Ihren Beitrag zu dieser Dissertation danken.

Für die Durchsicht des Manuskriptes gilt besonderer Dank meinem Freund und meiner Schwester. Meiner Mutter möchte ich für die Unterstützung bei der Übersetzung danken. Ansonsten möchte ich allen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit in irgendeiner Form beigetragen haben.

Auch meinen Eltern möchte ich herzlich danken, denn Sie haben mir diese Ausbildung ermöglicht und mich zu jeder Zeit unterstützt. Zu guter Letzt gilt mein Dank meinem Freund Björn für die Unterstützung, Geduld und Fürsorge während der Entstehung dieser Arbeit.



# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Problemstellung und Zielsetzung	3
3	Theoretische Grundlagen	5
3.1	Systembiologie	5
3.1.1	Metabolomanalyse	5
3.1.1.1	<sup>13</sup> C-Metabolomanalyse	7
3.1.1.2	Analytik von Aminosäuren	8
3.2	Massenspektrometrie	10
3.2.1	Elektrospray Ionisierung	11
3.2.2	Liquid Chromatography Triple Quadrupole Massenspektrometrie	13
3.3	Aminosäuren	15
3.3.1	L-Threonin	15
3.4	Threoninproduktion in <i>Escherichia coli</i>	17
3.4.1	Biologisches System <i>E. coli</i>	17
3.4.2	Zellmembran und Zellwand	18
3.4.3	Glucoseaufnahme in <i>E. coli</i>	19
3.4.4	Glykolyse	20
3.4.5	Zitronensäurezyklus	22
3.4.6	L-Threoninbiosynthese	23
3.4.7	L-Threoninkatabolismus	26
3.4.8	L-Threonintransport	27
3.4.9	Entwicklung von L-Threoninproduktionsstämmen	28
4	Material und Methoden	31
4.1	Charakterisierung der untersuchten <i>E. coli</i> Stämme	31
4.2	Stammhaltung	32
4.3	Vorkultivierung	32
4.4	Fermentation	33
4.4.1	Sensor Reaktor	33
4.4.2	Vorbereitung der Fermentation	35
4.4.3	Durchführung der Fermentation	36
4.5	Online Analytik	36
4.6	Schnelle Inaktivierung der Stoffwechselaktivität (Quenching)	38
4.7	Extraktion intrazellulärer Metabolite	38
4.8	Offline Analytik	40
4.8.1	Biomassekonzentration	40
4.8.2	pH-Wert	40
4.8.3	Membranintegritätstest	41
4.8.4	Extrazelluläre Analytik	41
4.8.4.1	Glucose	41
4.8.4.2	Phosphat	42
4.8.4.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	42

## Verzeichnisse

4.9	Intrazelluläre Analytik	44
4.9.1	Chromatographische Trennung anaboler Metabolite	44
4.9.1.1	4000 Q Trap™ Linear Ion Trap Tandem Massenspektrometer	45
4.9.1.2	TSQ Quantum Ultra™ Triple Quadrupol Massenspektrometer	47
4.9.2	Chromatographische Trennung kataboler Metabolite	48
4.9.2.1	4000 Q Trap™ Linear Ion Trap Tandem Massenspektrometer	49
4.10	Quantifizierungsstrategien	51
4.10.1	Methode der externen Kalibrierung	51
4.10.2	Methode der Standardaddition	51
4.10.3	Methode des Internen Standards	52
4.10.4	Isotope Dilution Mass Spectrometry	53
4.11	Berechnungen	54
4.11.1	Spezifische Wachstumsrate	54
4.11.2	Kohlendioxidbildung	54
4.11.3	Ertragskoeffizienten	54
4.11.4	Intrazelluläres Volumen	55
5	Ergebnisse und Diskussion	57
5.1	Entwicklung der Analytik für intrazelluläre Aminosäuren und biologische Amine	57
5.1.1	Chromatographische Trennung intrazellulärer Aminosäuren und biologischer Amine	63
5.1.2	Methodenvalidierung	72
5.1.2.1	Linearität	72
5.1.2.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	73
5.1.2.3	Reproduzierbarkeit	74
5.1.2.4	Analyse biologischer Zellextrakte	76
5.2	Messung <sup>13</sup> C-markierter Aminosäuren	78
5.2.1	Unterteilung der Methode in Perioden	83
5.2.1.1	Bestimmung der natürlichen Isotopenverteilung von Aspartat	88
5.3	Quantifizierungsstrategien	91
5.3.1	Bereitstellung von markiertem Zellextrakt für die Isotope Dilution	96
5.4	Quenching vs. Membranintegrität	99
5.4.1	Energieladung in <i>E. coli</i> Wildtyp und L-Threoninproduzenten	101
5.5	Probenaufarbeitung	104
5.5.1	Extraktionsverfahren	104
5.5.2	Stabilität der Metabolite während der Aufarbeitung	110
5.6	Fermentationen im Fed-Batch Betrieb	116
5.6.1	Wildtyp - <i>E. coli</i> MG 1655	116
5.6.1.1	Intrazelluläre Poolgrößen	118
5.6.2	Threoninproduzent - <i>E. coli</i> DM 1265	120
5.6.2.1	Intrazelluläre Poolgrößen	122
5.6.3	Threoninproduzent - <i>E. coli</i> BKIIM B-3996	127
5.6.3.1	Intrazelluläre Poolgrößen	128
5.6.3.2	Optimierungsansatz	133
5.6.4	Die optimierte Mutante <i>E. coli</i> PthrB	134

5.6.5	Vergleich der intrazellulären Poolgrößen der <i>E. coli</i> Threoninproduzenten	137
5.7	Ergebnisse der <sup>13</sup> C-Markierungsexperimente	141
5.7.1	Analytische Erfassung der intrazellulären Markierungs­dynamik	141
5.7.2	Dynamische <sup>13</sup> C-Markierung von <i>E. coli</i> DM 1265	145
5.7.2.1	Ergebnisse des <sup>13</sup> C-Markierungsexperiments	148
5.7.3	Dynamische <sup>13</sup> C-Markierung von <i>E. coli</i> BKIIM B-3996	159
5.7.3.1	Ergebnisse des <sup>13</sup> C-Markierungsexperiments	162
5.7.4	Vergleich der <sup>13</sup> C-Markierung in <i>E. coli</i> DM 1265 und BKIIM B-3996	174
5.8	Statistische Methoden zur Auswertung der Markierungsdaten	183
5.8.1	Zeitreihenanalyse	183
5.8.2	Analyse der Daten durch Cross Correlation	188
6	Zusammenfassung und Ausblick	193
7	Literatur	197
8	Anhang	A
8.1	Kultivierungsmedien	A
8.2	Laborgeräte	C
8.3	Chemikalien	G
8.4	MRM-Übergänge für die Messung markierter Aminosäuren	I

## Abkürzungsverzeichnis

AcCoA	Acetyl Coenzym A
AcetylCoA	s. AcCoA
Aco	Aconitat
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Aspartatkinase
AKG	$\alpha$ -Ketoglutarat
AMP	Adenosinmonophosphat
amu	atomic mass unit
$\alpha$ -AP	$\alpha$ -Aminopimelat
Anthr	Anthranilat
AS	Aminosäure(n)
ASA	L-Aspartat- $\beta$ -semialdehyd, Aspartatsemialdehyd
ASD	Aspartatsemialdehyd Dehydrogenase
Asn	L-Asparagin
Asp	L-Aspartat
AT	Aminotransferase (Aspartat-Aminotransferase)
ATP	Adenosintriphosphat
BCEC-Cl	2-(11H-Benzo[ $\alpha$ ]-carbazol-11-yl) Ethylchlorformiat
BG	Bestimmungsgrenze
bp	Basenpaare
BTM	Biotrockenmasse
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CE	Collision energy
CEM	Continuous Electron Multiplier
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
CHL	Chloroform
CHO	Chinese Hamster Ovary
CID	Collisionally Induced Dissociation
CIT	Citrat
CIT_IsoCIT	Citrat/Isocitrat
cps	counts per second
CXP	Collision cell exit potential
Da	Dalton
DAP	2,6-Diaminopimelat
demin.	demineralisiert
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DIMS	Direktinjektion Massenspektrometrie
dkl.	dunkel
DP	Declustering potential

EC	Energy Charge
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i> DM 1265	DSM12790, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur (Braunschweig, Deutschland)
<i>E. coli</i> PthrB	<i>E. coli</i> BKIIM Derivat, Degussa AG (Halle, Deutschland)
<i>E. coli</i> BKIIM	Reg. Nr. 1867, Stammsammlung USSR <i>Antibiotics Research Institute</i> (Moskau, Russland)
<i>E. coli</i> MG 1655	Wildtyp aus der Stammsammlung des Instituts für Biotechnologie 1 der Forschungszentrum Jülich GmbH (Jülich, Deutschland)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Enzym I
EII	Enzym II
ELSD	Evaporative Light Scattering Detection
ESI	Elektrospray Ionisierung
E4P	Erythrose-4-phosphat
ex	extrazellulär
FBP	Fructose-1,6-bisphosphat
Ferm	Fermentation
FIA	Flow Injection Analysis
fbr	Feedback resistant
F6P	Fructose-6-phosphat
Fum	Fumarat
FWHM	full width at half-maximum height
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GC	Gaschromatographie
Gln	L-Glutamin
griech.	griechisch
GS	Glutamatsynthase
G6P	Glucose-6-phosphat
HD	Homoserindehydrogenase
HK	Homoserinkinase
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPLC	high performance liquid chromatography / Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPr	Histidin Protein
Hse	L-Homoserin
ICL	Isocitratlyase
IDMS	Isotope Dilution Mass Spectrometry
[Im] <sup>+</sup>	Immoniumion
in	Intrazellulär
Ind	Indol
In-Source CID	In-Source Collisionally Induced Dissociation
IS	Interner Standard

## Verzeichnisse

IsoCIT	Iso-Citrat
kbp	Kilobasenpaare
KOH	Kaliumhydroxid
L	Liter
LB	Luria Bertani
LC-ESI-MS	Liquid Chromatography Electro Spray Ionisation Mass Spectrometry
M	Molekulargewicht
Mal	Malat
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight
max	Maximal
MeOH	Methanol
[M+H] <sup>+</sup>	Quasimolekül-Ion
min	Minute(n)
Mio.	Million(en)
ms	Millisekunde(n)
MS	Malatsynthase
μM	Mikromolar (μmol/L)
μm	Mikrometer
Mrd.	Milliarde(n)
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS/MS	Tandem MS
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
nM	Nanomolar (nmol/L)
nm	Nanometer
NMR	Kernresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)
NWG	Nachweisgrenze
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei λ = 600 nm
P	Phosphat oder Produkt
PC	Phosphoenolpyruvat Carboxylase
PDFOA	Pentadecafluorooctansäure
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvatkinase
2_3PG	2-/3-Phosphoglycerat
6PG	6-Phosphogluconat
pH	pondus Hydrogenii oder potentia Hydrogenii (lat. pondus = Gewicht; potentia = Kraft; hydrogenium = Wasserstoff)
PK	Pyruvatkinase

PPP	Pentosephosphatweg
PTS	Phosphotransferase System
Pyr	Pyruvat
Q <sub>1</sub>	1. Quadrupol
Q <sub>2</sub>	2. Quadrupol
Q <sub>3</sub>	3. Quadrupol
Rht	Resistance against homoserine and threonine
Ribu5P	Ribulose-5-phosphat
rpm	Revolutions per minute
R5P	Ribose-5-phosphat
RP	Umkehrphase (Reversed Phase)
RSD	relative Standardabweichung
Rt	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
s	Sekunde(n)
S	Substrat
SCX	Strong Cation Exchange
SDAP	N-Succinyldiaminopimelat
sec	s. s
SHK	Shikimat
S7P	Seduheptulose-7-phosphat
SRM	Selected Reaction Monitoring
Suc	Succinat
SuccinylCoA	Succinyl Coenzym A
TCA	Tricarboxylic acid
TE	s. Tris und EDTA
Temp.	Temperatur
Thr	L-Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	L-Tryptophan
TS	Threoninsynthase
U	Einheitlich (uniformly)
U <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -Glucose	Einheitlich <sup>13</sup> C-markierte Glucose
V	Volumen
v. Chr.	vor Christus
X	Biomasse
X5P	Xylulose-5-phosphat
Y	Ertragskoeffizient
ZS	Zentralstoffwechsel

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
2.1	Schema zur Optimierung der L-Threoninproduktion	3
3.1	Strategien der Metabolomanalyse	6
3.2	Positionsisotopomere eines C <sub>3</sub> -Moleküls	8
3.3	Prozess der Elektrospray Ionisierung	12
3.4	TurbolonSpray <sup>®</sup> Source – AB, MDS Sciex	12
3.5	Aufbau eines Triple Quadrupol Massenspektrometers mit ESI	13
3.6	Triple Quadrupol Ionpath	14
3.7	Ionendetektion	14
3.8	Die Aminosäure L-Threonin	16
3.9	Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>E. coli</i> Zellen	17
3.10	Zellhülle gramnegativer Bakterien	18
3.11	Glucoseaufnahme über das Phosphotransferase System	20
3.12	Glykolyse in <i>E. coli</i>	21
3.13	Zitronensäurezyklus in <i>E. coli</i>	23
3.14	L-Threoninbiosynthese	24
3.15	Threoninbiosynthese in <i>E. coli</i>	25
3.16	Threoninabbau in <i>E. coli</i>	26
3.17	Threoninbiosynthese in <i>E. coli</i> Produktionsstämmen	28
4.1	Sensor Reaktor mit schneller Probenahme	34
4.2	Visuelle Durchmischung bei der Pulsaufgabe in 4 Teilbildern	34
4.3	Pneumatisches Probenahmeventil	35
4.4	Enzymatische Umsetzung von Glucose	42
4.5	Agilent 1100 HPLC (links) und 4000 Q Trap <sup>™</sup> Linear Ion Trap	46
4.6	Agilent 1200 HPLC und TSQ Quantum Ultra <sup>™</sup>	48
4.7	Auswertung der externen Kalibrierung	51
4.8	Auswertung nach der Methode der Standardaddition	52
4.9	Auswertung der Isotope Dilution Mass Spectrometry	53
5.1	Fragmentierung der Aminosäure L-Threonin im MRM-Messmodus	57
5.2	Produkt-Ionen (Q3) nach CID-Fragmentierung der Aminosäure L-Threonin	57
5.3	MS/MS-Übergang der Aminosäure L-Threonin	58
5.4	Fragmentierung von Aminosäuren	58
5.5	Fragmentierung der Aminosäure Aspartat	60
5.6	MRM-Übergänge für Aspartyl- und Homoserinphosphat im positiven Messmodus	60
5.7	MRM-Übergänge für Aspartyl- und Homoserinphosphat im negativen Messmodus	61
5.8	Fragmentierung von Threonin und Homoserin	61
5.9	In-Source CID - Interferenzen von Asn mit Met, Leu und Ile	62

Abbildung	Titel	Seite
5.10	Ionische Wechselwirkung zwischen Ionenpaarreagenz und Analyt	65
5.11	Massenchromatogramm nach Petritis et al. (1999)	66
5.12	Ionische Wechselwirkung zwischen stationärer Phase und Analyt	67
5.13	Massenchromatogramme Asp, ASA, Thr und Hse	68
5.14	Massenchromatogramm eines Aminosäurestandards (c = 1 µM, pH 3,8)	69
5.15	Massenchromatogramme eines Aminosäurestandards (c = 2,5 µM, pH 6)	70
5.16	Einfluss des pK <sub>a</sub> -Wertes auf die Retentionszeit	71
5.17	Kalibriergeraden der Intermediate der Threoninbiosynthese	72
5.18	Kalibriergeraden für Trp und die basischen Aminosäuren Lys, His und Arg	73
5.19	Relative Standardabweichung – Mehrfachinjektion wässriger Standardlösungen	75
5.20	Relative Standardabweichung nach Aufarbeitung mit Chloroform	75
5.21	Massenchromatogramme biologischer Zellextrakte	76
5.22	Massenchromatogramme biologischer Zellextrakte	76
5.23	Massenchromatogramm eines Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellextraktes	77
5.24	Mittels Tandem Massenspektrometrie erfassbare Isotopomere eines C <sub>3</sub> -Moleküls	78
5.25	<sup>13</sup> C-Isotopomere von Aminosäuren - Massenbereiche der Vorläufer-Ionen	80
5.26	Trennung kritischer Aminosäuren mittels Ionenaustauschchromatographie	81
5.27	Fragmentierung von Glycin und Cystein	82
5.28	Trennung von Cystein/Glycin und Threonin/Homoserin/Phenylalanin	82
5.29	Aminosäurestandard 10 µM	84
5.30	Isotopomere des Aspartat	88
5.31	Simulation des natürlichen Isotopenmusters der Aminosäure Methionin	89
5.32	Massenspuren der Isotopomere des Methionin	90
5.33	Experimentelles Vorgehen	91
5.34	Intrazelluläre Aminosäurekonzentrationen von <i>E. coli</i> MG 1655	93
5.35	Intrazelluläre Aminosäurekonzentrationen in <i>E. coli</i> DM 1265	94
5.36	Intrazelluläre Aminosäurekonzentrationen (< 50 µM)	94
5.37	Isotope Dilution vs. externe Kalibrierung am Beispiel von Aspartat, Homoserin, Glycin und Alanin	96
5.38	Verhältnis von U <sup>13</sup> C-Markierung und Anzahl an C-Atomen im Molekül	98
5.39	Membranintegrität	99
5.40	Struktur von Propidiumiodid	99
5.41	Einfluss des Quenchings auf das Ausbluten von Aminosäuren	100
5.42	Verlauf der optischen Zelldichte (OD <sub>600</sub> ) im Schüttelkolben	101
5.43	Adenylatsystem nach kalter und warmer Probenahme	102
5.44	Vergleich intrazellulärer Konzentrationen nach dem Zellaufschluss	105
5.45	Einfluss der Aufschlussmethoden auf die Analytik	106
5.46	Vergleich einiger intrazellulärer Aminosäuren	107

Abbildung	Titel	Seite
5.47	Vergleich intrazellulärer Cofaktoren	108
5.48	Vergleich intrazellulärer Metabolite in Glykolyse und Pentosephosphatweg	109
5.49	Chromatographische Auflösung von Ribulose- und Xylulose-5-phosphat	109
5.50	Vergleich intrazellulärer Metabolite des Zitronensäurezyklus	110
5.51	Wiederfindung der Zentralstoffwechselmetabolite nach der Aufarbeitung	111
5.52	Wiederfindung der Aminosäuren nach der Aufarbeitung	113
5.53	Korrektur der Wiederfindung nach Chloroformaufschluss mittels Interner Standards	114
5.54	Korrigierte Wiederfindungen nach Chloroformaufschluss	115
5.55	OD <sub>600</sub> , BTM und extrazelluläre Pyruvat-, und Acetatkonzentration	116
5.56	Exponentielles Wachstum von <i>E. coli</i> MG 1655	117
5.57	Kohlenstoffbilanz direkt vor der Probenahme	117
5.58	Intrazelluläre Aminosäurekonzentrationen von <i>E. coli</i> MG 1655	118
5.59	Vergleich von Biomasse-, Threonin- und Acetatbildung	120
5.60	Exponentielles Wachstum – metabolisch quasi-stationärer Zustand	121
5.61	Kohlenstoffbilanz für <i>E. coli</i> DM 1265 nach 24,6 h und 43 h	121
5.62	Verläufe zweier unabhängiger Fermentationen von <i>E. coli</i> DM 1265	122
5.63	Kohlenstoffbilanzen zweier unabhängiger Fermentationen von <i>E. coli</i> DM 1265	123
5.64	<i>E. coli</i> DM 1265 vs. <i>E. coli</i> MG 1655 (Wildtyp)	124
5.65	<i>E. coli</i> DM 1265 vs. <i>E. coli</i> MG 1655 (Wildtyp)	126
5.66	Vergleich von Biomasse- und L-Threoninbildung	127
5.67	Exponentielles Wachstum – metabolisch quasi-stationärer Zustand	128
5.68	Kohlenstoffbilanz bei t = 38,4 h für <i>E. coli</i> BKIIM	128
5.69	Verläufe zweier unabhängiger Fermentationen von <i>E. coli</i> BKIIM	129
5.70	Aminosäurekonzentrationen in <i>E. coli</i> BKIIM (Ferm 3)	130
5.71	Intrazelluläre Konzentrationen <i>E. coli</i> BKIIM (Ferm 3 und Ferm 4) vs. Wildtyp	131
5.72	Optimierungsschema des Threoninproduzenten <i>E. coli</i> BKIIM B-3996	133
5.73	Vergleich von Biomasse-, Threonin- und Acetatbildung	134
5.74	Raum-Zeit-Ausbeute in Fermentationen der drei untersuchten Threoninproduzenten	135
5.75	Exponentielles Wachstum – metabolisch quasi-stationärer Zustand	136
5.76	Kohlenstoffbilanz für <i>E. coli</i> PthrB nach 20,8 h und 34,9 h	136
5.77	Intrazelluläre Konzentrationen der drei untersuchten Threoninproduzenten	137
5.78	Massenchromatogramme der Isotopomerverteilung im Aspartatpool	142
5.79	Gemessene intrazelluläre Markierungsdynamik im Homoserinpool	142
5.80	Ausschnitt der Markierungsdynamik im Homoserinpool aus <i>Abbildung 5.79</i>	143
5.81	Vergleich von Biomasse-, Threonin- und Acetatbildung	145
5.82	Exponentielles Wachstum – metabolisch quasi-stationärer Zustand	146
5.83	Raumzeitausbeute Threonin	146

Abbildung	Titel	Seite
5.84	Kohlenstoffbilanz für <i>E. coli</i> DM 1265 nach 22,9 h und 41,4 h	147
5.85	Verlauf von Substrat-, Biomasse- und Produktkonzentration während des <sup>13</sup> C-Markierungsexperiments	147
5.86	Markierungsdynamiken der intrazellulären Aminosäuren Asp, Hse, Thr, Gly, Asn, Ala, Glu und Ser	150-151
5.87	Markierungsdynamik im Valinpool	152
5.88	Vergleich der Dynamik von Asp, Hse, Thr, Glu und Asn	153
5.89	<sup>13</sup> C-Markierungsanreicherung im Glutamatpool	156
5.90	Anaplerose und Zitronensäurezyklus mit Glyoxylatweg in <i>E. coli</i>	157
5.91	Vergleich von Biomasse- und Threoninbildung	159
5.92	Kohlenstoffbilanz bei t = 10,5 h für <i>E. coli</i> BKIIM	160
5.93	Verlauf von Substrat-, Biomasse- und Produktkonzentration während des <sup>13</sup> C-Markierungsexperiments	160
5.94	Exponentielles Wachstum – metabolisch quasi-stationärer Zustand	161
5.95	Markierungsdynamiken der Glykolyseintermediate FBP und PEP	163
5.96	Markierungsdynamiken der intrazellulären Aminosäuren Met und Val	164
5.97	Markierungsdynamiken der Aminosäuren Asp, Hse, Thr, Gly, Asn, Ala, Glu und Ser	166-167
5.98	Vergleich der Markierungsanreicherung im Glycin- und Threoninpool	169
5.99	Stoffwechelausschnitt aus der Serin-, Glycin- und Threoninbiosynthese	170
5.100	Vergleich der Dynamiken von Asp, Hse, Thr, Glu und Asn	172
5.101	Markierungsverteilung im Aspartatpool	174
5.102	Vergleich der Dynamik von Ala, Ser und Asp	176
5.103	Vergleich der <sup>13</sup> C-Markierungsanreicherung in <i>E. coli</i> DM 1265 und BKIIM	177
5.104	Vergleich der <sup>13</sup> C-Markierungsanreicherung im Glycinpool	180
5.105	Vergleich der <sup>13</sup> C-Markierungsanreicherung im Valinpool	180
5.106	<sup>13</sup> C-Markierungsanreicherung im Threoninpool von <i>E. coli</i> DM 1265 und BKIIM	181
5.107	Heatmap - Abnahme unmarkierter Isotopomere nach Aufgabe des <sup>13</sup> C-Markierungspulses	183
5.108	Clusteranalyse der Markierungsdynamik ausgewählter Metabolite	184
5.109	Abnahme unmarkierter Isotopomere nach Aufgabe des <sup>13</sup> C-Markierungspulses	186-187
5.110	Entstehung der Zeitfaktoren durch Kompression der Zeitachse	188
5.111	Ergebnisse der Cross Correlation von Hse, Thr, Met und Asn mit Asp	189
5.112	Stoffwechelausschnitt aus der Methionin- und Cysteinbiosynthese	190
5.113	Ergebnisse der Cross Correlation von Gly, Met und Ala mit Ser	191

## Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
3.1	Makromoleküle in <i>E. coli</i> bei optimalen Wachstumsbedingungen	18
4.1	Chromatographiebedingungen für die Messung basischer Metabolite	44
4.2	Methodenparameter des 4000 Q Trap™ Triple Quadrupol MS	45
4.3	Substanzspezifische MS/MS-Parameter 4000 Q Trap™	46
4.4	Methodenparameter des Triple Quadrupol MS	47
4.5	Substanzspezifische MS/MS-Parameter TSQ Quantum Ultra™	48
4.6	Chromatographiebedingungen für die Messung kataboler Metabolite	49
4.7	Methodenparameter des 4000 Q Trap™ Triple Quadrupol MS	50
4.8	Substanzspezifische MS/MS-Parameter 4000 Q Trap™	50
5.1	Substanzspezifische MRM-Übergänge und Ionenoptik	59
5.2	Abhängigkeit der Elutionsreihenfolge von Gruppe und $pK_a$ -Wert des Analyten	70
5.3	Analytische Grenzen nach DIN 32 645	74
5.4	Mittels Tandem MS gemessene $^{13}C$ -Isotopomere des Threonin	78
5.5	Natürliche Isotopenverteilung einiger Elemente	79
5.6	Erfassbare Isotopomere der 21 untersuchten Metabolite	83
5.7	Programmierte Perioden für die Messung markierter Metabolite	84
5.8	Isotopenverteilung von Aspartat	88
5.9	Aminosäurekonzentrationen in <i>E. coli</i> MG 1655 nach externer und interner Kalibrierung	92
5.10	Kalibrierbereich und Bestimmtheitsmaß mit externer Kalibrierung und IDMS	95
5.11	Anteil an unmarkierten und vollständig $^{13}C$ -markierten Aminosäuren	97
5.12	Energy Charge nach kalter und warmer Probenaufarbeitung	103
5.13	Bewertung unterschiedlicher Zellaufschlussmethoden	104
5.14	Ertragskoeffizienten zum Poolexperiment und am Ende der Fermentation	121
5.15	Ertragskoeffizienten zweier Fermentationen von <i>E. coli</i> DM 1265	123
5.16	Vergleich zweier Fermentationen von <i>E. coli</i> DM 1265	124
5.17	Vergleich von <i>E. coli</i> MG 1655 (Wildtyp) und <i>E. coli</i> DM 1265	125
5.18	Ertragskoeffizienten zum Zeitpunkt der Probenahme	127
5.19	Ertragskoeffizienten zweier unabhängiger Fermentationen von <i>E. coli</i> BKIIM	129
5.20	Vergleich zweier Fermentationen von <i>E. coli</i> BKIIM	131
5.21	Vergleich von Wildtyp <i>E. coli</i> MG 1655 und <i>E. coli</i> BKIIM ( $\emptyset$ Ferm 3/4)	132
5.22	Vergleich der Produktivität von <i>E. coli</i> DM 1265, BKIIM und PthrB	135
5.23	Vergleich der Threonin RZA von <i>E. coli</i> DM 1265, BKIIM und PthrB	135
5.24	Verhältnisse gemessener intrazellulärer Aminosäurekonzentrationen	138

Tabelle	Titel	Seite
5.25	Intrazelluläre Konzentrationen vs. $K_M$	139
5.26	Kinetische Parameter der Enzyme der Threoninbiosynthese	140
5.27	Ertragskoeffizienten zum $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment und am Ende der Fermentation	146
5.28	Probenahmezeitpunkte des $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiments	148
5.29	Poolgrößen und Reaktion auf den Puls im $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment	149
5.30	$^{13}\text{C}$ -Markierungsanreicherung in den ersten Sekunden des Markierungsexperiments	154
5.31	Maximale Markierungsabreicherung des m+0 Isotopomers	155
5.32	Ertragskoeffizienten zu Beginn des $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiments	159
5.33	Probenahmezeitpunkte des $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiments	162
5.34	Poolgrößen und Reaktion auf den Puls im $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment	168
5.35	$^{13}\text{C}$ -Markierungsanreicherung in den ersten Sekunden des Markierungsexperiments	171
5.36	Maximale Markierungsabreicherung des m+0 Isotopomers	173
5.37	Vergleich der Reaktion auf den $^{13}\text{C}$ -Markierungspuls	175
5.38	$^{13}\text{C}$ -Markierungsanreicherung in den ersten Sekunden des Markierungsexperiments	175
5.39	Maximale Markierungsabreicherung der m+0 Massenisotopomere	178
5.40	Überschneidung der Isotopomere m+0 und m+n	179



# 1 Einleitung

Die Entwicklung eines Produktionsstammes zur Herstellung von Feinchemikalien ist in der Regel ein schwieriges Unterfangen, denn Mikroorganismen verfügen über komplexe Regulationsmechanismen. Diese sorgen dafür, dass Stoffwechselprodukte nur in den für die Energiegewinnung und Vermehrung erforderlichen Mengen gebildet werden. Dennoch nutzen wir Mikroorganismen bereits seit Jahrtausenden für die Herstellung von Lebensmitteln wie Brot, Joghurt, Bier, Wein und Essig. Die Spezialisierung der eingesetzten Kulturen entwickelte sich im Laufe der Zeit durch natürliche Auslese.

Eine Überproduktion industriell relevanter Stoffwechselprodukte kommt in der Natur nur selten vor. Das Ausschalten der zellulären Kontrolle kann jedoch durch eine gerichtete genetische Veränderung gelingen, so dass ein Organismus als Folge das gewünschte Produkt in unnatürlich hohem Maße produziert. Diese Strategie wird in der modernen Biotechnologie mit Methoden wie dem *Metabolic Engineering* verfolgt. Dieses definierte Bailey 1991 als „die Verbesserung der zellulären Aktivitäten durch Manipulation der enzymatischen, regulatorischen und Transportfunktionen der Zelle unter Verwendung rekombinanter DNA-Technologien“. Mit anderen Worten, man arbeitet an der gezielten Beeinflussung des mikrobiellen Stoffwechsels um Produktausbeuten und -titer zu optimieren. Das *Metabolic Engineering* umfasst (1.) die Konstruktion eines rekombinanten Stammes mit verbesserten Eigenschaften, (2.) die Analyse des rekombinanten Stammes, insbesondere den Vergleich zum ehemaligen Ausgangsstamm und (3.) die Identifizierung eines neuen Angriffsziels für die Stammoptimierung (Nielsen 2001). Auch Veränderungen der extrazellulären Bedingungen in Produktionsprozessen haben Einfluss auf intrazelluläre Umsatzraten, die sich nicht nur positiv, sondern auch negativ auf die Produktion auswirken können. Deshalb erfolgt das *Process Engineering* zur Entwicklung des gesamten Produktionsprozesses parallel zur Optimierung eines Produktionsstammes.

Heutzutage ist absehbar, dass die Verfügbarkeit von Öl und anderen fossilen Rohstoffen begrenzt ist und dass die Rohstoffpreise zukünftig weiter steigen werden. Aus diesem Grund wird es zunehmend attraktiver, fossile durch nachwachsende pflanzliche Rohstoffe zu ersetzen. Bezogen auf den Kohlenstoff sind Rohstoffe wie Zucker und Bio-Ethanol sogar kostengünstiger, wobei sich aber schon heute eine Preiskopplung an das Mineralöl abzeichnet. Auch im Hinblick auf eine günstige Kohlendioxidbilanz beim Herstellungsverfahren stehen nachwachsende Rohstoffe im Fokus, da beim landwirtschaftlichen Anbau z. B. Kohlendioxid gebunden wird (BIOforum 2008).

Die Biotechnologie wird nach einem Farbcode (rot, grün, weiß, blau und grau) in fünf Anwendungsfelder unterteilt. Die weiße oder industrielle Biotechnologie beschäftigt sich mit organischen Grund- und Spezialchemikalien, die zu einer Vielzahl von Folgeprodukten weiterverarbeitet werden können. Sie wurde bei der EuropaBio 2003 in Brüssel als „*Application of nature's toolbox in industrial production*“ definiert und zeichnet sich heute bereits als vielversprechende Technologie zur Umsetzung nachwachsender Rohstoffe in industriell relevante Produkte ab. Allerdings muss die Entwicklung von Organismen mit hohen Produktivitäten vorangetrieben werden, um gegenüber der chemischen Produktion konkurrenzfähig zu blei-

## Einleitung

ben. Die weiße Biotechnologie findet unter Anderem bei der Herstellung von Aminosäuren Anwendung. Mittlerweile sind sie wichtige Fermentationsprodukte die in Lebensmitteln, Futtermitteln und der pharmazeutischen Industrie zum Einsatz kommen. L-Threonin ist dabei mit 40.000 t/a (Eggeling und Bott 2005) eine der drei Hauptaminosäuren welche industriell auf fermentativem Wege hergestellt werden (Takors et al. 2007), die jährliche Wachstumsrate beträgt 5-7 % (Leuchtenberger et al. 2005).

Alle traditionell entwickelten Aminosäureproduzenten wurden in mehreren Runden von ungerichteter Mutagenese und Selektion sukzessive optimiert (Lee et al. 2007). Obwohl sich die Möglichkeiten des *Metabolic Engineering* in den letzten Jahren weiter entwickelt haben, stellt die rationale Optimierung des metabolischen Netzwerks noch immer eine Herausforderung dar. Aufgrund komplexer Regulationsmechanismen sind die Effekte genetischer Modifikationen häufig nicht vorhersehbar, so dass im Nachhinein umfangreiche analytische Untersuchungen notwendig sind. Deshalb steht die Entwicklung der *Omics*-Technologien (*Transkriptomics*, *Proteomics*, *Metabolomics* und *Fluxomics*) zur Analyse rekombinanter Stämme seit einigen Jahren im Fokus. An solche analytischen Methoden werden hohe Anforderungen gestellt, im Feld der *Metabolomics* z. B. ist die simultane Messung unterschiedlicher Substanzklassen innerhalb eines großen dynamischen Bereichs erforderlich. Neben einer sicheren Identifizierung (qualitativ) sollte zudem gewährleistet sein, dass geringe physiologische Änderungen erfasst werden (quantitativ). Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Metabolomanalyse haben gezeigt, dass neben der Kernresonanzspektroskopie (NMR) die Massenspektrometrie (MS) sehr gut für die Untersuchung des Stoffwechsels von bakteriellen (Buchholz et al. 2001, Oldiges et al. 2004), tierischen (Qian et al. 2004, Murphy et al. 2005) und pflanzliche Zellen (Fiehn 2002) geeignet ist.

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Beim klassischen Ansatz der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse erfolgt die Markierungsmessung mittels NMR (de Graaf et al. 2000) oder Gaschromatographie (GC) gekoppelt mit MS (Christensen und Nielsen 1999, Dauner und Sauer 2000) im C-Skelett der proteinogenen Aminosäuren. Aus diesen werden anschließend indirekt die Markierungsmuster der Zentralstoffwechselmetabolite abgeleitet. Diese Vorgehensweise vereinfacht die Probenaufarbeitung und Analytik, da die Aminosäuren aus dem Biomassehydrolysat sehr viel höhere Konzentrationen aufweisen als freie Metabolite im Zytoplasma. Allerdings ist die gewonnene Markierungsinformation auf die Beschreibung stationärer Stoffwechselzustände beschränkt und nicht auf industrielle Produktionsprozesse im Fed-Batch Betrieb übertragbar. Zudem bringen die größeren Pools den Nachteil langer Markierungszeiten mit sich. Die Dauer zur Erreichung eines stationären Markierungszustands im Protein liegt mindestens in der Größenordnung der Zellgenerationszeit (Nöh und Wiechert 2005), so dass hohe Kosten für die eingesetzten markierten Substrate entstehen (Kiefer et al. 2006). Bei der herkömmlichen Stoffflussanalyse können keine Informationen über limitierende Reaktionsschritte im Produktstoffwechsel abgeleitet werden. Um diese zu erhalten, ist die mathematisch außerordentlich komplexe instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse erforderlich (Nöh und Wiechert 2005). Die hierfür benötigte direkte Analyse intrazellulärer, zytoplasmatischer Metabolite erlaubt die Erfassung dynamischer Anreicherungsprofile im Zellstoffwechsel und ermöglicht den direkten Zugang zu *in vivo* Kinetiken und metabolischen Regulationsmechanismen in prozessnahen Fed-Batch Fermentationen (Kiefer et al. 2006). Die Verfolgung eines solchen Ansatzes ist bisher allerdings aufgrund fehlender analytischer Methoden nicht möglich, da NMR und GC-MS nicht für die Erfassung der sehr gering konzentrierten zytoplasmatischen Metabolite geeignet sind.

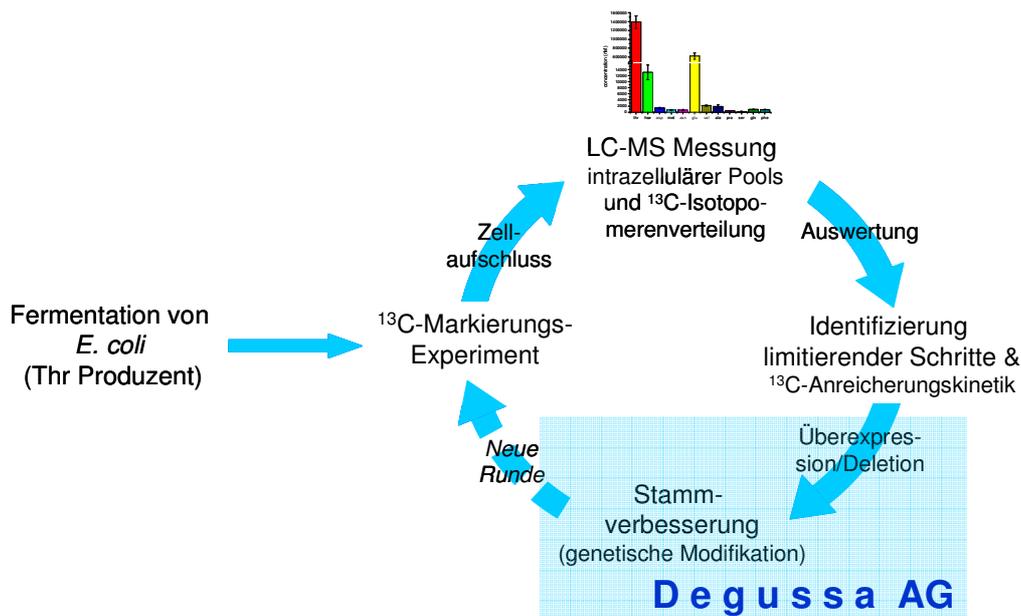


Abbildung 2.1: Schema zur Optimierung der L-Threoninproduktion

## Problemstellung und Zielsetzung

Obwohl Stoffwechselprodukte wie z. B. Aminosäuren und Vitamine von industriellem Interesse sind, stehen bei der direkten Metabolomanalyse (mit Ausnahme der Phenylalaninbiosynthese, Oldiges et al. 2004) bisher nur Untersuchungen des Zentralstoffwechsels im Fokus. Aus diesem Grund soll der Produktstoffwechsel von *E. coli* L-Threoninproduzenten in dieser Arbeit erstmalig direkt im Zytoplasma untersucht werden. Für die Quantifizierung der Poolgrößen im Aminosäureproduktstoffwechsel ist die Entwicklung und Validierung einer sensitiven LC-ESI-MS-Methode (*Liquid Chromatography Electro Spray Ionisation Mass Spectrometry*) notwendig. Basierend auf dem analytischen Ansatz sollen Informationen über Limitierungen in der L-Threoninbiosynthese zugänglich gemacht werden und in einem zweiten Schritt die Optimierung eines L-Threonin Produzenten erfolgen (s. *Abbildung 2.1*). Da Metabolitpools immer über zwei Flüsse definiert werden (in den Pool hinein und aus dem Pool heraus) und über die Poolgrößen nicht direkt auf Stoffflüsse geschlossen werden kann, sollen die identifizierten *Bottlenecks* anschließend über  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente verifiziert werden.

Die Markierungsverteilung in einem Metaboliten ist eine Funktion der metabolischen Aktivität möglicher Stoffwechselwege die zu seiner Bildung beitragen. Deshalb ist es möglich, Stoffwechselaktivitäten aus Markierungsmustern von Produkten, Biomasse und intrazellulären Metaboliten abzuleiten (Dauner und Sauer 2000, Kiefer et al. 2006). Um den Markierungseinbau zu ermitteln, soll das Metabolom unter Fed-Batch Bedingungen in einem isotopisch instationären Markierungsexperiment durch Verwertung von  $\text{U}^{13}\text{C}_6$ -Glucose markiert werden. Auf diese Weise kann die Markierungsanreicherung unter Produktionsbedingungen direkt in den intrazellulären Metaboliten erfasst werden. Mit Hilfe dieses Einblicks in die intrazellulären Vorgänge können limitierende Reaktionsschritte unter *in vivo* Bedingungen aufgedeckt und Hinweise für Angriffspunkte zur verbesserten Stammkonstruktion leichter zugänglich gemacht werden. Somit soll ein einfaches und kostengünstiges Werkzeug für das *Metabolic Engineering* bereitgestellt werden, das ohne den hohen Rechenaufwand der instationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse auskommt.

## 3 Theoretische Grundlagen

### 3.1 Systembiologie

Obwohl sich derzeit viele Arbeitsgruppen mit dem Thema Systembiologie beschäftigen, gibt es bisher noch keine generell akzeptierte Definition des Begriffes. Allgemein herrscht jedoch Übereinkunft darüber, dass die Systembiologie sowohl das komplette Repertoire der Gene (*Genome*), mRNAs (*Transcriptome*), Proteine (*Proteome*), Metabolite (*Metabolome*), Stoffflüsse (*Fluxome*) als auch die Interaktionen zwischen diesen *omics* Ebenen untersucht und in einem Modell zusammenfasst (Wendisch et al. 2006). Dabei muss man bedenken, dass Bakterienzellen typischerweise aus 5000 Genen bestehen - von denen allein während der exponentiellen Wachstumsphase ca. 500 exprimiert werden, die für 400 am Stoffwechsel beteiligte Enzyme und 100 Transport- und Regulatorproteine kodieren. Weiterhin sind ca. 1000 Metabolite am Zellstoffwechsel beteiligt, die zu mehreren Tausend möglichen intrazellulären Stoffflüssen führen (Takors et al. 2007). Diese Zahlen verdeutlichen die Komplexität und den ungeheuren experimentellen Aufwand, der sich hinter dem Wort Systembiologie versteckt. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf dem neuesten Werkzeug unter den *omics* Techniken - der Metabolomanalyse. Das Metabolom umfasst die Gesamtheit aller in der Zelle vorhandenen Metabolite, die als Substrate und Produkte von Proteinen fungieren, aber auch wichtige regulatorische Funktionen übernehmen.

#### 3.1.1 Metabolomanalyse

Die Metabolomanalyse wird allgemein in *Metabolic Profiling* (van Winden et al. 2005), *Metabolic Fingerprinting* (Fiehn et al. 2000, Fiehn 2002, Castrillo et al. 2003) und *Metabolic Footprinting* (Dalluge et al. 2004, Kaderbhai et al. 2003) unterteilt. Während der Fokus beim *Metabolic Profiling* auf der quantitativen Erfassung spezifischer intrazellulärer Metabolite liegt (Oldiges und Takors 2005, Oldiges et al. 2004), wird beim *Metabolic Fingerprinting* eine Übersichtsanalyse intrazellulärer Metabolite durchgeführt. Das *Metabolic Footprinting* hingegen befasst sich mit der schnellen Identifizierung extrazellulärer Metabolite im Fermentationsüberstand. Einen Überblick über die unterschiedlichen Strategien (s. *Abbildung 3.1*) geben unter anderem Dunn et al. (2005) und Oldiges et al. (2007). Für die Systembiologie ist besonders das *Metabolic Profiling* und *Fingerprinting* von Interesse, da die intrazellulären Metabolitkonzentrationen den Zustand des Zellstoffwechsels direkt widerspiegeln. Extrazelluläre Produkte hingegen sind von den Prozessbedingungen und Transportmechanismen der Zellen abhängig, so dass intrazelluläre Aspekte verdeckt werden könnten (Takors et al. 2007).

Die Quantifizierung intrazellulärer Metabolite stellt dabei die größte Herausforderung dar. Es muss gewährleistet sein, dass mit der analytischen Methode alle interessanten Metabolite akkurat und reproduzierbar mit vertretbaren Analysezeiten erfasst werden. Während dies derzeit bereits für einige Intermediate aus dem Zentralstoffwechsel möglich ist (Buchholz et al. 2001, Buchholz et al. 2002, Luo et al. 2007), bereiten Biosynthesewege zu interessanten

Produkten Schwierigkeiten (Oldiges et al. 2004). Häufig sind Referenzsubstanzen der Biosyntheseintermediate nicht kommerziell erhältlich, so dass eine quantitative Untersuchung unmöglich ist. Eine weitere Hürde stellt die Probenaufarbeitung dar. Abhängig vom biologischen System und der verwendeten Methode können Zellen beim Abstoppen der Stoffwechselaktivität ausbluten, in diesem Fall ist eine genaue Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen eine sehr große Herausforderung.

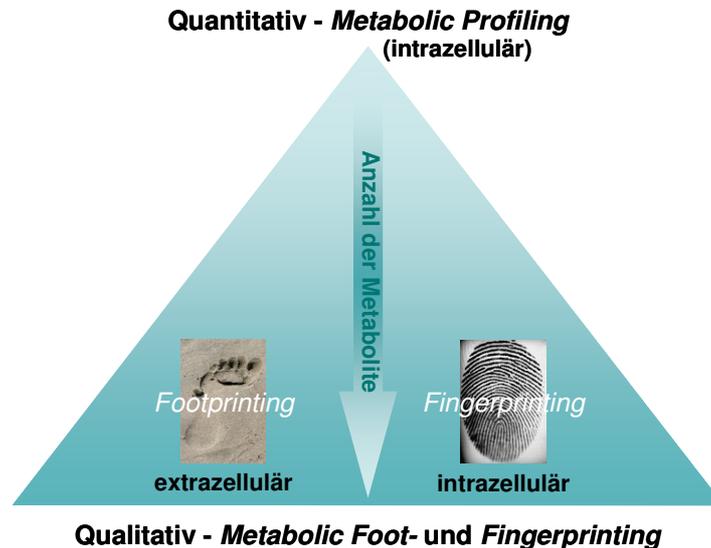


Abbildung 3.1: Strategien der Metabolomanalyse (Villas-Boas et al. 2005a, [1])

In den letzten Jahren wurden vielversprechende GC-, LC- und Kapillarelektrophorese-Methoden entwickelt, die zeigen, dass in der quantitativen Untersuchung ausgewählter Stoffwechselwege großes Potential für das *Metabolic Engineering* von Mikroorganismen steckt. Meist ist der Fokus dabei auf die Stoffflüsse anaplerotischer (Auffüll-) und Gleichgewichtsreaktionen gerichtet oder auf Verzweigungspunkte im Stoffwechsel, die entscheidend für die Produkt- und/oder Nebenproduktbildung sind (Wiechert 2001). Ein Nachteil der GC-MS ist, dass nur flüchtige Komponenten direkt untersucht werden können, polare, wenig flüchtige Analyten hingegen müssen vor der Messung derivatisiert werden. LC-MS kann prinzipiell vielseitiger eingesetzt werden, sie deckt einen größeren Massenbereich ab und erlaubt die simultane Untersuchung vieler Substanzklassen die mittels GC-MS nicht detektiert werden können (z. B. Cofaktoren). Zudem ist normalerweise keine Derivatisierung notwendig und moderne LC-MS-Instrumente bieten Optionen wie akkurate Massendetektion und Tandem MS zur Strukturaufklärung von Metaboliten (Böttcher et al. 2007).

Seit dem Ende des letzten Jahrhunderts wurden eine Reihe von Methoden für die Bestimmung intrazellulärer Metabolite beschrieben (Tolstikov und Fiehn 2002, van Dam et al. 2002, Piraud et al. 2005, Luo et al. 2007). Mittlerweile ist man sich auch der negativen Effekte wie z. B. Ionensuppression bewusst. Durch die Suppression wird die Response von Metaboliten in komplexen biologischen Matrices reduziert (Annesley 2003). Jede Komponente die mit dem zu quantifizierenden Analyten koeluiert, kann Effekte auf die Intensität des MS-Signals eines Analyten ausüben, auch wenn keine Detektion der Störsubstanz erfolgt, diese für den Detektor also „unsichtbar“ ist (Piraud et al. 2005). Dieser Problematik kann man durch

Einführung Interner Standards (IS, s. *Kapitel 4.10.3*) entgegenwirken, durch welche Matrixeffekte kompensiert werden können (Rashed 2001). Publikationen zur Metabolitquantifizierung in *Saccharomyces cerevisiae* und *Salmonella enterica* beschreiben die Verwendung der *Isotope Dilution* Technik (s. *Kapitel 4.10.4*), in welcher stabile, isotope markierte Analoge der Analyten als Interne Standards eingesetzt werden (Lu et al. 2006, de Graaf et al. 2000, Wittmann 2002). Neben der Korrektur von Matrixeffekten kompensieren diese auch Verluste während der Probenvorbereitung und Schwankungen bei der chromatographischen Analyse. Eine Unsicherheit bei der Theorie der *Isotope Dilution* Technik ist die Annahme, dass sich Analyt und isotope markiertes Analogon während des gesamten Prozesses identisch verhalten.

### 3.1.1.1 <sup>13</sup>C-Metabolomanalyse

Voraussetzung für <sup>13</sup>C-Markierungsexperimente ist der stabile Zustand des metabolischen Fließgleichgewichtes (*steady state*) einer Kultur über die gesamte Markierungsdauer. In diesem Zustand ist die zeitliche Änderung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen gleich Null. Dieses Kriterium wird in kontinuierlicher Kultur (Chemostat) erfüllt, wenn die Stoffflüsse über die Dauer des gesamten Experimentes konstant sind. In klassischen Ansätzen wird der Markierungseinbau in die Biomasse daher überwiegend indirekt in kontinuierlicher Kultur (Chemostat) untersucht. Die Zellen werden nach Erreichen eines stationären Zustands für mehrere Stunden markiert. Die Dauer des Experiments ist von der Verdünnungsrate abhängig. Anschließend wird die Markierungsverteilung im C-Skelett der proteino-genen Aminosäuren nach Hydrolyse der Biomasse mittels NMR (de Graaf et al. 2000) oder GC-MS (Christensen und Nielsen 1999, Dauner und Sauer 2000) bestimmt. Für diese Art von Experiment ist eine lange Markierungszeit von mindestens einer Generationszeit der Kultur erforderlich, bevor ein annähernd stationärer Markierungszustand im Proteom erreicht wird (Nöh und Wiechert 2005). Entscheidende Nachteile dieser Methodik sind einerseits die hohen Kosten für das markierte Substrat, andererseits ist sie auf die Untersuchung wachsender Systeme beschränkt. In den Metaboliten hingegen findet ein vergleichsweise schneller Markierungsaustausch innerhalb weniger Sekunden statt, da die Konzentrationen der intrazellulären Metabolitpools im nM bis µM Bereich liegen. Quasi-stationäre Bedingungen werden im Batch oder Fed-Batch Betrieb ohne Substratlimitierung auch in der exponentiellen Wachstumsphase erfüllt (Nöh und Wiechert 2005). Unter diesen Bedingungen wird in dieser Arbeit erstmals die <sup>13</sup>C-Markierungsanreicherung direkt in den intrazellulären Metaboliten des Produktstoffwechsels erfasst (vergl. *Kapitel 2*), um die Dauer des Markierungsexperiments und somit auch die Kosten für das markierte Substrat zu senken. Grundvoraussetzung hierfür sind ein geeigneter Bioreaktor mit automatisch betriebener schneller Probenahmeinheit, die es ermöglicht mehrere Proben innerhalb weniger Sekunden zu nehmen (s. *Kapitel 4.4.1*) und eine analytische Methode zur Erfassung der Markierungsverteilung im Metabolom.

Bei der Markierung des Stoffwechsels entstehen verschiedene Isotopomere der Metabolite die sich massenspektrometrisch detektieren lassen (s. *Abbildung 3.2*). Der Begriff Isotopomer (Isotop und Isomer) beschreibt einen der verschiedenen Markierungszustände in dem

sich ein Stoffwechselmetabolit befinden kann. Ein Positionsisotopomer hat ein exakt bestimmtes Markierungsmuster, beschrieben durch die Anzahl an  $^{13}\text{C}$ -Atomen an definierten Positionen im Molekül. Wohingegen ein Massenisotopomer lediglich durch die Anzahl an  $^{13}\text{C}$ -Atomen im Molekül beschrieben wird. Ein Metabolit mit  $n$  Kohlenstoffatomen kann an jeder Kohlenstoffposition markiert oder unmarkiert sein, somit ergeben sich  $2^n$  verschiedene Markierungszustände oder Isotopomere eines Metaboliten (Wittmann 2002).

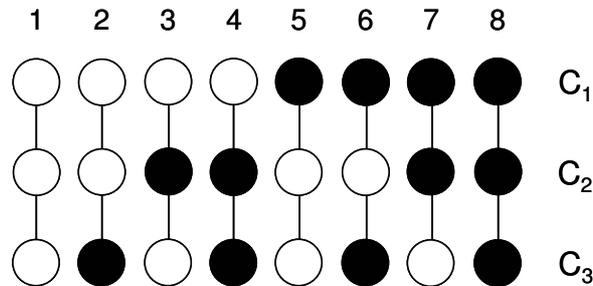


Abbildung 3.2:  $2^3 = 8$  Positionsisotopomere eines  $\text{C}_3$ -Moleküls (Christensen und Nielsen 1999)  
(weiße Kreise =  $^{12}\text{C}$ , schattierte Kreise =  $^{13}\text{C}$ )

Um Anreicherungsmuster im Proteom nach Totalhydrolyse des Zellproteins zu messen, dienen bisher NMR-Spektroskopie, *Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation - Time of Flight* (MALDI-TOF)-MS (Wittman und Heinzle 2001) oder GC-MS (Dauner und Sauer 2000). Messungen mit LC-MS sind derzeit noch wenig erprobt, die ersten LC-ESI-MS/MS Messungen  $^{13}\text{C}$ -markierter intrazellulärer Metabolite werden von Mashego et al. (2004) beschrieben. Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie, mit der eine Bestimmung der Positionsisotopomere möglich wäre, ist für die Quantifizierung der in sehr geringen Konzentrationen vorliegenden intrazellulären Metabolite nicht sensitiv genug. Zudem ist eine parallele Erfassung der unmarkierten Spezies nicht möglich. MALDI-TOF-MS erfasst einen großen Massenbereich mit hoher Sensitivität und schneller Scan-Geschwindigkeit, kann jedoch nicht an GC oder LC gekoppelt werden, wodurch eine chromatographische Vortrennung isobarer Metabolite nicht möglich ist. Für die gaschromatographische Analyse ist vor der Messung eine Derivatisierung der Analyten erforderlich, da die Stoffwechselmetabolite wenig flüchtig und teilweise thermisch labil sind (Wiechert 2001). Für die an Stoffwechselreaktionen häufig beteiligten Cofaktoren ATP und ADP, die auch am L-Threoninbiosyntheseweg beteiligt sind, bleibt die Flüchtigkeit selbst nach Derivatisierung zu gering. Die LC-MS hingegen ermöglicht eine sehr sensitive, direkte Bestimmung markierter und unmarkierter Spezies in wässriger Lösung, ohne dass eine vorhergehende Derivatisierung notwendig ist.

### 3.1.1.2 Analytik von Aminosäuren

In der Vergangenheit wurden viele Methoden für die Aminosäurebestimmung in den unterschiedlichsten biologischen Matrices entwickelt (Petritis et al. 1999, Gomez-Ariza et al. 2005, Chaimbault et al. 1999, You et al. 2007, Qu et al. 2002, van Eijk et al. 1999). Bei der Flüssigkeitschromatographie wird in den meisten Fällen auf den Einsatz von Reagenzien zur Vor- bzw. Nachsäulenderivatisierung, oder Ionenpaarbildner zurückgegriffen. Diese ermöglichen die Retention der nicht UV-aktiven, hoch polaren Analyten auf Umkehrphasen. Für die

Detektion nach gaschromatographischer Trennung ist zunächst eine Überführung in flüchtige Derivate der Aminosäuren notwendig. Die exakte Dosierung solcher Reagenzien ist schwierig, da die Aminosäurekonzentration in Zellextrakten über bis zu neun Größenordnungen variiert. Zudem können unerwünschte Nebenreaktionen mit biogenen Aminen oder organischen Säuren ablaufen. Aus diesen Gründen, birgt der Einsatz von Derivatisierungsmitteln und Ionenpaarbildnern Unsicherheitsfaktoren. Das häufig verwendete Derivatisierungsreagenz OPA (*ortho*-Phtaldialdehyd) reagiert nur mit primären Aminogruppen, so dass z. B. Prolin nicht erfasst wird (You et al. 2007). Bei der Aminosäureanalyse mittels Gaschromatographie ist die Quantifizierung von Arginin nicht möglich, da die Umsetzung der Seitenketten unvollständig abläuft (Makita et al. 1976, Husek und Simek 2006, Namera 2002). Aufgrund der geringen Flüchtigkeit wird Arginin unter diesen Bedingungen bereits beim Injektionsprozess zurückgehalten. Einige Analyten reagieren zu unterschiedlich häufig substituierten Derivaten, wodurch die Ausbeute der gemessenen Spezies gemindert wird. Die Stabilität der gebildeten Derivate ist häufig variabel, einige sind nur in bestimmten pH-Bereichen stabil, worauf bei der Aufarbeitung und Umsetzung der Proben geachtet werden muss. In solchen Fällen ist der Einsatz von geeigneten Internen Standards (s. *Kapitel 4.10.3*), welche die Verluste ausgleichen, unerlässlich.

Die meisten der genannten Methoden basieren auf der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Ultraviolett- oder Fluoreszenzdetektion die keine sichere Identifizierung der Analyten zulassen. Koeluierende Verbindungen in hochkomplexen biologischen Matrices, lassen sich mit diesen Detektionsmethoden nicht differenzieren. Die Fluoreszenzdetektion wird zudem stark vom Quenching der Matrix beeinflusst (z. B. durch überschüssiges Derivatisierungsreagenz und / oder gebildete Nebenprodukte, You et al. 2007). Bei Anwendung dieser Detektionsmethoden ist eine gute chromatographische Trennung oder das zeitintensive Verfahren der Standardaddition notwendig (s. *Kapitel 4.10.2*). Aus den genannten Gründen sollten quantitative Daten deshalb immer kritisch hinterfragt werden. Die Flüssigkeitschromatographie gekoppelt an ein Tandem-Massenspektrometer (LC-MS/MS, s. *Kapitel 3.2.2*) ermöglicht eine sensitive und selektive Trennung intrazellulärer Metabolite bis in den unteren nM Bereich. Die Detektion erfolgt dann anhand von drei Kriterien, der *Retentionszeit*, des *Molekulargewichtes* und des *Fragmentierungsmusters*.

### 3.2 Massenspektrometrie

Das Prinzip der Massenspektrometrie geht auf J.J. Thomson (Entdecker des Elektrons 1897) zurück. Er konstruierte 1912 das erste Massenspektrometer und zeigte, dass das Edelgas Neon eine Mischung von zwei Isotopen der Massen 20 und 22 ist. Der Durchbruch der Massenspektrometrie in der organischen Chemie gelang erst um 1960, nachdem der Quadrupol Analysator und die Ionenfalle 1953 von W. Paul und H.S. Steinwedel patentiert wurden. Die Notwendigkeit der Verdampfung vor der Ionisierung einer organischen Probe, beschränkte die Massenspektrometrie zunächst auf die Untersuchung flüchtiger, thermostabiler Analyten. Dies führte in den 1970er bis 1990er Jahren zur Entwicklung verschiedener Ionisierungsverfahren, bei denen die Ionisierung vor dem Übergang in die Gasphase erfolgt. Mittlerweile können durch Ionisierungstechniken wie *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation* (APCI), *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation* (MALDI) und die *Electrospray Ionisation* (ESI, s. Kapitel 3.2.1) auch höhermolekulare und biologisch relevante Verbindungen massenspektrometrisch erfasst werden. Heute ist die Massenspektrometrie dank ihrer hohen Nachweisempfindlichkeit und den vielfältigen Einsatzgebieten als wichtige Analysenmethode auf dem Gebiet der *Life Sciences* etabliert (de Hoffmann und Stroobant 2001, Hesse et al. 2002).

Alle Massenspektrometer bestehen aus (de Hoffmann und Stroobant 2001):

- einem Probeneinlass System (Direkteinlass, GC, HPLC),
- einer Ionenquelle (zur Bildung von Ionen in der Gasphase),
- einem oder mehreren Analysatoren welche die gebildeten Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) auftrennen,
- einem Detektor der aus dem Massenanalysator austretende Ionen zählt
- und einem Computer für die Prozessierung der Messdaten.

Die gewonnenen Daten werden entweder in Form von Ionenchromatogrammen (aufgelöst nach der Zeit, bei Kopplung chromatographischer Methoden mit der MS) oder als Massenspektren (für einen Zeitpunkt) ausgegeben. Über das Isotopenmuster, das Quasimolekül-Ion und das Fragmentierungsmuster (den spezifischen Zerfall eines Analyten) lassen sich aus Massenspektren sowohl qualitative als auch quantitative Informationen ableiten. Für die quantitative Analytik werden mittlerweile überwiegend Quadrupol Massenspektrometer eingesetzt, bei welchen die Ablenkung der Ionen mittels elektrischer Felder erfolgt. Unter bestimmten Spannungsverhältnissen führt ein spezifisches Ion in Abhängigkeit seiner Masse eine stabile oszillierende Flugbahn aus, passiert den Massenfilter und erreicht den Detektor. Andere Massen hingegen werden unter gleichen Verhältnissen ausgeblendet, so dass eine Massentrennung erreicht wird. Aufgrund dieser Eigenschaft werden Quadrupole auch Massenfilter genannt. Durch Änderung der Spannungsverhältnisse (innerhalb von Millisekunden) werden unterschiedliche Massenbereiche stabilisiert, so dass ein Massenspektrum entsteht. Um die Selektivität und Sensitivität bei Quantifizierungen zu verbessern wurden *Triple Quadrupole*

Massenspektrometer (drei hintereinander geschaltete Quadrupole, auch Tandem Massenspektrometer, s. *Kapitel 3.2.2*) entwickelt. Diese Technik ermöglicht es, einzelne Moleküle aus Gemischen herauszufiltern, auch wenn diese in sehr geringen Mengen vorliegen. Sie ist deshalb für die Analytik stark matrixbelasteter Proben, wie z. B. biologischer Zellextrakte, geeignet (Hesse et al. 2002).

### 3.2.1 Elektrospray Ionisierung

Die Geschichte der Elektrospray Ionisierung (ESI) geht auf Experimente von Dole et al. (1968) zurück. Beim Versprühen einer Lösung aus einer elektrisch geladenen Kapillare, entdeckte er die Möglichkeit Makromolekül-Ionen in der Gasphase zu generieren. Aufbauend auf Doles Entdeckung demonstrierten Fenn et al. (1989) die Messung mehrfach geladener Proteine nach Elektrospray Ionisierung und etablierten die ESI als *Interface* für die Massenspektrometrie. Seitdem hat sich die LC-ESI-MS-Kopplung, die besonders für biologische Fragestellungen wie die Messung von Proteinen, Peptiden und polaren Metaboliten geeignet ist, zu einer der wichtigsten Methoden in der Massenspektrometrie entwickelt. Bei dieser sanften Ionisierungsmethode werden Ionen kleiner und großer polarer Moleküle in Lösung gebildet und unter Atmosphärendruck in die Gasphase transferiert. Dabei entstehen ein oder mehrfach geladene Ionen, die bei LC-MS-Kopplung nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis aufgetrennt werden.

Der erste Schritt der ESI ist die Bildung geladener Tröpfchen an der Spitze der Spraynadel (Taylor-Kegel). Hierzu wird die Probelösung durch eine Kapillare geleitet, an deren Ende eine positive oder negative Spannung (abhängig von der Polarität der Analyten) im Bereich von  $\pm 3\text{-}5$  kV angelegt ist. Das elektrische Feld  $E_c$  am Ende der Elektrospraykapillare wird durch die folgende Gleichung beschrieben (Bruins 1998):

$$E_c = \frac{V_c}{r_c \ln(4d/r_c)}$$

Wobei  $V_c$  die Spannungsdifferenz zwischen Spraykapillare und Gegenelektrode,  $r_c$  der Radius der Spraykapillare und  $d$  die Entfernung zwischen Spraykapillare und Gegenelektrode ist. Die Spannung zieht gegensätzlich geladene Ionen an die Lösungsmitteloberfläche (s. *Abbildung 3.3*). Wird die elektrostatische Abstoßung größer als die Oberflächenspannung löst sich ein kleiner ( $0,5 - 1 \mu\text{m}$ ) geladener Tropfen von der Oberfläche und wandert durch die Gasphase auf die Gegenelektrode zu. Während dieser Strecke erfolgt die Verkleinerung des versprühten Tröpfchens durch Verdampfung des Lösemittels. Bei diesem Prozess entstehen hohe elektrische Felder an der Oberfläche, zusätzlich sind die Tröpfchen Scherkräften ausgesetzt, so dass es zur Deformierung kommt. Bei Erreichen des Raleigh-Limits übersteigt die elektrostatische Abstoßung erneut die Oberflächenspannung, der Tropfen wird instabil und zerfällt in kleinere Tröpfchen ( $0,1 \mu\text{m}$ ). Wird der Tröpfchenradius kleiner als  $10 \text{ nm}$  folgt der dritte und letzte Schritt der ESI, die Bildung gasförmiger Ionen. Man geht davon aus, dass die Ladung an der Tröpfchenoberfläche entweder durch Emission von Ionen (Ionenevaporation - *ion emission model*, Iribane und Thomson 1976, Thomson und Iribane 1979) oder bis zur vollständigen Verdampfung des Lösemittels durch immer kleiner werden-

de Tröpfchen (*charged residue model*, Dole et al. 1968) reguliert wird (Bruins 1998, [2]). Vor dem Eintritt ins Hochvakuum wird eventuell verbliebenes Lösemittel durch Passieren eines trockenen Stickstoffgasstroms (*Curtaingas*), oder einer beheizten Transferkapillare verdampft.

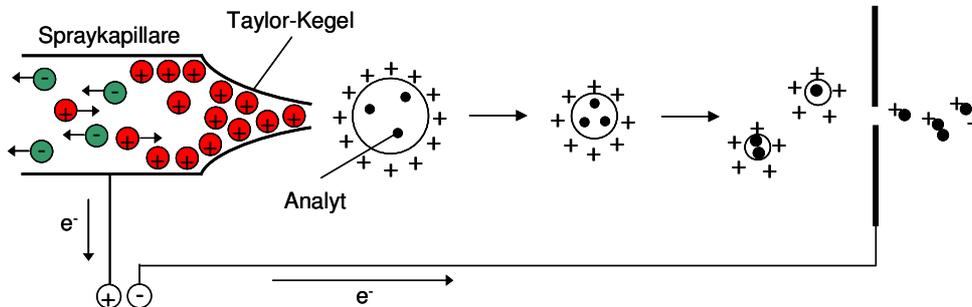


Abbildung 3.3: Prozess der Elektrospray Ionisierung

Bei kleinen Flussraten, geringen Oberflächenspannungen und niedrigen Analytkonzentrationen ist die Bildung kleiner Tröpfchen unproblematisch. Erhöht man allerdings eine oder mehrere dieser Variablen, wird die oben beschriebene Aerosolbildung erschwert. Dies kann zu einem gewissen Maß durch Erhöhung des elektrischen Feldes an der Spitze der Spraynadel kompensiert werden. Allerdings tritt hierbei, besonders bei der negativen Ionisierung, leicht eine elektrische Entladung auf. Die Verdünnung einer wässrigen Lösung mit einem organischen *Modifier* wie z. B. Methanol, Acetonitril, Ethanol oder Isopropanol, ist förderlich für die Elektrospray Ionisierung, da auf diese Weise die Oberflächenspannung herabgesetzt wird (Bruins 1998).

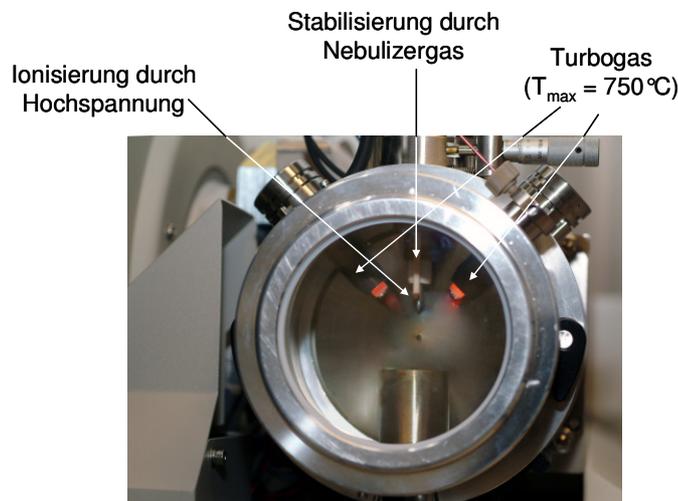


Abbildung 3.4: TurbolonSpray® Source – AB, MDS Sciex

Moderne ESI-Quellen (s. *Abbildung 3.4*) arbeiten mit pneumatischer Vernebelung durch Stickstoff oder Luft (*Nebulizer- / Turbogas, Sheath- / Auxiliarygas*) und erhöhten Temperaturen (bis  $750^\circ\text{C}$ ) zur Verbesserung des Sprays. Auf diese Weise werden höhere Flussraten (bis  $1000\ \mu\text{L}/\text{min}$ ) toleriert und die Ionisierungsspannung kann reduziert werden, was dem Auftreten elektrischer Entladungen vorbeugt.

### 3.2.2 Liquid Chromatography Triple Quadrupole Massenspektrometrie

Die LC-MS-Technologie ermöglicht eine direkte Messung der Metabolite nach chromatographischer Vortrennung, da die Ionisierung direkt aus dem Eluat der Chromatographie erfolgt (s. Kapitel 3.2.1). *Triple Quadrupole* Instrumente arbeiten mit 3 hintereinander geschalteten Quadrupolen, von denen der erste (Q1) und dritte (Q3) als Massenfilter dienen. Die Quadrupole bestehen aus vier parallelen, runden oder hyperbolischen Stabelektroden (s. *Abbildung 3.5 und 3.6*), wobei jeweils die gegenüber liegenden Stäbe elektrisch miteinander verbunden sind. An die beiden Stabpaare wird eine Wechselspannung (*Rf Voltage*) angelegt, wobei die Phase eines Paares um  $180^\circ$  verschoben ist. An eines der Paare wird eine positive Gleichspannung (*DC Voltage*) an das andere eine negative Gleichspannung angelegt, wodurch ein elektrisches Feld entsteht. Befinden sich Ionen innerhalb des Feldes, oszillieren diese in X- und Y-Richtung<sup>[3]</sup>. Lediglich für ein bestimmtes Masse-zu-Ladungsverhältnis ergibt sich im Inneren der vier Stäbe eine stabile Flugbahn, alle anderen Ionen werden ausgeblendet (sie prallen auf die Stäbe und werden entladen). Durch Variation der angelegten Spannungen kann ein Massenbereich gescannt werden. Der zweite Quadrupol (Q2, nur Wechselspannung) dient als Stosszelle zur Fragmentierung oder Transmission von Ionen. Die Fragmentierung in *Triple Quadrupole* Massenspektrometern wird durch Kollision mit Inertgas (z. B. Argon oder Stickstoff) induziert und kann durch den Gasdruck und die Kollisionsenergie (CE) beeinflusst werden. Der Druck wird dabei so gewählt, dass im Mittel ein erzeugtes Ion maximal einmal mit einem Gasmolekül kollidiert<sup>[4]</sup>.

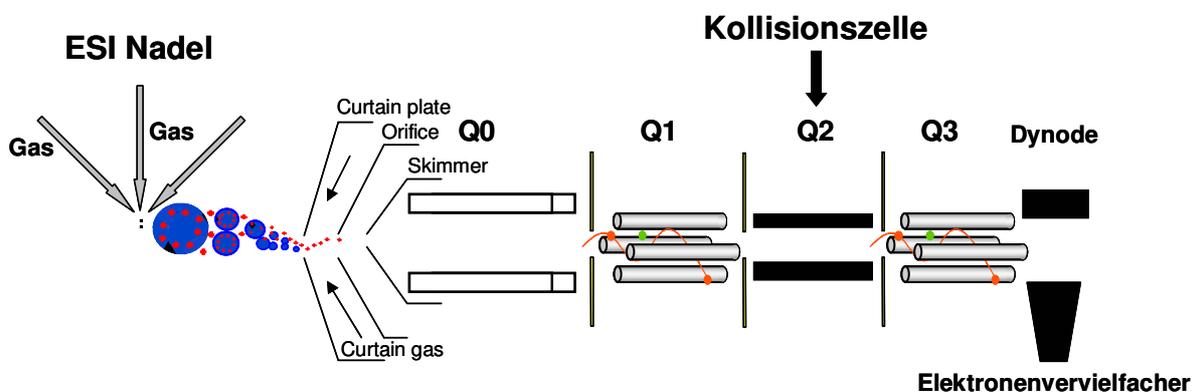


Abbildung 3.5: Aufbau eines Triple Quadrupol Massenspektrometers mit ESI

Durch die Anordnung von drei hintereinander geschalteten Quadrupolen sind verschiedene Experimente wie *Product* oder *Precursor Ion Scan*, *Neutral Loss* und *Multiple Reaction Monitoring* möglich. Das *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) oder auch *Selected Reaction Monitoring* (SRM) ist durch die kurze Zykluszeit für die Quantifizierung am besten geeignet. Der *Scanmodus* wird eingesetzt um einen, oder mehrere Massenübergänge spezifischer Ionen ( $m/z$ ) mit hoher Sensitivität zu messen. Q1 wird dabei darauf programmiert ein spezifisches Ion (Vorläufer- oder Mutter-Ion) zu selektieren, die Kollisionsenergie in Q2 wird so eingestellt, dass ein bestimmtes Fragment-Ion (Synonyme = Produkt- oder Tochter-Ion) optimal gebildet wird, dieses wird anschließend im Q3 selektiert. Auf diese Weise gelangen nur Ionen mit der exakten Kombination an Übergängen zum Detektor. Es können mehrere

dieser sogenannten MRM-Übergänge hintereinander programmiert und in einem Experiment untersucht werden<sup>[5]</sup>.

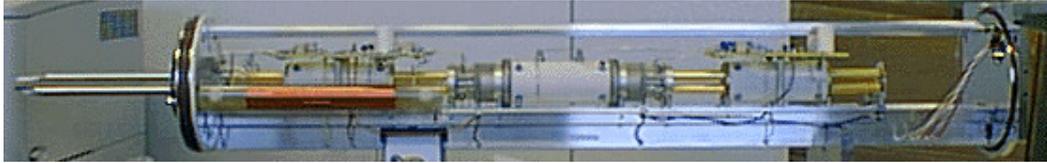


Abbildung 3.6: Triple Quadrupol Ionpath<sup>[6]</sup>

Nach der Selektion erfolgt die Detektion der gebildeten Ionen über eine Konversionsdynode und einen Elektronenvervielfacher (s. *Abbildung 3.7*). An die Dynode wird ein Potential von  $\pm 15$  kV angelegt, sie hat eine konkave Metalloberfläche die rechtwinklig zum Ionenstrom angeordnet ist. Schlagen Ionen auf die Oberfläche, werden Sekundärpartikel gebildet. Dies können positive oder negative Ionen, Elektronen und Neutralteilchen sein. Im positiven Messmodus schlagen positive Ionen auf einer negativ geladenen Dynode ein, die Sekundärpartikel sind in diesem Fall Anionen und Elektronen. Im negativen Messbetrieb schlagen negative Ionen auf eine positiv geladene Dynode und es entstehen Kationen. Die Sekundärpartikel werden fokussiert, über einen Spannungsgradienten beschleunigt und in den Elektronenvervielfacher gelenkt<sup>[3]</sup>.

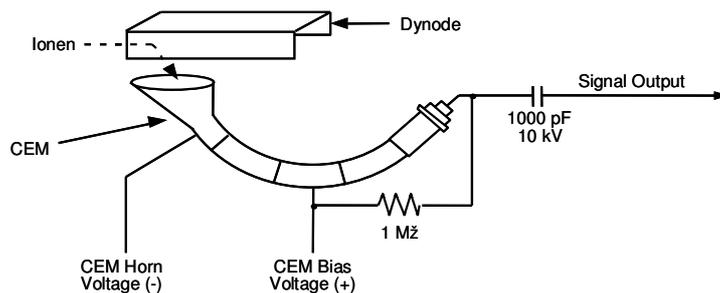


Abbildung 3.7: Ionendetektor<sup>[6]</sup> (CEM = Continuous Electron Multiplier)

Der Elektronenvervielfacher besteht aus einer Kathode und einer Anode. Die Kathode ist ein trichterförmiger Widerstand aus Bleioxid an deren Ende sich die Anode befindet welche die aus der Kathode freigesetzten Elektronen anzieht. In der Dynode gebildete Sekundärpartikel schlagen auf der Kathode des Elektronenvervielfachers ein und setzen dabei Elektronen frei. Diese werden durch einen Spannungsgradienten weiter in die Kathode hinein beschleunigt. Aufgrund der Trichterform schlagen die Elektronen auf dem Weg zur Anode erneut auf der Kathode ein und setzen dabei weitere Elektronen frei. Auf diese Weise wird eine Kaskade von Elektronen gebildet, die beim Auftreffen auf die Anode einen messbaren Strom erzeugen. Dieser ist proportional zur Anzahl der eingeschlagenen Sekundärpartikel. Die Verstärkung des erzeugten Stroms liegt normalerweise in der Größenordnung von  $10^5$  bis  $10^6$  für ein einfach geladenes Ion<sup>[3]</sup>.

### 3.3 Aminosäuren

Aminosäuren sind wichtige Nährstoffe und die Bausteine von Proteinen. Proteine aller Spezies, von Bakterien bis zum Menschen, bestehen überwiegend aus den gleichen 20 Standardaminosäuren, welche daher auch proteinogene Aminosäuren genannt werden. Alle außer Glycin besitzen vier verschiedene Reste, die um ein chirales  $C_{\alpha}$ -Atom angeordnet sind. Die zwei möglichen deckungsgleichen Spiegelbilder der chiralen Aminosäuren (L- und D-) werden Enantiomere genannt. Diese sind physikalisch und chemisch identisch, können aber basierend auf ihrer Eigenschaft linear polarisiertes Licht zu drehen, unterschieden werden. In Proteinen sind lediglich L-Aminosäuren zu finden, D-Aminosäuren treten in der Natur sehr selten auf, z. B. in der Bakterienzellwand (s. *Kapitel 3.4.2*) und einigen Peptidantibiotika. Die 20 Standard Aminosäuren unterscheiden sich in ihrer Seitenkette anhand der sie in Gruppen eingeteilt werden können (unpolar, polar, sauer oder basisch, Hames und Hooper 2000).

Im Jahr 2005 lag der Weltmarkt für Aminosäuren bei über 2,5 Mio. Tonnen pro Jahr, was einem Marktwert von über 5 Mrd. € entspricht (Eggeling und Bott 2005). Aminosäuren können nach vier Verfahren gewonnen werden: (1) der chemischen Synthese, (2) durch Extraktion aus Proteinhydrolysaten, (3) mittels enzymatischer Katalyse oder (4) durch bakterielle Fermentation. Die Extraktion aus Proteinhydrolysaten hat den Nachteil, dass sie viele Trennungsstufen beinhaltet. Nach Spaltung der Proteine muss das heterogene Gemisch aus polaren, aromatischen und unpolaren Aminosäuren in verschiedenen aufeinander folgenden Schritten weiter aufgespaltet werden. Chemisch gewonnene Aminosäuren weisen oft nicht nur die L-Form, sondern auch die optisch aktive D-Form auf, die nicht von allen Lebewesen verwertet werden kann. Deshalb wird immer häufiger auf die biotechnologische Herstellung durch Bakterien oder Enzyme zurückgegriffen. In der modernen Biotechnologie ist die fermentative L-Aminosäureproduktion mit Saccharose oder Glucose als Kohlenstoffquelle weit verbreitet. Große Mengen an L-Glutamat (1.200.000 t/a), L-Lysin (650.000 t/a), L-Threonin (40.000 t/a), L-Phenylalanin (15.000 t/a) und L-Tryptophan (1.500 t/a) werden hauptsächlich durch Fermentation von *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) und *E. coli* hergestellt (Eggeling und Bott 2005). Neben dem Einsatz für die menschliche Ernährung (Geschmacksverstärker, Süßstoffe), kommen Aminosäuren als Futtermitteladditive (tierische Nahrungsergänzung), in Kosmetika, in der pharmazeutischen Industrie (Infusionslösungen, diätetische Lebensmittel) und in der chemischen Industrie zum Einsatz (Krämer 2004).

#### 3.3.1 L-Threonin

L-Threonin (2-Amino-3-hydroxybuttersäure, s. *Abbildung 3.8*) war die erste Aminosäure deren Lebensnotwendigkeit erkannt wurde. Sie zählt zu den so genannten essentiellen Aminosäuren welche von den meisten höheren Organismen nicht eigenständig hergestellt werden können, sondern mit der Nahrung aufgenommen werden müssen. In vielen pflanzli-

chen Proteinen wie Mais, Soja, Hafer, Gerste, Weizen und Reis kommen essentielle Aminosäuren nicht in den für eine gesunde Ernährung erforderlichen Mengen vor. Der Mangel nur einer Aminosäure führt zu einer negativen Stickstoffbilanz, d. h. es wird mehr Protein abgebaut als synthetisiert und folglich mehr Stickstoff ausgeschieden als aufgenommen. Bei vorwiegend vegetarischer Ernährung ist es deshalb empfehlenswert, pflanzliche Proteine durch Zusatz essentieller Aminosäuren aufzuwerten. In Schweine- und Geflügelfutter ist L-Threonin nach L-Lysin die zweite limitierende Aminosäure (Rees et al. 1990). Aus diesem Grund erreicht die Gewichtszunahme bei Verfütterung von Weizen oder Reis in der Tiermast, erst bei Zusatz von L-Lysin und L-Threonin den Futterwert von Casein (Schmid 2006, Täufel et al. 1998).

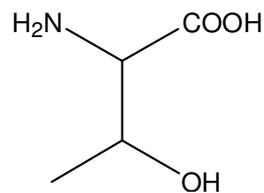


Abbildung 3.8: Die Aminosäure L-Threonin

Bakterien hingegen können proteinogene Aminosäuren in Gegenwart geeigneter Kohlen- und Stickstoffquellen synthetisieren. Durch genetische Mutation werden Stammsysteme generiert die ausgewählte Aminosäuren überproduzieren, so dass diese Eigenschaft im industriellen Maßstab genutzt werden kann (Schmid 2006). Vor 10 Jahren wurde L-Threonin noch mittels Extraktion oder durch Fermentation mit coryneformen Bakterien in Mengen von einigen hundert Tonnen pro Jahr gewonnen. In den letzten Jahren konnten durch Kombination klassischer Methoden mit rekombinanten DNA-Techniken erfolgreich Stämme verschiedener Spezies für die industrielle Produktion nutzbar gemacht werden (Rehm und Reed 1996). Produktionsorganismen für L-Threonin sind deregulierte *E. coli* Hochleistungsmutanten (s. Kapitel 3.4.9), wobei die besten Stämme in nur 30 h 80 g/L bilden (Schmid 2006). Die Abtrennung des Produktes aus dem Fermentationsmedium erfolgt durch Zentrifugation oder Ultrafiltration. Das Filtrat wird aufkonzentriert, entfärbt und das L-Threonin auskristallisiert (Rehm und Reed 1996). Im Jahre 2004 wurden ca. 55.000 t L-Threonin hergestellt (Schmid 2006, Rehm und Reed 1996). Es wird hauptsächlich als Futtermitteladditiv genutzt, aber auch in der pharmazeutischen und chemischen Industrie verwendet, außerdem dient es als Wachstumsfaktor bei der fermentativen Herstellung anderer Aminosäuren (Debabov et al. 1992).

### 3.4 Threoninproduktion in *Escherichia coli*

#### 3.4.1 Biologisches System *E. coli*

*E. coli* ist ein gramnegatives Bakterium, das zu den fakultativen Anaerobiern gehört. Der Organismus wurde 1885 von dem Kinderarzt Theodor Escherich entdeckt. Er gab der unbekanntenen Bakterienart den Namen *Bacterium coli comunale* (= allgemeines Dickdarmbakterium, Escherich 1885), der inzwischen durch den Namen des Entdeckers ersetzt wurde. Die Zellen haben die Form kurzer, stumpfer Stäbchen von 1-4  $\mu\text{m}$  Länge (s. *Abbildung 3.9*). Das fakultativ anaerobe Bakterium kann Energie sowohl durch Atmung als auch durch gemischte Säuregärung gewinnen. Es gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* (griech. enteron = Darm), ist peritrich begeißelt und bildet keine Sporen. Bei optimalen Wachstumsbedingungen (Komplexmedium, 37 °C, pH 6,5-7,3) beträgt die Generationszeit 20 min. Der natürliche Lebensraum ist der Dickdarm von Mensch und Tier. Trotzdem der Darmbewohner nicht zahlenmäßig überwiegt, gilt *E. coli* aufgrund seiner Überlebensfähigkeit außerhalb des natürlichen Lebensraumes als Indikatorkeim für die fäkale Verschmutzung von Trinkwasser (Schlegel 1992) und anderen Lebensmitteln.

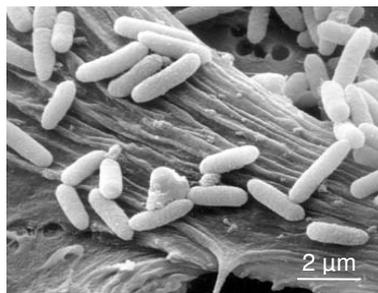


Abbildung 3.9: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *E. coli* Zellen<sup>[7]</sup>

*E. coli* K12 zählt zu den ersten untersuchten und voll sequenzierten Organismen (4.639.221 bp  $\approx$  etwa 5000 Gene, Blattner et al. 1997). Am Bakterium gelangen grundlegende Entdeckungen wie z. B. die Entschlüsselung des genetischen Codes, die Funktion des genetischen Materials über Transkription und Translation, wichtige Erkenntnisse über die Regulation der genetischen Aktivität und über die Entstehung und Reparatur von Mutationen (Knippers 2001). Die einfache Kultivierung des Organismus (schnelles Wachstum auf Minimalmedium) erlaubte bisher die Aufklärung vieler stoffwechselphysiologischer Vorgänge in Prokaryonten (Schlegel 1992). Mittlerweile wird *E. coli* industriell erfolgreich für die Produktion verschiedenster Feinchemikalien (z. B. Aminosäuren und Vitamine), rekombinanter Proteine, Insulin und vielen mehr genutzt. Bezüglich der L-Threoninproduktion ist *E. coli* neben *Brevibacterium flavum* oder *Serratia marcescens* einer der produktivsten Stämme (Debabov et al. 1992). Eine grobe Übersicht über die Zusammensetzung einer *E. coli* Zelle unter optimalen Wachstumsbedingungen gibt *Tabelle 3.1*.

Tabelle 3.1: Makromoleküle in *E. coli* bei optimalen Wachstumsbedingungen (Knippers 2001)

	Anzahl der Moleküle <sup>1</sup>	Unterschiedliche Arten	Anteil an Zellmasse (%) <sup>1</sup>
Nukleinsäuren			
DNA	2-4	1	1
RNA			6
	16S rRNA	$3 \times 10^4$	1
	23S rRNA	$3 \times 10^4$	1
	tRNA	$4 \times 10^5$	etwa 80
	mRNA	$10^3$	Mehr als 1000
Proteine	$10^6$	Mehr als 3000	15
Zellhülle und niedermolekulare Verbindungen			10-12

<sup>1</sup> Die Werte unterliegen je nach physiologischem Zustand der Zelle starken Schwankungen

### 3.4.2 Zellmembran und Zellwand

Die Zellhülle von Bakterien ist die Barriere zwischen dem Zellinnern und der Umwelt. Die meisten Organismen verfügen wie eine Zwiebel über eine mehrschichtige Hülle. Die innerste Membran (Zytoplasmamembran) stellt dabei die wesentliche Diffusionsbarriere für gelöste Substanzen dar.

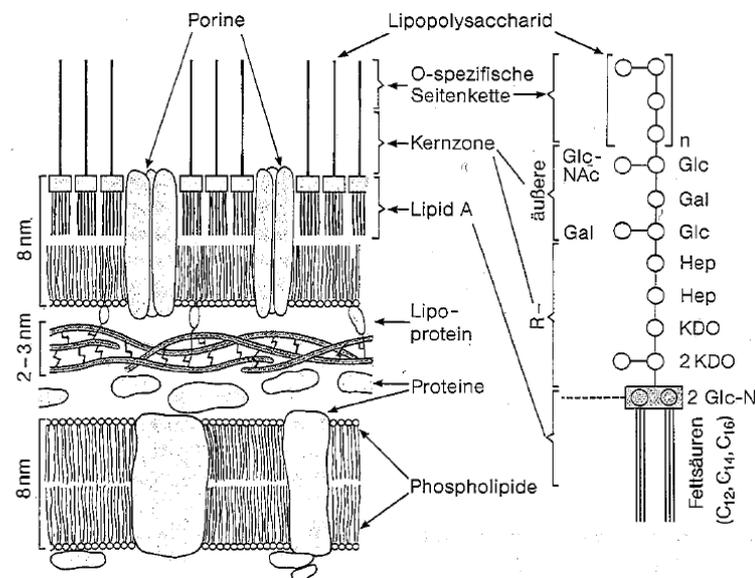


Abbildung 3.10: Zellhülle gramnegativer Bakterien (Schlegel 1992)

Die prokaryotische Zelle ist komplett von einer Zytoplasmamembran umhüllt, die das Zytoplasma umschließt und als osmotische Schranke dient. Diese Membran ist ca. 8 nm dick und besteht aus einer Lipiddoppelschicht (Phospholipide und Sphingolipide) in die Proteine eingebettet sind. Diese dienen als spezifische Transportsysteme um den Ein- und Austritt von Metaboliten zu kontrollieren. Kleinere lipophile Moleküle, wie z. B. Kohlendioxid, Alkohole und Harnstoff können frei durch die Lipiddoppelschicht diffundieren (Hames und Hooper 2000, Milner et al. 1987).

Zum Schutz vor mechanischen Einflüssen und osmotischem Druck besitzen die meisten Prokaryoten eine 3-25 nm dicke Zellwand aus Peptidoglykan (Murein). N-Acetylglucosamin

und N-Acetylmuraminsäure sind darin alternierend  $\beta$ -1,4-glycosidisch verknüpft und bilden das unverzweigte Rückrad des Mureins. Die einzelnen Muraminsäureketten werden zur Verbesserung der Festigkeit und Stabilität der Zellwand über die Lactylgruppen mit Aminosäuren peptidisch quervernetzt. Zu den typischen Aminosäuren der Tetrapeptide gehören L-Alanin, D-Glutaminsäure, *meso*-Diaminopimelinsäure und D-Alanin (Hames und Hooper 2000, Schlegel 1992). Zwischen Zytoplasmamembran und Peptidoglycanschicht liegt das Periplasma, ein Raum, in dem sich von der Zelle sekretierte Proteine befinden (Hames und Hooper 2000, Nikaido 2003, Milner et al. 1987).

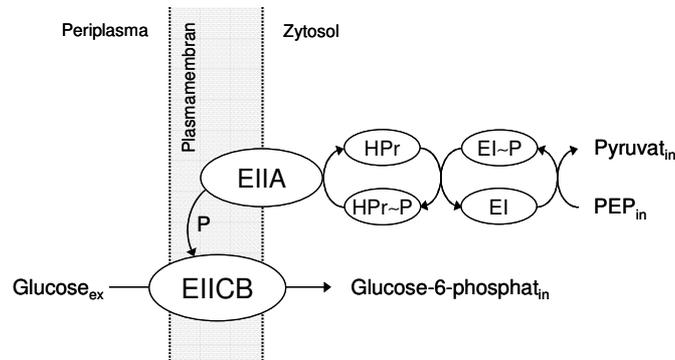
Gramnegative Bakterien wie *E. coli* besitzen eine dünne Zellwand (3 nm), die von einer äußeren Membran umschlossen wird. Diese besteht wie andere biologische Membranen aus einer asymmetrischen, proteinreichen Lipiddoppelschicht wobei die beiden Lipidschichten unterschiedlich aufgebaut sind. Phospholipide, in die Lipoproteine eingebettet sind, finden sich überwiegend in der inneren Schicht. Die äußere Schicht hingegen besteht vorwiegend aus Lipopolysacchariden mit O-spezifischen Seitenketten (Schlegel 1992, Milner et al. 1987). Die wichtigste Funktion dieser zusätzlichen äußeren Membran ist wahrscheinlich die selektive Permeationsbarriere. Im Gegensatz zur Plasmamembran ist die äußere Membran durchlässig für relativ große Moleküle ( $> 1000$  Da). Dies wird durch Porine – wassergefüllte Proteinkanäle in der Lipiddoppelschicht – ermöglicht, welche die Passage niedermolekularer hydrophiler Substanzen durch die äußere Membran erlauben (s. *Abbildung 3.10*). Lipopolysaccharide und Membranproteine bestimmen die Oberflächencharakteristik gramnegativer Zellen und sind für ihre antigene Wirkung, Virulenzfaktoren, Toxizität, Resistenz gegen Antibiotika und vieles mehr verantwortlich (Milner et al. 1987).

Für die Untersuchung intrazellulärer Metabolite ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Zytoplasmamembran der Zellen bis zum Zellaufschluss intakt bleibt, um ein „Ausbluten“ der Metabolite vor der Extraktion zu verhindern. Die Glycosidbindung zwischen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure ist hydrolyseanfällig gegenüber Lysozym. Die Mureinschicht wird bei vielen gramnegativen Bakterien allerdings erst nach Komplexierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) zugänglich, da  $\text{Ca}^{2+}$  zur Erhaltung der Stabilität der Lipopolysaccharidschicht notwendig zu sein scheint (Schlegel 1992). Der Einbau von D-Aminosäuren macht die Zellwand resistent gegen den Abbau durch Proteasen, allerdings stellen sie gleichzeitig auch ein spezifisches Angriffsziel für Penicillin und andere  $\beta$ -Lactam Antibiotika dar (Hames und Hooper 2000).

### 3.4.3 Glucoseaufnahme in *E. coli*

Kleine Moleküle und Ionen können die bakterielle Zellwand ungehindert passieren, nur Makromoleküle mit einem Molekulargewicht  $> 600$  g/mol werden zurückgehalten. Die Plasmamembran hingegen ist eine natürliche Barriere für alle Nährstoffe (s. *Kapitel 3.4.2*). Die Substrataufnahme durch die Plasmamembran in die Zelle ist im Allgemeinen spezifisch und wird von verschiedenen Transportsystemen katalysiert. Nutzt *E. coli* Glucose als Energie- und Kohlenstoffquelle, wird diese über das Phosphoenolpyruvat (PEP) abhängige Phosphotransferase System (PTS) aufgenommen und geht als Glucose-6-phosphat (G6P) in den Zentralstoffwechsel ein (Schlegel 1992). Die Phosphorylierung der Glucose ist mit der

Passage durch die Plasmamembran verknüpft. Die Energie für diesen Prozess wird über mehrere Zwischenschritte vom energiereichen Glykolyse-Intermediat PEP geliefert (s. *Abbildung 3.11*).



*Abbildung 3.11: Glucoseaufnahme über das Phosphotransferase System*

Die extrazellulär (ex) vorliegende Glucose wird vom Membranprotein EIICB aufgenommen. Über eine Enzymkaskade wird die aus PEP freigesetzte Phosphatgruppe (P) auf Glucose transferiert. Das entstehende Glucose-6-phosphat wird nach der Phosphorylierung intrazellulär (in) ins Zytoplasma abgegeben. Enzym I (EI) und das Histidin-Protein (HPr) sind zuckerunspezifische, lösliche Zytoplasmaproteine, die am Transport aller PTS-Zucker beteiligt sind und allgemein PTS-Proteine genannt werden. Das integrale Membranprotein Enzym II (EII) ist zuckerspezifisch und besitzt 3 Domänen (A, B und C). EIIA und EIIB besitzen Phosphat-Bindungsstellen, die membrangebundene hydrophobe Domäne EIIC die Glucose-Bindungsstelle (Schlegel 1992).

Zucker, die durch das PTS aufgenommen werden, hemmen den Transport und die Verwertung gleichzeitig vorhandener anderer Kohlenstoffquellen (Katabolit-Repression - das Bakterium verwertet im Allgemeinen bevorzugt das Substrat, welches schnelleres Wachstum ermöglicht). In Gegenwart von Glucose ist die Adenosin-3',5' monophosphat (cAMP) Konzentration in der Zelle gering. Fehlen hingegen PTS-Substrate, steigt der Phosphorylierungsgrad der PTS-Komponenten im Zytoplasma an, was eine energetische Aufladung des Transportsystems bewirkt. In diesem Zustand zeigt die Adenylat-Cyclase eine hohe Aktivität, so dass die intrazelluläre cAMP Konzentration steigt und die Verstoffwechslung alternativer Kohlenstoffquellen ermöglicht. Das Phosphotransferase System ist somit nicht nur für die Substrataufnahme zuständig, sondern übernimmt auch regulatorische Funktionen (Schlegel 1992).

### 3.4.4 Glykolyse

Der am weitesten verbreitete Hexoseabbauweg ist die Glykolyse (aus dem Griechischen *glykos* = süß und *lysis* = Auflösung (Berg et al. 2007) auch als Embden-Meyerhof-Parnas-Weg oder Fructose-1,6-bisphosphat-Weg bekannt (Schlegel 1992). Sie besteht aus mehreren Reaktionen die im Zytoplasma aller Pro- und Eukaryoten stattfindet. Hierbei wird ein Glucosemolekül zu zwei Pyruvatmolekülen umgesetzt, welche in Form von Acetyl Coenzym A (AcetylCoA) in den Zitronensäurezyklus eingeschleust werden. Alle Zwischenprodukte

der Glykolyse (ausgenommen Glucose) sind phosphorylierte Verbindungen (Hames und Hooper 2000, s. *Abbildung 3.12*).

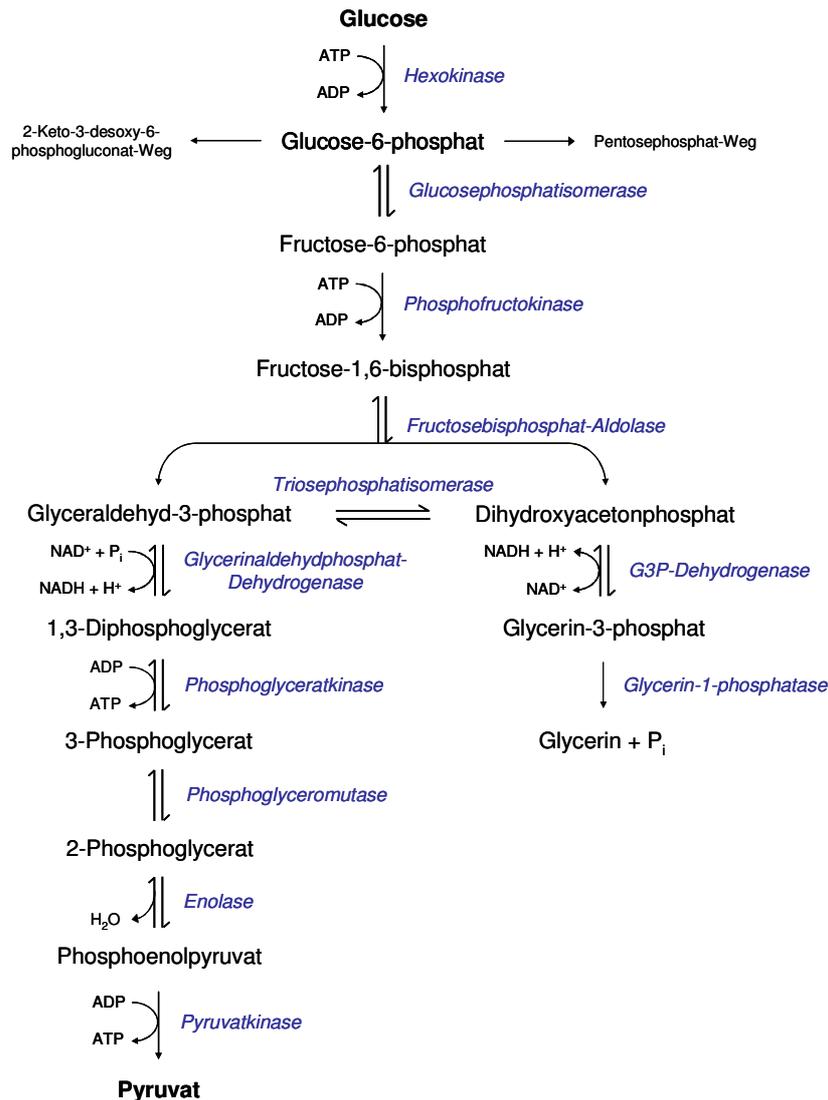


Abbildung 3.12: Glykolyse in *E. coli* (Hames und Hooper 2000)

Die Glykolyse hat zwei Funktionen: die erste ist die Produktion chemischer Energie in Form von Adenosin-5'-triphosphat (ATP); die zweite die Bereitstellung von Vorstufen für verschiedene Biosynthesewege, wie z. B. AcetylCoA für die Fettsäurebiosynthese (Hames und Hooper 2000). Zu Beginn des katabolen Stoffwechselweges werden zwei Mol ATP zur Phosphorylierung von Glucose und Fructose-6-phosphat verbraucht. Später werden dann vier Mol ATP durch die Dephosphorylierung von zwei Molekülen Glyceraldehyd-3-phosphat und zwei Molekülen Phosphoenolpyruvat gebildet. Somit beträgt die Nettoausbeute zwei Mol ATP pro Mol Glucose. Außerdem erfolgt die Reduktion von zwei Mol Nicotinamidadenindinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) welche über die oxidative Phosphorylierung drei weitere Mol ATP liefern.

Die Gesamtbilanz der Glykolyse entspricht folgender Gleichung:

(Abkürzungen: ADP: Adenosindiphosphat,  $\text{P}_i$ : Phosphat  $\text{H}_2\text{O}$ : Wasser)



Die Regulation der Glykolyse erfolgt hauptsächlich über die Phosphofruktokinase. Die Enzyme Hexokinase (nur wenn die Glucoseaufnahme nicht über ein PTS-System erfolgt) und Pyruvatkinase sind zusätzliche Punkte an denen der Stoffwechselweg reguliert wird. Die Phosphofruktokinase wird allosterisch über ATP (und Citrat) inhibiert, die Hexokinase durch Glucose-6-phosphat. Die Pyruvatkinase wird durch Fructose-1,6-bisphosphat aktiviert aber allosterisch durch ATP und Alanin inhibiert (Hames und Hooper 2000). Alle anderen Reaktionen der Glykolyse sind reversibel (Schlegel 1992).

Die Glykolyse läuft sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen ab. In Gegenwart von Sauerstoff wird Glucose in *E. coli* zu 70% über die Glykolyse und zu 30% über den Pentosephosphatweg (PPP) abgebaut. Aus dem PPP werden unter anderem Ribose-5-phosphat (R5P) für die Nukleotidsynthese, Erythrose-4-phosphat (E4P) für die Synthese aromatischer Aminosäuren und 2 Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH + H<sup>+</sup>) als Reduktionsäquivalente für Biosynthesewege zur Verfügung gestellt (Schlegel 1992).

### 3.4.5 Zitronensäurezyklus

Der aerobe Glucoseabbau führt über die Glykolyse hin zum Zitronensäurezyklus auch bekannt als TCA- (*Tricarboxylic acid*) oder Krebs-Zyklus (1937 nach seinem Entdecker benannt). Ausgehend von Pyruvat erfolgt hier der oxidative Endabbau der Glucose zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O. Der Zyklus findet im Zytoplasma von Prokaryoten und in den Mitochondrien von Eukaryoten statt (Hames und Hooper 2000). Von vielen Organismen wird der überwiegende Anteil an gebildetem Pyruvat vom Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplex zu AcetylCoA oxidiert, welches in den Zitronensäurezyklus eingeschleust wird. Unter aeroben Bedingungen können in *E. coli* aus einem Molekül Glucose etwa 30 Moleküle ATP generiert werden (Berg et al. 2007). Neben der Energiegewinnung spielt der Zitronensäurezyklus eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung von Vorstufen für verschiedene Biosynthesewege. Die Succinatdehydrogenase, das einzige membrangebundene Enzym im Zitronensäurezyklus, ist bei Prokaryoten in der Plasmamembran und Eukaryoten in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert (Hames und Hooper 2000).

Citrat ist zwar ein spiegelbildlich symmetrisches Molekül, wird im Zitronensäurezyklus aber asymmetrisch abgebaut. Es entsteht durch die von der Citratsynthase katalysierte Addition von AcetylCoA an Oxalacetat, wobei Coenzym A abgespalten wird (Berg et al. 2007). Der Zitronensäurezyklus besteht aus einer achtstufigen zyklischen Reaktionskaskade (s. *Abbildung 3.13*) in der bei jedem Durchlauf 1 Mol GTP direkt im Zyklus (in *E. coli* ATP), 3 Mol NADH bei der Oxidation von Isocitrat, α-Ketoglutarat und Malat (in *E. coli* 2 NADH und 1 NADPH, s. *Abbildung 3.13*) und ein Molekül FADH<sub>2</sub> bei der Oxidation von Succinat entstehen. Bis auf die Bildung von SuccinylCoA sind alle Reaktionen reversibel (Hames und Hooper 2000, Schlegel 1992).

Die Bilanz eines Umlaufs entspricht folgender Gleichung:



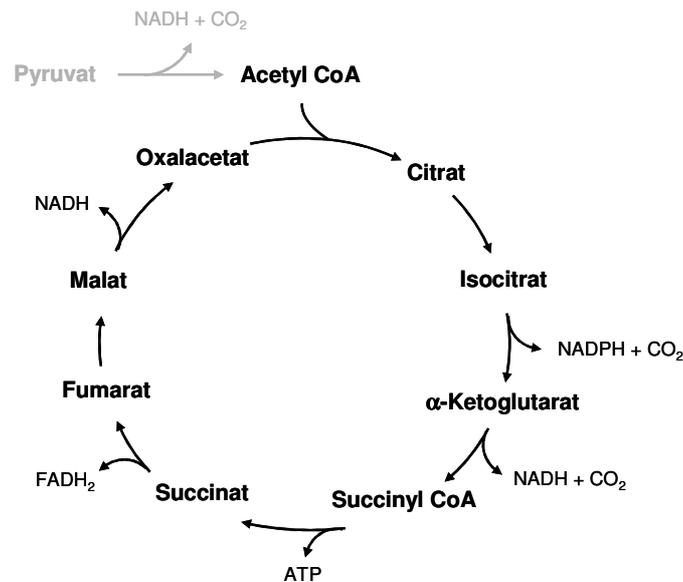


Abbildung 3.13: Zitronensäurezyklus in *E. coli* [8]

Die Gesamtgeschwindigkeit des Zitronensäurezyklus wird durch die Geschwindigkeit der Umwandlung von Pyruvat zu AcetylCoA und den Umsatz der Citratsynthase, Isocitratdehydrogenase und  $\alpha$ -Ketoglutaratdehydrogenase bestimmt. Der Aktivität dieser Enzyme hängt hauptsächlich von den Konzentrationen der Substrate und Produkte ab. Die Akkumulation der Endprodukte ATP und NADH führt zur Inhibierung. Die Intermediate des Zitronensäurezyklus fungieren als Vorstufen für die Biosynthese von Aminosäuren, Purinen, Pyrimidinen, Porphyrinen, Fettsäuren und Glucose (Hames und Hooper 2000, Nelson und Cox 2001). So genannte anaplerotische Reaktionen (= Auffüllreaktionen) gewährleisten die Aufrechterhaltung eines Mindestspiegels derjenigen Zwischenprodukte des TCA-Zyklus, die in andere Biosynthesewege eingehen. Andernfalls würde ein Mangel an Intermediaten entstehen. Ein Beispiel für eine anaplerotische Reaktion ist die Carboxylierung von PEP, aus der Oxalacetat entsteht. Umgesetzt wird diese Reaktion durch die PEP-Carboxylase (Berg et al. 2007).

### 3.4.6 L-Threoninbiosynthese

L-Threonin (Thr) ist ein Intermediat der L-Isoleucinbiosynthese und gehört wie L-Lysin, L-Methionin und L-Isoleucin zur Aspartatfamilie. Der Vorläufer L-Aspartat wird aus Oxalacetat, einem Intermediat des Zitronensäurezyklus (s. Kapitel 3.4.5) gebildet. Aufgrund der verzweigten Natur des Biosyntheseweges unterliegt dieser einer komplexen Regulation, die von Organismen unterschiedlich gelöst wird. In *E. coli* läuft die Threoninbiosynthese über fünf enzymkatalysierte Reaktionen (s. Abbildung 3.14). Die ersten beiden Schritte teilen sich die Threonin-, Lysin- und Methioninbiosynthese, die dritte Reaktion führt zur Synthese von L-Threonin und L-Methionin, nur die letzten beiden Reaktionen dienen lediglich der Threonin- und Isoleucinbiosynthese.

Die Threoninbiosynthese in *E. coli* wird auf unterschiedlichen Ebenen reguliert. Die enzymatische Aktivität unterliegt einer *Feedback* Inhibierung durch das Produkt L-Threonin. Zusätzlich wird die Enzymexpression durch eine Kombination der beiden Produkte L-Threonin und L-Isoleucin reprimiert. Das Operon (*thrABC*) kodiert für vier der fünf an der Threoninbio-

synthese beteiligten Enzyme (Čamajová et al. 2002). Die Regulierung der Expression des Threoninoperons erfolgt auf Transkriptionsebene und unterliegt einer starken Kontrolle durch Attenuation (Gardner 1979). Bei hohen intrazellulären L-Threonin- und L-Isoleucinkonzentrationen wird ein Leaderpeptid mit 21 Aminosäureresten (davon 8 x Threonin und 4 x Isoleucin) gebildet welches die Transkription des *thrABC* Operons reprimiert. Bei physiologischen Konzentrationen der Produkte bleibt die Bildung des Leaderpeptids aus, so dass die Transkription des Operons ungehindert erfolgt.

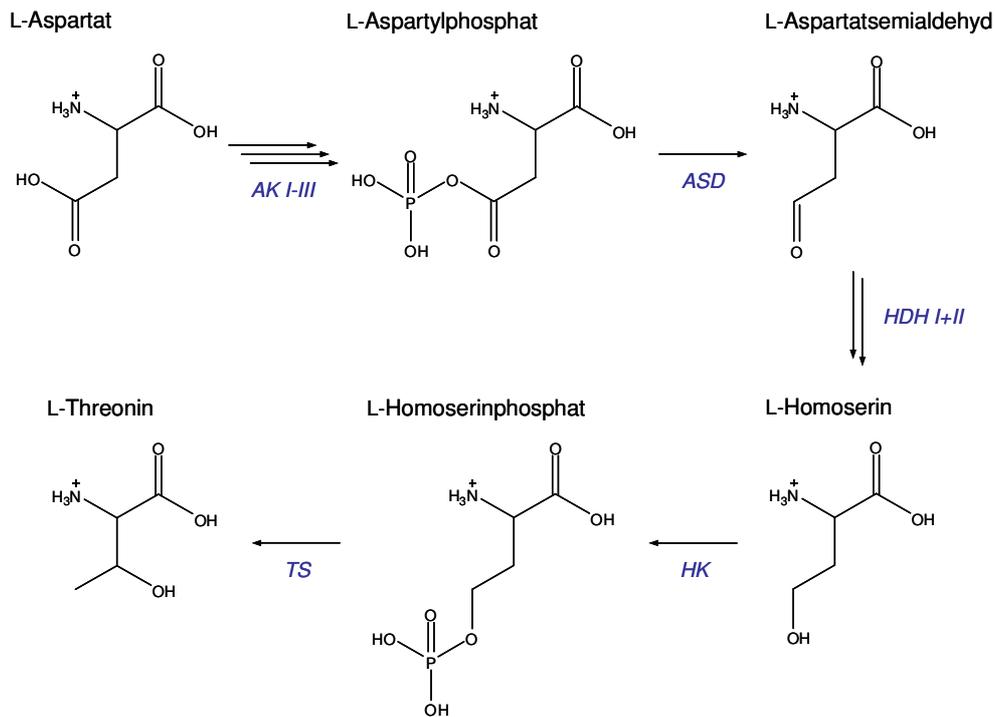


Abbildung 3.14: L-Threoninbiosynthese

Der erste Schritt des Biosyntheseweges in *E. coli* wird von den drei Isoenzymen **Aspartatkinase I-III** (AK I-III) katalysiert, die den Vorläufer L-Aspartat zu L-Aspartylphosphat umsetzen (s. *Abbildung 3.15*).

1. Die Aspartatkinase I (*thrA*) ist für die Threoninbiosynthese verantwortlich, ihre Aktivität wird durch L-Threonin allosterisch feedback inhibiert, und ihre Synthese durch L-Threonin und L-Isoleucin reprimiert.
2. Die Expression der Aspartatkinase II (*metL*) wird durch L-Methionin reprimiert. Das Expressionslevel der AK II ist verglichen mit den anderen Isoenzymen allerdings gering (Chassagnole et al. 2001).
3. L-Lysin reguliert die Aktivität der für die Lysinbiosynthese verantwortlichen Aspartatkinase III und reprimiert die Expression des kodierenden Gens *lysC* (Debabov 2003).

Eine Besonderheit von *thrA* und *metL* ist die Kodierung der bifunktionalen Enzyme **Aspartatkinase I / II - Homoserindehydrogenase I / II**. Die beiden Isoenzyme katalysieren zwei nicht aufeinander folgende Reaktionen. Zunächst die Phosphorylierung von L-Aspartat zum L-β-Aspartylphosphat (unter ATP-Verbrauch) und nach einem Zwischenschritt die NADPH+H<sup>+</sup> abhängige Reduktion des L-Aspartat-β-semialdehyd (ASA) zum L-Homoserin (s.

Abbildung 3.15). Das dritte monofunktionale Enzym Aspartatkinase III katalysiert lediglich die Phosphorylierung von L-Aspartat (Čamajová et al. 2002).

Die zweite Reaktion der L-Threoninbiosynthese ist die Bildung von L-Aspartat- $\beta$ -semialdehyd durch eine NADPH+H<sup>+</sup> abhängige reduktive Dephosphorylierung von L- $\beta$ -Aspartylphosphat. Das katalysierende Enzym, die **Aspartatsemialdehyd Dehydrogenase** (ASD) wird durch das Gen *asd* kodiert. Die Regulierung der Expression von *asd* in *E. coli* erfolgt prinzipiell über L-Lysin (Reduktion um bis zu Faktor 50). L-Methionin und L-Threonin haben nur geringen Einfluss (Reduktion um bis zu Faktor 2), außerdem wird die Repression durch Glucose-6-Phosphat reguliert (Čamajová et al. 2002, Debabov 2003, Haziza et al. 1982). James und Viola (2002) diskutierten *Channeling* (= direkte Weitergabe eines Enzymproduktes an das folgende Enzym) von L- $\beta$ -Aspartylphosphat durch Ausbildung eines Proteinkomplexes zwischen AK / HD und ASD. Auf diese Weise würde der labile Metabolit direkt weiterreagieren, wodurch Verluste durch Hydrolyse in Lösung minimiert und die Effizienz des Biosyntheseweges erhöht wären.

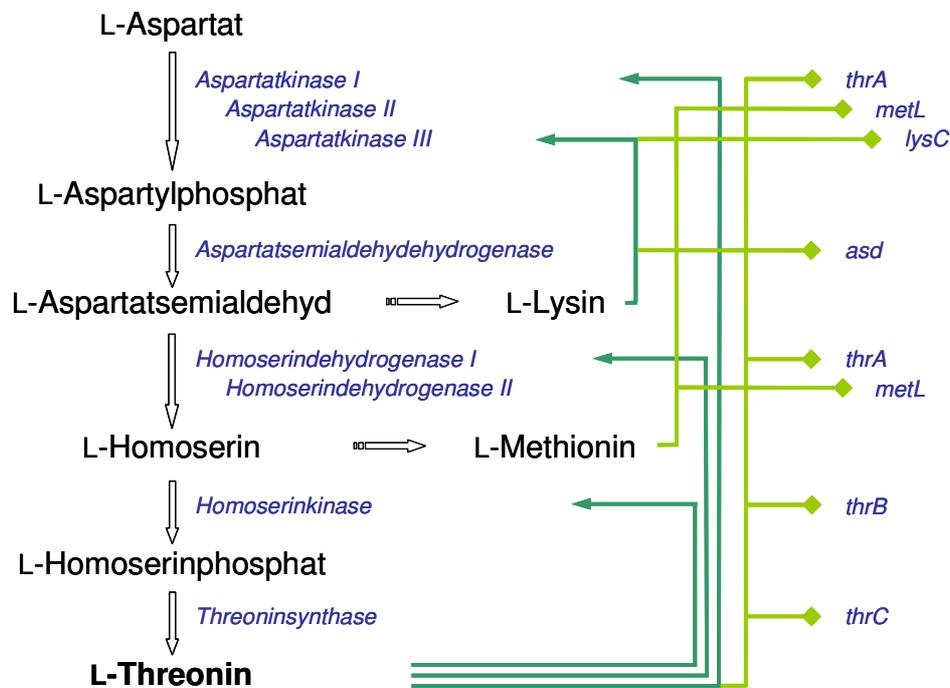


Abbildung 3.15: Threoninbiosynthese in *E. coli* – dunkelgrüne Pfeile markieren Inhibition der Enzyme, hellgrüne Vierecke Repression der Gene

Die **Homoserinkinase** (HK, Gen *thrB*) katalysiert die Umsetzung von L-Homoserin zu L-Homoserinphosphat in Anwesenheit von ATP. Es ist das erste Enzym in der Synthesekette, das ausschließlich zum Produkt L-Threonin (bzw. L-Isoleucin) führt. Durch hohe Substratkonzentrationen wird die Aktivität der HK reduziert (> 1 mM L-Homoserin, > 3 mM ATP), außerdem erfolgt eine kompetitive Inhibition durch L-Threonin, L-Isoleucin und L-Lysin (Chassagnole et al. 2001). Für die Enzym-Substratbindung des Homoserins sind relativ hohe Konzentrationen an Magnesium-Ionen erforderlich (zwischen 20 und 30 mM Mg<sup>2+</sup> für maximale Aktivität, Burr et al. 1976).

Das letzte Enzym der Threoninbiosynthese, die **Threoninsynthase** (TS, *thrC*) katalysiert die Pyridoxal-5-phosphat abhängige Umsetzung von L-Homoserinphosphat zu L-Threonin und anorganischem Phosphat. Über die komplexe Reaktion ist lediglich bekannt, dass die Threoninsynthase substratspezifisch ist und keine physiologischen Effektoren hat (Chassagnole et al. 2001).

### 3.4.7 L-Threoninkatabolismus

L-Threonin kann intrazellulär zu  $\alpha$ -Ketobuttersäure, L-2-Amino-3-ketobuttersäure oder Glycin und Acetaldehyd abgebaut werden. In *E. coli* sind vier am Abbau von L-Threonin beteiligte Enzyme beschrieben (s. *Abbildung 3.16*).

Die Enzyme Threonindeaminase (auch unter Threonindehydratase bekannt, Gen *ilvA*) und katabole Deaminase (Gen *tdcB*) katalysieren den Abbau zu  $\alpha$ -Ketobuttersäure und Ammoniak. Das Abbauprodukt  $\alpha$ -Ketobuttersäure wird entweder zu Isoleucin oder Propionat weiter umgesetzt. Als Kohlenstoffquelle kann es in *E. coli* nur unter anaeroben Bedingungen genutzt werden. Die Inhibierung der Threonindeaminase erfolgt bereits durch geringe Mengen an L-Isoleucin. Die katabole Deaminase wird nur unter anaeroben Bedingungen induziert, weshalb der Katabolismus über  $\alpha$ -Ketobuttersäure in industriellen Fermentationen nicht relevant ist (Debabov 2003).

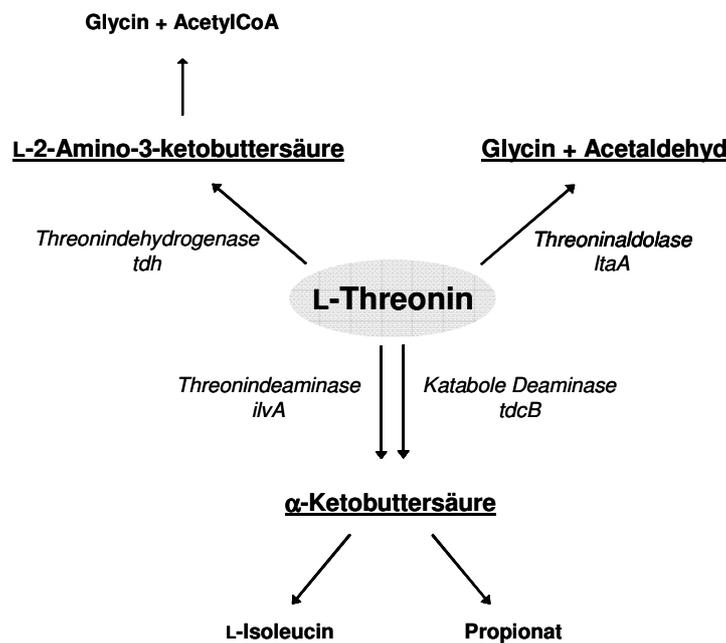


Abbildung 3.16: Threoninabbau in *E. coli*

Das am besten charakterisierte Enzym ist die Threonindehydrogenase (Gen *tdh*). Es katalysiert die NAD abhängige Umsetzung von L-Threonin in das instabile Intermediat L-2-Amino-3-ketobuttersäure. Das Produkt decarboxyliert entweder spontan zu Aminoaceton und CO<sub>2</sub> oder wird in einem zweiten enzymatischen Schritt (2-Amino-3-ketobuttersäure CoA Ligase, Gen *kb1*) zu AcetylCoA und Glycin katabolisiert. Dieser zweistufige Abbau ist der Hauptweg der Threoninverwertung und gleichzeitig eine alternative Route der Glycin- und Serinbiosynthese in *E. coli* [8].

Ein weiteres am katabolen Threoninstoffwechsel beteiligtes Enzym ist die Threoninaldolase (Gen *ItaA*), die L-Threonin in Glycin und Acetaldehyd spaltet. Trotzdem die Threoninaldolase in der KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* <sup>[9]</sup>) Datenbank für den Organismus *E. coli* K-12 MG 1655 aufgeführt ist, konnte die Aktivität des Enzyms in *E. coli* Wildtyp bisher nicht detektiert werden (Marcus und Dekker 1993, Liu et al. 1998).

### 3.4.8 L-Threonintransport

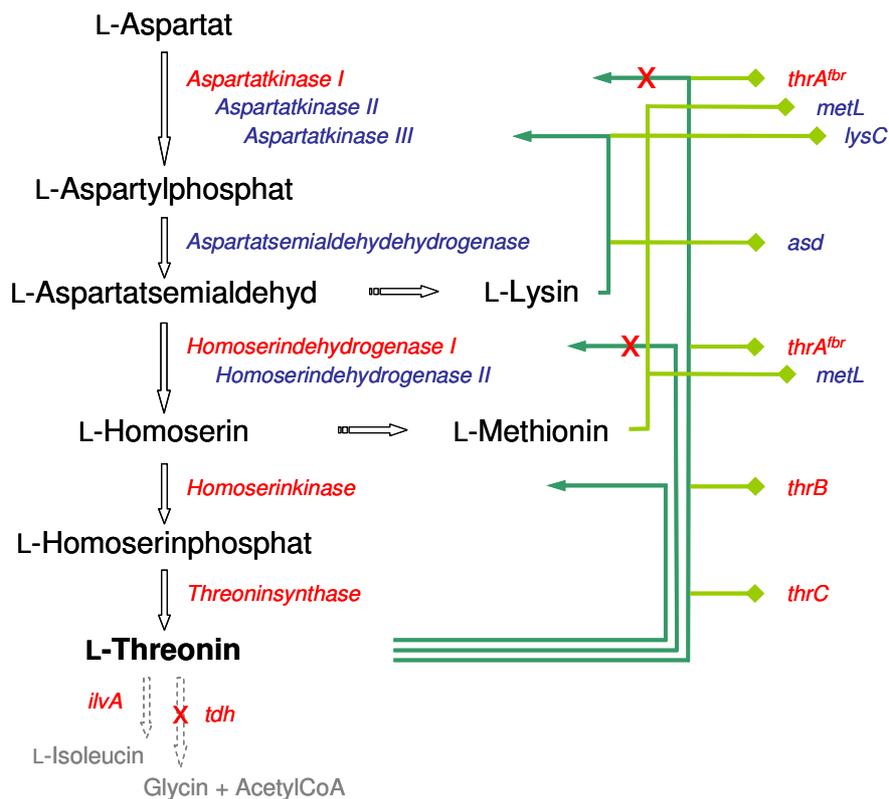
In Produktionsfermentationen müssen Aminosäuren die Zytoplasmamembran nach der Biosynthese entweder passiv oder aktiv passieren. Die Durchquerung der Membran, entweder durch Diffusion oder mit Hilfe eines *Carrier*-Systems, ist von der Eigenschaft der jeweiligen Aminosäure und der Aktivität vorhandener Transportsysteme abhängig (Čamajová et al. 2002). Dabei kann der Transport limitierend für die Produktion sein, wenn eine intrazelluläre Produktakkumulation zur Unterdrückung der Biosynthese führt. Somit kann der Export die Stoffflüsse aus der Zelle kontrollieren und trägt in diesem Fall entscheidend zur Produktivität eines Organismus bei. Arbeiten von Krämer (1996) haben gezeigt, dass Aminosäuren die Plasmamembran auch unter Produktionsbedingungen nicht passiv überwinden können. Trotzdem ist es zur Verhinderung der *Feedback* Inhibierung wichtig, die intrazelluläre Aminosäurekonzentration gering zu halten.

Die Hypothese, dass die Produktkonzentration im Zytoplasma durch energieabhängige, aktive Exportsysteme auf einem physiologischen Level gehalten wird, wurde mittlerweile für viele Aminosäuren bestätigt (Krämer 2004). In *E. coli* wurden zunächst die Threoninexporter *RhtB* und *RhtC* (*Rht* = *resistance against homoserine and threonine*) identifiziert, die einer großen Superfamilie von Transportern angehören (Zakataeva et al. 1999). 2003 identifizierten und charakterisierten Livshits et al. (2003) das Gen *rhtA*, nach dessen Überexpression *E. coli* hohe Konzentrationen an L-Threonin, L-Homoserin und anderen Aminosäuren (sowie deren Analoga) toleriert. Gleichzeitig wird die Exkretion von L-Threonin und L-Homoserin gefördert.

Auch Aminosäureaufnahmesysteme können der Aminosäureproduktion entgegen wirken, da einerseits Energie durch den Ex- und Re-Import des Produktes in einem „*futile cycle*“ verschwendet wird und andererseits die intrazelluläre Produktkonzentration steigt, so dass *Feedback* Inhibierung und Repression die Biosynthese unterdrücken können. Für *E. coli* sind drei L-Threonin Aufnahmesysteme beschrieben, LIV1, SstT und TdcC, wobei das TdcC-System ausschließlich unter anaeroben Bedingungen aktiv ist (Čamajová et al. 2002). Auch die Aktivität des LIV1-Systems ist unter Produktionsbedingungen vernachlässigbar (Kruse et al. 2001). Das dritte Threoninaufnahmesystem SstT ist unter aeroben Bedingungen in Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle aktiv (Kruse 2000). Kruse et al. (2001) zeigten, dass die L-Threoninaufnahme in *E. coli* Produktionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp signifikant vermindert ist.

### 3.4.9 Entwicklung von L-Threoninproduktionsstämmen

Bei der Entwicklung von *E. coli* Threoninproduzenten (s. *Abbildung 3.17*) aus *E. coli* Wildtyp K 12 (s. *Abbildung 3.15*) kamen sowohl Methoden der klassischen Mutation, als auch moderne Techniken der Stammoptimierung zum Einsatz. Nach Mutagenese mit Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine wurden  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -hydroxyvaleriansäure (L-Threonin Analogon) resistente Stämme generiert, und der effektivste Threoninüberproduzent selektiert. Es stellte sich heraus, dass die AK I / HD I (*thrA*) feedback resistent gegen L-Threonin ist, und die Threonindeaminase Aktivität (*ilvA*, s. *Kapitel 3.4.7*) um Faktor 80-90 reduziert war. Die *ilvA* Mutation führte zu Stämmen mit L-Isoleucin Defizit, wobei die L-Isoleucinunterversorgung die Attenuation des Threoninoperons (*thrABC*) verhindert (s. *Kapitel 3.4.6*). Anschließend wurde das Hybridplasmid pYN7 (*thrA<sup>ibr</sup>BC*) in den Stamm transformiert. Die Mutation im Gen *ilvA* beinhaltet einen Selektionsvorteil für Zellen die das Hybridplasmid pYN7 tragen, da die Isoleucinbildung nur so lange erfolgt, wie die hohe intrazelluläre L-Threoninkonzentration den Defekt kompensiert. Beim Verlust des Plasmids wird der Stamm L-Isoleucin auxotroph und die Vermehrung wird gestoppt (Debabov 2003).



*Abbildung 3.17: Threoninbiosynthese in E. coli Produktionsstämmen – dunkelgrüne Pfeile markieren Inhibierung der Enzyme, hellgrüne Vierecke Repression der Gene*

Da die industrielle Produktion mit kostengünstigen Substraten wie Melasse (Kohlenstoffquelle Saccharose) erfolgt, ist die Saccharoseverwertbarkeit ein wichtiger Aspekt für die Rentabilität der fermentativen L-Threoninproduktion. Aus diesem Grund wurden die L-Threoninüberproduzenten weiter optimiert um Saccharoseverwertbarkeit und L-Threoninresistenz zu

erreichen. Auf einem Saccharose-assimilierenden Stamm wurde zunächst der Bakteriophage P1 angezogen und in den Threoninproduzenten transduziert. Anschließend folgte die Selektion der Transduktante mit der effektivsten Saccharose Verwertung. Toleranz gegenüber hohen L-Threonin und L-Homoserinkonzentrationen wurde durch Selektion des Stammes auf M9-Medium mit 5 g/L L-Threonin erzielt. Der Hauptabbauweg des L-Threonin zu Glycin über die Threonindehydrogenase (s. *Abbildung 3.16*) wurde im effektivsten Produzenten dieser Stammlinie (*E. coli* BKIIM B-3996) durch Transduktion des Bakteriophagen P1 (Transposon im *tdh*-Gen) geblockt. Anschließend folgte die Fusion von pYN7 und Vektor pAYC32 zum pVIC40 Hybridplasmid (pYN7 kodiert das Threoninoperon (*thrA<sup>br</sup>BC*) und pAYC32 implementiert Streptomycinresistenz). Das Hybridplasmid pVIC40 wurde dann in den Produktionsstamm *E. coli* BKIIM B-3996 kloniert (Debabov et al. 1992).



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Charakterisierung der untersuchten *E. coli* Stämme

Der Wildtyp ***E. coli* K 12 MG 1655** (*E. coli* MG 1655), aus der Stammsammlung des Instituts für Biotechnologie 1 wurde von der Forschungszentrum Jülich GmbH (Jülich, Deutschland), zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um den Wildtyp, der *E. coli* DM 1265 genetisch am nächsten steht. Er wurde kultiviert um den Stoffwechselzustand unter natürlichen Bedingungen darzustellen.

Der L-Threonin Produzent ***E. coli* DM 1265** weist eine *feedback* resistente Asparatkinase I / Homoserindehydrogenase I und eine reduzierte Threonindeaminase Aktivität auf. Der Stamm wächst auf Saccharose und ist resistent gegen mindestens 5 g/L L-Threonin. Er zeichnet sich durch eine hohe Stabilität aus, die Selektion erfolgt über Ampicillinresistenz (Hermann und Rieping 2003). Bei der Darstellung des L-Threoninproduzenten wurde zunächst ein 6,25 kbp langes DNA-Fragment, welches das *thrABC* Operon kodiert, vom Plasmid pYN7 (aus *E. coli* VL334/pYN7, *Russian National Collection of Industrial Microorganisms*, Moskau, Russland) und ein 4,3 kbp langes DNA-Fragment vom Plasmid pBR322 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) isoliert, ligiert und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Das *thrA<sup>thr</sup>BC* Operon stammt aus einem gegen das Threoninanalogen  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -hydroxyvaleriansäure resistenten *E. coli* K12. Nach der Selektion der Klone auf Luria Bertani (LB) Medium mit Ampicillin (50  $\mu$ g/mL) wurde das Plasmid erneut isoliert und mit der Region *parB* (629 bp) des Plasmids pKG1022 ligiert (Gerdes 1988). Das resultierende Plasmid pYN7*parB* wurde in *E. coli* ATCC98082 (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA; Debatov et al. 1997) transformiert und als *E. coli* DM1265 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur (Braunschweig, Deutschland) unter der Nummer DSM12790 hinterlegt. Der Stamm wurde von der Degussa AG (Halle, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Der L-Threonin Produzent ***E. coli* BKIIM B-3996** (*E. coli* BKIIM) enthält das rekombinante Plasmid pVIC40 und ist seit dem 19. November 1987 bei der Stammsammlung des USSR *Antibiotics Research Institute* (Moskau, Russland) CIS unter der Reg. Nr. 1867 hinterlegt. Er wird durch L-Threonin und L-Homoserin nicht *feedback* inhibiert und produziert während einer 36 h Fermentation 85 g/L L-Threonin. Der Stamm trägt plasmidkodiert Gene der L-Threonin-biosynthese (*thrA<sup>thr</sup>*, *thrB* und *thrC*) und eine Streptomycinresistenz ( $Sm^r$ ). Das Gen *thrA<sup>thr</sup>* kodiert für das *feedback* resistente bifunktionelle Enzym Aspartatkinase I / Homoserindehydrogenase I, *thrB* für die Homoserinkinase und *thrC* für die Threoninsynthese (Debatov et al. 1992). *E. coli* BKIIM B-3996, wurde in mehreren Stufen aus *E. coli* VNIIgenetika M-1 hergestellt. Er zeichnet sich im Vergleich zum Vorgängerstamm durch eine höhere Plasmidstabilität aus. L-Threonin und L-Homoserin *Feedback* Resistenz wurde durch Selektion von VNIIgenetika M-1 in M9-Medium mit 5 mg/mL L-Threonin erzielt. Anschließend wurde der Threoninabbau zum Glycin durch Transduktion des Bacteriophagen P1 (Transpo-

son im *tdh*-Gen) geblockt. Es folgte die Fusion von pYN7 und Vektor pAYC32 zum pVIC40 Hybridplasmid (pYN7 kodiert das Threonin Operon *thrA<sup>fbr</sup>BC* und pAYC32 implementiert Streptomycinresistenz). Die genetischen Veränderungen beruhen teilweise auf spontaner Mutation, aber auch auf gezielter genetischer Transformation (Debabov et al. 1992). Der Stamm wurde beim *Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms* (Moskau, Russland) erworben.

Basierend auf Ergebnissen dieser Arbeit (s. *Kapitel 5.6*) wurde die L-Threonin produzierende Mutante ***E. coli* B-3996 pMW118P*thrB*** (*E. coli* P*thrB*) kloniert. Der Stamm ist ein *E. coli* BKIIM Derivat (s. o.), der ein zweites Plasmid enthält, auf welchem die Homoserinkinase zusätzlich exprimiert wird. Hierfür wurde das Gen *thrB* in den low copy Vektor pMW118 (Ampicillin resistent) kloniert und in *E. coli* BKIIM transformiert. Die Klonierung basierend auf *E. coli* BKIIM wurde von der Degussa AG (Halle, Deutschland) durchgeführt.

### 4.2 Stammhaltung

Zur Archivierung werden Kryokulturen der Stämme angelegt, die aus 50 % (v/v) einer über Nacht kultivierten LB-Kultur (gegebenenfalls mit Antibiotikum, s. *Kapitel 4.1*) und 50 % (v/v) sterilem Glycerin bestehen. Glycerin verhindert die Bildung von Gefrierkristallen und gewährleistet schonendes Einfrieren und Auftauen der Kulturen ohne die Zellen zu schädigen. Die Organismen werden im Schüttelinkubator (3033, GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland) herangezogen (37 °C, 150 *revolutions per minute* (rpm), für 12-18 h). Bei einer optischen Zelldichte von 3-5 (OD<sub>600</sub>) wird die Zellsuspension in 100 %iges Glycerin gegeben, jeweils 2 mL in Nalgene®-Kryoröhrchen (5000, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark) aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 4.3 Vorkultivierung

Die Threoninproduzenten *E. coli* BKIIM, DM 1265 und *pthrB* (s. *Kapitel 4.1*) werden auf Minimal Medium Agar-Platten (Hermann und Rieping 2003) ausgestrichen (*E. coli* MG 1655 auf LB-Agar-Platten) und für 2-5 Tage bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Platten bei 4 °C 3-4 Wochen gelagert.

Die Inokulierung der Schüttelkultur (Debabov et al. 1992, Hermann und Rieping 2003) erfolgt durch Impfösenabstrich von der Agar-Platte (DMR 90 mm, Anicrin, Scorze, Italien) in 500 oder 1000 mL Erlenmeyerkolben mit Schikanen (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland), die mittels Alukappen als Sterilbarriere verschlossen werden. Die Kolben verfügen über eine mittels einer Siliconmembran verschlossene zusätzliche Öffnung zur sterilen Probenahme. Die Organismen werden in 50-100 mL Medium stammabhängig für 15-40 h kultiviert (37 °C, 150-180 rpm). Die Probenahme zur Verfolgung des Wachstums über die optische Zelldichte (OD<sub>600</sub>), den pH-Wert und die Glucosekonzentration erfolgt mittels

einer sterilen Einwegspritze mit Kanüle (Injekt 2 mL, Sterican (0,9 x 70 mm), B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland).

## **4.4 Fermentation**

### **4.4.1 Sensor Reaktor**

Der Sensor Reaktor (El Massaoudi et al. 2003, s. *Abbildung 4.1*) ist ein vollständig automatisiertes mobiles System, das mit dem Ziel entwickelt wurde Parallelfementationen im *Master/Slave* Modus mit Produktionsfermentern (bis 1000 L) durchzuführen. Durch Inokulierung des Sensor Reaktors aus einem Fermenter höheren Maßstabs ist es möglich, den physiologischen Zustand der Produktionskultur zu simulieren und Markierungsexperimente durchzuführen, die im großtechnischen Maßstab sehr kostenintensiv wären. Neben dem Parallelbetrieb kann der Reaktor auch autark in allen reaktionstechnischen Betriebsweisen betrieben werden. Der Prototyp des Reaktors wurde von El Massoudi (2003) entwickelt. Die Weiterentwicklung der schnellen Probenahme erfolgte durch Karsten Grönke <sup>[16]</sup>. Der Bioreaktor besteht aus einem Edelstahlrührkessel (Sonderanfertigung Infors AG, Basel, Schweiz) mit einem Volumen von 2 L (Arbeitsvolumen 0,3 – 1,2 L). Zwei, über ein Teflonlager mit dem Deckel verbundene, Scheibenrührer werden über eine Magnetkupplung angetrieben (max. 1600 U/min). Zusätzlich verfügt der Rührkessel über Strombrecher, die zur Erhöhung des Sauerstoffeintrags eine turbulente Strömung erzeugen. Der Abgasstrom wird mittels Wasser gekühlt um Verdunstung zu vermeiden. Die Reaktortemperatur wird über einen äußeren Heizmantel und eine mit Kühlwasser durchflossene Rohrschlaufe im Innern des Reaktors reguliert. Die Regelung von Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck und Überdruck (Piezosensor im Abgaskühler, Cooler ECP, M&C TechGroup Germany GmbH, Ratingen, Deutschland) erfolgt über entsprechende Elektroden und *softwareseitig* implementierte Proportional-Integral-Differentiell (PID)-Regler.

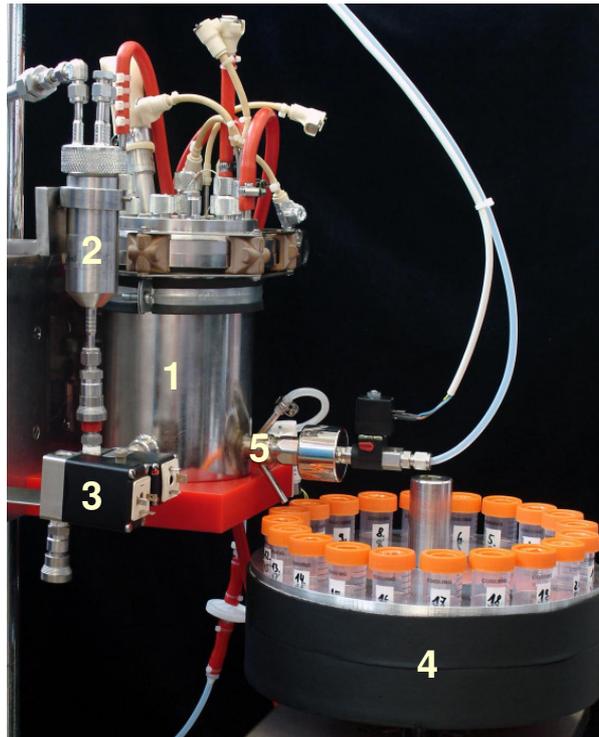


Abbildung 4.1: Sensor Reaktor mit schneller Probenahme  
1: Edelstahlrührkessel, 2: Vorlagebehälter der Pulsmarkierungseinheit, 3: Pulsventile,  
4: motorisierter Probenahmeteller für 20 Proben, 5: pneumatisches Probenahmeventil

Die Pulsmarkierungseinheit beinhaltet einen Vorlagebehälter aus rostfreiem Edelstahl (Volumen 65 mL) der mit steriler Druckluft (4 bar) beaufschlagt wird. Über Schnellverschlusskupplungen wird der Behälter mit einem System aus zwei Magnetventilen verbunden. Das Pulsventil ist über eine Schnellverschlusskupplung (Swagelok) an den Sensor Reaktor angeflanscht. An der Innenseite des Reaktors befindet sich eine Edelstahldüse, die den Puls direkt auf die Rührblätter lenkt, um kurze Mischzeiten (0,5 – 1 sec) zu gewährleisten (s. *Abbildung 4.2*). Vor dem Einsatz werden die Ventile (Ventiltyp 0330, Firma Bürkert) chemisch mit 5 M Natronlauge sterilisiert und anschließend mit sterilem Wasser neutral gewaschen (El Massaoudi 2003).

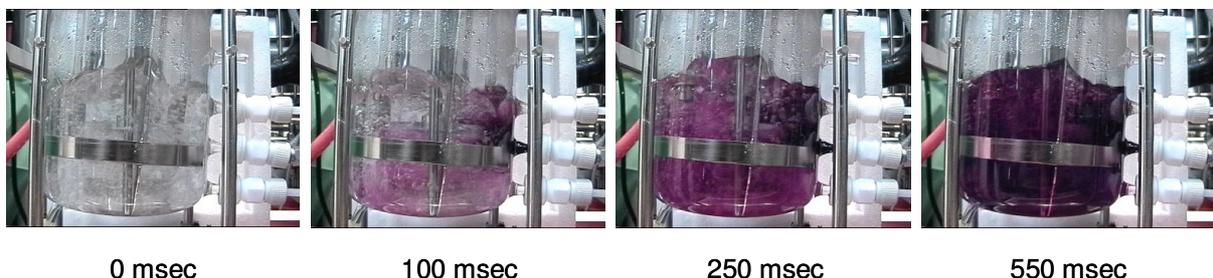


Abbildung 4.2: Visuelle Durchmischung bei der Pulsaufgabe in 4 Teilbildern  
(El Massaoudi 2003, <sup>[10]</sup>)

Die schnelle Probenahme erfolgt über ein pneumatisches Ventil (Druckluft 6 bar) mit geringem Totvolumen (VPAK-PS-ESD/USD/VSD-G, Aerre Inox, Fiesco Cremona, Italien; s. *Abbildung 4.1*, 5). Die Reinigung folgt nach jeder Probenahme automatisch durch einen sterilen Luftstoß (Druckluft 1,5 bar, 30-50 ms, s. *Abbildung 4.3*). Das komplette Ventil kann dampf-

sterilisiert und autoklaviert werden. Zur automatisierten Steuerung des Ventils dient ein Pilot-Minimagnetventil (Typ 6012P, Bürkert GmbH & Co KG, Ingelfingen, Deutschland). Die Reinigung des Ventils nach jeder Probenahme erfolgt mit steriler Luft (1 bar) geregelt über ein Schlauchquetschventil der Firma Bio-Chem (Omnifit Ltd., Cambridge, England).

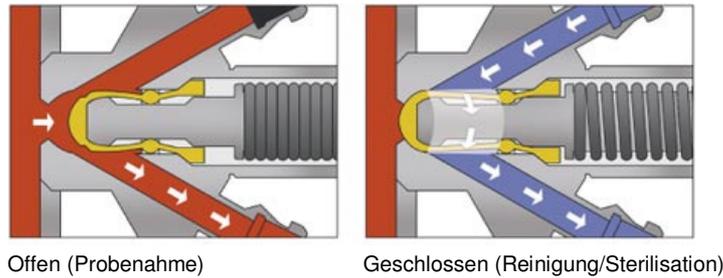


Abbildung 4.3: Pneumatisches Probenahmeventil<sup>[11]</sup>

Der motorisierte Probensteller (8MSA4M.E0-00, B&R Industrie-Elektronik GmbH, Bad Homburg, Deutschland) kann mit bis zu 20 Proben bestückt werden (s. *Abbildung 4.1, 4*). Die Probenahmezeitpunkte für 20 Proben werden über die *Software* programmiert und simultan mit der Pulsaufgabe des markierten Substrats gestartet. Das Probenvolumen wird über die Ventilöffnungszeit definiert und vor dem Start des Experiments auf 5 mL eingestellt. Die automatische Probenahme ermöglicht eine Beprobungsrate des Fermenters von bis zu 3 Proben pro Sekunde.

Die Steuerung des gesamten Sensor Reaktorsystems (Bioreaktor, Prozessdatenübertragung, Markierungsaufgabe und automatisierte schnelle Probenahme) erfolgt über eine SPS (speicherprogrammierbare Steuerung) basierte Steuer- und Regeleinheit. Die Bedienung des Systems erfolgt über ein *Touchpanel*. Temperatur, Druck, pH- und gelöst Sauerstoff werden *softwareseitig* über PID-Regler gesteuert.

#### 4.4.2 Vorbereitung der Fermentation

Vor der Fermentation wird die pH-Elektrode (405 DPAS-SC-K8S-325 *combination*, Mettler Toledo, Giessen, Deutschland) gegen Referenzlösungen (pH-Pufferlösungen, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) bei pH 4 und 7 kalibriert und zusammen mit der pO<sub>2</sub>-Sonde (InPro6800, Mettler Toledo, Giessen, Deutschland) in den Reaktor eingebaut. Das Glucose freie Medium (s. Anhang, Hermann und Rieping 2003) wird in den Reaktor eingefüllt und dieser sorgfältig verschlossen. Anschließend werden alle Anschlüsse mit Alufolie abgedeckt und der Reaktor zusammen mit der separat angesetzten Glucoselösung in den Autoklaven (FOF4/ Thema I AutoclaviSPA T line 2284 ED, Fedegari, Albuzzano, Italien oder Tuttnauer Autoclave Steam Sterilizer 2540 ELV, Tuttnauer, Wesel, Deutschland) gestellt. Alles wird für 30 Minuten bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Medienbestandteile wie z. B. Antibiotika werden steril filtriert und nach dem Abkühlen mit einer Spritze über ein Septum zum Fermentationsmedium gegeben. Die separat autoklavierte Glucoselösung wird über eine Schnellkupplung angeschlossen und mittels einer Schlauchpumpe (Smith&Nephew Watson Marlow, Ilsfeld, Deutschland) bis zur gewünschten Startkonzentration in den Reaktor gepumpt. Die zur Neutralisation verwendete Base wird ebenfalls über eine Schlauchpumpe manuell zudosiert bis der gewünschte pH-Wert eingestellt ist.

Der Reaktor wird auf eine Temperatur von 37°C geregelt und anschließend die Sauerstoffelektrode (InPro6800, Mettler Toledo, Giessen, Deutschland) zuerst mit Stickstoff (N<sub>2</sub>) auf 0 % und dann mit Luft auf 100 % kalibriert. Der Nullwert wird im drucklosen Reaktor ermittelt, der Maximalwert bei einem Volumenstrom von 2 L/min und 0,2 bar Überdruck. Die Rührerdrehzahl beträgt in beiden Fällen 1000 U/min. Zeitgleich erfolgt die Kalibrierung der Abgasanalytik. Hierzu wird der Reaktor für den O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Nullwert mit Stickstoff und für die Kalibrierung des O<sub>2</sub>-Maximalwertes (20,9 %) mit Luft begast. Zur Kalibrierung des maximalen CO<sub>2</sub>-Gehaltes (5 %) wird ein Kalibriergas angeschlossen.

### 4.4.3 Durchführung der Fermentation

Vor Beginn der Fermentation werden die Sollwerte der Regelparameter eingestellt (0 bar, 37°C, 1 L/min, pH 7,0, pO<sub>2</sub> 30 %). Anschließend wird der Reaktor mit einer Schüttelkolbenkultur über eine Schnellkupplung angeimpft und die Fermentation über die Software gestartet.

Nach dem Animpfen wird der Reaktor mit 0,2 bar Überdruck beaufschlagt um Kontaminationen vorzubeugen. Der Rührer ist an den Messwert der pO<sub>2</sub>-Sonde gekoppelt, so dass die Rührerdrehzahl automatisch erhöht wird sobald der Sauerstoffbedarf der Kultur steigt. Bei einer Drehzahl von etwa 950 U/min wird die Luftzufuhr manuell auf 2 L/min erhöht. Nachdem die im Reaktor vorgelegte Glucose auf eine Konzentration von etwa 1 g/L abgesunken ist, wird die Glucosezufuhr gestartet. Die Dosierung der Glucose erfolgt über eine Schlauchpumpe (Smith&Nephew Watson Marlow, Ilsfeld, Deutschland) die mit einer Waage gekoppelt ist auf der die Glucoselösung steht. Somit kann die Glucosezufuhr automatisch gesteuert und eine Glucosekonzentration zwischen 1 und 5 g/L während der Fermentation eingestellt werden.

Zu Beginn und während der Fermentation werden in regelmäßigen Abständen Proben genommen, um den pH-Wert, die Biomassekonzentration und die Substrat- und Produktkonzentrationen zu bestimmen (s. *Kapitel 4.8*).

## 4.5 Online Analytik

Der **pH-Wert** wird über eine autoklavierbare pH-Elektrode (405 DPAS-SC-K8S-325 *combination*, Mettler Toledo, Giessen, Deutschland) erfasst. Vor der Sterilisation erfolgt die Kalibrierung der Elektrode mit zwei Referenzlösungen (pH-Pufferlösungen, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) bei pH 4 und 7. Zur pH-Einstellung während der Fermentation wird 25 %ige Ammoniaklösung über Schlauchpumpen (Smith & Nephew, Watson Marlow, Ilsfeld, Deutschland) in den Fermenter dosiert.

Über eine autoklavierbare Sauerstoffelektrode (InPro6800, Mettler Toledo, Giessen, Deutschland) wird der **Sauerstoffpartialdruck - pO<sub>2</sub>** im Fermenter bestimmt. Die pO<sub>2</sub>-Sonde wird vor der Sterilisation des Bioreaktors eingebaut. Vor Beginn der Fermentation erfolgt die Kalibrierung auf 100 % O<sub>2</sub> bei einer Begasungsrate von 1 L/min, einer Drehzahl von 1000 U/min und 0,2 bar Überdruck. In der Anlage befindet sich ein Drehzahlregler, über den der

$pO_2$ -Sollwert konstant gehalten wird. Die Ober- und Untergrenzen der Rührerdrehzahl können in der Software definiert werden. Bei Erreichen der Drehzahlobergrenze kann entweder der Sollwert des Sauerstoffpartialdrucks herabgesetzt oder die Zuluft hochgesetzt werden.

Der Abgasanalysator (Binos 100 2M, Fisher-Rosemount, Systems GmbH & Co., Haan, Deutschland) wird während der Fermentation von einem konstanten Abgasstrom (1 L/min) durchströmt. Vor Beginn der Fermentation wird eine Kalibrierung des Analysators durchgeführt. Die **Abgasanalytik** von  $CO_2$  erfolgt mittels Nahinfrarotabsorption und von  $O_2$  paramagnetisch. Die Gehalte in % werden über den Prozessrechner erfasst.

Die Parameter Prozesszeit, Zuluft, pH-Wert, Temperatur, Druck, Sauerstoffpartialdruck,  $O_2$  und  $CO_2$  im Abgas sowie die Rührerdrehzahl werden über Sensoren erfasst und als analoge Signale eingespeist. Unter Vorgabe eines Sollwertes erfolgt die Regelung der Parameter pH, Rührerdrehzahl ( $pO_2$ ), Druck und Temperatur mittels PID-Regler automatisch über die Software.

#### **4.6 Schnelle Inaktivierung der Stoffwechselaktivität (Quenching)**

Proben für die Messung intrazellulärer Metabolite werden in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer optischen Dichte von  $\sim 30$  ( $OD_{600}$ ) entnommen. Dies entspricht einer Biotrockenmasse von  $\sim 10$  g/L. Aus dem Sensor Reaktor werden 5 mL Zellsuspension direkt in 15 mL kalte ( $-50$  °C) wässrige Methanollösung (60 % v/v, in Falcon Tubes (50 mL Centrifuge Tube, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) über Nacht bei  $-80$  °C gekühlt) gesprüht, um eine sofortige Inaktivierung der Stoffwechselfvorgänge zu gewährleisten. Anschließend werden die Proben für 5 min bei  $-20$  °C und  $10397 \times g$  zentrifugiert (Avanti™ 30, Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland), der Überstand abdekantiert, die verbleibende Flüssigkeit mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet wie in *Kapitel 4.7* beschrieben aufgeschlossen.

Bei der Probenahme aus anderen Fermentersystemen (s. Lussem 2006 und Zeller 2006) wird mit einem Messzylinder 1 Teil Zellsuspension entnommen und unverzüglich in 3 Teile kalte ( $-50$  °C) wässrige Methanollösung (60 % v/v) gegeben. Im  $-20$  °C Ethanolbad (Thermo-Haake C50P, Phoenix ContiTech AG, Hannover, Deutschland) wird die Suspension unter Schwenken mit einer Vollpipette in 20 mL Aliquote aufgeteilt und wie oben beschrieben weiter bearbeitet.

#### **4.7 Extraktion intrazellulärer Metabolite**

**Chloroformaufschluss** – Die nach dem Quenching (s. *Kapitel 4.6*) erhaltenen Zellpellets werden in 1 mL Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer,  $4$  °C, 1M Tris, 10M EDTA, pH 7) und 1 mL Methanol ( $-80$  °C) unter vortexen (Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA) resuspendiert. Nach Zugabe von 2 mL Chloroform ( $-20$  °C) werden die Proben für 2 h im Überkopf-Mischer (Reax 2, Heidolph, Kelheim, Deutschland) bei  $-20$  °C geschüttelt. Anschließend erfolgt durch Zentrifugieren bei  $-20$  °C und  $10397 \times g$  für 5 min (Avanti™ 30, Beckmann Coulter, Krefeld, Germany) eine Auftrennung in TE-Methanol- (oben), Chloroformphase (unten) und Zelltrümmer (Mitte). Die TE-Methanolphase wird mit einer Pasteurpipette abgenommen und filtriert ( $0,22 \mu\text{m}$ , FP30/0,2 CA, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) um verbliebene Zelltrümmer zu entfernen.

**Kaliumhydroxidaufschluss** – Die nach dem Quenching (s. *Kapitel 4.6*) erhaltenen Zellpellets werden in 0,5 mL kalter ( $-50$  °C) wässriger Methanollösung (60 % v/v) resuspendiert, mit 2 mL kalter ( $-20$  °C) 0,3 M Kaliumhydroxidlösung in Ethanol (25 % v/v) 5 min inkubiert und über Nacht bei  $-80$  °C eingefroren. Nach einem Tau-Gefrier-Zyklus erfolgt eine schrittweise Neutralisation der Proben mit  $\sim 30 \mu\text{L}$  Eisessig ( $4$  °C) bis  $\sim \text{pH } 7$ . Die Zelltrümmer werden für 5 min bei  $10397 \times g$  abzentrifugiert (Avanti™ 30, Beckmann Coulter, Krefeld, Germany) und der Überstand zur Entfernung verbliebener Rückstände filtriert.

**Ethanolauflösung** – 5 mL siedender Ethanolösung 75 %ig (w/w) werden auf die Zellpellets der gequenchten Proben (s. *Kapitel 4.6*) gegeben und das Tube anschließend fest verschlossen. Nach kurzem Homogenisieren mittels Vortex werden die Proben für 3 min im Wasserbad bei 95 °C gekocht. Nach Abkühlung im Kühlbad werden die Proben über Nacht bei -80 °C eingefroren.

**Perchlorsäureauflösung** – Die nach dem Quenching (s. *Kapitel 4.6*) erhaltenen Zellpellets werden in 500 µL 60 %iger (v/v) wässriger Methanolösung (-80 °C) mittels Vortex resuspendiert und mit 2 mL 43,75 %iger Perchlorsäure (-28 °C) versetzt. Nach erneuten Durchmischen (Vortex) werden die Proben 5 Minuten bei -20 °C inkubiert und zum vollständigen Auflösung bei -80 °C über Nacht eingefroren. Nach dem Auftauen der Proben erfolgt eine schrittweise Neutralisation mit 1,2 mL kalt gesättigter Kaliumcarbonatlösung (4°C) bis pH 7 (Indikatorpapier) - die dabei auftretende Schaumbildung kann durch Kühlung mit flüssigem Stickstoff vermindert werden!

**Methanolauflösung** – Die Zellpellets der gequenchten Proben (s. *Kapitel 4.6*) werden mit kaltem Methanol (-20 °C) versetzt und über Nacht bei -80 °C aufgeschlossen.

Nach Chloroform- und Kaliumhydroxidauflösung erhaltene Zellextrakte werden bei -20 °C gelagert und vor der LC-MS/MS Analyse mit demin. Wasser 1:2, 1:10 und 1: 50 verdünnt. Aus Ethanol-, Perchlorsäure- und Methanolauflösungen erhaltene Zellextrakte werden zur Abtrennung von Zelltrümmern für 5 min bei 10397 x g zentrifugiert (Avanti™ 30, Beckmann Coulter, Krefeld, Germany) und die Überstände zur Entfernung verbliebener Rückstände filtriert. Die erhaltenen Zellextrakte werden bei -20 °C gelagert und vor der LC-MS/MS Analyse mit demin. Wasser verdünnt.

**Untersuchung der Stabilität der Metabolite beim Zellaufschluss** – Die Standardlösungen Zentralstoffwechselstandard (ZS-Standard) 100 µM und Aminosäurestandard (AS-Standard) 50 µM wurden wie im Folgenden beschrieben aufgearbeitet. Die erhaltenen Lösungen werden vermessen und dann mit den original ZS- und AS-Standards verglichen um bei der Extraktion auftretende Metabolitverluste zu erfassen (s. *Kapitel 5.5.2*).

Chloroformauflösung – 400 µL AS-Standard, 200 µL ZS-Standard, 1 mL Methanol (- 80 °C) und 400 µL Wasser werden vereint und mit 2 mL Chloroform (-20 °C) versetzt. Das Zweiphasensystem wird für 2 h bei -20 °C im Überkopf-Mischer geschüttelt. Durch anschließendes Zentrifugieren bei -20 °C und 10397 x g erfolgt eine Auftrennung in Chloroform- und wässrige Phase. Die wässrige Phase enthält die polaren Metabolite und wird nach Abtrennung mittels LC-MS/MS vermessen. Die resultierende Lösung enthält die eingesetzten Standardsubstanzen in einer Konzentration von 10 µM.

Kaliumhydroxidauflösung – 400 µL AS-Standard, 200 µL ZS-Standard und 1,4 mL kalter (-20 °C) 0,3 M Kaliumhydroxidlösung in Ethanol (25 % v/v) werden vereint, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und über Nacht bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen der

## Material und Methoden

Proben erfolgt eine schrittweise Neutralisation mit ~20 µL Eisessig (4 °C) bis ~pH 7. Die resultierende 10 µM Lösung wird mittels LC-MS/MS untersucht.

ZS-Standard 100 µM – G6P, F6P, FBP, GAP, DHAP, PEP, Pyr, 2\_3PG, 6PG, R5P, SHK, Ribulose5P, X5P, E4P, AcCoA, CIT\_IsoCIT, AKG, Suc, Fum, Mal, ATP, ADP, AMP, cGMP, NADP, NAD, NADH, NADPH

AS-Standard 50 µM – Amino Acid Standard AAS18-5ML von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Gln, N-Succinyldiaminopimelat (SDAP), Trp, Asn, Ind, Hse, Anthr, α-Aminopimelat (α-AP), 2,6-Diaminopimelat (DAP) und ASA

## 4.8 Offline Analytik

### 4.8.1 Biomassekonzentration

Die **optische Dichte** (OD) wird anhand eines Zweistrahlenspektrophotometers (UV-1700 Pharma Spec, Shimadzu, Duisburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %ig) vermessen. Im Extinktionsbereich von 0,1 – 0,8 besteht ein linearer Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Zellkonzentration. Die Proben werden für diesen Messbereich entsprechend verdünnt.

Die Bestimmung der **Biotrockenmasse** (BTM) erfolgt gravimetrisch. Hierzu werden 2 mL Eppendorftubes für 24 h im Trockenschrank bei 70 °C getrocknet. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wird eine Leergewichtsbestimmung ( $m_{\text{leer}}$ ) vorgenommen. 2 mL (V) der Zellsuspension werden in die Probengefäße pelletiert (Heraeus Biofuge<sup>®</sup> pico, Kendro Laboratory Products International Sales, Hanau, Deutschland, 12000 · g min<sup>-1</sup>, 5 min), bei 70°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und erneut gewogen ( $m_{\text{voll}}$ ). Die Biotrockenmassekonzentration errechnet sich anschließend nach der folgenden Gleichung:

$$\text{BTM} = (m_{\text{voll}} - m_{\text{leer}}) \cdot V^{-1}$$

Der Zentrifugationsüberstand wird für die Bestimmung der extrazellulären Metabolite, Phosphat und die enzymatische Glucosebestimmung verwendet.

### 4.8.2 pH-Wert

Die offline Messung des pH-Wertes wird bei Kultivierungen in Schüttelkolben und als Referenzmessung bei Fermentationen an einem pH-Meter (632 pH-Meter, Metrohm, Filderstadt, Deutschland) durchgeführt. Der pH-Wert wird mit einer Gel-pH-Elektrode (Fermprobe Housing, Broadley James, Bedford, UK) gemessen, die zuvor gegen Referenzlösungen (pH-Pufferlösungen, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) bei pH 4 und 7 kalibriert wird.

### 4.8.3 Membranintegritätstest

Die Integrität der Zellmembran nach dem Methanolquenching wird mit dem Live/Dead® BacLight™ Viabilitätstest (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) untersucht (s. *Kapitel 5.4*). Dieser Assay beruht auf der Messung der Fluoreszenz zweier Nucleinsäureinterkalatoren (SYTO®9 und Propidiumiodid). Die beiden Farbstoffe unterscheiden sich in der Fähigkeit, die intakte bakterielle Zellmembran zu passieren. Für SYTO®9 stellt die Zellmembran keine Barriere dar, so dass der grüne Fluoreszenzfarbstoff in alle Zellen ungehindert eindringt. Propidiumiodid hingegen kann die intakte Membran lebender Zellen nicht passieren. Es dringt somit nur in perforierte Zellen vor, konkurriert dort mit SYTO®9 und lässt die Zellen rot fluoreszieren.

Bei der Anwendung des Assays werden jeweils 3 µL der Farbstofflösungen in 1 mL demin. Wasser vereint. Die Zellsuspensionen werden nach dem Methanolquenching auf eine optische Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,05 verdünnt. Jeweils 100 µL der Farbstofflösung und der verdünnten Zellsuspension werden in die Kavität einer Mikrotiterplatte (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) überführt, mit Alufolie abgedeckt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Mikrotiterplatte im Plattenreader (Wallac Victor<sup>2</sup>, PerkinElmer, Bad Wildbad, Deutschland) bei Anregungswellenlängen von 485 und 535 nm und einer Emissionswellenlänge von 615 nm vermessen. Das Verhältnis der Fluoreszenz der interkalierten Farbstoffe ist ein Maß für die Durchlässigkeit der Membran. Als positiv und negativ Vergleich werden unbehandelte Zellen und mit 100 % Methanol behandelte Zellen parallel aufgearbeitet.

### 4.8.4 Extrazelluläre Analytik

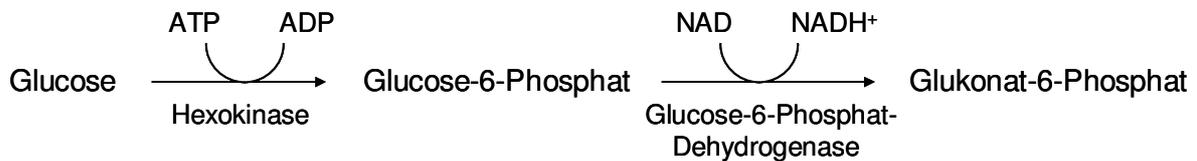
Für die Analytik der extrazellulären Metabolite der unterschiedlichen Fermentationsphasen, werden die bei der Bestimmung der Biotrockenmasse (s. *Kapitel 4.8.1*) gewonnenen Zentrifugationsüberstände bis zur Vermessung bei -20 °C gelagert.

#### 4.8.4.1 Glucose

Zur **Glucoseschnellbestimmung** werden ACCU-CHEK® Sensor Comfort Teststreifen für Diabetiker von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Auf einem Einmalteststreifen ist das Enzym Glucoseoxidase immobilisiert, welches Glucose zu Glucosylakton und Wasserstoffperoxid umsetzt. Die Wasserstoffperoxidbildung ist proportional zur Glucosekonzentration und wird amperometrisch bestimmt. Der Messbereich des Biosensors liegt zwischen 0,1 und 6 g/L Glucose. Der Teststreifen wird in das Gerät eingeführt, anschließend werden etwa 10-20 µL des Kulturüberstandes (nach Bedarf verdünnt) auf den Teststreifen aufgebracht. Nach 30 Sekunden kann das Ergebnis abgelesen werden.

Die quantitative Bestimmung der Glucosekonzentration erfolgt mittels **Enzymassay**. Bei der Reaktion wird Glucose durch das Enzym Hexokinase in Gegenwart von ATP zu Glucose-6-Phosphat (G6P) phosphoryliert und dann durch das Enzym Glucose-6-Phosphatdehydrogenase in Gegenwart des Cofaktors NAD zu Glukonat-6-Phosphat umge-

setzt (s. *Abbildung 4.4*). Die Reduktion von NAD zu NADH<sup>+</sup> ist direkt proportional zur Glucosekonzentration und kann aufgrund der UV-Aktivität des Cofaktors bei  $\lambda = 340 \text{ nm}$  verfolgt werden.



*Abbildung 4.4: Enzymatische Umsetzung von Glucose*

Auf eine UV-Mikrotiterplatte wird eine 8-Punkt Standardreihe in Wasser als Doppelansatz pipettiert. Die Proben werden ebenfalls in Doppelbestimmung in die verbleibenden Kavitäten pipettiert. Nach Zugabe aller Reagenzien (Puffer, Cofaktoren und Enzyme) wird die Platte mit Parafilm abgedeckt und für 45 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert (TitraMax 100, Molecular Devices Beckman, Sunnyvale, CA, USA). Nach der enzymatischen Umsetzung folgt die Messung im Plattenreader (ThermoMax, Molecular Devices Beckman, Sunnyvale, CA, USA).

#### 4.8.4.2 Phosphat

Die Bestimmung der Phosphatkonzentration erfolgt im Kulturüberstand mittels des Reflectoquant® Phosphattests (Merck, Darmstadt, Deutschland) <sup>[12]</sup>. Orthophosphat-Ionen ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) bilden in Verbindung mit Molybdat-Ionen in schwefelsaurer Lösung Molybdato-phosphorsäure. Die Molybdato-phosphorsäure wird dann mit Ascorbinsäure zu Phosphomolybdänblau reduziert und dessen Konzentration reflektometrisch bestimmt.

Für die Messung wird der Kulturüberstand mit 0,9 %iger NaCl-Lösung in einen Bereich zwischen 5-120 mg/L Phosphat verdünnt. 1 mL der Probe wird mit einem Tropfen Reagenz 1 vermischt und ein Teststreifen für ca. 2 Sekunden in die Mischung getaucht. Zeitgleich wird die Starttaste am Reflektometer betätigt. Nach 90 Sekunden wird der Teststreifen in das Reflektometer eingeführt und die Phosphatkonzentration ermittelt. Der Phosphattest wird sehr stark durch die Matrix beeinflusst, weshalb die Ergebnisse lediglich verwendet werden, um die relative Abnahme des verfügbaren Phosphats zu erfassen.

#### 4.8.4.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die im Folgenden beschriebenen Hochleistungsflüssigkeits (HPLC)-Messungen wurden von P. Makus durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels der Chromeleon 6.4, Chromatographie *Software* von Dionex (Idstein, Deutschland).

#### Organische Säuren

Die organischen Säuren Pyruvat, Shikimat, Orotsäure, Uracil, Citrat, Lactat, Acetat und Fumarat werden mittels Ionen-Ausschluss-Chromatographie aufgetrennt. Der saure Eluent polarisiert die undissoziiert vorliegenden Analyten, so dass diese mit der stationären Phase (Kationentauscher) wechselwirken. Die Elution erfolgt isokratisch mit 0,1 M Schwefel-

säure (0,5 mL/min, S1000, Sykam, Fürstenfeldbruck, Deutschland) bei 40 °C (S4110, Sykam, Fürstenfeldbruck, Deutschland) auf einer Aminex HPX-87H Säule (300 x 7,8 mm, Bio-Rad, München, Deutschland). Die Injektion von 100 µL der 1:10 verdünnten (Microlab 1000, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) Fermentationsüberstände erfolgt durch einen kühlbaren Autosampler (4-5 °C, S5200, Sykam, Fürstenfeldbruck, Deutschland). Die eluierenden organischen Säuren werden mit einem Dioden-Array-Detektor (UVD 3440S, Dionex, Idstein, Deutschland) bei  $\lambda = 215, 200$  und 275 nm detektiert. Bei jeder Messserie werden neben den Fermentationsproben zwei Standardlösungen vermessen (OS4: Pyruvat 0,5 mM, Orotsäure 0,01 mM, Shikimat 0,01 mM, Uracil 0,01 mM und OS5: Citrat 0,2 mM, Fumarat 0,01 mM, Acetat 1 mM, Lactat 1 mM). Die quantitative Auswertung erfolgt bei einer Wellenlänge von 215 nm über 1-Punkt Kalibrierung.

### Aminosäuren

Die chromatographische Trennung der polaren Aminosäuren erfolgt auf einer Umkehrphase. Um eine ausreichende Retention auf der hydrophoben Phase zu gewährleisten ist eine Derivatisierung der Aminosäuren notwendig. Diese erfolgt mit dem Derivatisierungsreagenz o-Phtaldialdehyd (OPA) in Gegenwart von Mercaptoethanol. Die Carbonylfunktion des OPA reagiert mit den primären Aminogruppen zu fluoreszierenden Isoindolen, die sich aufgrund ihres hydrophoben Charakters für die Trennung auf Umkehrphasen eignen.

Die Trennung erfolgt isokratisch (15 % Phosphatpuffer 12 mM, 35 % Methanol und 15 % Acetonitril) mit einem Fluss von 0,9 mL/min (G1312A, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) bei 40 °C (G1316A, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) auf einer LiCrospher 100 RP EC Säule (Reversed Phase C18, 125 x 4 mm, CS GmbH, Langerwehe, Germany). Die Derivatisierung der verdünnten (Microlab 1000, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) Fermentationsüberstände erfolgt unmittelbar vor der Injektion (10 µL) im kühlbaren *Autosampler* (4-5 °C, ALS G1329A, Agilent, Technologies, Waldbronn, Deutschland). Die eluierenden Aminosäurederivate werden mit einem Fluoreszenzdetektor (G1321A, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm detektiert. Die Quantifizierung der Aminosäuren Threonin (25-200 µM), Alanin, Glutamat, Valin, Isoleucin und Leucin (25-100 µM) sowie Ammonium (250-1000 µM) erfolgt über externe 5-Punkt Kalibrierung (s. *Kapitel 4.10.1*).

## 4.9 Intrazelluläre Analytik

### 4.9.1 Chromatographische Trennung anaboler Metabolite

Die Chromatographiebedingungen der etablierten Trennung basischer Metabolite (s. Kapitel 5.1) sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Alle Metabolite außer L-Homoserin und U<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-Aspartat werden bei Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. L-Homoserin wird bei Lancaster Synthesis (Eastgate, White Lund, Morecombe, England) und U<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-Aspartat bei Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA, USA) bestellt. Weiterhin kommt eine Aminosäurestandardlösung (*Amino Acid Standard* AAS18-5ML) von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) zum Einsatz. Wasser für die Herstellung von Stamm- (5 mM) sowie Standardlösungen, mobilen Phasen und zur Probenvorbereitung wird über ein Millipore Wasseraufbereitungssystem (Millipore, Schwalbach, Germany) demineralisiert und filtriert (0,22 µm). Für die Herstellung der mobilen Phasen werden Essigsäure 100 % p.a. (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany) und Ammoniumacetat puriss p.a. für die Massenspektrometrie (Fluka, Buchs, Schweiz) verwendet.

Tabelle 4.1: Chromatographiebedingungen für die Messung basischer Metabolite

Säule	Luna <sup>®</sup> 5µ SCX 100Å (150 x 2 mm)
Säulenofen	G1316A
Temperatur	40 °C
Flussrate	0,2 mL/min (Spülen 5 mL/min)
Pumpe	G1312A
Degasser	G1379A
Injektionsvolumen	10 µL
Autosampler	ALS G1329A
Thermostat	6 °C, ALS Therm G1330B
Detektion	DAD G1315B und MS
Eluent A	Essigsäure 5 %ig
Eluent B	Ammoniumacetat 15 mM pH 3,8 (1,1562 g/L auf pH 3,8 bzw. (Lys, Arg und His = pH 6) einstellen)
Gradient	0-17 min 15 % B, 18 min 24 % B, 30-37 min 100 % B, 38-58 min 15 % B (pH 3,8) 0-20 min 15 % B, 35-65 min 100 % B, 65.1-85 min 15 % B (pH 6)

Die Chromatographie erfolgt auf einer Luna<sup>®</sup> 5u SCX 100Å (150x2 mm) Säule von Phenomenex Ltd. (Aschaffenburg, Deutschland). Die stationäre Phase trennt basische Metabolite basierend auf Kationenaustauschmechanismen. Das Material enthält Benzolsulfonsäure-Liganden die eine „mix-mode“ Trennung, basierend auf Umkehrphasen-Ionenaustausch-Chromatographie und aromatischen Wechselwirkungen, ermöglichen. Die Elution der polaren Analyten erfolgt entweder durch Erhöhung des pH-Wertes oder der Konzentration der konkurrierenden Ionen (Ammonium). Als chromatographisches System dient eine Agilent 1100 *high performance liquid chromatography* (HPLC), bestehend aus *Degasser* (G1379A), Binärer Pumpe (G1312A), *Autosampler* (ALS G1329A) mit Thermostat (ALS Therm G1330B), Säulenofen (G1316A) und DAD-Detektor (G1315B, Agilent Technologies, Wald-

bronn, Deutschland, s. *Abbildung 4.5*). Die Trennung erfolgt mittels Gradientenelution (s. *Tabelle 4.1*). Ein Volumen von 10 µL der Probe wird auf die LC-Säule injiziert und bei einer Flussrate von 200 µL/min und 40 °C aufgetrennt. Die mobilen Phasen bestehen aus 5 %iger Essigsäure (A) und 15 mM Ammoniumacetat pH 3,8 oder 6 (für basische Metabolite) (B). Die Retentionszeiten werden durch den Salzgehalt der Probe beeinflusst. Bei Injektion unverdünnter stark salzhaltiger Proben können die Retentionszeiten schwanken. Außerdem wurden Unterschiede der Trenneffizienz verschiedener Chargen der Luna SCX Säulen beobachtet, bei Säulenwechsel kann eine Anpassung des Gradienten erforderlich sein. Vor jeder Messserie wurde das System durch eine Blindinjektion mit demineralisiertem (demin.) Wasser equilibriert. In der verwendeten Methode eluieren die Analyten innerhalb von 36 min von der Säule und werden über eine *Peakkapillare* ins MS geleitet. Die Methodenparameter der massenspektrometrischen Messung sind in *Tabelle 4.2* aufgeführt.

#### 4.9.1.1 4000 Q Trap™ Linear Ion Trap Tandem Massenspektrometer

Das Tandem MS-System besteht aus einem 4000 Q Trap™ *Linear Ion Trap* Tandem Massenspektrometer, ausgestattet mit einer *Turbo Ion Spray* Quelle (Applied Biosystems MDS Sciex, Concord, Canada, s. *Abbildung 4.5*) und *Analyst Software* (Version 1.4.1).

*Tabelle 4.2: Methodenparameter des 4000 Q Trap™ Triple Quadrupol MS*

Massenspektrometer	4000 Q Trap™ linear ion trap tandem mass spectrometer
Model	1004229
Ionenquelle	Turbo Spray (Electro Spray Ionisation - ESI)
Turbogas	Luft, 55 Einheiten
Nebulizergas	Luft, 35 Einheiten
Curtaingas	Stickstoff / 25 psi
Ion Spray Voltage	5500 V
Turboheater Temp.	600 °C
Polarität	Positiv (+)
MS Scanmodus	Multiple Reaction Monitoring (MRM)
ESI Parameter	Automatische Optimierung mittels Spritzeninfusion und Flow Injection Analysis (FIA)
Kollisionsgas (Q <sub>2</sub> )	Stickstoff, 5 psi
Auflösung	0,7 amu (FWHM)
Scanzeit	80 msec je MRM
Software Version	Analyst 1.4.1

Die aminogruppenhaltigen Metabolite wurden positiv ionisiert und im *Multiple Reaction Monitoring* Scanmodus detektiert. Mittels *Flow Injection Analysis* (FIA) wurden die *Ion Spray Voltage* (5500 V), die *Turbo Heater* Temperatur (600 °C) und die Gaseinstellungen *Nebulizergas* 35, *Turbogas* 55 und *Curtaingas* 25 psi, optimiert. Stickstoff für Kollisions- und *Curtaingas* wurde aus komprimierter Druckluft über einen NM20ZA Stickstoff Generator (Peak Scientific, Bedford, MA, USA) bereitgestellt. Das Kollisionsgas im zweiten Quadrupol (Q<sub>2</sub>, Kollisionszelle) betrug 5 psi. Die Versorgung von *Nebulizer*- und *Turbogas* erfolgte über einen Null-Luft-Generator. Die MRM Übergänge wurden mit einer *dwell time* von 80 msec und *Unit*-Auflösung (0,7 amu (*atomic mass unit*), FWHM (*full width at half-maximum height*)) für den ersten (Q<sub>1</sub>) und dritten Quadrupol (Q<sub>3</sub>) gemessen. *Declustering potential* (DP), Kollisionsenergie (CE), *collision cell exit potential* (CXP) und MRM-Übergänge (s. *Tabelle 4.3*)

## Material und Methoden

wurden durch direkte Spritzeninfusion (5  $\mu\text{L}/\text{min}$ , Syringe Pump 11 PLUS, Harvard Apparatus, Holliston, USA) für jeden Metaboliten anhand von Referenzstandards automatisch über die MS-Software Analyst 1.4.1 optimiert.

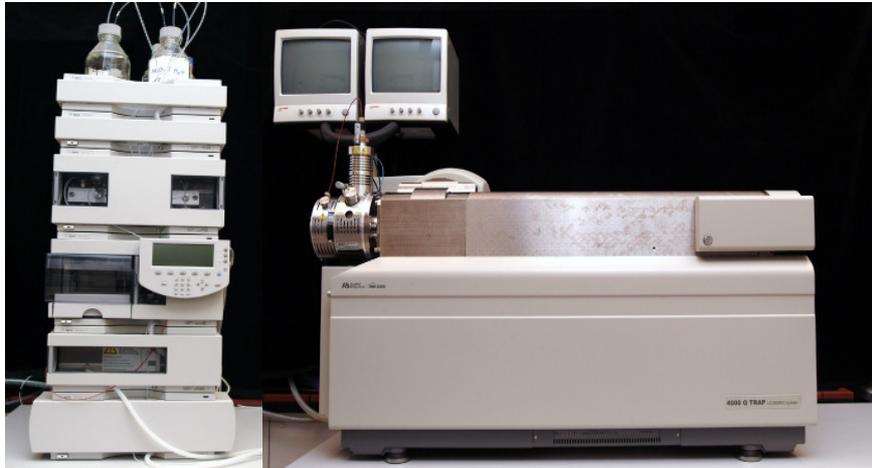


Abbildung 4.5: Agilent 1100 HPLC (links) und 4000 Q Trap<sup>TM</sup> Linear Ion Trap (AB, MDS Sciex)

Tabelle 4.3: Substanzspezifische MS/MS-Parameter 4000 Q Trap<sup>TM</sup> Triple Quadrupol MS

Analyt	Vorläufer-Ion Q <sub>1</sub> [m/z]	Produkt-Ion Q <sub>3</sub> [m/z]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
Glycin	76,0	48,1 [M+H-CO] <sup>+</sup>	36	11	0
Alanin	90,1	44,1 [Im] <sup>+</sup>	36	21	0
Serin	106,1	60,0 [Im] <sup>+</sup>	31	15	8
Prolin	116,0	70,1 [Im] <sup>+</sup>	46	23	4
Aspartatsemialdehyd	117,9	74,0 [Im] <sup>+</sup>	46	19	4
Valin	118,1	72,0 [Im] <sup>+</sup>	41	15	4
Indol	118,1	91,2	36	35	18
Threonin	120,2	74,1 [Im] <sup>+</sup>	41	17	4
Homoserin	120,2	74,1 [Im] <sup>+</sup>	41	17	4
Cystein	122,0	76,1 [Im] <sup>+</sup>	36	19	4
Isoleucin / Leucin	132,1	86,0 [Im] <sup>+</sup>	36	17	4
Asparagin	133,0	87,0 [Im] <sup>+</sup>	46	15	4
Aspartat	134,1	74,1 [Im] <sup>+</sup>	36	21	4
U <sup>13</sup> C <sub>4</sub> -Aspartat	138,1	76,1 [Im] <sup>+</sup>	36	21	4
Anthranilat	138,2	120,0 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	36	17	8
Glutamin	147,2	84,1 [Im-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	46	23	4
Glutamat	148,1	84,0 [Im-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	46	21	4
Methionin	150,1	104,0 [Im] <sup>+</sup>	46	15	6
Phenylalanin	166,1	120,0 [Im] <sup>+</sup>	41	19	8
$\alpha$ -Aminopimelat	176,2	112,0 [Im-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	36	21	8
Tyrosin	182,1	136,1 [Im] <sup>+</sup>	46	19	6
Tryptophan	205,1	187,9 [M+H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	41	15	18

Für die Messung <sup>13</sup>C-markierter Metabolite werden zusätzlich zu den hier aufgeführten MRM-Übergängen alle Übergänge möglicher Isotopomere und deren Fragmentationen programmiert. Aufgrund fehlender Referenzstandards und der Annahme, dass sich alle Isotopomere eines Analyten identisch verhalten, erfolgt für diese Übergänge keine separate Optimierung.

#### 4.9.1.2 TSQ Quantum Ultra™ Triple Quadrupol Massenspektrometer

Das Tandem MS-System besteht aus einem TSQ Quantum Ultra™ Tandem Massenspektrometer, ausgestattet mit einer *Heated-ESI™* Quelle (Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, USA, s. *Abbildung 4.6*) und *Xcalibur Software* (Version 2.0). Die verwendeten Einstellungen sind in *Tabelle 4.4* zusammengefasst.

*Tabelle 4.4: Methodenparameter des Triple Quadrupol MS (Thermo Electron Corporation)*

Massenspektrometer	TSQ Quantum Ultra™ LC-MS/MS
Ionenquelle	Heated-ESI™
Sheath Gas Pressure	35 psi
Auxiliary Gas Pressure	30 psi
Spray Voltage	4000 V
Vaporizer Temperatur	200 °C
Capillary Temperatur	300 °C
Polarität	positiv (+)
MS Scan Modus	Selected Reaction Monitoring (SRM)
ESI Parameter	manuelle Optimierung durch Spritzeninfusion
Tube Lens Offset	automatische Software Optimierung
Kollisionsgas (Q <sub>2</sub> )	Argon, 1,0 mTorr
Auflösung Q <sub>1</sub>	0,5 amu (FWHM)
Auflösung Q <sub>3</sub>	0,7 amu (FWHM)
Scanzeit	150 msec je SRM
Ventilschaltung	Verwurf (0-5 min) MS (ab 5 min)
Software Version	Xcalibur 2.0

Die aminogruppenhaltigen Metabolite wurden positiv ionisiert und im SRM Scanmodus detektiert. *Spray Voltage* (4000 V), *Sheath Gas* (35 psi), *Auxiliary Gas* (30 psi), *Vaporizer Temperatur* (200 °C), *Capillary Temperatur* (300 °C) und SRM-Übergänge (s. *Tabelle 4.5*) wurden direkt durch Spritzeninfusion (10 µL/min) und Injektion über eine 10 µL Probenschleife in den LC-Fluss (Eluent angepasst an die Elutionsbedingungen des jeweiligen Analyten) für jeden Metaboliten manuell anhand von Referenzstandards optimiert. Stickstoff für *Sheath Gas* und *Auxiliary Gas* wurde mittels eines Maxigas Moduls (N2MAX108) der Firma Domnick Hunter (Gateshead, England) aus Druckluft erzeugt die katalytisch durch Oxidation ölfrei gemacht wird (EcoTec Converter, Bauer, München, Deutschland). Der Druck des Kollisionsgases (Argon) im zweiten Quadrupol (Q<sub>2</sub>, Kollisionszelle), wurde auf 1,0 mTorr optimiert. Die SRM Übergänge wurden mit einer *dwell time* von 150 msec und einer Auflösung von 0,5 amu (FWHM) im ersten (Q<sub>1</sub>) und 0,7 amu (FWHM) im dritten Quadrupol (Q<sub>3</sub>) gemessen. Für die ersten 5 min der Chromatographie wurde der LC-Fluss über ein Schaltventil in den Abfall geleitet, um der Verschmutzung des Detektors vorzubeugen.



Abbildung 4.6: Agilent 1200 HPLC und TSQ Quantum Ultra™ (Thermo Electron Corporation)

Tabelle 4.5: Substanzspezifische MS/MS-Parameter TSQ Quantum Ultra™

Analyt	Vorläufer Q <sub>1</sub> [m/z]	Produkt Q <sub>3</sub> [m/z]	Kollisions- energie [V]	Tube Lens	Rt ± 2 [min]
Glycin	76,000	30,265	10	103	12,8
Glycin	76,000	76,000	57	103	12,8
Alanin	90,114	44,186	12	109	13,7
Serin	106,050	60,098	11	114	9,9
Prolin	116,104	70,116	14	102	13,5
Aspartatsemialdehyd	118,095	74,042	10	114	9,4
Valin	118,110	72,112	10	99	16,2
Threonin	120,070	74,108	14	120	10,4
Homoserin	120,070	74,108	14	120	11,6
Cystein	122,040	59,062	25	111	8,3
Isoleucin / Leucin	132,116	86,103	10	116	18,7
Asparagin	133,050	74,039	18	109	10,3
Aspartat	134,060	74,118	17	73	7,2
Glutamin	147,080	84,072	21	116	11,4
Lysin	147,127	84,105	21	109	41,5
Glutamat	148,080	84,055	18	116	9,5
Methionin	150,061	56,139	18	104	14,0
Histidin	156,070	110,094	18	111	43,9
Phenylalanin	166,080	120,057	11	110	17,5
Arginin	175,115	70,103	18	118	47,1
Tyrosin	182,077	136,023	15	113	11,7
Tryptophan	205,080	145,965	16	132	20,9
Cystin	241,015	151,881	17	137	44,0

#### 4.9.2 Chromatographische Trennung kataboler Metabolite

Die Chromatographie der katabolen Metabolite erfolgte nach Luo et al. (2007). Die Bedingungen sind in *Tabelle 4.6* zusammengefasst. Alle Metabolite außer S7P (GLYCO-TEAM GmbH, Hamburg, Deutschland), wurden von Sigma-Aldrich oder Fluka (Steinheim, Deutschland) bezogen. Wasser für die Herstellung von Standardlösungen, mobilen Phasen und die Probenvorbereitung wurde über ein Millipore Wasseraufbereitungssystem (Millipore, Schwalbach, Germany) demineralisiert und filtriert (0,22 µm). Für die mobilen Phasen kamen

Tributylamin von Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland), Essigsäure (GC *standard grade*) von Fluka (Steinheim, Deutschland) und Methanol (LC-MS *grade*) von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) zum Einsatz.

Tabelle 4.6: Chromatographiebedingungen für die Messung kataboler Metabolite

Säule	Synergi Hydro-RP C18 4 $\mu$ 80Å (150x2,1 mm)
Säulenofen	G1316A
Temperatur	Raumtemperatur
Flussrate	0,2 mL/min (Spülen 5 mL/min)
Pumpe	G1312A
Degasser	G1379A
Injektionsvolumen	10 $\mu$ L
Autosampler	ALS G1329A
Thermostat	6 °C, ALS Therm G1330B
Detektion	DAD G1315B und MS
Eluent A	Tributylamin 10 mM, Essigsäure 15 mM (pH 4,95)
Eluent B	Methanol
Gradient	0-15 min 0 % B, 25-55 min 20 % B, 60-65 min 35 % B, 70-75 min 60 % B, 75,1-80 min 90 % B

Die Chromatographie erfolgt auf einer Synergi Hydro-RP C18 4 $\mu$  80Å (150x2,1 mm) Säule von Phenomenex Ltd. (Aschaffenburg, Deutschland). Die C18 Phase mit polarem Endcapping ist für die Auflösung hochpolarer Verbindungen geeignet. Sie bietet den Vorteil, dass sehr hohe Anteile (bis 100 %) an wässriger mobiler Phase zur Elution verwendet werden können. Als chromatographisches System dient eine Agilent 1100 *high performance liquid chromatography* (HPLC) bestehend aus *Degasser* (G1379A), Binärer Pumpe (G1312A), *Autosampler* (ALS G1329A) mit Thermostat (ALS Therm G1330B), Säulenofen (G1316A) und DAD-Detektor (G1315B, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland, s. *Abbildung 4.5*). Die Trennung erfolgt mittels Gradientenelution (s. *Tabelle 4.6*), 10  $\mu$ L der Probe werden auf die LC-Säule injiziert und bei einer Flussrate von 200  $\mu$ L/min aufgetrennt. Die mobile Phase besteht aus 10 mM Tributylamin - pH 4,95, eingestellt mit 15 mM Essigsäure - (A) und Methanol (B). Vor jeder Injektion wird die LC-Säule für 10 min unter Startbedingungen konditioniert. In der verwendeten Methode eluieren die Analyten innerhalb von 80 min von der Säule, das Eluat wird direkt in das MS geleitet. Die Methodenparameter der massenspektrometrischen Messung sind in *Tabelle 4.7* und *4.8* aufgeführt.

#### 4.9.2.1 4000 Q Trap™ Linear Ion Trap Tandem Massenspektrometer

Das Tandem MS-System besteht aus einem 4000 Q Trap™ *Linear Ion Trap* Tandem Massenspektrometer, ausgestattet mit einer Turbo Ion Spray Quelle (Applied Biosystems MDS Sciex, Concord, Canada, s. *Abbildung 4.5*) und *Analyst Software* (Version 1.4.1). Die katabolen Metabolite wurden negativ ionisiert und im *Multiple Reaction Monitoring* Scanmodus detektiert. Mittels *Flow Injection Analysis* (FIA) erfolgte die Optimierung der *Ion Spray Voltage* (-4500 V), der *Turbo Heater* Temperatur (550 °C) und der Gaseinstellungen *Nebulizergas* 60, *Turbogas* 60, *Curtaingas* 30 psi und *Kollisionsgas* 5 psi. Die MRM-Übergänge wurden mit einer *dwel time* von 150 msec und *Unit*-Auflösung (0,7 amu, FWHM) gemessen. *Declustering potential* (DP), *Kollisionsenergie* (CE), *collision cell exit potential*

## Material und Methoden

(CXP) und MRM-Übergänge wurden durch direkte Spritzeninfusion (5  $\mu\text{L}/\text{min}$ , *Syringe Pump* 11 PLUS, Harvard Apparatus, Holliston, USA) für jeden Metaboliten anhand von Referenzstandards automatisch über die MS-Software Analyst 1.4.1 optimiert. In *Tabelle 4.8* sind die substanzspezifischen Messparameter aufgeführt (für Angaben zur Gasversorgung s. *Kapitel 4.9.1*).

*Tabelle 4.7: Methodenparameter des 4000 Q Trap™ Triple Quadrupol MS*

Massenspektrometer	4000 Q Trap™ linear ion trap tandem mass spectrometer
Model	1004229
Ionenquelle	Turbo Spray (Electro Spray Ionisation - ESI)
Turbogas	Luft, 60 Einheiten
Nebulizergas	Luft, 60 Einheiten
Curtaingas	Stickstoff / 30 psi
Ion Spray Voltage	-4500 V
Turboheater Temp.	550 °C
Polarität	Negativ (-)
MS Scanmodus	Multiple Reaction Monitoring (MRM)
ESI Parameter	Automatische Optimierung mittels Spritzeninfusion und Flow Injection Analysis
Kollisionsgas (Q <sub>2</sub> )	Stickstoff, 5 psi
Auflösung	0,7 amu (FWHM)
Scanzeit	150 msec je MRM
Software Version	Analyst 1.4.1

*Tabelle 4.8: Substanzspezifische MS/MS-Parameter 4000 Q Trap™ Triple Quadrupol MS*

Analyt	[M-H] <sup>-</sup> Q <sub>1</sub> [m/z]	Fragment Q <sub>3</sub> [m/z]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
G6P / F6P	259	97 [H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	-50	-22	-5
FBP	339	97 [H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	-60	-28	-5
DHAP / GAP	169	97 [H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	-35	-14	-7
3PG / 2PG	185	79 [PO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-35	-44	-3
PEP	167	79 [PO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-35	-20	-5
Pyr	87	43 -CO <sub>2</sub>	-30	-12	-1
AcCoA	808	79 [PO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-120	-130	-1
6PG	275	79 [PO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-60	-66	-5
R5P / Ribu5P / Xylu5P	229	97 [H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	-50	-22	-5
E4P	199	97 [H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	-55	-14	-5
S7P	289	97 [H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	-50	-22	-5
Oxa	131	87 -CO <sub>2</sub>	-25	-10	-5
AKG	145	101 -CO <sub>2</sub>	-35	-12	-7
Suc	117	73 -CO <sub>2</sub>	-45	-16	-5
Fum	115	71 -CO <sub>2</sub>	-35	-10	-3
Mal	133	115 -H <sub>2</sub> O	-30	-14	-9
Aco	173	85 -2CO <sub>2</sub>	-35	-18	-5
CIT / IsoCIT	191	111 -CO <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	-30	-18	-7
IsoCIT	191	73 -	-40	-28	-3
CIT	191	87 -	-35	-26	-5
NAD	662	540 -Nicotinamid	-50	-22	-9
NADH	664	79 [PO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-110	-120	-3
NADP	742	620 -Nicotinamid	-60	-22	-11
NADPH	744	79 [PO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-110	-118	-3
ATP	506	79 [PO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-90	-106	-1
ADP	426	79 [PO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-80	-88	-3
AMP	346	79 [PO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-70	-62	-5
cGMP	344	150 [Guanin-H] <sup>-</sup>	-70	-34	-11

## 4.10 Quantifizierungsstrategien

### 4.10.1 Methode der externen Kalibrierung

Bei der Methode der externen Kalibrierung wird eine Standardreihe (mindestens 5 Konzentrationen) mit einer Probenserie vermessen. Die durch Integration erhaltenen Peakflächen werden gegen die eingesetzte Konzentration aufgetragen. Durch Lineare Regression wird eine Ausgleichsgerade ( $y = b \cdot x + a$ ) berechnet. Anschließend erfolgt die Auswertung der Proben anhand der gemessenen Peakflächen über die externe Kalibriergerade (s. *Abbildung 4.7*).

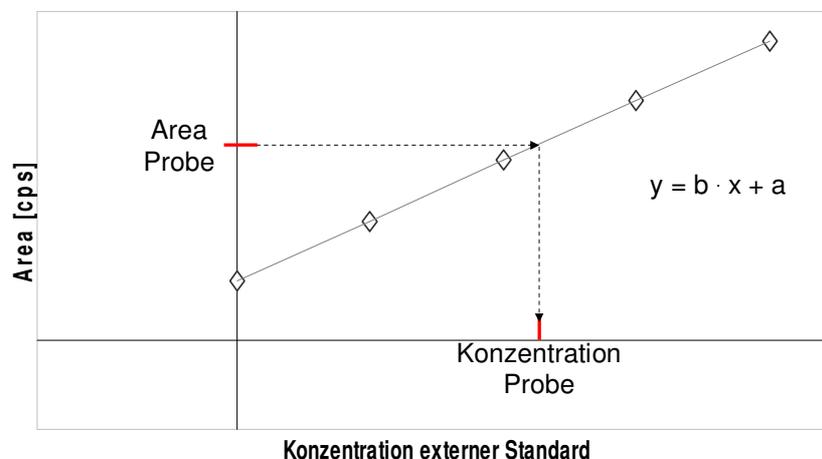


Abbildung 4.7: Auswertung der externen Kalibrierung

### 4.10.2 Methode der Standardaddition

Bei stark Matrix belasteten Proben wird die Methode der Standardaddition <sup>[13]</sup> angewendet, um Einflüsse der Probenmatrix bei der quantitativen Messung zu kompensieren. Durch die Addition einer Standardreihe zum Probenmaterial sind Proben- und Standardmatrix identisch. Man geht davon aus, dass sich Matrixeinflüsse auf diese Weise aufheben. Die Probe wird in 5 Aliquote geteilt. Hierbei dient eines als Nullprobe und wird mit demin. Wasser aufgestockt, 4 Aliquote werden mit dem gleichen Volumen an Standard steigender Konzentration versetzt, so dass eine Standardgerade entsteht (s. *Abbildung 4.8*). Die Probenkonzentration in allen Aliquots ist somit identisch, die Standardkonzentration hingegen steigt von der Nullprobe bis zur höchsten addierten Standardkonzentration an.

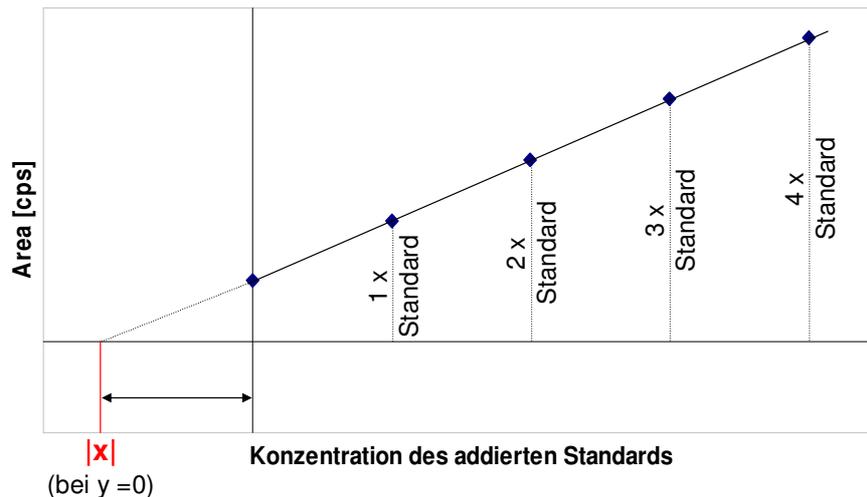


Abbildung 4.8: Auswertung nach der Methode der Standardaddition

Die gemessenen *Peakflächen* werden dann gegen die Konzentration an addiertem Standard aufgetragen und mittels Linearer Regression eine Ausgleichsgerade berechnet. Die Nullprobe stellt auf diese Weise den Schnittpunkt mit der Y-Achse dar (Standardkonzentration  $x = 0$ ). Die Analytkonzentration in der Probe ist gleich dem Betrag des X-Achsen Schnittpunktes der Ausgleichsgerade multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor der Probe (s. *Abbildung 4.8*,  $|x|$  bei  $y = 0$ ). Voraussetzung für die Auswertung ist ein linearer Zusammenhang zwischen *Peakfläche* und Konzentration, somit kann das Verfahren nur angewendet werden wenn der lineare Arbeitsbereich bekannt ist. Nachteile der Standardaddition sind die lange Messzeit (statt einer sind 5 Messungen pro Probe erforderlich) sowie die arbeits- und zeitintensive Probenvorbereitung.

### 4.10.3 Methode des Internen Standards

Ähnlich wie die Methode der Standardaddition wird die interne Kalibrierung zur Kompensierung von Aufarbeitungs-, Injektionsverlusten und Matrixeinflüssen eingesetzt. Im Gegensatz zur Standardaddition ist dieses Verfahren vom Zeitaufwand her mit der externen Kalibrierung vergleichbar. Die Herausforderung bei dieser Quantifizierungsmethode stellt die Auswahl des Internen Standards dar. Eine Substanz ist als Interner Standard geeignet, wenn sie dem Analyten möglichst ähnlich ist und im Idealfall „identisches“ physikalisches und chemisches Verhalten aufweisen. Je besser diese Kriterien erfüllt sind, desto akkurater ist das Ergebnis. Bei der Anwendung des Verfahrens wird eine definierte Konzentration des Internen Standards zu Proben- und Standardlösung gegeben und vermessen. Anhand der folgenden Gleichung wird ein Korrekturfaktor (KF) berechnet, der bei der Berechnung der Analytkonzentration in der Probe eingesetzt wird.

$$KF = \frac{c_{Std} \cdot A_{IS}}{c_{IS} \cdot A_{Std}}$$

$c_{Std}$	:	Analytkonzentration des Standards
$c_{IS}$	:	Konzentration des Internen Standards
$A_{Std}$	:	Peakarea des Standards
$A_{IS}$	:	Peakarea Interner Standard

Unter Verwendung des entsprechenden Korrekturfaktors kann nun die Konzentration des Analyten in der Probe nach folgender Gleichung berechnet werden <sup>[13]</sup>.

$$c_P = \frac{KF \cdot c_{IS} \cdot A_P}{A_{IS}}$$

- $c_P$  : Analytkonzentration in der Probe  
 $c_{IS}$  : Konzentration des Internen Standards  
 $A_P$  : Peakarea Analyt in der Probe  
 $A_{IS}$  : Peakarea Interner Standard

Im Rahmen dieser Arbeit wurde  $U^{13}C_4$ -Aspartat als Interner Standard eingesetzt, um Aufarbeitungsverluste und Messeinflüsse zu kompensieren (s. *Kapitel 5.3*).

#### 4.10.4 Isotope Dilution Mass Spectrometry

Analog der Methode des Internen Standards arbeitet man bei der *Isotope Dilution Mass Spectrometry* (IDMS) mit Internen Standards (IS), um Verluste bei der Aufarbeitung oder Messung auszugleichen. Hier werden isotypenmarkierte Analoge (z. B.  $U^{13}C$ ) der Analyten eingesetzt, welche die Anforderung an Interne Standards bestmöglich erfüllen. Ein weiterer entscheidender Vorteil der Methode ist, dass die absolute Konzentration der zugesetzten Standards nicht bekannt sein muss (Wu et al. 2005). Da sich Analyt und IS lediglich in der Masse unterscheiden, findet die IDMS allerdings nur in der Massenspektrometrie Anwendung. Bei dem Verfahren wird die Interne Standardlösung zu Proben- und einer externen Kalibrierreihe gegeben und vermessen. Das Verhältnis der *Peakflächen* des externen Standards (bekannter Konzentration) zum markierten IS ( $U^{12}C/U^{13}C$ ) wird dann gegen die Konzentration des externen Standards aufgetragen (s. *Abbildung 4.9*).

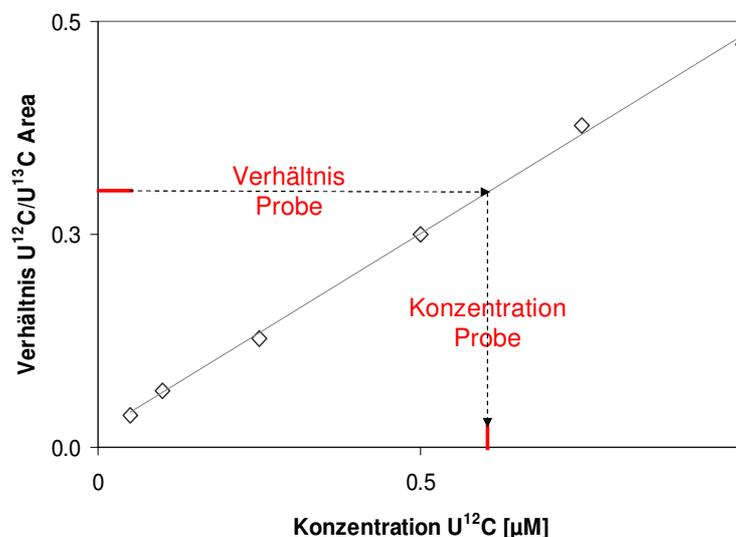


Abbildung 4.9: Auswertung der Isotope Dilution Mass Spectrometry

Über Lineare Regression wird eine Ausgleichsgerade berechnet und die Analytkonzentration in den Proben analog der externen Kalibrierung ermittelt.

## 4.11 Berechnungen

### 4.11.1 Spezifische Wachstumsrate

Die Spezifische Wachstumsrate  $\mu$  wurde nach der folgenden Formel berechnet.

$$\mu_{t1} = \frac{\ln(X_2) - \ln(X_1)}{t_2 - t_1}$$

- $\mu_{t1}$  : Spezifische Wachstumsrate zwischen Zeitpunkt  $t_1$  und  $t_2$   
 $t$  : Zeitpunkt [h]  
 $X_t$  : BTM oder  $OD_{600}$  zum Zeitpunkt  $t$

### 4.11.2 Kohlendioxidbildung

Die Menge an produziertem  $CO_2$  wird über den  $CO_2$ -Gehalt im Abgas berechnet. Hierzu wird zunächst die  $CO_2$ -Bildungsrate ( $CO_{2fr}$ ) berechnet.

$$CO_{2fr,t} = \left( \frac{A_{CO_{2out,t}} - A_{CO_{2in}}}{100} \right) * \frac{\left( \frac{F_t * 60}{22,414} \right)}{V_{R,t} * 1000} \text{ [mmol/L*h]}$$

- $t$  : Zeitpunkt  
 $A$  : Anteil  
 $CO_{2out,t}$  :  $CO_2$  im Abgas zum Zeitpunkt  $t$   
 $CO_{2in}$  :  $CO_2$  im Flow [ca. 0,1 %]  
 $F_t$  : Flussrate [L/h] zum Zeitpunkt  $t$   
 $V_{R,t}$  : Reaktorvolumen zum Zeitpunkt  $t$

Der produzierte  $CO_2$ -Anteil zum Zeitpunkt  $t$  wird über die folgende Gleichung bestimmt.

$$c_{CO_2,t} = \left( \sum_{n=0}^{n=t} \frac{CO_{2fr,n} * V_{R,n} * (t_n - t_{n-1})}{1000} \right) * V_{R,t}$$

### 4.11.3 Ertragskoeffizienten

Ertragskoeffizienten für verbrauchtes Substrat (S - Glucose), gebildete Biomasse (X - BTM) und das Produkt (P - Thr) wurden anhand der folgenden Gleichungen ermittelt.

$$Y_{S/X} = \frac{S_{sum}}{X_t}$$

$$Y_{P/X} = \frac{P_t}{X_t}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_t}{S_{sum}}$$

$S_{\text{sum}}$	:	Summe des verbrauchten Substrates zum Zeitpunkt t
$X_t$	:	BTM zum Zeitpunkt t
$P_t$	:	Extrazelluläre Threoninkonzentration zum Zeitpunkt t
t	:	Zeitpunkt

#### 4.11.4 Intrazelluläres Volumen

Für die Bestimmung der Intrazellulären Konzentrationen der Metabolite im Zellextrakt wurden die gemessenen Konzentrationen mit dem folgenden Faktor multipliziert (Buchholz 2002):

$$F_{\text{intracellular}} = \frac{(BTM \cdot V_S \cdot K_E + V_E + V_N + V_X)}{(BTM \cdot V_S \cdot K_E)}$$

BTM	:	Biotrockenmasse
$V_S$	:	Probevolumen
$K_E$	:	Spezifisches Zellvolumen ( <i>E. coli</i> : $2,78 \cdot 10^{-3}$ L/g)
$V_E$	:	Extraktionsvolumen
$V_N$	:	Neutralisationsvolumen (keine Neutralisierung bei Chloroformextraktion)
$V_X$	:	Interzelluläres Volumen ( $318 \cdot 10^{-6}$ L)



## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Entwicklung der Analytik für intrazelluläre Aminosäuren und biologische Amine

Die Entwicklung der Analytik beginnt mit der substanzspezifischen Optimierung der Ionenoptik des Massenspektrometers für die Referenzsubstanzen. Bei Anwendung des positiven Ionisierungsmodus ist das intensivste Ion bei allen untersuchten Metaboliten das protonierte Quasimolekül-Ion  $[M+H]^+$  (Gómez-Ariza et al. 2005, Petritis et al. 2000). Aus diesem Grund werden diese als Vorläufer-Ionen für die MS/MS-Messung gewählt.

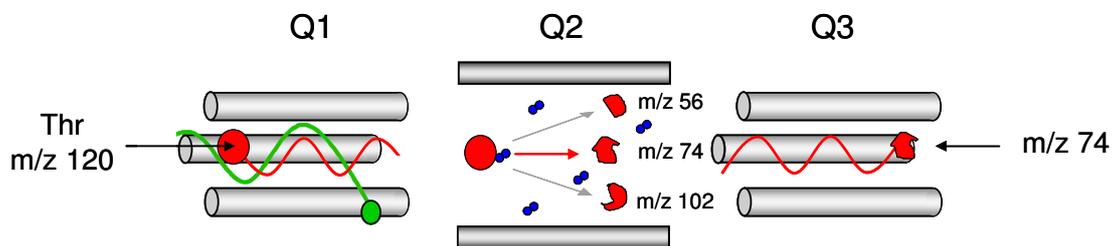


Abbildung 5.1: Fragmentierung der Aminosäure L-Threonin im MRM-Messmodus

Beim MRM-Messmodus eines Triple Quadrupol Massenspektrometers wird das gewählte Vorläufer-Ion im ersten Quadrupol gefiltert, im zweiten Quadrupol fragmentiert und eines der entstandenen substanzspezifischen Fragmente im dritten Quadrupol selektiert (s. Kapitel 3.2.2). In *Abbildung 5.1* sind die im Inneren des Triple Quadrupol Massenspektrometers ablaufenden Vorgänge eines MRM-Überganges für die Aminosäure Threonin dargestellt.

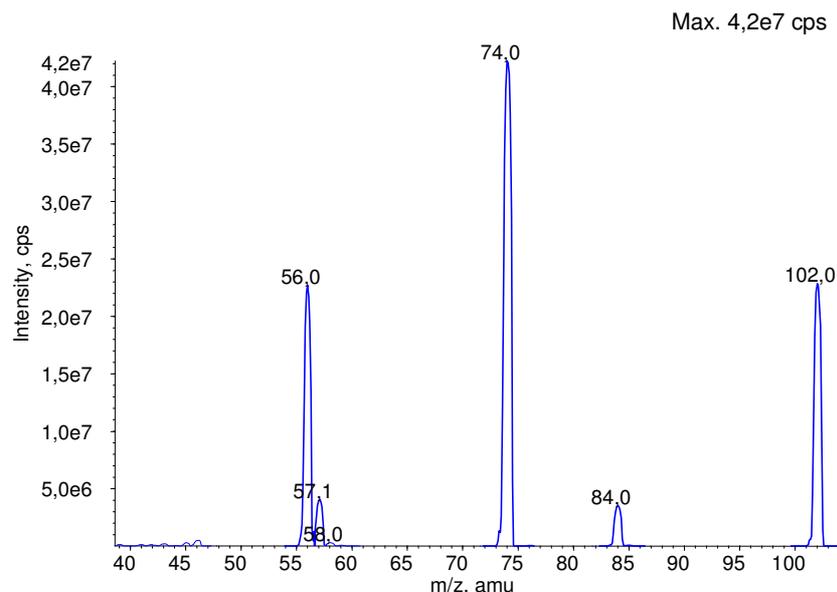


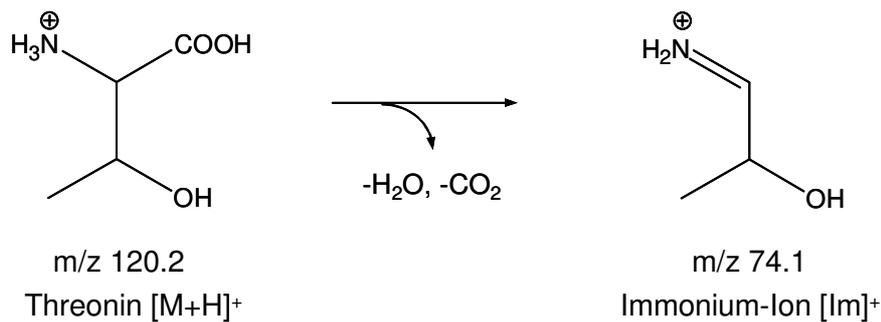
Abbildung 5.2: Produkt-Ionen (Q3) nach CID-Fragmentierung der Aminosäure L-Threonin

Für die Auswahl des geeigneten MS/MS-Übergangs eines Analyten werden jeweils zwei Faktoren abgewogen: erstens sollte der Übergang spezifisch für den Analyten sein und

## Ergebnisse und Diskussion

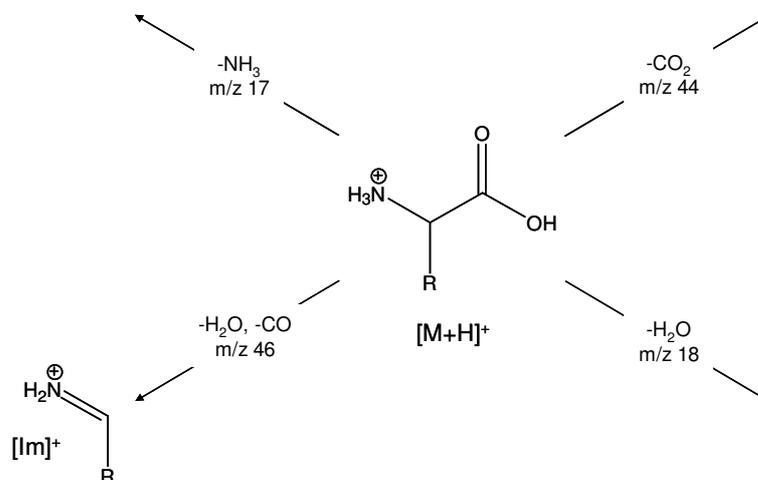
zweitens muss die Intensität des Produkt-Ions ausreichend sein um eine sensitive Detektion zu ermöglichen. Wie in *Abbildung 5.2* beispielhaft für die Aminosäure Threonin gezeigt wird, muss zunächst jeweils das protonierte Quasimolekül-Ion  $[M+H]^+$  mittels *Collisionally Induced Dissociation* (CID) fragmentiert werden und anschließend die generierten Produkt-Ionen aller Analyten bestimmt werden.

Das intensivste substanzspezifische Produkt-Ion, das bei der Fragmentierung von Threonin entsteht, hat ein Masse-zu-Ladungsverhältnis von  $m/z$  74 (s. *Abbildung 5.2*). Bei einem Vorläufer-Ion von  $m/z$  120 und dem intensivsten Produkt-Ion  $m/z$  74 ergibt sich für Threonin somit der in *Abbildung 5.3* dargestellte Übergang im MRM-Messmodus.



*Abbildung 5.3: MS/MS-Übergang der Aminosäure L-Threonin*

Die vorwiegend beobachtete Fragmentierung der untersuchten Metabolite ist der Verlust von Wasser und Kohlenmonoxid unter Bildung des Immonium-Ions  $[Im]^+$  des jeweiligen Analyten. Außerdem werden bei vielen Metaboliten Abspaltungen von Ammoniak ( $NH_3$ , -17  $m/z$  units), Kohlendioxid ( $CO_2$ , -44  $m/z$  units) und Wasser ( $H_2O$ , -18  $m/z$  units) beobachtet (s. *Abbildung 5.4*). Während der Bildung der Immonium-Ionen von Glutamat,  $\alpha$ -Aminopimelat und Glutamin, tritt zusätzlich eine Wasserabspaltung ( $H_2O$ , -18  $m/z$  units) auf. Die Aminosäuren Tryptophan und Lysin spalten Ammoniak ab ( $NH_3$ , -17  $m/z$  units), eine Ausnahme ist Glycin welches nach einer Umlagerung lediglich Kohlenmonoxid ( $CO$ , -28  $m/z$  units) abspaltet (Rogalewicz et al. 2000).



*Abbildung 5.4: Fragmentierung von Aminosäuren*

Aspartat ist die einzige Aminosäure die bei der CID-Fragmentierung neben der Bildung des Immonium-Ions  $[Im]^+$  einen neutralen  $C_2$ -Körper abspaltet ( $H_2O + CH_2=C=O$ , -60 m/z units, s. *Abbildung 5.5*). Alle anderen Aminosäuren werden über ihr Immonium-Ion, nach Kohlenmonoxid und Wasser Verlust (-46 m/z units, s. *Abbildung 5.4*) gemessen. Detaillierte Angaben zur Fragmentierung von Aminosäuren sind in der Literatur (Petritis et al. 2000, Gómez-Ariza et al. 2005, Piraud et al. 2003, Rogalewicz et al. 2000, Pingitore et al. 2007) beschrieben. Die optimierten massenspektrometrischen Parameter wie Vorläufer- und Produkt-Ionen sowie die ermittelten substanzspezifischen Parameter der Ionenoptik im MRM-Messmodus (s. *Abbildungen 5.1-3* und *Kapitel 3.2.2*) sind in *Tabelle 5.1* aufgeführt.

*Tabelle 5.1: Substanzspezifische MRM-Übergänge und Ionenoptik*

Analyt (s. Abkürzungen)	$[M+H]^+$	Produkt-Ion	DP (volts)	CE (volts)	
Ala	90,1	44,1	$[Im]^+$	36	21
AP	176,2	112,0	$[Im-H_2O]^+$	36	25
Anthr	138,2	120,0	$[M+H-H_2O]^+$	36	21
Arg	175,1	70,1	$[C_4H_8N]^+$	51	35
Asp	134,1	74,1	$[Im]^+$	36	21
ASA	117,9	74,0	$[Im]^+$	46	19
Asn	133,0	87,0	$[Im]^+$	46	15
Cys	122,0	76,1	$[Im]^+$	36	19
Gly	76,0	48,1	$[M+H-CO]^+$	36	11
Glu	148,1	84,0	$[Im-H_2O]^+$	46	21
Gln	147,2	84,1	$[Im-NH_3]^+$	46	23
His	156,1	110,0	$[Im]^+$	46	21
Hse	120,2	74,1	$[Im]^+$	41	17
Ind	118,1	91,2	-	36	35
Ile	132,1	86,0	$[Im]^+$	36	17
Leu	132,1	86,0	$[Im]^+$	36	17
Lys	147,1	130,0	$[M+H-NH_3]^+$	41	15
Met	150,1	104,0	$[Im]^+$	46	15
Phe	166,1	120,0	$[Im]^+$	41	19
Pro	116,0	70,1	$[Im]^+$	46	23
Ser	106,1	60,0	$[Im]^+$	31	15
Thr	120,2	74,1	$[Im]^+$	41	17
Trp	205,1	187,9	$[M+H-NH_3]^+$	41	15
Tyr	182,1	136,1	$[Im]^+$	46	19
Val	118,1	72,0	$[Im]^+$	41	15

Abkürzungen: Ala: Alanin, AP:  $\alpha$ -Aminopimelat, Anthr: Anthranilat, Arg: Arginin, Asp: Aspartat, ASA: Aspartatse-mialdehyd, Asn: Asparagin, CE: Collision Energy, Cys: Cystein, DP: Declustering Potential, Gly: Glycin, Glu: Glutamat, Gln: Glutamin, His: Histidin, Hse: Homoserin, Ind: Indol, Ile: Isoleucin, Leu: Leucin, Lys: Lysin, Met: Methionin, Phe: Phenylalanin, Pro: Prolin, Ser: Serin, Thr: Threonin, Trp: Tryptophan, Tyr: Tyrosin, Val: Valin,  $[Im]^+$ :  $[H_2N=CH-R]^+$  wobei R den Rest des jeweiligen Analyten darstellt

## Ergebnisse und Diskussion

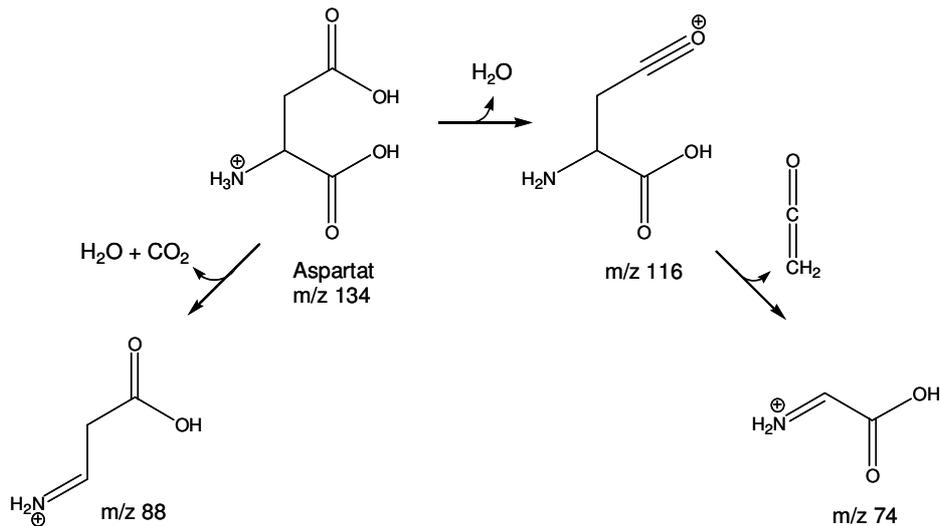


Abbildung 5.5.: Fragmentierung der Aminosäure Aspartat (Pingitore et al. 2007)

Für die Threoninbiosynthese-Intermediate Aspartyl- und Homoserinphosphat stehen keine Referenzstandards zur Verfügung, um die Ionenoptik des Massenspektrometers zu optimieren. Um die Threoninbiosynthese-Intermediate im Zellextrakt trotzdem erfassen zu können, werden die in den *Abbildungen 5.6* und *5.7* dargestellten Fragmentierungen für den positiven Messmodus postuliert.

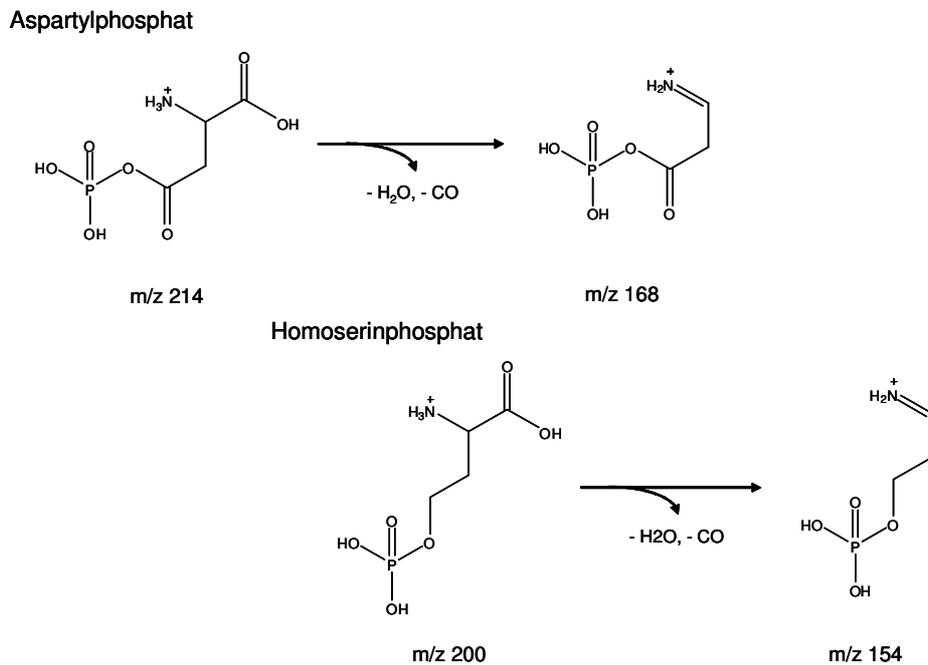


Abbildung 5.6: MRM-Übergänge für Aspartyl- und Homoserinphosphat im positiven Messmodus

Die postulierten MRM-Übergänge m/z 214 → 168 und m/z 200 → 154 werden in die in *Kapitel 4.9.1* beschriebene Methode integriert.

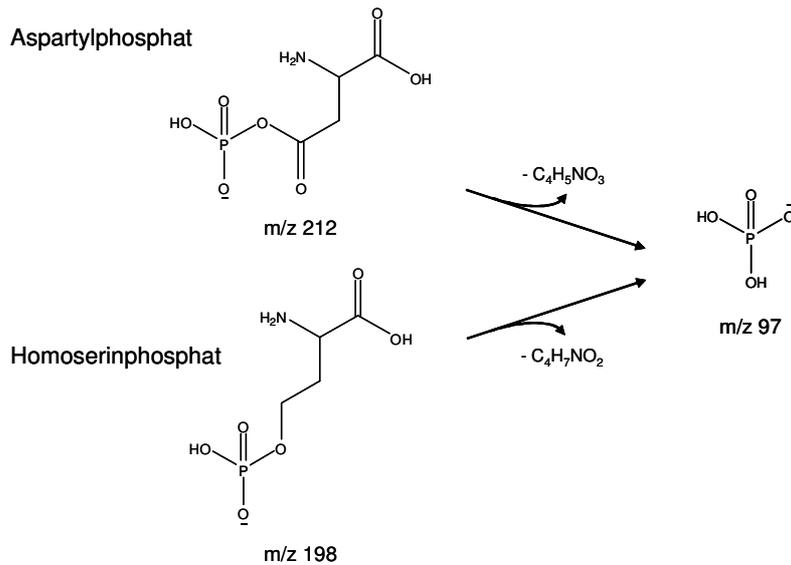


Abbildung 5.7: MRM-Übergänge für Aspartyl- und Homoserinphosphat im negativen Messmodus

Für den negativen Messmodus postulierte MRM-Übergänge,  $m/z$  212  $\rightarrow$  97 und  $m/z$  198  $\rightarrow$  97, werden in die in Kapitel 4.9.2 beschriebene Methode programmiert. Die Einstellung der Ionenoptik des Massenspektrometers wird von analogen Übergängen übernommen. Im positiven Messmodus dienen die Spannungen der Aminosäuren Aspartat und Homoserin, im negativen Messmodus die Einstellungen von Glucose-6-Phosphat als Referenz.

Die Selektivität der Tandem MS Analyse wird durch die kombinierte Messung von Vorläufer- und Produkt-Ion ermöglicht. Auch wenn diese Technik anderen überlegen ist, erzeugen Moleküle mit gleichem Fragmentierungsverhalten Interferenzen, wenn sie nebeneinander in Lösung vorliegen. Dies kann insbesondere bei isobaren Analyten, also massengleichen Molekülen zu falschen Ergebnissen führen. Diese sind für den Massendetektor identisch und können lediglich anhand der Retentionszeit unterschieden werden. Im Falle der Threoninbiosynthese ist die Trennung der Aminosäuren Threonin und Homoserin kritisch, da ihre Fragmentierungsmuster nach der CID-Fragmentierung fast identisch sind (s. *Abbildung 5.8*).

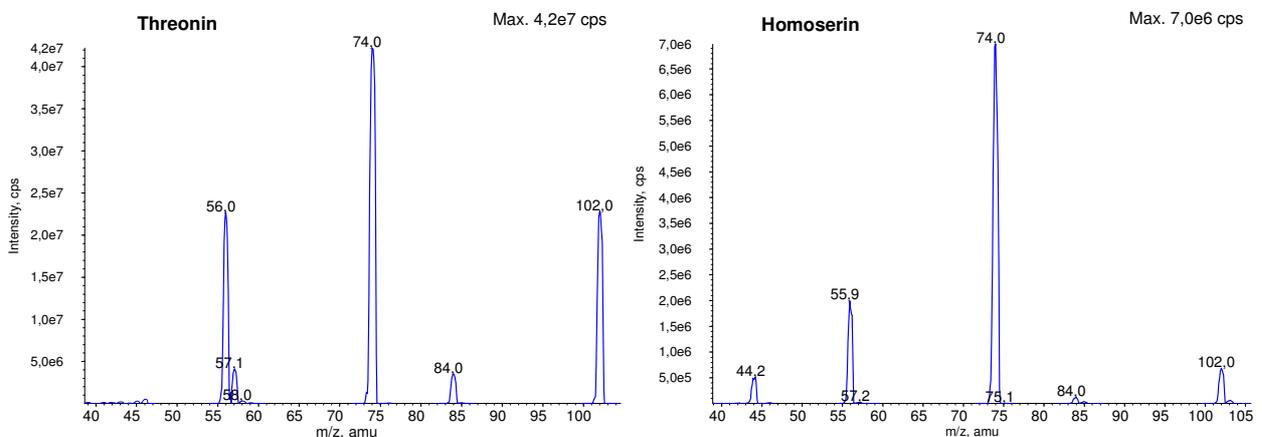
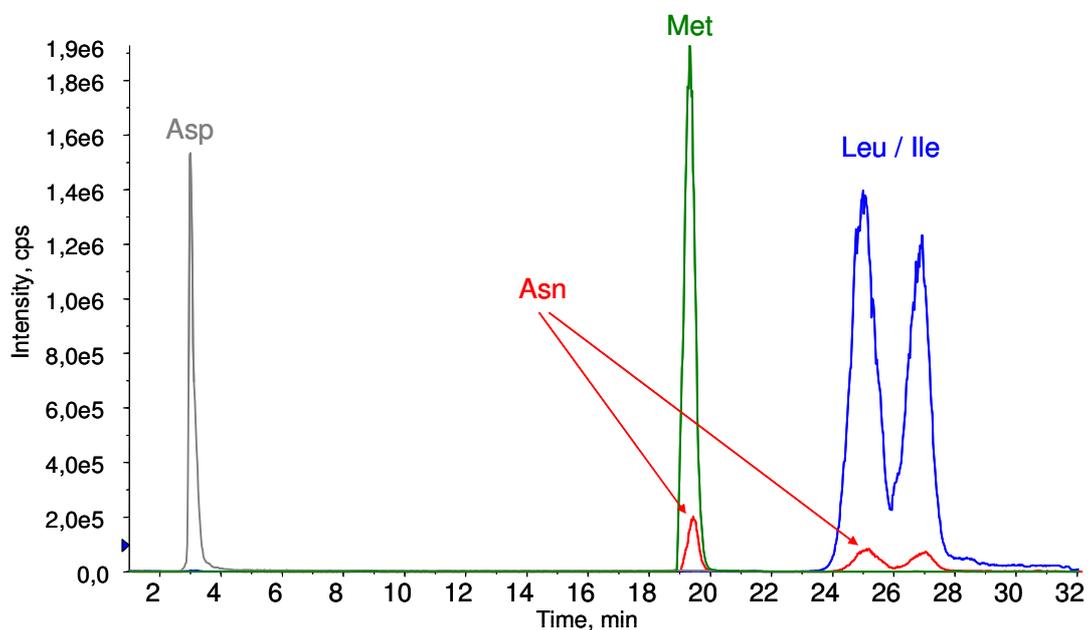


Abbildung 5.8: Fragmentierung von Threonin (links) und Homoserin (rechts)

## Ergebnisse und Diskussion

Aus diesem Grund können die beiden Analyten weder anhand ihrer Vorläufer- noch ihrer Produkt-Ionen voneinander unterschieden werden. Somit ist eine chromatographische Trennung vor der massenselektiven Detektion essentiell wenn eine Quantifizierung folgen soll (Piraud et al. 2003). Beispiele für Analyten mit identischer Fragmentierung sind Threonin / Homoserin, Glutamin / Lysin und Leucin / Isoleucin.

Außerdem kann *In-Source* CID, eine frühzeitige Fragmentierung, die bereits in der Ionenquelle erfolgt bevor der Analyt den Massenanalysator erreicht, zu Überlagerungen führen. Bei diesem Phänomen werden labile Moleküle durch Kollisionen während des Transfers in die Gasphase fragmentiert. Die auf diese Weise entstandenen Molekül-Ionen können leicht mit anderen Vorläufer-Ionen verwechselt werden, wenn im Vorfeld keine zeitliche Auflösung durch die Chromatographie erfolgt ist (s. *Abbildung 5.27*, Piraud et al. 2003). Eine solche Verwechslung kann z. B. bei den Aminosäuren Methionin / Leucin / Isoleucin mit Asparagin auftreten. In *Abbildung 5.9* ist ein Massenchromatogramm dieser kritischen Aminosäuren dargestellt. In Grün und Blau sind die substanzspezifischen MRM-Übergänge (s. *Tabelle 5.1*) der drei Analyten zu sehen. Legt man nun den spezifischen MRM-Übergang des Asparagin (in Rot dargestellt) über das Massenchromatogramm, kommt das Phänomen der *In-Source* CID zum Vorschein. Obwohl Asparagin nicht in der vermessenen Lösung enthalten ist, wird sowohl bei der Retentionszeit des Methionins, als auch bei den Analyten Leucin und Isoleucin ein deutliches Signal detektiert.



*Abbildung 5.9: In-Source CID - Interferenzen von Asn mit Met, Leu und Ile*

Stellt man sich nun vor, dass vor der massenselektiven Detektion keine chromatographische Trennung erfolgt, würden alle Analyten gleichzeitig detektiert und die in *Abbildung 5.9* dargestellten roten Peaks würden zu einem Signal aufaddiert. Das auf diese Weise entstehende Signal für den MRM-Übergang des Asparagin würde dann in der Größenordnung einer 2  $\mu$ M Asparaginlösung liegen, obwohl dies nicht in der Lösung enthalten ist. Überträgt man dieses Wissen auf komplexe biologische Proben wie z. B. Zellextrakte, in denen ca. 1000 Metabolite

(Takors et al. 2007) nebeneinander vorliegen, ist leicht einzusehen, dass die Güte eines quantitativen Ergebnisses mit der chromatographischen Auflösung korreliert. Weitere Beispiele für Analyten bei denen solche Überlagerungen auftreten können, sind  $^{13}\text{C}$ -Asparagin und Asparaginsäure, Asparaginsäure und Prolin,  $^{13}\text{C}$ -Tyrosin und Phenylalanin sowie  $^{13}\text{C}$ -Cystein und Serin (Petritis et al. 2000).

### 5.1.1 Chromatographische Trennung intrazellulärer Aminosäuren und biologischer Amine

Die Elutionsbedingungen bei der LC-MS Kopplung sind auf flüchtige Puffersysteme beschränkt, deshalb lassen sich die meisten HPLC Routinemethoden mit UV- oder Fluoreszenzdetektion nicht direkt auf LC-MS-Systeme übertragen. Trotz dieser Einschränkung wurden bereits einige HPLC-Methoden mit massenselektiver Detektion in der Literatur beschrieben. So entwickelten z. B. Gómez-Ariza et al. (2005) eine Normalphasenchromatographie zur Trennung proteinogener Aminosäuren in Orangensaft. Die Elution erfolgt mit 2 bzw. 5 %iger Essigsäure, Acetonitril und Methanol bei einem pH-Wert von 3. Die Gesamtlaufzeit der Methode beträgt 40 min. Um eine hinreichende Peakauflösung zu erzielen, wird während der ersten 14 min mit einer Flussrate von 0,2 mL/min gearbeitet, die zur Verkürzung der Gesamtlaufzeit im zweiten Teil des chromatographischen Laufes auf 0,4 mL/min verdoppelt wird. Innerhalb der ersten 6 min eluieren bereits 11 der 20 untersuchten Aminosäuren. Die Retentionszeiten von Arginin, Lysin, Alanin und Histidin befinden sich sogar im Bereich des Totvolumens der LC-Säule. In diesem Retentionsbereich eluieren Verbindungen, die eine geringe Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial eingehen, darunter befinden sich in der Regel viele Bestandteile der Probenmatrix. Da die Elektrospray Ionisierung (s. *Kapitel 3.2.1*) anfällig für Ionensuppression (s. *Kapitel 3.1.1*) ist, versucht man die Analyten durch Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial solange zurückzuhalten, bis alle Störsubstanzen eluiert wurden. Besonders bei der komplexen Matrix biologischer Zellextrakte könnten derart kurze Retentionszeiten Probleme bei der Reproduzierbarkeit quantitativer Ergebnisse mit sich bringen. Neben dem Nachteil der Retention ist auch die Peakform der Aminosäuren mit der Methode von Gómez-Ariza et al. schlecht, da die Mehrzahl der Analyten ein starkes Tailing zeigt (Gómez-Ariza et al. 2005). Dies ist wahrscheinlich auf eine schlechte Wechselwirkung der Analyten mit der stationären Phase zurück zu führen. Weitere Parameter, die Einfluss auf die Peakform haben, sind der pH-Wert und die Ionenstärke der mobilen Phase. Im Allgemeinen sind Peakform und -symmetrie auf Umkehrphasen besser als bei der Normalphasenchromatographie. Allerdings gehen sehr polare und ionische Analyten keine ausreichenden Wechselwirkungen mit Umkehrphasen ein, so dass ausreichende Retention nur durch den Einsatz von Ionenpaar- oder Derivatisierungsreagenzien realisiert werden kann. You et al. (2007) beschreiben eine Umkehrphasenchromatographie für Aminosäuren nach Derivatisierung mit dem synthetisierten Reagenz *2-(11H-Benzo[ $\alpha$ ]-carbazol-11-yl) Ethylchlorformiat* (BCEC-Cl). Zur Elution der Aminosäurederivate unter MS-kompatiblen Bedingungen werden Acetonitril, Wasser und Formiatpuffer (pH 3,5) eingesetzt. Die Umsetzung primärer und sekundärer Amine erfolgt innerhalb von 3 min bei Raumtemperatur mit einem 2 - 3fach molaren Überschuss an BCEC-Cl. Dabei haben sowohl die Stabilität des Reagenzes, als auch der entstandenen Derivate Einfluss auf das Messergebnis. Deshalb

sind eine genaue Einhaltung des Derivatisierungsprotokolls und die zeitnahe Messung derivatisierter Proben entscheidend. Einige Aminosäuren (z. B. Tyrosin, Ornithin, Lysin und Histidin) bilden zweifach umgesetzte Derivate. Für die Quantifizierung von Tyrosin ist die Aufsummierung der Ergebnisse der ein- und zweifach umgesetzten Derivate notwendig (You et al. 2007). Probleme, wie instabile Derivate, Nebenreaktionen, unvollständige Umsetzungen und Interferenzen mit den eingesetzten Derivatisierungsreagenzien entfallen, wenn Aminosäuren direkt, ohne vorhergehende Derivatisierung erfasst werden. Allerdings besitzen sie keine Chromophore die zur Detektion genutzt werden können, so dass weder gängige UV- noch Fluoreszenzdetektoren einsetzbar sind. In diesen Fällen sind alternative Detektionsmethoden wie *Evaporative Light Scattering Detection* (ELSD, Petritis et al. 1999), elektrochemische Detektion (Ye und Baldwin 1994, Pei und Li 2000) oder MS (Gómez-Ariza et al. 2005, Chaimbault et al. 1999, Qu et al. 2002) erforderlich.

Da den meisten Aminosäuren, als Ausgleich zu den polaren Amino- und Carboxylgruppen, eine lange hydrophobe Seitenkette fehlt, die eine ausreichend starke Wechselwirkung mit Umkehrphasen eingehen kann, ist der Einsatz von Ionenpaarreagenzien eine weitere Möglichkeit eine Trennung auf Umkehrphasen zu erzielen. Diese Reagenzien sollten bei LC-MS Methoden allerdings flüchtig sein, um Kristallisation in der Spraynadel der Ionenquelle vorzubeugen. Qu et al. (2002) trennen underivatisierte Aminosäuren mit den Ionenpaarreagenzien Perfluorheptansäure und Trifluoressigsäure (pH 2,8) sowie Acetonitril innerhalb von 36 Minuten an einer C<sub>18</sub>-Säule. Besonders im Bereich von 3 bis 8 Minuten ist die chromatographische Auflösung von sauren und polaren Aminosäuren optimierungsfähig. Es treten Koelutionen auf, so dass die eigentliche Trennung nicht in der zeitlichen Dimension sondern anhand der Masse erfolgt. Auch die basischen Aminosäuren Lysin, Arginin und Histidin werden nicht chromatographisch voneinander getrennt sondern koeluierten trotz einer langen Retentionszeit von annähernd 35 min. Weiterhin treten Probleme mit der Perfluorheptansäure auf, Qu et al. (2002) beschreiben, dass die stationäre Phase durch Akkumulation des Ionenpaarreagenzes langsam modifiziert wird. Dadurch verschieben sich die Retentionszeiten teilweise so stark, dass die automatische Peakerkennung der Software nicht mehr zuverlässig ist. Um akkumuliertes Ionenpaarreagenz von der Säule zu waschen wird die stationäre Phase deshalb nach jedem sechsten Lauf für 30 Minuten mit 100% Acetonitril gespült. Dieses Protokoll ist sehr zeitaufwendig und könnte möglicherweise umgangen werden, indem die Konditionierungsdauer der C<sub>18</sub>-Säule unter Startbedingungen vor dem Beginn einer neuen Analyse verlängert wird. Alternativ könnten die Ionenpaarreagenzien sowohl der wässrigen als auch der organischen mobilen Phase zugesetzt werden. In diesem Fall würde neben der Gradientenelution durch Erhöhung des Acetonitrilanteils kein zweiter Gradient über die abnehmende Konzentration des Ionenpaarreagenzes erfolgen. Genau dieses Zusammenspiel zweier entgegengesetzter Gradienten machen sich aber Chaimbault et al. (1999) zu nutze, um erst die sauren und polaren Aminosäuren aufzulösen und anschließend die basischen Aminosäuren innerhalb kurzer Analysenzeiten zu eluieren. Sie arbeiten mit dem Ionenpaarreagenz Pentadecafluorooctansäure (PDFOA, s. *Abbildung 5.10*) und Acetonitril auf Umkehrphasen. Bei sauren pH-Werten ist die Bildung doppelter Ionenpaare bei den basischen Aminosäuren wahrscheinlich. Auf diese Weise sind die Wechselwirkungen mit der stationären Phase stärker als bei einfachen Ionenpaaren und die Verweilzeiten auf Umkehr-

phasen dementsprechend länger. Chaimbault et al. (1999) und Petritis et al. (1999) zeigen eine gute Auflösung der sauren und polaren Aminosäuren während der ersten 12 Minuten. Innerhalb einer Gesamtlaufrzeit von 40 Minuten werden alle proteinogenen Aminosäuren eluiert, wobei 17 der 20 Aminosäuren in der zeitlichen Dimension aufgelöst werden. Beim Vergleich der Arbeiten von Qu et al. (2002) und Chaimbault et al. (1999) wird der Einfluss der C-Kettenlänge des Ionenpaarreagenzes auf die Verweilzeit der Analyten und die chromatographische Auflösung deutlich.

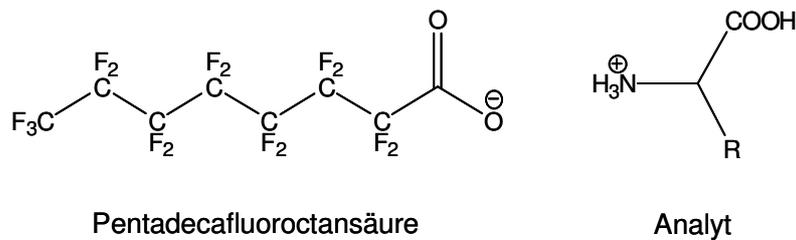


Abbildung 5.10: Ionische Wechselwirkung zwischen Ionenpaarreagenz und Analyt

Für die chromatographische Trennung der intrazellulären Metabolite in dieser Arbeit wird zunächst eine modifizierte Ionenpaarchromatographie nach Petritis et al. (1999) und Chaimbault et al. (1999) verwendet. In *Abbildung 5.11* sind Chromatogramme der Trennung dargestellt. Dabei werden die Analyten an einer Umkehrphase (Luna<sup>®</sup> C18(2), 3 $\mu$ , Phenomenex) getrennt und mittels Pentadecafluorooctansäure ( $c = 0,5$  mM, pH 3) und Acetonitril eluiert. Die unterschiedlichen Farben der in *Abbildung 5.11* dargestellten Signale stellen jeweils einen substanzspezifischen Massenübergang dar. Die zugehörigen MRM-Übergänge der programmierten Vorläufer- (Q1) und Produkt-Ionen (Q3, s. *Tabelle 5.1*) sind in beiden Chromatogrammen jeweils oberhalb der Bezeichnung der Analyten angegeben.

Anders als bei der herkömmlichen Umkehrphasenchromatographie bilden kationische Analyten mit dem zugesetzten anionischen Ionenpaarreagenz PDFOA ein Ionenpaar (s. *Abbildung 5.10*). Dieses elektrisch neutrale Paar verhält sich nun wie ein hydrophober Analyt, der über die lange C-Kette sehr gut mit der Umkehrphase in Wechselwirkung treten kann. Dabei wird die Retention durch die Art des Gegenions, seine Konzentration sowie Art und Menge des organischen Modifiers (z. B. Acetonitril) so beeinflusst, dass für die Selektivität der Trennung eine große Variationsbreite besteht (Römpf 2009<sup>[14]</sup>); auf diese Weise können sogar sehr polare, ionische Analyten auf Umkehrphasenmaterial zurückgehalten werden. Unter diesen selektiven Bedingungen wird eine zufriedenstellende Trennung aller isobaren Analyten, mit Ausnahme des Peakpaares Threonin / Homoserin erzielt. Da die Auflösung der Intermediate der Threoninbiosynthese für den Fokus dieser Arbeit essentiell ist wird die Entwicklung einer geeigneten Chromatographie erforderlich.

## Ergebnisse und Diskussion

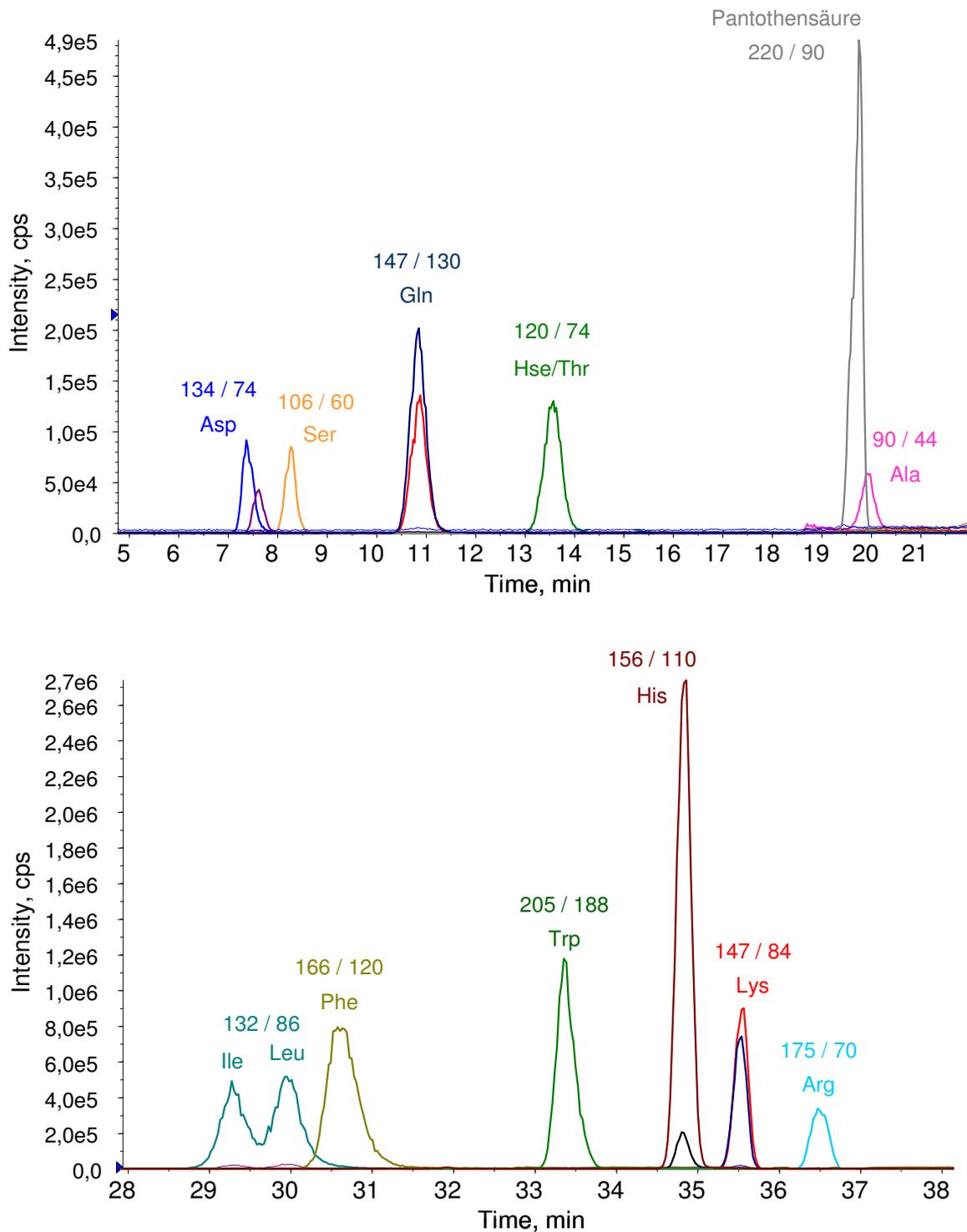


Abbildung 5.11: Massenchromatogramm nach Petritis et al. (1999) – Standardlösung ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) dargestellt in zwei Abschnitten, 0 - 21 min (oben) 28 – 38 min (unten)

Aufgrund der Polarität der Analyten wird ein starker Kationenaustauscher basierend auf Umkehrphasenmaterial als stationäre Phase gewählt (Luna<sup>®</sup> 5 $\mu$  SCX (Strong Cation Exchange), Phenomenex, s. Abbildung 5.12 und Kapitel 4.9.1).

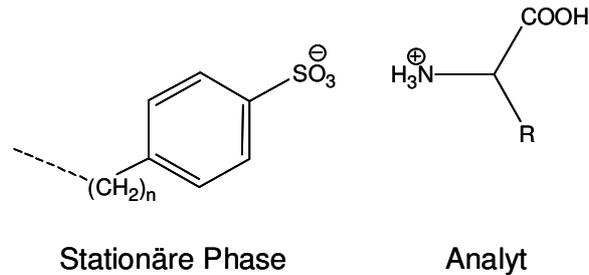


Abbildung 5.12.: Ionische Wechselwirkung zwischen stationärer Phase und Analyt

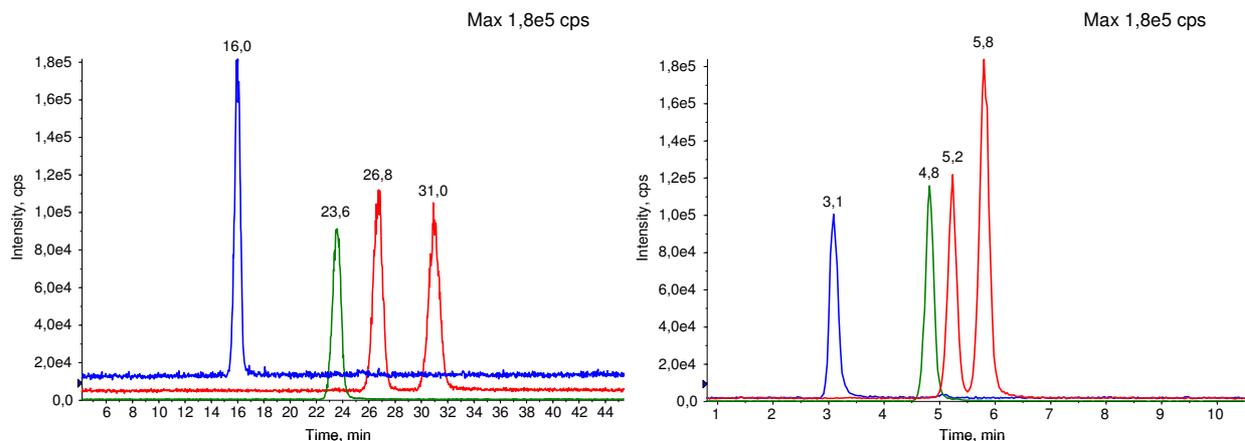
Das Material enthält Benzolsulfonsäure Liganden die eine „mix-mode“ Trennung, aufgrund von Umkehrphasen-Ionenaustauschchromatographie und aromatischen Wechselwirkungen ermöglichen. Auf diese Weise soll die Retention der underivatisierten polaren Analyten ermöglicht und mit den guten Eigenschaften der Umkehrphasenchromatographie kombiniert werden. Bei der Ionenaustauschchromatographie wird zunächst ein pH-Wert gewählt, bei dem das zu trennende Molekül eine zur stationären Phase entgegengesetzte Ladung aufweist. Bei den Aminosäuren ist ein pH-Wert von  $\sim 2,5$  ausreichend um die Aminfunktion zu protonieren (s. *Abbildung 5.12*). Anschließend wird das System bei niedriger Ionenstärke equilibriert. Die Retention erfolgt durch Adsorption der Aminosäuren ( $^+NH_3-R$ ) an die stationäre Phase. Dabei werden die jeweiligen Gegenionen an der Kontaktfläche mit dem Ionenaustauscher von den Analyten verdrängt. Bei Erhöhung der Salzkonzentration (z. B.  $NH_4^+$ ) in der mobilen Phase erfolgt anschließend die Elution durch erneute Verdrängung sowie bei Veränderung des pH-Wertes durch Ladungsminimierung oder –umkehr (Römpp 2009<sup>[14]</sup>).

Bei der Kationenaustauschchromatographie kommen für gewöhnlich Phosphat-, Sulfat- oder Citratpuffersysteme zum Einsatz, die mit der Massenspektrometrie nicht kompatibel sind. Moore et al. (1958) z. B. trennen die neutralen und sauren Aminosäuren mit Natriumcitrat Puffer in Form eines pH-Gradient von pH 3,25 bis 4,23 an einer Amberlite IR-120 Säule. Für die Elution der basischen Aminosäuren verwenden die Autoren Natriumcitratpuffer bei pH 5,28. Die Detektion erfolgt dabei photometrisch nach Umsetzung mit Ninhydrin. Da die chromatographischen Bedingungen wegen der MS-Detektion auf flüchtige Puffersysteme beschränkt sind, ist die Auswahl der Eluenten limitiert. Aus diesem Grund wird die Methodenentwicklung auf die Puffersysteme Ameisensäure / Ammoniumformiat und Essigsäure / Ammoniumacetat begrenzt. Aufgrund des Umkehrphasencharakters der stationären Phase wird außerdem Acetonitril zugesetzt, ein signifikanter Einfluss auf die Trennung wird dabei jedoch nicht beobachtet.

Für die Trennung der Intermediate der Threoninbiosynthese werden mit dem Puffersystem Essigsäure / Ammoniumacetat gute Ergebnisse auf der Ionenaustauschphase erzielt. In der folgenden Abbildung soll der Einfluss der mobilen Phase auf die Trennung der Intermediate der Threoninbiosynthese verdeutlicht werden. Bei Elution mit 2 %iger Essigsäure (pH 2,52) liegen die Retentionszeiten für Aspartat, Aspartatsemialdehyd, Threonin und Homoserin zwischen 16 und 31 min (s. *Abbildung 5.13, links*). Durch Erhöhung des pH-Wertes auf 3,47 und der Konzentration an konkurrierenden Kationen in der mobilen Phase auf 2 mM wird die Wechselwirkung der Analyten mit der stationären Phase stark herabgesetzt und die Retentionszeiten auf 3 bis 6 min verkürzt. Unter diesen Bedingungen ist die Auflösung der Analy-

## Ergebnisse und Diskussion

ten Aspartatsemialdehyd / Threonin und Threonin / Homoserin schlechter (s. *Abbildung 5.13, rechts*).



*Abbildung 5.13: Massenchromatogramme Asp, ASA, Thr und Hse jew. 0,5  $\mu$ M - Essigsäure 2 % (links) und Ammoniumacetat 2 mM (rechts)*

Auf diese Weise kann die Retentionszeit der Analyten, den Anforderungen entsprechend variiert werden. Beim Vergleich der beiden Massenchromatogramme erkennt man auch einen Nachteil der Essigsäure, sie enthält Verunreinigungen die zu hohen Basislinien bei den MRM-Übergängen von Asparat, Homoserin und Threonin führen. Im Säuren verläuft die Ionisierung des Aspartat allerdings deutlich besser (vergl. Intensität Asp *Abbildung 5.13 links* und *rechts*), deshalb leidet die Nachweisgrenze in diesem Fall nicht unter der erhöhten Basislinie. Durch reinere Elutionsmittel könnte die Nachweisempfindlichkeit allerdings verbessert werden. Da die Molekulargewichte der Aminosäuren, ausgenommen Tryptophan, unter 200 g/mol liegen, treten häufig Interferenzen mit der Probenmatrix oder Verunreinigungen der mobilen Phase auf. Deshalb sind spezifische MS/MS-Übergänge und eine gute chromatographische Auflösung umso wichtiger für eine akkurate Quantifizierung.

Anhand der Ionenkonzentration (konkurrierende Kationen) in diesem Fall Ammoniumacetat und des pH-Wertes, hier der Anteil an Essigsäure in der mobilen Phase, wird die Trennung der Aminosäuren optimiert. Die besten Trenneigenschaften zeigt ein mobiles Trennsystem aus 5 %iger Essigsäure (Eluent A) und 15 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 3,8, Eluent B). Dabei erfolgt die Elution im ersten Teil des chromatographischen Laufes isokratisch. Hier wird besonders darauf geachtet, dass eine gute Auflösung der polaren Aminosäuren, zu denen auch Threonin und Homoserin bzw. Aspartatsemialdehyd gehören, erzielt wird. Anschließend wird die Konzentration an Eluent B in Form eines linearen Gradienten erhöht um auch die aromatischen und unpolaren Aminosäuren zu eluieren (s. *Kapitel 4.9.1*). In der folgenden *Abbildung 5.14* ist ein Massenchromatogramm der entwickelten Aminosäuretrennung bei pH 3,8 dargestellt.

Nach Rey und Pohl (1996) sinkt der Ionisierungsgrad der Sulfonsäuregruppen der stationären Phase mit steigender Temperatur, so dass die Kationenaustauschkapazität geringer wird. Für die Chromatographie der Aminosäuren wird der Temperaturbereich zwischen 20 und 60 °C getestet, die besten Trenneigenschaften werden bei einer Temperatur von 40 °C erzielt.

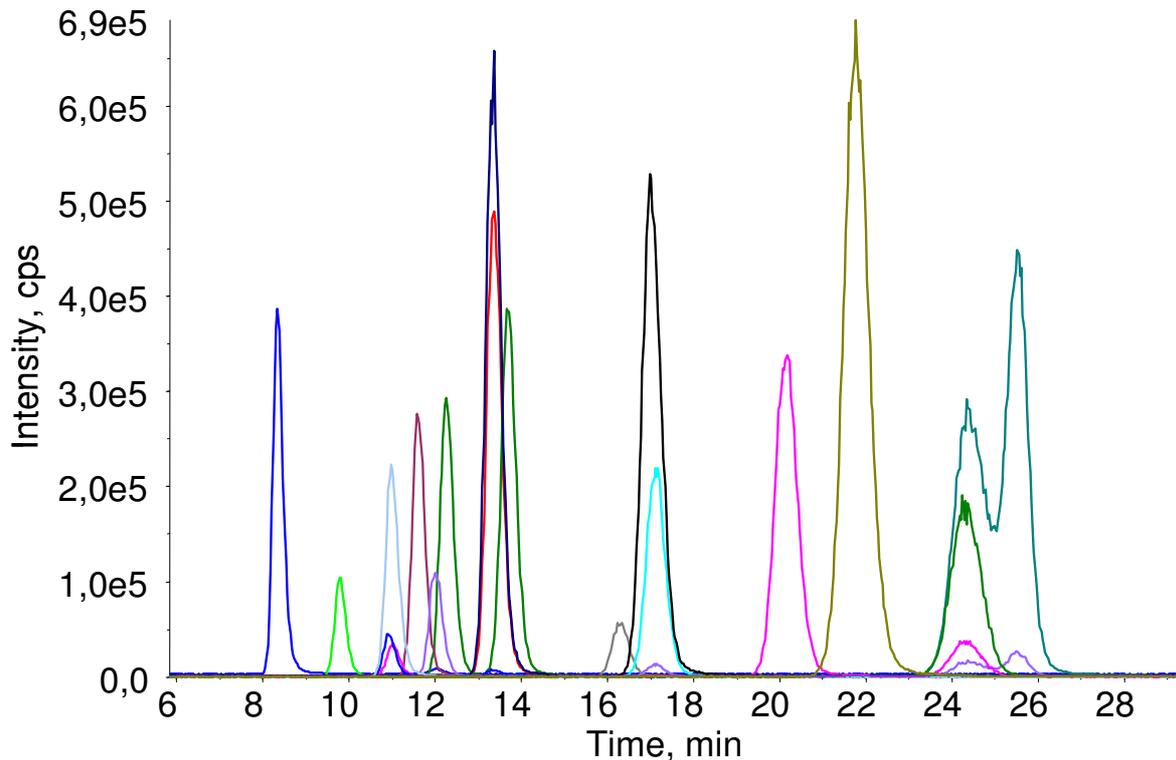


Abbildung 5.14: Massenchromatogramm eines Aminosäurestandards ( $c = 1 \mu\text{M}$ ,  $\text{pH } 3,8$ )

Von Links nach Rechts - blau: Aspartat, grün: Cystein, blau: Glutamat, hellblau: Serin, dkl. lila: Aspartatsemialdehyd, flieder: Asparagin, dkl. grün: Threonin, schwarz: Glutamin, rot: Tyrosin, dkl. grün: Homoserin, grau: Alanin, schwarz: Prolin, türkis: Methionin, pink: Valin, oliv: Phenylalanin, dkl. grün: Tryptophan, grün: Leucin, Isoleucin

Bei einem pH-Wert von 3,8 ist die Elution der basischen Aminosäuren mittels 15 mM Ammoniumacetatpuffer nicht möglich. Diese sind mehrbasig (Lysin 2, Histidin 3, Arginin 4) und liegen aufgrund ihrer hohen  $\text{pK}_a$ -Werte bei saurem pH-Wert mehrfach protoniert vor. Somit gehen sie unter diesen Bedingungen sehr starke Wechselwirkungen mit dem Ionenaustauschmaterial ein. Zur Elution der basischen Aminosäuren Lysin, Histidin und Arginin ist deshalb eine Erhöhung des pH-Wertes auf pH 6 notwendig um die Elution durch Ladungsminimierung und / oder -umkehr herbeizuführen. Auf diese Weise können 24 biologische Amine in einem chromatographischen Lauf getrennt werden (s. *Abbildung 5.15*). Dementsprechend verlängert sich auch die für die Chromatographie benötigte Zeit (s. *Kapitel 4.9.1*).

Die Elution der Aminosäuren wird durch Erhöhung der Konzentration an konkurrierenden Kationen und / oder des pH-Wertes in der mobilen Phase begünstigt. Neben dem  $\text{pK}_a$ -Wert wird die Trennung auf der „mix-mode“ Phase zusätzlich von den Parametern Polarität und Molekülgröße der Analyten beeinflusst. Die Elution beginnt mit den sauren Aminosäuren und deren Amiden - Asparaginsäure (niedrigster  $\text{pK}_a$ -Wert), Glutaminsäure, Asparagin und Glutamin (s. *Tabelle 5.2*). Versetzt schließen sich dann die polaren Aminosäuren Cystein, Serin, Threonin, Homoserin und Methionin an. Anschließend folgen aromatische und aliphatische

## Ergebnisse und Diskussion

Aminosäuren. Zum Schluss eluieren die basischen Aminosäuren Lysin, Histidin und Arginin (höchster  $pK_a$ -Wert).

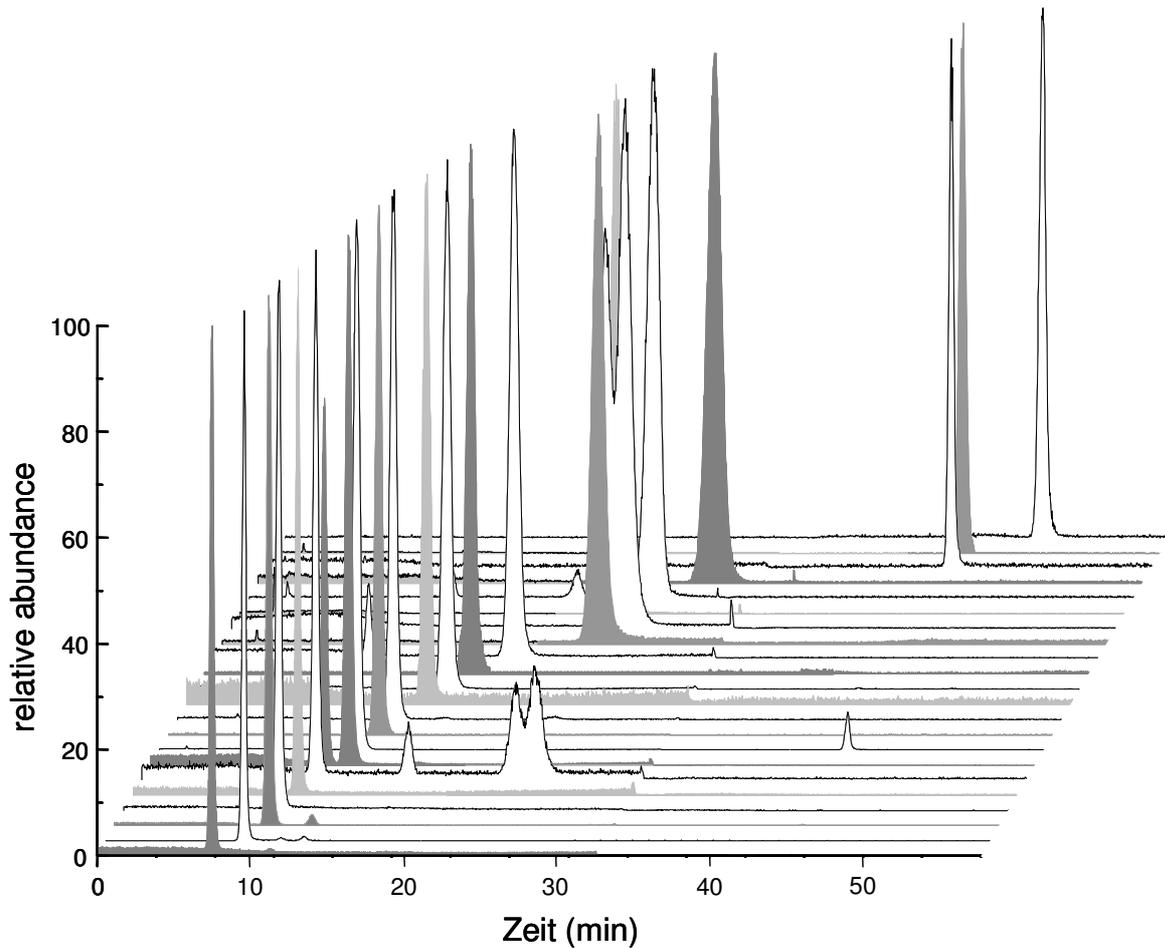


Abbildung 5.15: Massenchromatogramme eines Aminosäurestandards ( $c = 2,5 \mu\text{M}$ , pH 6)

Analyten nach aufsteigender Retentionszeit - Aspartat, Cystein, Glutamat, Serin, Aspartatsemialdehyd, Asparagin, Threonin, Glutamin, Homoserin, Tyrosin, Glycin, Prolin, Alanin, Methionin, Valin, Phenylalanin, Anthr, Leucin, Indol, Tryptophan, Isoleucin, Lysin, Histidin, Arginin

Tabelle 5.2: Abhängigkeit der Elutionsreihenfolge von Gruppe und  $pK_a$ -Wert (Römpf 2009<sup>[14]</sup>) des Analyten

Rt [min]	Analyt	Gruppe	$pK_a$ -Wert	Rt [min]	Analyt	Gruppe	$pK_a$ -Wert
7,2	Asp	sauer	3,68*	13,5	Ala	aliphatisch	9,87
8,3	Cys	polar	8,33*	13,8	Met	polar	9,21
9,3	Glu	sauer	4,25*	15,8	Val	aliphatisch	9,62
9,8	Ser	polar	9,15	17,1	Phe	aromatisch	9,13
10,2	Asn	sauer	8,84	19,2	Leu	aliphatisch	9,60
10,3	Thr	polar	9,12	20,4	Trp	aromatisch	9,39
11,2	Gln	sauer	9,13	20,6	Ile	aliphatisch	9,62*
11,5	Hse	polar	-	41,6	Lys	basisch	10,28*
11,5	Tyr	aromatisch	9,11	45,9	His	basisch	9,07*
12,6	Gly	aliphatisch	9,60	47,2	Arg	basisch	12,48*
13,2	Pro	Iminosäure	10,60				

\*  $pK_a$  der sauren/basischen Funktion im Rest der Aminosäure

Grundsätzlich zeichnet sich bei der Elutionsreihenfolge innerhalb der Gruppen eine Ordnung nach aufsteigendem  $pK_a$ -Wert ab. Dies ist besonders deutlich bei den sauren Aminosäuren zu erkennen (s. *Abbildung 5.16*), da die Unterschiede zwischen den  $pK_a$ -Werten hier am stärksten sind. Aber auch bei den aromatischen Aminosäuren besteht die Korrelation zwischen Retentionszeit und  $pK_a$ -Wert. Hier wirken Polarität und Molekülgröße allerdings unterstützend, so eluiert zunächst die polarste aromatische Aminosäure Tyrosin, gefolgt vom eher unpolaren Phenylalanin. Tryptophan, die größte der proteinogenen Aminosäuren, geht neben den ionischen Wechselwirkungen die stärksten aromatischen Wechselwirkungen ein und eluiert zum Schluss.

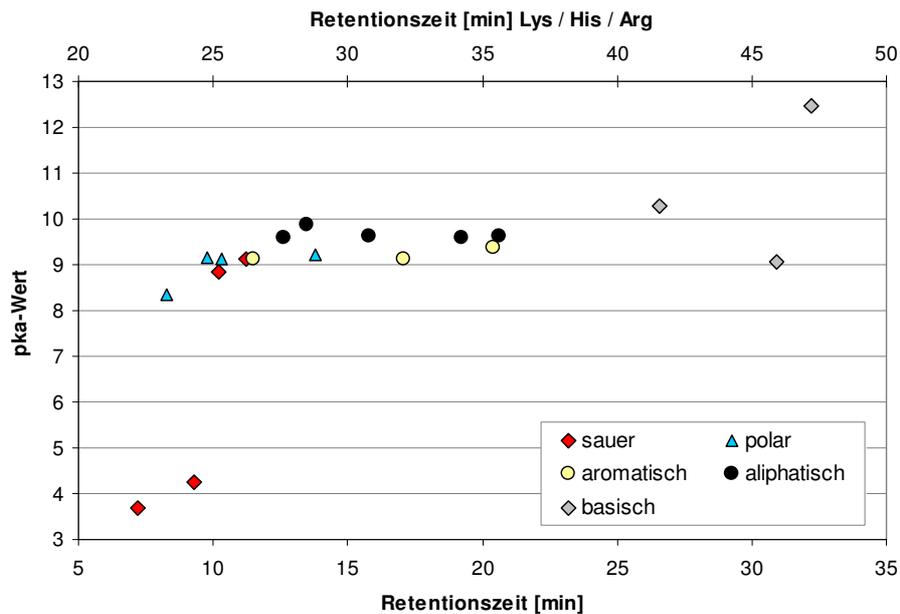


Abbildung 5.16: Einfluss des  $pK_a$ -Wertes auf die Retentionszeit

Bei den polaren und aliphatischen Aminosäuren unterscheiden sich die  $pK_a$ -Werte der  $\alpha$ - $NH_3$ -Gruppen im Bereich zwischen 9 und 10 nur geringfügig. In diesem Fall überwiegen die Einflüsse der Molekülgröße und Polarität der Analyten, so dass die Trennung nach abnehmender Polarität und aufsteigendem Molekulargewicht erfolgt. Die Ausnahme der Regel ist die basische Aminosäure Histidin. Mit drei Stickstoffatomen zählt sie zwar zu den basischen Aminosäuren, aber der hydrophobe Charakter des Imidazolrestes unterscheidet sich von den Resten der anderen Aminosäuren. Der  $pK_a$ -Wert des Imidazolrestes liegt mit 6,1 deutlich unter denen von Lysin (10,3) und Arginin (12,5). Die protonierte Spezies hat aromatischen Charakter, sie kann durch zwei äquivalente Resonanzformeln beschrieben werden und ist somit resonanzstabilisiert (Peter et al. 1995). Aufgrund des niedrigen  $pK_a$ -Wertes müsste Histidin theoretisch früher eluieren, wahrscheinlich ist die starke Retention auf aromatische Interaktionen mit den Benzolsulfonsäure Liganden der stationären Phase zurückzuführen.

## 5.1.2 Methodenvalidierung

### 5.1.2.1 Linearität

Ein linearer Zusammenhang zwischen Peakfläche und Konzentration der Metabolite Alanin, Aspartat, Asparagin, Glutamat, Glutamin, Homoserin, Methionin, Threonin, und Tyrosin besteht im Konzentrationsbereich von 0,25 bis 1  $\mu\text{M}$  (s. *Abbildung 5.17*). Der Arbeitsbereich des Aspartatsemialdehyd liegt zwischen 0,3 und 1,2  $\mu\text{M}$  (s. *Abbildung 5.17*). Die Metabolite Indol, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Prolin, Serin und Valin weisen im Bereich von 0,25 bis 2,5  $\mu\text{M}$  Linearität auf sowie Anthranilat und Glycin für einen Bereich von 0,25 bis 5  $\mu\text{M}$ . Die Elektrospray Ionisierung ist besonders gut für die Quantifizierung von Tryptophan geeignet, welches über einen sehr weiten Arbeitsbereich von 0,25 bis 62,5  $\mu\text{M}$  Linearität zeigt (s. *Abbildung 5.18*). Der lineare Bereich der basischen Aminosäuren unterscheidet sich von denen anderer Aminosäuren. Er liegt zwischen 0,25 und 25  $\mu\text{M}$  für Lysin, 1,25-12,5  $\mu\text{M}$  für Histidin und 0,625-10  $\mu\text{M}$  für Arginin (s. *Abbildung 5.18*). Die vermessenen Lösungen werden in demineralisiertem (demin.) Wasser angesetzt und mit der in *Kapitel 5.1 und 4.9.1* beschriebenen Standardmethode bei pH 3,8 (Lysin, Histidin und Arginin bei pH 6) analysiert.

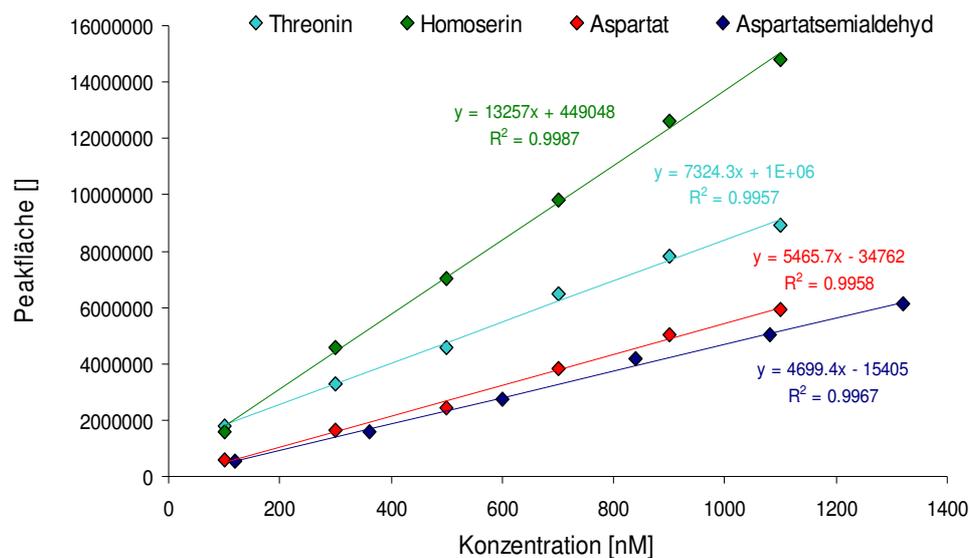


Abbildung 5.17: Kalibriergeraden der Intermediate der Threoninbiosynthese

Alle Analyten zeigen einen linearen Zusammenhang im untersuchten Konzentrationsbereich (s. *Tabelle 5.3*). Die nach Regressionsanalyse der Daten ermittelten Korrelationskoeffizienten liegen zwischen 0,9948 und 1,0000 und sind somit für alle Analyten  $> 0,9945$  (vergl. *Abbildungen 5.17 und 5.18*).

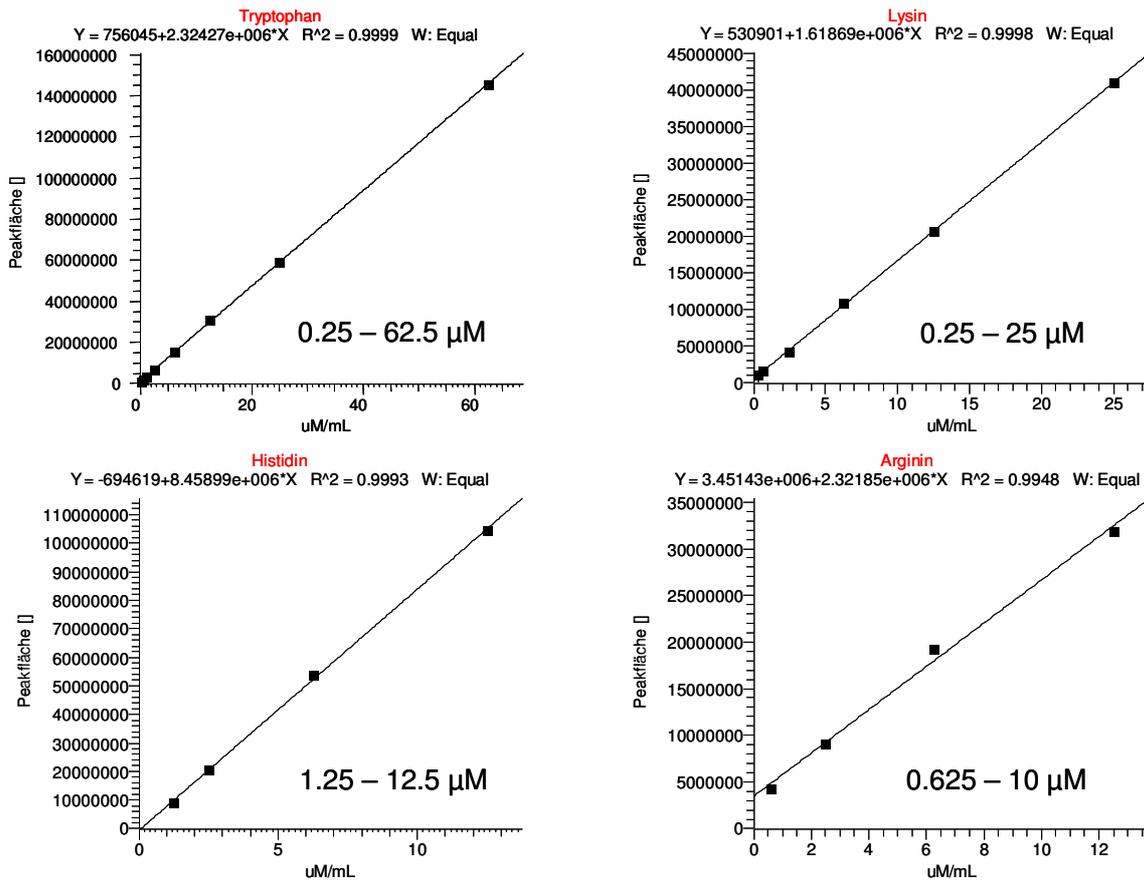


Abbildung 5.18 Kalibriergeraden für Trp und die basischen Aminosäuren Lys, His und Arg

### 5.1.2.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der entwickelten Methode werden unter Verwendung der Software DINTTEST (Version 2004 DE, Georg Schmitt, Michael Herbold) nach DIN 32 645 bestimmt. Die Nachweisgrenzen (NWG) der untersuchten Metabolite liegen zwischen 2 und 550 nM und sind in der Regel  $< 25$  nM (s. *Tabelle 5.3*). Eine Ausnahme stellt Glycin dar, dessen Produkt-Ion mit einem Masse zu Ladungsverhältnis von  $m/z$  48 vergleichsweise klein und somit schlecht massenspektrometrisch detektierbar ist. (1.) ist der Hintergrund bei Molekulargewichten  $< 100$  g/mol vergleichsweise hoch, (2.) liegt die Masse nah am unteren Messbereich des Massenspektrometers ( $m/z$  45) und (3.) sind kleine Ionen vergleichsweise schnell, da die Masse Einfluss auf die kinetische Energie der Ionen hat. Die Nachweisgrenzen von Methionin und Serin sind vergleichsweise hoch, da die Übergänge durch den hohen Untergrund der Eluenten (Essigsäure und Ammoniumacetat) gestört werden. Die erhaltenen Bestimmungsgrenzen (BG) bewegen sich zwischen 8 und 1800 nM, liegen aber für die meisten untersuchten Metabolite unterhalb von 50 nM.

Tabelle 5.3: Analytische Grenzen nach DIN 32 645 ( $n = 5$ ,  $\alpha = 5\%$ , Unsicherheit = 33%)

Analyt	Arbeitsbereich ( $\mu\text{M}$ )	Nachweisgrenze (nM)	Bestimmungsgrenze (nM)
Ala	0,25-1	2,5	9,0
Anthr	0,25-5	-	-
Arg	0,625-10	320	1263
Asp	0,25-1	11,0	37,3
ASA	0,3-1,2	2,4	8,0
Asn	0,25-1	6,7	19,0
Gly	0,25-5	126	459
Glu	0,25-1	545	1773
Gln	0,25-1	3,9	11,8
His	1,25-12,5	243	980
Hse	0,25-1	2,2	7,5
Ind	0,25-2,5	12,0	40,8
Ile	0,25-2,5	5,5	16,2
Leu	0,25-2,5	2,2	7,5
Lys	0,25-25	489	1616
Met	0,25-1	24,6	82,0
Phe	0,25-2,5	3,0	9,8
Pro	0,25-2,5	6,4	18,2
Ser	0,25-2,5	18,8	111,5
Thr	0,25-1	8,1	23,1
Trp	0,25-62,5	2,4	8,1
Tyr	0,25-1	5,5	16,1
Val	0,25-2,5	4,6	13,7

Abkürzungen: s. Tabelle 5.1

### 5.1.2.3 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode wird durch dreimalige Injektion wässriger Standardlösungen untersucht. Hierfür werden Lösungen innerhalb des Arbeitsbereiches der Analyten (0,25 – 2,5  $\mu\text{M}$ , vergl. Kapitel 5.1.2.1) angesetzt und mit der in Kapitel 5.1 und 4.9.1 beschriebenen Standardmethode bei pH 3,8 (Lysin, Histidin und Arginin bei pH 6) analysiert. Aus der Dreifachbestimmung wird jeweils die auf den Mittelwert bezogene relative Standardabweichung (RSD) berechnet. In der folgenden Abbildung 5.19 sind die Ergebnisse für einige Metabolite dargestellt. Im untersuchten Konzentrationsbereich liegen die relativen Standardabweichungen, mit Ausnahme von Glutamat (< 10 %) unter 5 %.

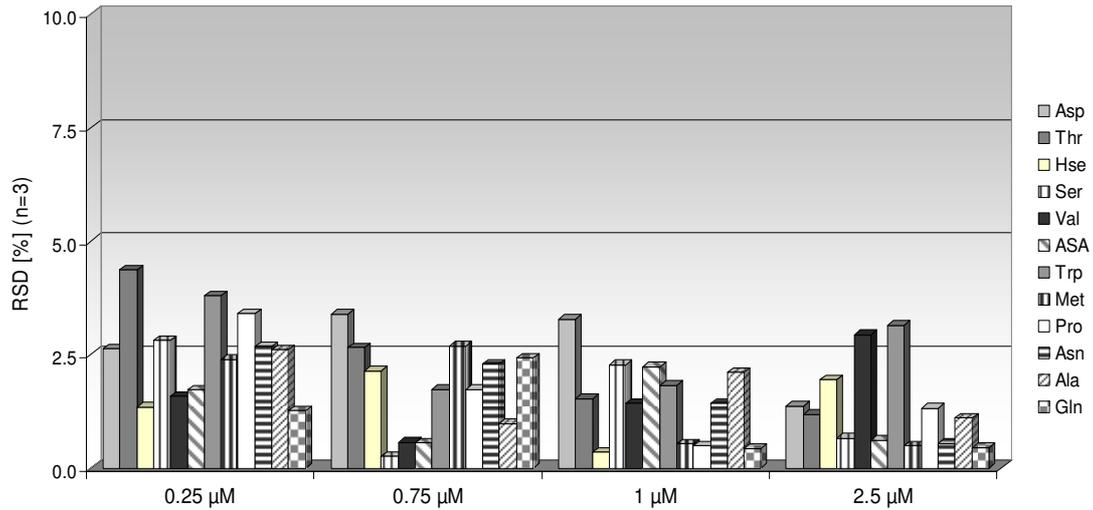


Abbildung 5.19: Relative Standardabweichung - Mehrfachinjektion wässriger Standardlösungen

Weiterhin wurde die Reproduzierbarkeit der Methode inklusive der vorhergehenden Aufarbeitung (s. Kapitel 5.5) untersucht. Die in der folgenden Abbildung (5.20) dargestellten relativen Fehler ergeben sich aus der Summe aller Verluste und Schwankungen von der Probenvorbereitung bis zur Integration der gemessenen Peakflächen.

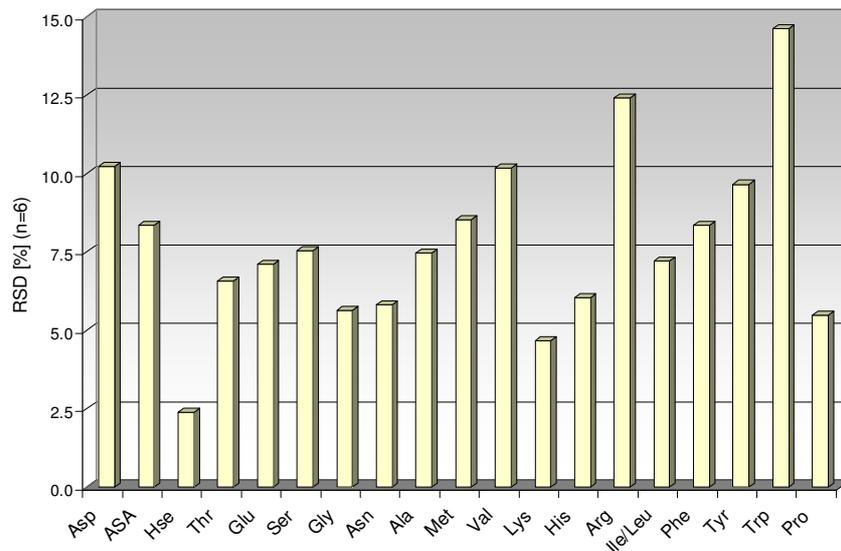
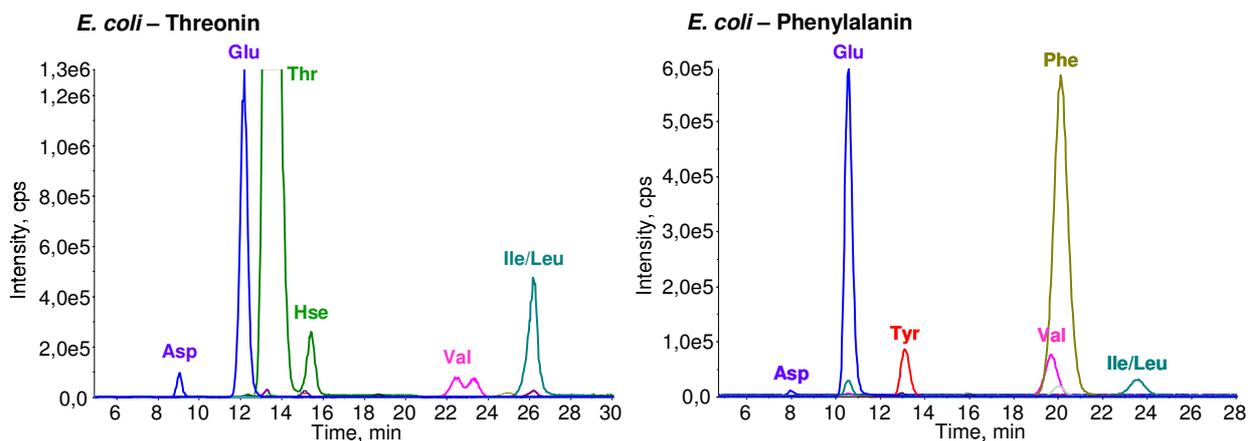


Abbildung 5.20: Relative Standardabweichung nach Aufarbeitung mit Chloroform

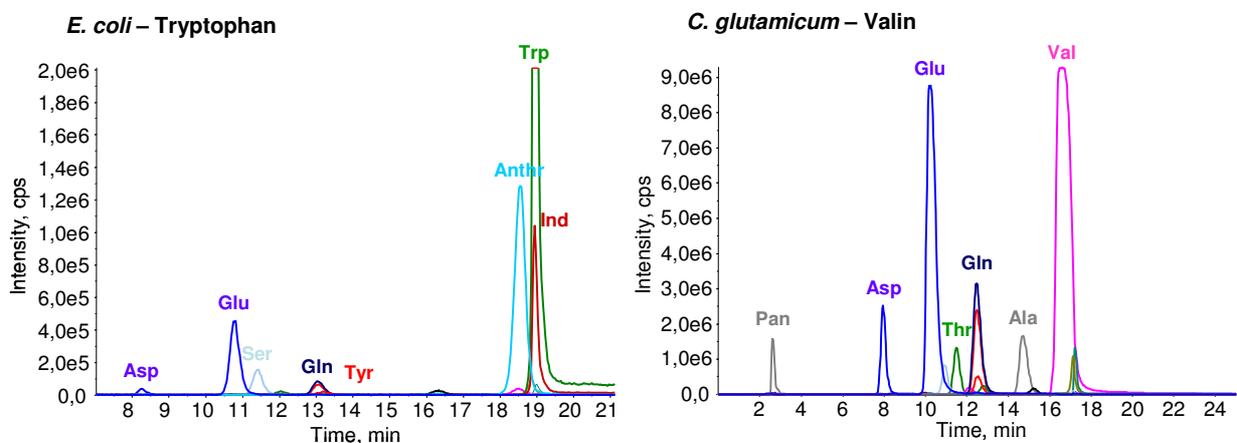
Der Relative Fehler liegt für die Mehrzahl der untersuchten Analyten bei  $\leq 10\%$  RSD. Lediglich Arginin und Tryptophan liegen oberhalb von  $10\%$  RSD, die relativen Fehler sind jedoch  $< 15\%$ . Auch die Wiederfindung der Analyten nach der Messung inklusive Probenvorbereitung wurde untersucht. Die Ergebnisse werden in Kapitel 5.5.2 diskutiert.

### 5.1.2.4 Analyse biologischer Zellextrakte

Die Anwendbarkeit der entwickelten Methode wird an unterschiedlichen biologischen Systemen überprüft. In *Abbildung 5.21* und *5.22* sind Chromatogramme der Zellextrakte von *E. coli* Threonin-, Phenylalanin- und Tryptophanproduzenten sowie eines *C. glutamicum* Valinproduzenten dargestellt.



*Abbildung 5.21: Massenchromatogramme biologischer Zellextrakte - E. coli Threoninproduzent (links) und E. coli Phenylalaninproduzent (rechts)*



*Abbildung 5.22: Massenchromatogramme biologischer Zellextrakte - E. coli Tryptophanproduzent (links) und C. glutamicum Valinproduzent (rechts)*

Anhand der Chromatogramme wird deutlich, dass die entwickelte Methode für die Trennung komplexer biologischer Proben geeignet ist. Alle Massenchromatogramme zeigen eine gute Auflösung der Aminosäuren im Zellextrakt. Neben der jeweils überproduzierten Aminosäure wird auch das spezifische Nebenproduktprofil analytisch erfasst, so dass die entwickelte Methode als Werkzeug für die Stammentwicklung und Prozessoptimierung eingesetzt werden kann.

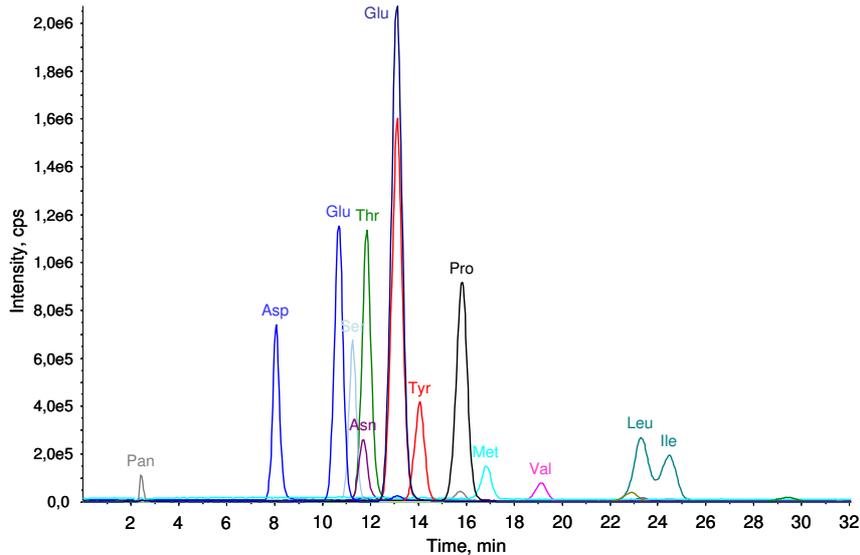


Abbildung 5.23: Massenchromatogramm eines Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellextraktes

Neben bakteriellen Zellextrakten ist die Quantifizierung anaboler Metabolite auch in Säuger- (s. *Abbildung 5.23*) und Pflanzenzellextrakten (Thiele et al. 2008) möglich. Die vielfältige Einsetzbarkeit für die Untersuchung verschiedener Spezies demonstriert die Robustheit der entwickelten analytischen Methode.

Für die verfügbaren Referenzstandards der Threoninbiosynthese wird mittels Ionenaustauschchromatographie eine gute Auflösung erzielt. Für die Intermediate Aspartyl- und Homoserinphosphat stehen keine Referenzstandards zur Optimierung der Ionenuptik des Massenspektrometers zur Verfügung. Um die Threoninbiosynthese-Intermediate trotzdem im Zellextrakt erfassen zu können werden entsprechende MRM-Übergänge programmiert. Weiterhin werden Aminosäuren mit identischem Fragmentierungsverhalten separiert, so dass *In-Source* Fragmentierung (s. *Abbildung 5.9*) kein Problem mehr darstellt und die Voraussetzungen für die Analytik  $^{13}\text{C}$ -markierter Aminosäuren erfüllt werden. Aufgrund der kürzeren Laufzeiten und der besseren Auflösung, saurer und polarer Aminosäuren bei niedrigem pH-Wert, erfolgt die Untersuchung der Intermediate der L-Threoninbiosynthese bei pH 3,8.

Mit der beschriebenen Methode erhaltene Kalibriergeraden sind mit Korrelationskoeffizienten ( $r^2$ ) > 0,9945 über einen Bereich von ein bis zwei Größenordnungen linear. Die Validierungsergebnisse der entwickelten Methode sind in *Tabelle 5.3* zusammengefasst. Die nach DIN 32 645 bestimmten Nachweisgrenzen der untersuchten Metabolite liegen zwischen 2 und 550 nM. Die erhaltenen Bestimmungsgrenzen bewegen sich zwischen 8 und 1800 nM, liegen aber für die meisten untersuchten Metabolite unterhalb von 50 nM. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen liegen eine oder zwei Größenordnungen unterhalb der in der Literatur beschriebenen analytischen Grenzen (Debabov et al. 1992, Annesley 2003). Im Arbeitsbereich der Analyten (0,25 – 2,5  $\mu\text{M}$ ) liegt die auf den Mittelwert bezogene relative Standardabweichung (RSD) für Standardlösungen in Wasser unter 5 %. Bei Aufsummierung aller Verluste und Schwankungen von der Probenvorbereitung bis zur Integration der gemessenen Peakflächen liegt die RSD für die Mehrzahl der untersuchten Analyten bei  $\leq 10$  %.

## 5.2 Messung <sup>13</sup>C-markierter Aminosäuren

Bei der Markierung von *E. coli* Zellen, z. B. durch Kultivierung auf <sup>13</sup>C-markiertem Substrat, entstehen Isotopomere der Metabolite. Der Begriff Isotopomer (Isotop und Isomer) beschreibt einen der verschiedenen Markierungszustände in dem sich ein Stoffwechselmetabolit befinden kann. Ein Positionsisotopomer hat ein exakt bestimmtes Markierungsmuster, beschrieben durch die Anzahl an <sup>13</sup>C-Atomen an definierten Positionen im Molekül. Ein Massenisotopomer hingegen wird lediglich durch die Anzahl an <sup>13</sup>C-Atomen im Molekül beschrieben. Ein Metabolit mit n Kohlenstoffatomen kann an jeder Kohlenstoffposition markiert oder unmarkiert sein, somit ergeben sich 2<sup>n</sup> verschiedene Markierungszustände / Isotopomere eines Metaboliten (s. *Abbildung 3.2*, Wittmann 2002). Die Anzahl der mittels Tandem Massenspektrometrie erfassbaren Isotopomere in der <sup>13</sup>C-markierten Metabolomanalyse wird durch die Anzahl an C-Atomen im Molekül und das Fragmentierungsverhalten des Analyten definiert (s. *Abbildung 5.24*).

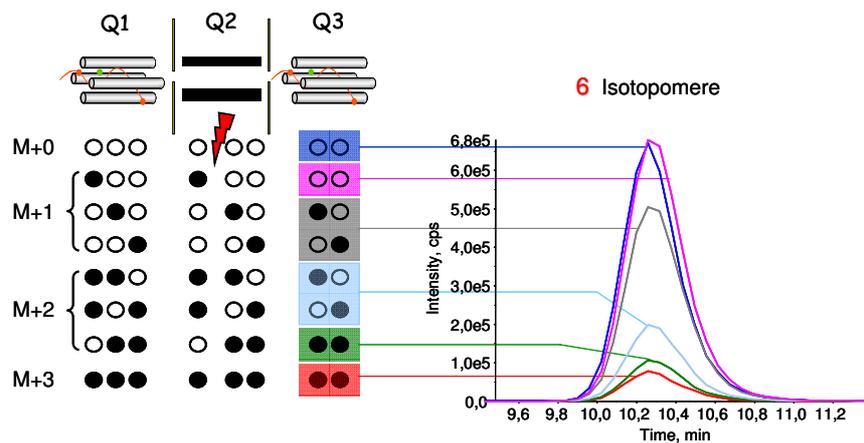


Abbildung 5.24: Mittels Tandem Massenspektrometrie erfassbare Isotopomere eines C<sub>3</sub>-Moleküls (weiße Kreise = <sup>12</sup>C, schwarze Kreise = <sup>13</sup>C)

Ein Beispiel für die Isotopomere der Aminosäure Threonin (m/z 120 → 74) ist in *Tabelle 5.4* aufgeführt (Fragmentierung des Threonin s. *Abbildung 5.3*). Für die Messung aller erfassbaren Isotopomere des Threonin ist das simultane *Monitoring* von acht MS/MS-Übergängen notwendig (vergl. *Tabelle 5.4*).

Tabelle 5.4: Mittels Tandem MS gemessene <sup>13</sup>C-Isotopomere des Threonin

Analyt	[M+H] <sup>+</sup>	Produkt-Ion	Übergang
Threonin	120 [ <sup>12</sup> C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	74 [ <sup>12</sup> C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO] <sup>+</sup>	1
Threonin ( <sup>13</sup> C <sub>1</sub> )	121 [ <sup>12</sup> C <sub>3</sub> <sup>13</sup> CH <sub>10</sub> NO <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	74 [ <sup>12</sup> C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO] <sup>+</sup>	2
		75 [ <sup>12</sup> C <sub>2</sub> <sup>13</sup> CH <sub>8</sub> NO] <sup>+</sup>	3
Threonin ( <sup>13</sup> C <sub>2</sub> )	122 [ <sup>12</sup> C <sub>2</sub> <sup>13</sup> C <sub>2</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	75 [ <sup>12</sup> C <sub>2</sub> <sup>13</sup> CH <sub>8</sub> NO] <sup>+</sup>	4
		76 [ <sup>12</sup> C <sup>13</sup> C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> NO] <sup>+</sup>	5
Threonin ( <sup>13</sup> C <sub>3</sub> )	123 [ <sup>12</sup> C <sup>13</sup> C <sub>3</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	76 [ <sup>12</sup> C <sup>13</sup> C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> NO] <sup>+</sup>	6
		77 [ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO] <sup>+</sup>	7
Threonin ( <sup>13</sup> C <sub>4</sub> )	124 [ <sup>13</sup> C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	77 [ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO] <sup>+</sup>	8

Um mittels LC-MS Informationen über die Position der  $^{13}\text{C}$ -Markierung eines Metaboliten zu erhalten, ist der Einsatz von Tandem Massenspektrometern von Vorteil. Über die gemessenen Produkt-Ionen können Rückschlüsse auf die Position der Markierung gezogen werden. Es ist jedoch nicht für jedes Kohlenstoffatom eine eindeutige Zuordnung der Markierung möglich, da der Bindungsbruch bei der CID Fragmentierung nicht an jeder beliebigen Stelle des Moleküls erfolgt. Die Bruchstelle ist auf einige energetisch günstige Bindungen im Molekül beschränkt (meist Heteroatombindungen) an denen das Molekül-Ion nach Kollision mit Inertgas in ein Neutralteilchen und das Produkt-Ion zerfällt (s. *Kapitel 3.2.2*).

Wird die Trennung in der Dimension der Masse gewährleistet, ist für die Identifizierung und Quantifizierung von Analyten keine vollständige chromatographische Auflösung mehr erforderlich. Dies ist ein Vorteil der Tandem Massenspektrometrie gegenüber anderen Techniken (Lafaye et al. 2005, Gou et al. 2007). Trotzdem bleibt die Messung von Aminosäuren eine Herausforderung, da Massendifferenzen von wenigen g/mol unterschieden werden müssen. Die isotopengenaue Auflösung ist deshalb grundlegend für eine akkurate Erfassung der  $^{13}\text{C}$ -Markierungsanreicherung. Auch wenn der Einfluss der Markierung des Kohlenstoffs bei Kultivierung auf  $\text{U}^{13}\text{C}_6$ -Glucose viel größer ist als der anderer Isotope, dürfen Überschneidungen aufgrund der natürlich auftretenden Isotopenverteilung (s. *Tabelle 5.5*) nicht außer Acht gelassen werden (Piraud et al. 2003). Hierbei fallen neben der natürlichen Häufigkeit des  $^{13}\text{C}$ -Isotops insbesondere Isotope der Elemente S und Si ins Gewicht, Letzteres wird häufig bei der Derivatisierung polarer Analyten in der Gaschromatographie eingesetzt (Strelkov et al. 2004).

*Tabelle 5.5: Natürliche Isotopenverteilung einiger Elemente<sup>[15]</sup>*

Element	Isotop	Relative Intensität	
C	$^{12}\text{C}$	100,000	$[\text{M}+\text{H}]^+$
	$^{13}\text{C}$	1,082	$[\text{M}+1+\text{H}]^+$
	$^{14}\text{C}$	0,000	
N	$^{14}\text{N}$	100,000	$[\text{M}+\text{H}]^+$
	$^{15}\text{N}$	0,369	$[\text{M}+1+\text{H}]^+$
O	$^{16}\text{O}$	100,000	$[\text{M}+\text{H}]^+$
	$^{18}\text{O}$	0,205	$[\text{M}+2+\text{H}]^+$
	$^{17}\text{O}$	0,038	$[\text{M}+1+\text{H}]^+$
H	$^1\text{H}$	100,000	$[\text{M}+\text{H}]^+$
	$^2\text{H}$	0,012	$[\text{M}+1+\text{H}]^+$
	$^3\text{H}$	0,000	
S	$^{32}\text{S}$	100,000	$[\text{M}+\text{H}]^+$
	$^{34}\text{S}$	4,519	$[\text{M}+2+\text{H}]^+$
	$^{33}\text{S}$	0,801	$[\text{M}+1+\text{H}]^+$
	$^{36}\text{S}$	0,021	$[\text{M}+4+\text{H}]^+$
Si	$^{28}\text{Si}$	100,000	$[\text{M}+\text{H}]^+$
	$^{29}\text{Si}$	5,078	$[\text{M}+1+\text{H}]^+$
	$^{30}\text{Si}$	3,347	$[\text{M}+2+\text{H}]^+$

Kommen über  $^{13}\text{C}$ -Markierungseinbau zusätzlich Isotopomere der Aminosäuren hinzu, führt dies zu erheblichen Massenüberschneidungen, insbesondere im Bereich von  $m/z$  115 bis

## Ergebnisse und Diskussion

156 (s. *Abbildung 5.25*), so dass eine gute chromatographische Auflösung essentiell wird. Die Aminosäuren Glycin, Alanin, Serin, Tyrosin und Tryptophan weisen keine Masseninterferenzen mit anderen Aminosäuren auf. Ihre in *Abbildung 5.25* dargestellten Massenbereiche der Vorläufer-Ionen (grün) sind isoliert von denen anderer Aminosäuren.

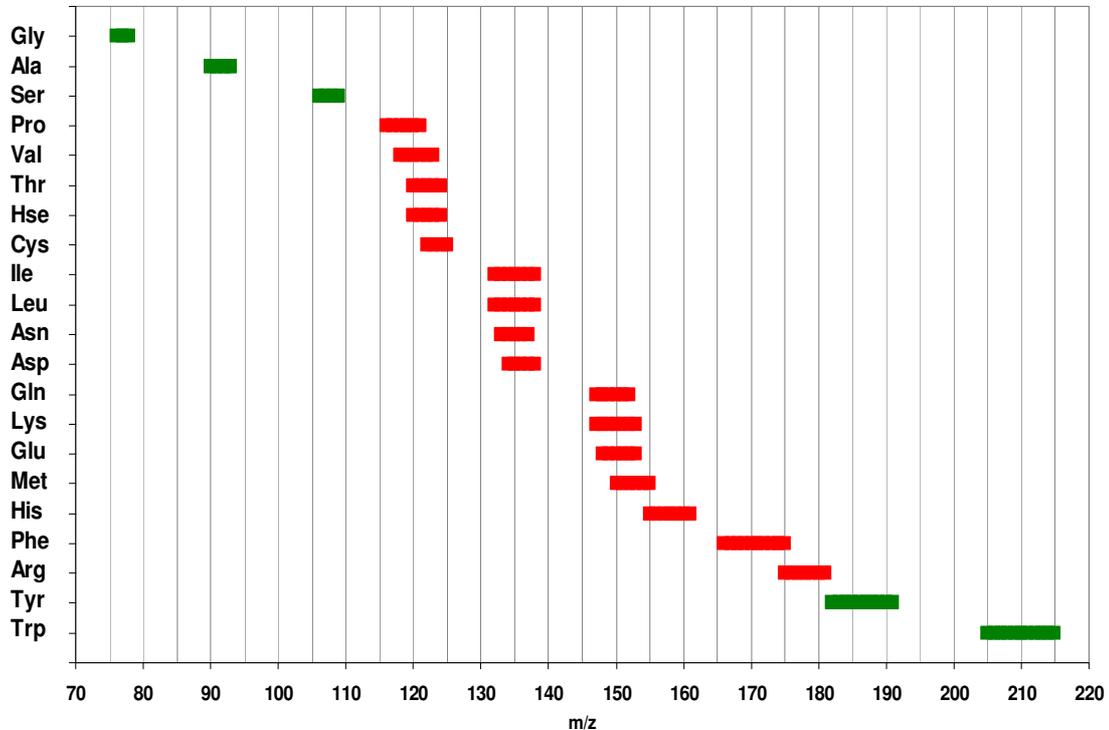


Abbildung 5.25:  $^{13}\text{C}$ -Isotopomere von Aminosäuren - Massenbereiche der Vorläufer-Ionen

Kritische Aminosäuren bezüglich des Molekulargewichtes (rot dargestellt) sind Prolin, Valin, Threonin, Homoserin und Cystein (Vorläufer-Ionenbereich  $m/z$  116-125), Leucin, Isoleucin, Asparagin und Aspartat ( $m/z$  132-138), Glutamin, Lysin, Glutamat, Methionin und Histidin ( $m/z$  147-155) sowie Phenylalanin und Arginin ( $m/z$  175). Diese Analyten mit überlappenden Massenbereichen müssen in der zeitlichen Dimension, also chromatographisch voneinander getrennt werden (Chaimbault et al. 1999). Mit Ausnahme von Leucin und Isoleucin, lassen sich mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten chromatographischen Methode alle kritischen Aminosäuren in der zeitlichen Dimension vollständig trennen (s. *Abbildung 5.26 a-d*). Auf diese Weise können Überschneidungen aufgrund des Molekulargewichtes ausgeschlossen werden.

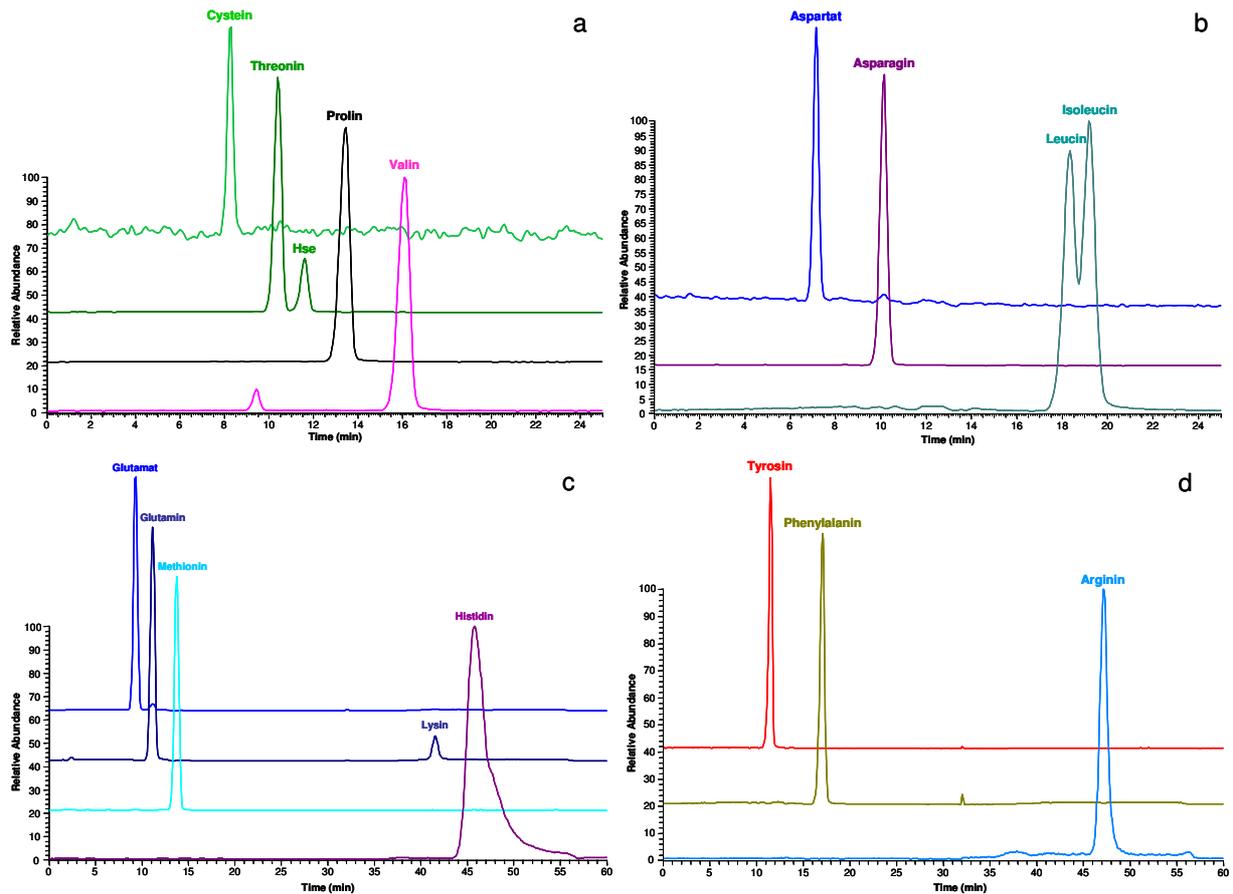


Abbildung 5.26: Trennung kritischer Aminosäuren mittels Ionenaustauschchromatographie

Zusätzlich zu den gezeigten Überschneidungsbereichen der Molekulargewichte, können Probleme durch *In-Source Collisionally Induced Dissociation* (*In-Source* CID, Piraud et al. 2003, Niessen 1998) aufgrund der chemischen Verwandtschaft von Aminosäuren auftreten. Neben Asparagin mit Methionin / Leucin und Isoleucin wie bereits in *Kapitel 5.1* gezeigt, ist *In-Source* CID auch bei den Aminosäuren Phenylalanin / Threonin / Homoserin und Glycin / Cystein kritisch. Das *In-Source* CID Produkt des Phenylalanin und die Vorläufer der isobaren Aminosäuren Threonin / Homoserin zeigen identische Ionen von  $m/z$  120, das gleiche gilt für das *In-Source* CID Produkt des Cystein und die Aminosäure Glycin (s. *Abbildung 5.27*). Während Phenylalanin und Threonin / Homoserin nach einem zweiten Fragmentierungsschritt über das entstehende Produkt-Ion getrennt werden können, zeigen Cystein und Glycin auch bei weiterer Fragmentierung in der Kollisionszelle des Massenspektrometers identisches Verhalten. Somit ist eine Unterscheidung der Analyten mittels Tandem Massenspektrometrie nicht möglich (s. *Abbildung 5.27*). Dieses Beispiel verdeutlicht die Notwendigkeit der chromatographischen Trennung. Auch die Aminosäuren Phenylalanin, Threonin, Homoserin, Glycin und Cystein lassen sich mit der entwickelten Ionenaustauschchromatographie vollständig auflösen (s. *Abbildung 5.28*). Auf diese Weise können Verwechslungen durch *In-Source* CID ausgeschlossen werden.

# Ergebnisse und Diskussion

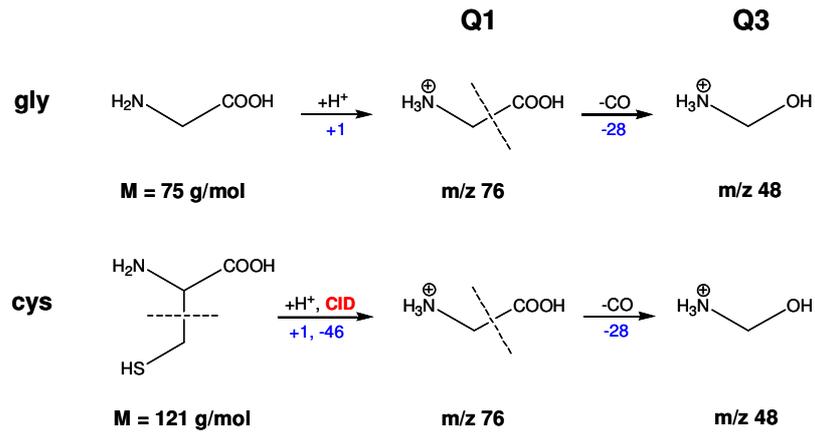


Abbildung 5.27: Fragmentierung von Glycin und Cystein

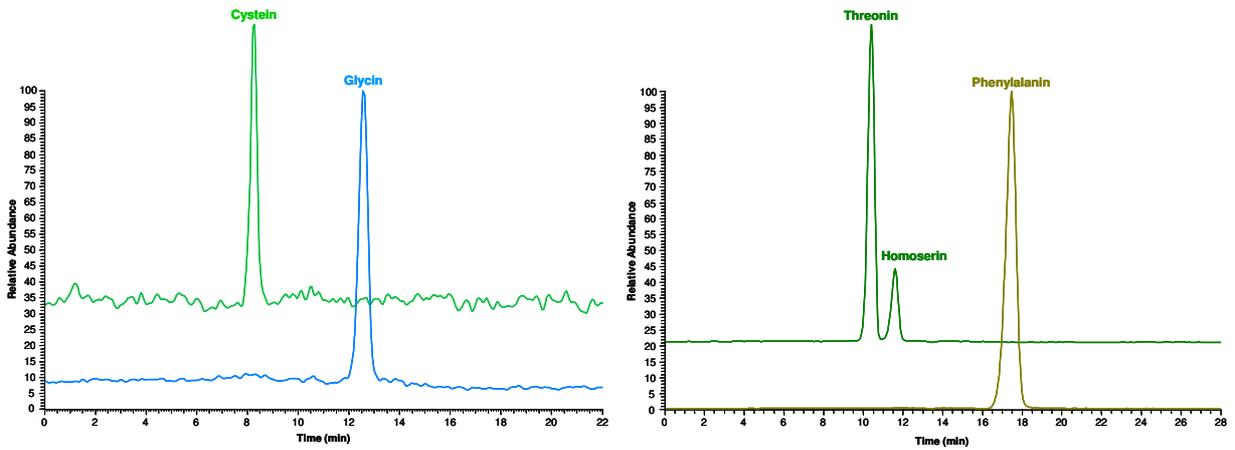


Abbildung 5.28: Trennung von Cystein/Glycin (links) und Threonin/Homoserin/Phenylalanin (rechts)

### 5.2.1 Unterteilung der Methode in Perioden

Für die Erfassung aller Isotopomere der hier untersuchten 21 Metabolite müssten 189 Übergänge während eines chromatographischen Laufes gemessen werden (s. *Tabelle 5.6*). Dies ist aus programmiertechnischen und zeitlichen Gründen nicht ohne weiteres realisierbar. Aus diesem Grund wird das Chromatogramm in Zeitabschnitte unterteilt und die Übergänge der jeweiligen Isotopomere nur in den Abschnitt der Elution programmiert. Auf diese Weise kann ausreichend Scanzeit für jeden Analyten und ein Minimum von 15 bis 20 Datenpunkten über die Peakbreite gewährleistet werden. Ein positiver Nebeneffekt ist die gleichzeitige Erhöhung der Sensitivität.

*Tabelle 5.6: Erfassbare Isotopomere der 21 untersuchten Metabolite*

Analyt	Summenformel	C-Atome	Isotopomere
<i>Aspartat</i>	$C_4H_7NO_4$	4	9
<i>Cystein</i>	$C_3H_7NO_2S$	3	6
<i>Glutamat</i>	$C_5H_9NO_4$	5	10
<i>Aspartatsemialdehyd</i>	$C_4H_7NO_3$	4	8
<i>Serin</i>	$C_3H_7NO_3$	3	6
<i>Asparagin</i>	$C_4H_8N_2O_3$	4	8
<i>Threonin/Homoserin</i>	$C_4H_9NO_3$	4	8
<i>Glutamin</i>	$C_5H_{10}N_2O_3$	5	10
<i>Tyrosin</i>	$C_9H_{11}NO_3$	9	18
<i>Glycin</i>	$C_2H_5NO_2$	2	4
<i>Alanin</i>	$C_3H_7NO_2$	3	6
<i>Methionin</i>	$C_5H_{11}NO_2S$	5	10
<i>Prolin</i>	$C_5H_9NO_2$	5	10
<i>Valin</i>	$C_5H_{11}NO_2$	5	10
<i>Phenylalanin</i>	$C_9H_{11}NO_2$	9	18
<i>Isoleucin/Leucin</i>	$C_6H_{13}NO_2$	6	10
<i>Tryptophan</i>	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	11	12
<i>Lysin</i>	$C_6H_{14}N_2O_2$	6	7
<i>Arginin</i>	$C_6H_{14}N_4O_2$	6	15
<i>Histidin</i>	$C_6H_9N_3O_2$	6	12
<i>Summe:</i>			197

Die Aufteilung der Analyten in vier Perioden ist in *Tabelle 5.7* und den folgenden Abbildungen dargestellt. In der ersten Periode eluiert Aspartat (Retentionszeit (Rt) = 8,5 min, s. *Abbildung 5.29*), die neun Übergänge aller Massenisotopomere der Aminosäure (s. *Anhang*) wurden in die Methode programmiert und innerhalb der ersten 9 min detektiert. In der zweiten Periode folgen Glutamat, Threonin, Homoserin, Aspartatsemialdehyd, Asparagin, Serin, Tyrosin und Glutamin (68 Übergänge). Die dritte Periode beinhaltet die Aminosäuren Alanin, Methionin, Prolin und Glycin mit 30 Übergängen. Und in Periode vier eluieren die unpolaren Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin und Tryptophan (50 Übergänge). Im Falle der Chromatographie bei pH 6 wird eine weitere Periode für die basischen Aminosäuren Lysin (147,2 – 84,1), Histidin (156,1 – 110,0) und Arginin (175,1 – 70,1) mit 34 Übergängen programmiert (nicht abgebildet).

## Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5.7: *Programmierte Perioden für die Messung markierter Metabolite*

Periode	Zeit (min)	Analyt
1	0 – 9,5	Aspartat
2	9,5 – 15,5	Glutamat, Threonin/Homoserin, Aspartat-semialdehyd, Asparagin, Serin, Tyrosin, Glutamin
3	15,5 - 19	Alanin, Methionin, Prolin, Glycin
4	19 - Ende	Valin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Tryptophan
(5)	(55 - Ende)	(Lysin, Histidin, Arginin nur bei pH 6)

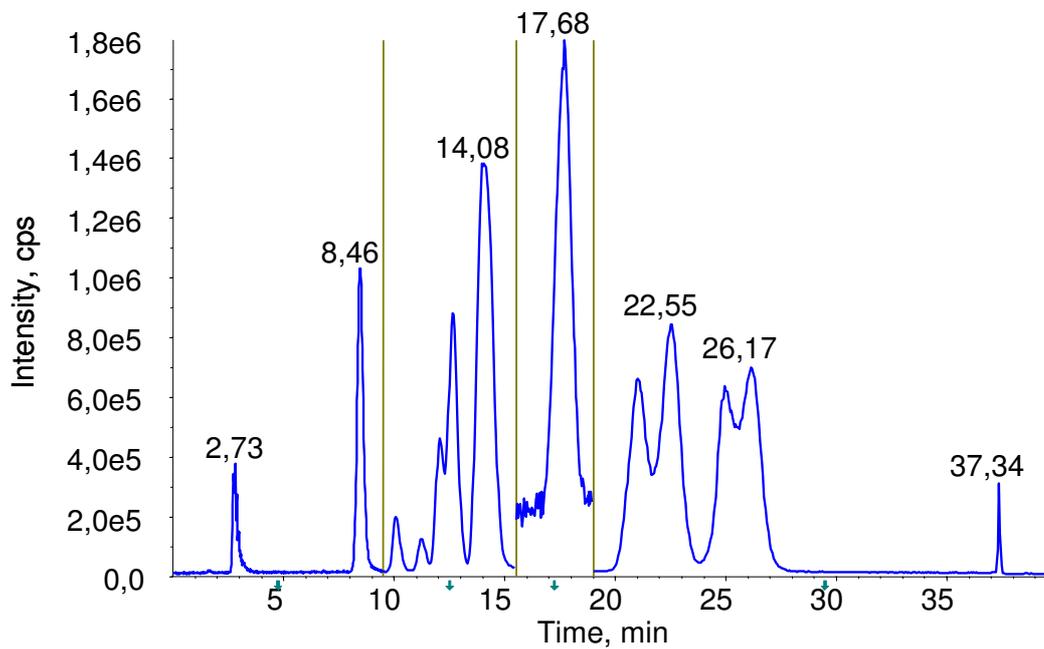
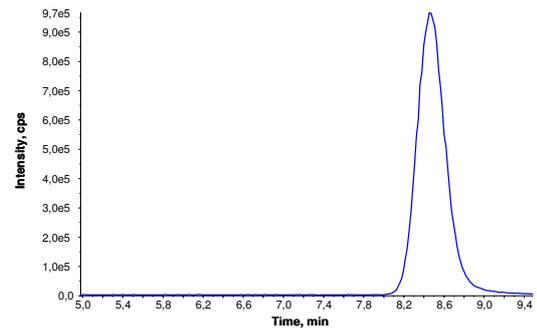


Abbildung 5.29: *Aminosäurestandard 10 µM*

## Ergebnisse und Diskussion

### Periode 1:

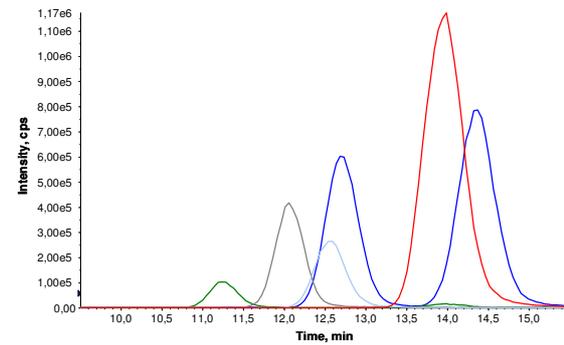
Laufzeit 9,5 min  
Aspartat 134,1 - 74,1



Periode 1 - Asp 10 µM

### Periode 2:

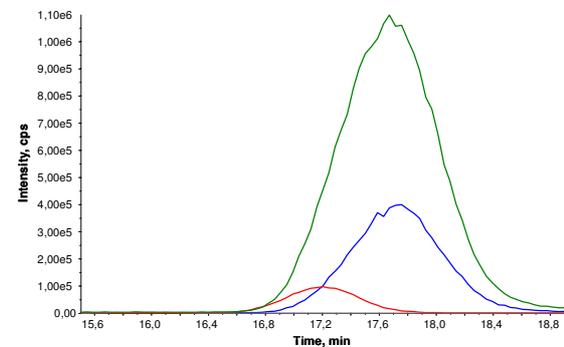
Laufzeit 6,0 min  
Glutamin\* 147,2 - 84,1  
Threonin/Homoserin 120,2 - 74,1  
Serin 106,1 - 60,0  
Asparagin 133,0 - 87,0  
Cystein 122,0 - 76,1  
Glutamat 148,1 - 84,0  
Aspartatsemialdehyd 117,9 - 74,0  
Tyrosin\* 182,1 - 136,1



Periode 2 - Glu, Ser, Asn, Thr, Hse und Gln 10 µM

### Periode 3:

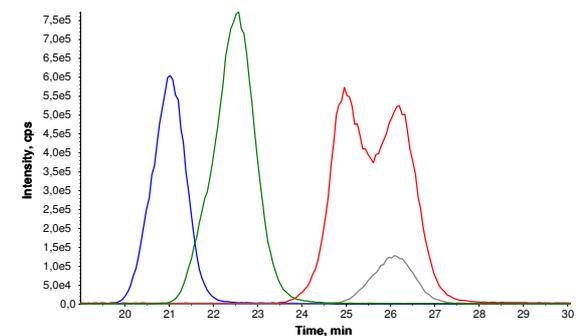
Laufzeit 3,5 min  
Glycin 76,0 - 48,1  
Alanin 90,1 - 44,1  
Methionin 150,1 - 104,0  
Prolin 116,0 - 70,1



Periode 3 - Gly, Ala, Pro und Met 10 µM

### Periode 4:

Laufzeit Start 19,0 min  
Valin 118,1 - 72,0  
Phenylalanin\* 166,1 - 120,0  
Leucin/Isoleucin 132,1 - 86,0  
Tryptophan 205,1 - 187,9



Periode 4 - Val, Phe, Ile/Leu und Trp 10 µM

Sehr viele der untersuchten Aminosäuren eluieren in der zweiten Periode. Außerdem bilden die kohlenstoffreichen, aromatischen Aminosäuren in Periode vier viele Massenisotopomere im  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment (s. *Tabelle 5.6*). Dies führt dazu, dass in beiden Perioden die simultane Detektion von mehr als 40 Übergängen notwendig wäre.

Die sinnvolle Anzahl an Übergängen in einer Periode wird über die Peakbreite und die Zykluszeit definiert. Letztere ist die Zeit die benötigt wird, um jedes in der Periode programmierte Experiment einmal auszuführen. Die Zykluszeit errechnet sich aus der *dwell time* (Messdauer eines programmierten MRM-Übergangs), der Anzahl an Analyten (programmierte MRM-Übergänge) und der Umschaltzeit des Massenspektrometers zwischen zwei MRM-Übergängen ( $\sim 5$  ms). Aus der Gesamtlaufzeit der Periode und der Zykluszeit ergibt sich dann die Anzahl an Zyklen innerhalb der Periode.

Durch Erhöhung der *dwell time* wird der Untergrund (*Noise*) reduziert, auf diese Weise kann das Signal zu Rausch Verhältnis direkt beeinflusst werden. Allerdings darf die *dwell time* nur so hoch gesetzt werden, dass während der Elution eines Analyten (Peakbreite) mindestens 15-20 Zyklen durchlaufen werden. Auf diese Weise wird eine minimal erforderliche Anzahl von Datenpunkten für den MRM-Übergang eines Analyten gewährleistet. Je nach Peakbreite und Anzahl der Analyten liegt die *dwell time* normalerweise zwischen 50 und 250 ms.

Aufgrund der Peakbreite von 1-3 min wird versucht eine *dwell time* von 80 ms nicht zu unterschreiten. Bei 40 Übergängen in einer Periode würde sich somit eine Zykluszeit von 3,4 s, bestehend aus 3,2 s Messzeit und 0,2 s Umstellzeit, ergeben. Für einen Peak mit einer Breite von einer Minute erhält man auf diese Weise 17,6 Datenpunkte, so dass die Anforderung von 15-20 Datenpunkten gerade erfüllt wird. Aus diesem Grund können in der zweiten Periode nicht alle Isotopomere simultan erfasst werden. Durch Variation der Eluenten wäre es zwar möglich das Zeitfenster zu strecken, und in zwei Perioden zu unterteilen, allerdings ginge dies mit einer Verbreiterung der Peaks und Verlängerung der Gesamtlaufzeit einher. Deshalb werden einige Aminosäuren (Glu, Cys, Tyr, Phe auf Seite 85 mit \* gekennzeichnet) in eine extra Methode ausgelagert die bei Bedarf genutzt werden kann.

Zwischen dem Ende einer Periode und dem Beginn der nachfolgenden Periode benötigt das Massenspektrometer ebenfalls eine Umschaltzeit ( $\sim 0,02$  min) in der keine Datenaufzeichnung erfolgt. Dies bedeutet, dass beim Wechsel der Perioden kein Peak eluieren sollte, denn wenn dies eintritt, kann aufgrund fehlender Messdaten keine Auswertung erfolgen. Die Analyten in Periode zwei und vier eluieren verschachtelt, so dass es nicht möglich ist ohne Datenverlust weitere Unterteilungen vorzunehmen. Außerdem müssen Perioden so gesetzt werden, dass Retentionszeitverschiebungen (bei der Ionenaustauschchromatographie z. B. bedingt durch variierende Salzgehalte der Proben) ausgeglichen werden können. Um Datenverlust vorzubeugen wird die Messung einiger markierter Aminosäuren (Ala, Met, Val) deshalb ebenfalls in die oben beschriebene extra Methode ausgelagert.

Bereits angekündigte Weiterentwicklungen der *MS-Software* sollen es ermöglichen MRM-Übergänge für bestimmte Zeitabschnitte zu programmieren. Chromatogramme müssen dann nicht mehr in Perioden unterteilt werden, stattdessen werden MRM-Übergänge verschachtelt. Auf diese Weise reicht es aus, Übergänge lediglich im Retentionszeitfenster eines Analyten zu programmieren. Somit kann einerseits die *dwell time* erhöht, also die Nachweis-

empfindlichkeit gesteigert werden und andererseits Schwankungen in der Retentionszeit durch geeignete Wahl der Messzeitfenster einfach ausgeglichen werden.

### 5.2.1.1 Bestimmung der natürlichen Isotopenverteilung von Aspartat

Die Anwendbarkeit der aufgesetzten Methode zu Messung  $^{13}\text{C}$ -markierter Metabolite, wird durch die exemplarische Bestimmung der natürlichen Isotopenverteilung von Aspartat überprüft. Hierzu wird ein 10  $\mu\text{M}$  Aspartatstandard mit der oben beschriebenen Methode vermessen (s. *Abbildung 5.30*). Über die ermittelten Peakflächen wird die Isotopenverteilung der Referenzsubstanz berechnet und in *Tabelle 5.8* mit der natürlichen Isotopenverteilung verglichen.

Tabelle 5.8: Isotopenverteilung von Aspartat

Aspartat	[Fläche]	$\Sigma$ [Fläche]	Gemessener Anteil %	natürlicher Anteil %
M+0	1.93E+07	1.93E+07	94,41	94,42
M+1	4.60E+05	9.60E+05	4,70	4,66
M+1(F)	5.00E+05			
M+2	8.79E+04	1.83E+05	0,89	0,87
M+2(F)	1.23E+04			
M+1 +1(F)	8.25E+04			

Abkürzungen: m+0:  $^{12}\text{C}_4\ ^{13}\text{C}_0$ , m+1:  $^{12}\text{C}_3\ ^{13}\text{C}_1$ , m+2:  $^{12}\text{C}_2\ ^{13}\text{C}_2$ , (F): Position der Markierung ist im Fragment

Gemessene und natürliche Isotopenverteilung zeigen eine sehr gute Übereinstimmung. Die Ergebnisse demonstrieren die Anwendbarkeit der Methode für die Untersuchung der  $^{13}\text{C}$ -Aufnahme im Zellstoffwechsel. Da das eingesetzte Quadrupol Massenspektrometer mit Unit Auflösung filtert (0,7 amu, *full width at half-maximum height*), werden bei jeder Aminosäure die m-1 und m+| $^{13}\text{C}_{\text{max}}$ |+1 Übergänge programmiert (s. *Abbildung 5.30* und Anhang). Auf diese Weise wird überprüft, ob die Massenkalibrierung stabil ist.

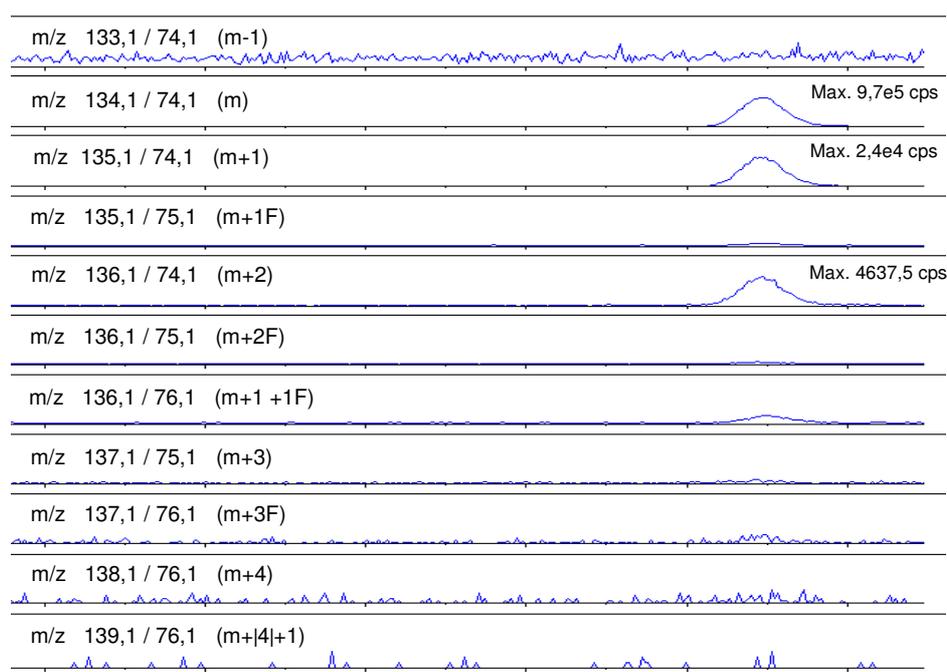


Abbildung 5.30: Isotopomere des Aspartat (Aminosäurestandard 10  $\mu\text{M}$ )

Abkürzungen: m+1 +1F:  $^{12}\text{C}_2\ ^{13}\text{C}_2$  von zwei Markierungen liegt nur eine im Fragment, Rest s. Tabelle 5.8

Ein Unsicherheitsfaktor bei der Messung von Metaboliten (< 1000 g/mol) ist der hohe Untergrund bei geringen Molekulargewichten. Diese liegen bei underivatisierten Aminosäuren unterhalb von 200 g/mol (Ausnahme Trp 204 g/mol), so dass der Untergrund im Massenspektrum sehr hoch sein kann. Hierdurch kann insbesondere die Bestimmung der Isotopenverteilung und der Quantifizierung von Isotopomeren erschwert werden. Starke Unterschiede in Intensität und Rauschen der Basislinie, führen zu abweichenden Signal-zu-Rauschverhältnissen markierter und unmarkierter MRM-Übergänge eines Analyten (d. h. die Nachweisgrenzen sind unterschiedlich).

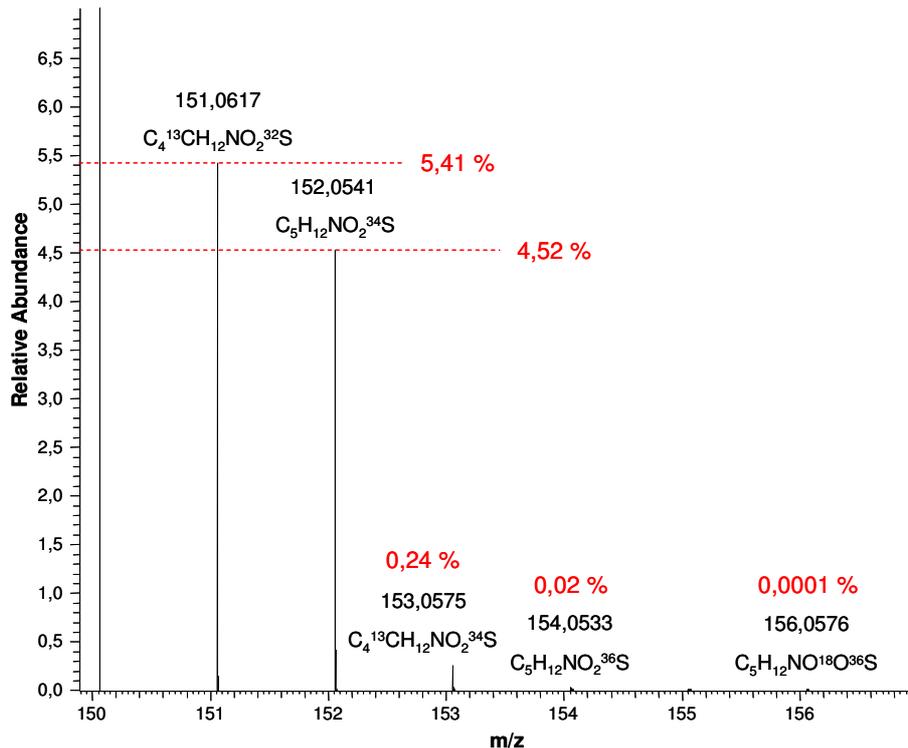


Abbildung 5.31: Simulation des natürlichen Isotopenmusters der Aminosäure Methionin <sup>[15]</sup>

Dies kann so weit gehen, dass die natürliche Isotopenverteilung der Referenzsubstanz Methionin (m/z 150,1, s. *Abbildung 5.31*) verfälscht wird. Ein Massenchromatogramm der gemessenen MS/MS-Übergänge eines Methioninstandards (unmarkiert) in Wasser ist in *Abbildung 5.32* dargestellt. Hier kann das einfach <sup>13</sup>C-markierte (m+1) Isotopomer des Methionin wegen des hohen Untergrundes nicht detektiert werden (natürlicher Anteil 5,41 % < NWG). Im Gegensatz dazu ist das geringer vertretene zweifach <sup>34</sup>S-markierte (m+2) Isotopomer erkennbar (natürlicher Anteil 4,52 % > NWG). Bei Quantifizierungen wird das unmarkierte Isotopomer für die Kalibrierung herangezogen, weil davon ausgegangen wird, dass physikalische und chemische Eigenschaften aller Isotopomere identisch sind. Dabei wird vorausgesetzt, dass auch die Messbedingungen für alle Isotopomere identisch sind. Diese Annahme ist für den Fall des Methionins im <sup>13</sup>C-Markierungsexperiment von *E. coli* DM 1265 (s. *Kapitel 5.7.2*) leider nicht zutreffend, da die Charge der verwendeten Essigsäure eine störende Verunreinigung enthielt. Aus diesem Grund darf die Basislinie bei der Interpretation von Markierungsdaten nicht außer Acht gelassen werden.

## Ergebnisse und Diskussion

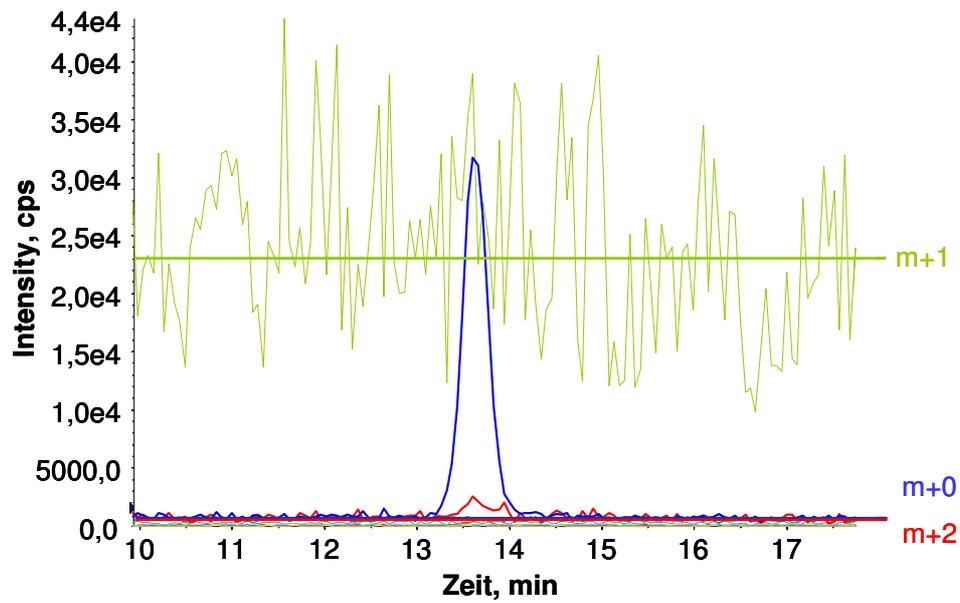


Abbildung 5.32: Massenspuren der Isotomere des Methionin

Dieser Limitierung kann nur durch eine Erhöhung der Massenauflösung begegnet werden. Bei Messungen mit akkurater Massenauflösung würde es Interferenzen zwischen Analyt und Untergrund nur dann geben, wenn es sich bei den Störsubstanzen um Isomere der Analyten mit identischem Retentionsverhalten handelt.

### 5.3 Quantifizierungsstrategien

Mittlerweile ist die Massenspektrometrie als essentielle analytische Technik zur Metabolomanalyse von Bakterien, Säuger- und Pflanzenzellen weit verbreitet. Auch wenn wiederholt Bedenken zur Anwendbarkeit und Belastbarkeit der LC/MS geäußert wurden, da die Technik - insbesondere mit Elektrospray Ionisierung (s. Kapitel 3.2.1) - anfällig gegen Matrixeffekte ist (Böttcher et al. 2007). Durch eine vergleichende Studie unterschiedlicher Quantifizierungsansätze wird der Einfluss der Zellmatrix im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Hierzu werden der Wildtyp *E. coli* MG 1655 und der L-Threoninproduzent *E. coli* DM 1265 im Bioreaktor kultiviert (s. Kapitel 5.6.1 und 5.6.2). Die Zellen werden in der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600}$  ca. 30) geerntet, nach Kapitel 4.7 aufgearbeitet und die Zellextrakte mittels LC-MS/MS wie in Kapitel 4.9 beschrieben vermessen. Ein Schema des experimentellen Vorgehens ist in Abbildung 5.33 dargestellt. Die angewandten Quantifizierungsstrategien (s. Kapitel 4.10) sind *Standardaddition* (ASA, Met und Ser), *interne Kalibrierung*, *Isotope Dilution* und *externe Kalibrierung*.

Die Verwendung stabiler, isopenmarkierter Interner Standards normalisiert die MS Intensität eines Analyten bezogen auf sein markiertes Analoges. Auf diese Weise werden Matrixeffekte wie Ionensuppression, Variationen bei der Probenaufarbeitung, der Injektion und des Messinstrumentes kompensiert. Da die Verfügbarkeit solcher Standards limitiert ist, werden häufig strukturell verwandte Verbindungen genutzt. Dies kann insbesondere in komplexen Matrices die Quantifizierung beeinträchtigen, da die Standards nicht mit den Analyten koeleuieren und somit nicht für Matrixeffekte wie z. B. Ionensuppression korrigieren können. In diesem Fall, spiegelt die relative Signalintensität eines Metaboliten und seines Internen Standards möglicherweise nicht das Konzentrationsverhältnis wider (Guo et al. 2007).

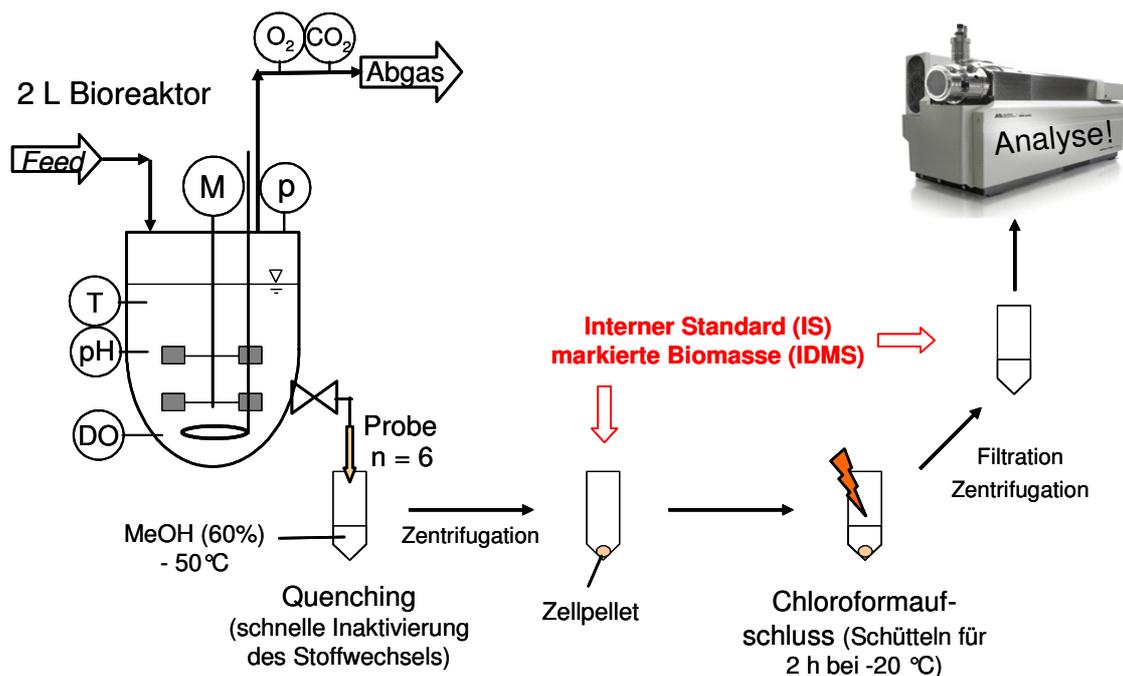


Abbildung 5.33: Experimentelles Vorgehen

Interne Standards können entweder vor oder nach dem Zellaufschluss zugegeben werden, um (1.) für Matrixeffekte und andere Verluste während der Probenaufarbeitung bis hin zur Analyse und (2.) lediglich für Matrix- und Analyseneffekte zu kompensieren (s. *Abbildung 5.33*). Damit eine Substanz als Interner Standard (IS) geeignet ist, sollte sie dem Analyten möglichst ähnlich sein, also „identisches“ physikalisches und chemisches Verhalten aufweisen. Für die Untersuchungen mit interner Kalibrierung wird U<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-markiertes Aspartat (Vorläufer der Threoninbiosynthese s. *Kapitel 3.4.6*) als Interner Standard eingesetzt. Im besten Fall korrigiert der IS (U<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-Aspartat) nicht nur für sein unmarkiertes Analogon (U<sup>12</sup>C<sub>4</sub>-Aspartat), sondern kann auch für die Quantifizierung anderer Aminosäuren genutzt werden. Dies setzt voraus, dass das Verhalten (z. B. Stabilität, Löslichkeit und Ionisierung) von Aspartat und anderen Aminosäuren während der Aufarbeitung und Quantifizierung vergleichbar ist. So lange sich Analyt und Interner Standard identisch verhalten, werden durch Störfaktoren nur die absoluten Intensitäten der Messsignale beeinflusst, nicht aber das Verhältnis der beiden zueinander (Delatour 2004).

Bei der *Isotope Dilution Mass Spectrometry* (IDMS) dient markierter Zellextrakt als Interner Standard. Dieser muss, unter Verwendung markierter Substrate, zunächst durch Fermentation hergestellt werden (s. *Kapitel 5.3.1*). Auf diese Weise verteilt sich die Markierung im gesamten Stoffwechsel und jeder zu quantifizierende Analyt im Zellextrakt erhält ein isotope-markiertes Analoges. Guo et al. (2007) zeigten, dass deuterierte Standards bei der RP-Chromatographie Isotopeneffekten unterliegen, <sup>13</sup>C-markierte Standards hingegen zeigten identisches Retentionsverhalten wie die unmarkierten Analyten. Aus diesem Grund sollten <sup>13</sup>C-markierte Standards in der LC-MS bevorzugt werden, da sie Matrixeffekte effektiver ausgleichen können.

Die Ergebnisse der intrazellulären Aminosäurepools im Wildtyp *E. coli* MG 1655 sind in *Abbildung 5.34* dargestellt. Beim Vergleich der Konzentrationen nach externer und interner Kalibrierung fällt auf, dass die ermittelten Konzentrationen bei der Auswertung über Internen Standard durchweg höher sind. Die prozentualen Abweichungen der Ergebnisse nach interner und externer Kalibrierung liegen zwischen 6 und 80 % (s. *Tabelle 5.9*). Diese Beobachtungen decken sich mit den, von Annesley (2003), Delatour (2004) und Böttcher et al. (2007), beschriebenen Effekten der Ionensuppression in komplexen Matrices.

*Tabelle 5.9: Aminosäurekonzentrationen in E. coli MG 1655 nach externer und interner Kalibrierung*

Aminosäure	Externe Kalibrierung Konz. [µM]	Interne Kalibrierung Konz. [µM]	Abweichung [%]
Ala	295,0	422,8	30,2
Asp	122,8	130,2	5,7
Glu	429,7	1,9	-
Gly	135,2	649,9	79,2
Hse	4,3	11,7	62,9
Met	30,7	43,8	30,0
Phe	42,6	60,6	29,6
Pro	4,6	6,24	26,8
Ser	16,2	25,1	35,6
Thr	8,1	17,7	54,4
Val	49,7	57,3	13,3

Die Ergebnisse der externen Kalibrierung und der Auswertung über Internen Standard sind mit wenigen Ausnahmen vergleichbar. Die gemessenen Gehalte liegen insbesondere beim Glycin und Glutamat sehr weit auseinander, trotzdem scheint die Quantifizierung mit externer Kalibrierung bei höheren Konzentrationen (Ala, Asp) akkurat zu sein. Dies liegt sehr wahrscheinlich daran, dass die Metabolitkonzentrationen in den linearen Messbereich verdünnt werden müssen, was ebenfalls zu einer Verdünnung der störenden Probenmatrix führt.

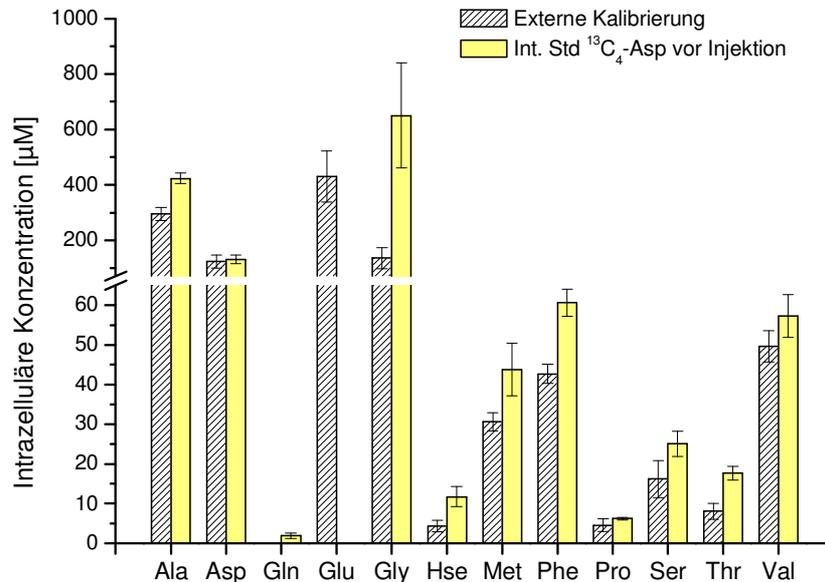


Abbildung 5.34: Intrazelluläre Aminosäurekonzentrationen von *E. coli* MG 1655

Da der Interne Standard erst direkt vor der analytischen Messung zugegeben wurde, können Verluste, die vor diesem Zeitpunkt erfolgt sind, nicht ausgeglichen werden. Um herauszufinden, ob der Zeitpunkt der Zugabe des Internen Standards einen Effekt auf das Messergebnis hat, wird ein weiteres Experiment mit *E. coli* DM 1265 durchgeführt. Die gemessenen Aminosäurepools sind in *Abbildung 5.35* dargestellt.

Grundsätzlich scheint es kaum einen Unterschied zu machen, ob der Interne Standard (U<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-Aspartat) vor oder nach dem Chloroformaufschluss zugegeben wird (s. *Abbildung 5.33*). Möglicherweise entstehen die größten Verluste bereits während des Methanolquenchings (s. *Kapitel 5.4*). Diese Verluste sind praktisch nicht erfassbar, da aufgrund mangelnder Verfügbarkeit von Leerproben keine Wiederfindungsexperimente mit „metabolitfreien“ Zellextrakten durchführbar sind. Die Ergebnisse der Aminosäuren Alanin, Aspartat und Valin demonstrieren, dass hohe physiologische Konzentrationen (intrazellulär > 50 µM) sehr gut über externe Kalibrierung quantifizierbar sind. Matrixeffekte scheinen in diesem Konzentrationsbereich eine untergeordnete Rolle zu spielen, so dass bei intrazellulären Konzentrationen > 50 µM keine Notwendigkeit besteht die Methode der *Isotope Dilution* zur Aminosäurequantifizierung anzuwenden.

Die Auswertung über den Internen Standard U<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-Aspartat zeigt zufriedenstellende Resultate (vergl. *Abbildung 5.35*). Über interne Kalibrierung ermittelte Konzentrationen entsprechen mit Ausnahme der Aminosäure Serin denen der *Isotope Dilution*, bei der jede Aminosäure ihr

## Ergebnisse und Diskussion

eigenes markiertes Analogon hat. Somit ist das eingesetzte markierte Aspartat nicht nur als Interner Standard für sein unmarkiertes Analogon geeignet, sondern kann auch für die Quantifizierung der meisten anderen Aminosäuren im chromatographischen Lauf herangezogen werden (s. Kapitel 5.5.2).

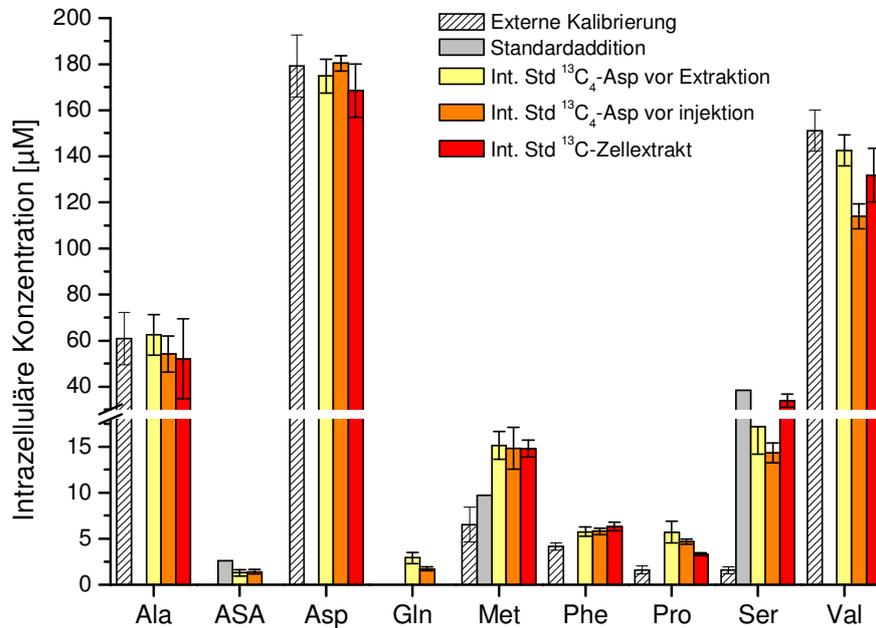


Abbildung 5.35: Intrazelluläre Aminosäurekonzentrationen in *E. coli* DM 1265 - Verdünnung 1:10 und 1:20 (Ala, Asp, Val), Verdünnung 1:2 und 1:10 (ASA, Gln, Met, Phe, Pro, Ser)

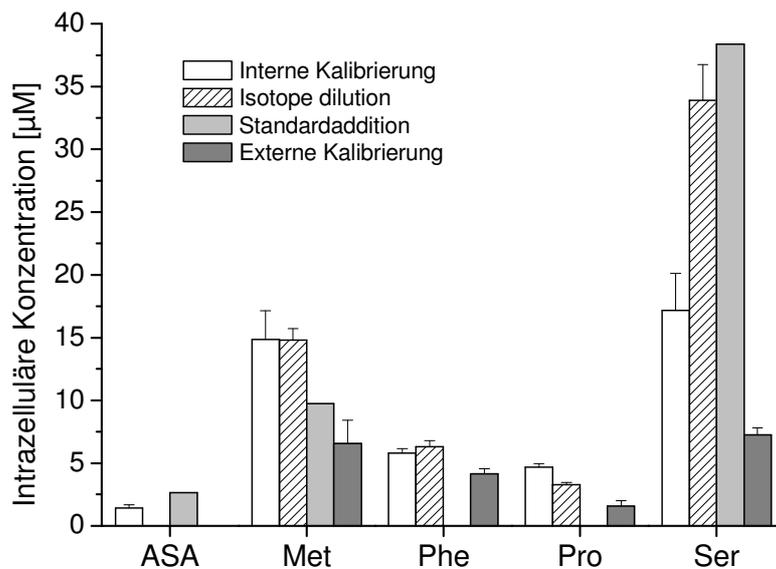


Abbildung 5.36: Intrazelluläre Aminosäurekonzentrationen (< 50 µM)

Bei der Quantifizierung intrazellulärer Metabolite im Konzentrationsbereich  $< 50 \mu\text{M}$  scheint die externe Kalibrierung für die Quantifizierung weniger gut geeignet zu sein. Zum besseren Vergleich sind die gering konzentrierten Aminosäuren im Zellextrakt von *E. coli* DM 1265 deshalb in *Abbildung 5.36* vergrößert dargestellt. Es werden negative Effekte beobachtet, die besonders beim Serin stark ausgeprägt sind. Hier liegen nur die mittels *Isotope Dilution* und Standardaddition erhaltenen Ergebnisse dicht beieinander, über interne- und externe Kalibrierung ermittelte Konzentrationen sind deutlich geringer. Diese Effekte könnten z. B. durch Ionensuppression erklärt werden. Sie können nur kompensiert werden, wenn ein koeluiendes Analogon als Interner Standard die Matrixeffekte ausgleicht.

Die besten Ergebnisse im Konzentrationsbereich  $< 50 \mu\text{M}$  werden mit der *Isotope Dilution* und interner Kalibrierung erzielt. Über externe Kalibrierung bestimmte Gehalte sind durchgehend niedriger. Somit ist die Kompensation von Matrixeffekten bei der Quantifizierung von  $\leq 1:2$  verdünnten Zellextrakten zur Bestimmung absoluter Gehalte unerlässlich. Für Zellextrakte in Verdünnungen von 1:2 bis 1:20, eignen sich die interne Kalibrierung und die *Isotope Dilution* Massenspektrometrie am besten um Matrixeffekte zu kompensieren. Zudem zeigen die Ergebnisse, dass  $\text{U}^{13}\text{C}_4$ -Aspartat als Interner Standard für die Quantifizierung vieler Aminosäuren im chromatographischen Lauf geeignet ist (Ausnahme Ser). Die Methode der Standardaddition ist aufgrund des hohen Zeitbedarfs lediglich bei sehr gering konzentrierten Metaboliten wie z. B. Aspartatsemialdehyd empfehlenswert. Zur Vermeidung der zeitaufwendigen Prozedur, können die Proben auch aufkonzentriert und anschließend mittels interner Kalibrierung vermessen werden. Für die Quantifizierung biologischer Proben in Verdünnungen  $\geq 1:20$  ist die externe Kalibrierung ausreichend, da kaum Matrixeinflüsse beobachtet werden.

Bei Anwendung der *Isotope Dilution*, bei der jeder Metabolit sein eigenes markiertes Analogon hat, wird der Korrelationskoeffizient positiv beeinflusst und auch der lineare Bereich der Kalibrierkurve erweitert. Dies ist in *Tabelle 5.10* und *Abbildung 5.37* exemplarisch für die Aminosäuren Aspartat, Homoserin, Glycin und Alanin dargestellt.

*Tabelle 5.10: Kalibrierbereich und Bestimmtheitsmaß mit externer Kalibrierung und IDMS*

	Externe Kalibrierung		IDMS	
	[ $\mu\text{M}$ ]	$R^{2*}$	[ $\mu\text{M}$ ]	$R^{2*}$
Asp	0,25 - 1	0,9971	0,05 - 5	1,0000
Hse	0,25 - 1	0,9253	0,05 - 5	0,9986
Gly	0,25 - 2,5	0,9823	0,25 - 5	0,9982
Ala	0,25 - 1	0,9578	0,05 - 5	0,9979

\* Bestimmtheitsmaß für den Kalibrierbereich

## Ergebnisse und Diskussion

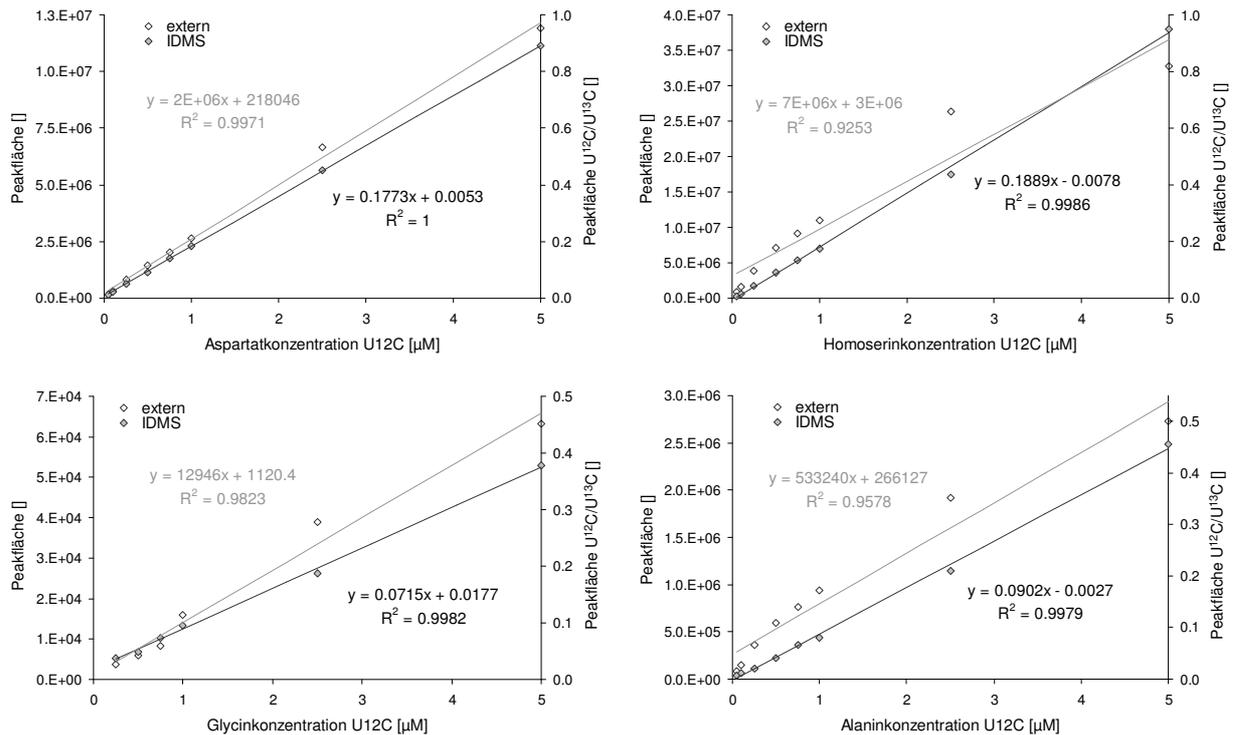


Abbildung 5.37: Isotope Dilution (grau) vs. externe Kalibrierung (weiß) am Beispiel von Aspartat, Homoserin, Glycin und Alanin

Die Untersuchungen der verschiedenen Quantifizierungsstrategien zeigen, dass eine gute chromatographische Trennung die reproduzierbare Erfassung relativer Änderungen der Metabolitkonzentration ermöglicht. Für eine Quantifizierung sind allerdings markierte Interne Standards notwendig. Dies ist bei der Vielzahl von Metaboliten, deren Strukturen teilweise unbekannt sind oder für die es keine Referenzmaterialien gibt, nur schwer realisierbar (Böttcher et al. 2007). Somit scheint die *Isotope Dilution*, bei der markierter Zellextrakt hergestellt und eingesetzt wird, die einfachste und akkuratere Variante zu sein, um metabolische Veränderungen nach physiologischer Stimulation zu erfassen und quantitative intrazelluläre Konzentrationen abzuleiten.

### 5.3.1 Bereitstellung von markiertem Zellextrakt für die Isotope Dilution

Zur Herstellung markierter Biomasse für die Nutzung als markierter Interner Standard, wird der Stamm *E. coli* DM 1265 auf  $\text{U}^{13}\text{C}_6$ -Glucose kultiviert (Zeller 2006). Die markierte Biomasse wird nach 37,5 h komplett gequench und mit Chloroform aufgeschlossen (s. Kapitel 4.6 und 4.7). Für die Extraktion der markierten intrazellulären Metabolite wird nur die Hälfte des üblicherweise eingesetzten Volumens an Extraktionslösung verwendet, um die später folgende Verdünnung bei der Zugabe zu unmarkierten Zellextrakten zu kompensieren. Auf diese Weise hergestellte  $^{13}\text{C}$ -markierte Zellextrakte werden für die *Isotope Dilution Mass Spectrometry* (IDMS) eingesetzt (Wu et al. 2005, s. Kapitel 5.3).

Die Aminosäurekonzentrationen in den Extrakten werden anschließend mittels LC-MS/MS nach Kapitel 4.9.1 bestimmt. Die ermittelten Peakflächen der unterschiedlichen Markierungszustände der intrazellulären Aminosäuren werden aufsummiert und der Anteil des jeweiligen Isotopomers berechnet. Aufgrund der verwendeten unmarkierten Medienbestandteile Hefe-

extrakt und Carbonat, sowie der Begasung während der Fermentation, kann keine vollständige Markierung erreicht werden. Allerdings ist dies für die Anwendung der Methode der *Isotope Dilution* auch nicht notwendig, da die Gehaltsbestimmung über das Verhältnis von vollmarkiertem Metabolit zu unmarkiertem Metabolit erfolgt. In *Tabelle 5.11* sind die Anteile an unmarkierten und vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierten Aminosäuren gegenübergestellt.

*Tabelle 5.11: Anteil an unmarkierten und vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierten Aminosäuren*

Aminosäure	Anteil an der Gesamtpeakfläche		Anzahl C-Atome
	$\text{U}^{12}\text{C}$ [%]	$\text{U}^{13}\text{C}$ [%]	
Gly	0,0	96,4	2
Ala	0,0	97,3	3
Ser	0,0	92,1	3
Asp	0,2	84,7	4
ASA	0,0	87,3	4
Hse	0,0	89,3	4
Thr	0,0	88,7	4
Asn	0,0	83,0	4
Glu	0,2	80,8	5
Met	0,0	80,2	5
Pro	4,4	74,9	5
Val	1,7	89,9	5
Phe	0,9	87,9	9

*Anmerkung: die zu 100 % fehlenden Anteile an der Gesamtpeakfläche verteilen sich auf die anderen möglichen Markierungszustände der Analyten:  $m+1$  bis  $m+n-1$  ( $n$  = Anzahl an C-Atomen im Molekül)*

Für die meisten Aminosäuren ist der Anteil an unmarkiertem Isotopomer nicht nachweisbar oder sehr gering, so dass der markierte Extrakt als Interner Standard eingesetzt werden kann. Mit steigender Kohlenstoffkette im Molekül sinkt der  $\text{U}^{13}\text{C}$ -Markierungsanteil. Dies kann durch die längeren Stoffwechselwege zu den entsprechenden Aminosäuren erklärt werden, da die Wahrscheinlichkeit des Eintrags von unmarkiertem Kohlenstoff (z. B. durch den Einbau von  $^{12}\text{CO}_2$  aus der Zuluft oder Signalverdünnung durch unmarkierte Speichermetabolit-pools wie dem *Protein turnover*, s. Grotkjær et al. 2004) mit zunehmender Entfernung von der Glykolyse steigt. Außerdem ist die Wahrscheinlichkeit des Einbaus unmarkierter  $^{12}\text{C}$ -Atome mit steigender Anzahl an C-Atomen im Molekül größer.

## Ergebnisse und Diskussion

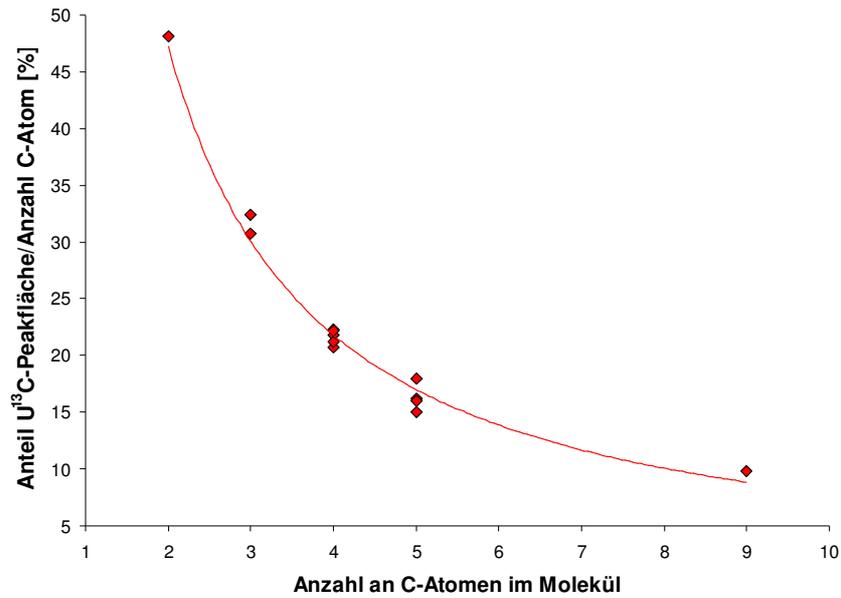


Abbildung 5.38: Verhältnis von  $U^{13}C$ -Markierung und Anzahl an C-Atomen im Molekül

Das Verhältnis zwischen der  $U^{13}C$ -Peakfläche und der Anzahl an C-Atomen ist in *Abbildung 5.38* dargestellt. Aminosäuren mit der gleichen Anzahl an C-Atomen zeigen vergleichbare Anteile der  $U^{13}C$ -Peakfläche/Anzahl C-Atome Verhältnisse. Dies lässt darauf schließen, dass die vermessenen Aminosäuren aus dem markierten Substrat  $U^{13}C$ -Glucose und nicht aus anderen C-Quellen gebildet wurden.

## 5.4 Quenching vs. Membranintegrität

Zur Untersuchung der Auswirkung des Methanolquenchings (s. Kapitel 4.6) auf die Integrität der Zellmembran (s. Abbildung 3.10), werden *E. coli* und *C. glutamicum* in Schüttelkolben kultiviert. Aus den Kulturen werden Proben in Doppelbestimmung entnommen und mit 60 %igem Methanol penetriert. Als positiv Kontrollen werden Proben ohne Methanoleinwirkung parallel aufgearbeitet, als negativ Kontrollen dienen mit purem Methanol penetrierte Zellen. Die Membranintegrität wird anschließend mit dem Live/Dead® BacLight™ Viabilitätstest bestimmt (s. Kapitel 4.8.3), der auf der Messung der Fluoreszenz zweier Nucleinsäureinterkalatoren beruht. Die Ergebnisse für die beiden untersuchten Stämme sind in Abbildung 5.39 dargestellt:

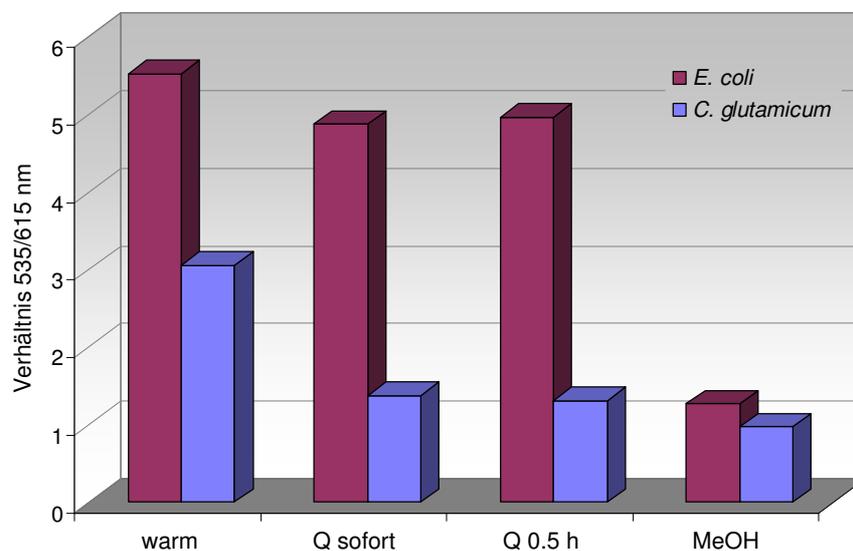


Abbildung 5.39: Membranintegrität

warm = positiv Kontrolle, Q = Quenching, sofort = kurze Einwirkzeit, 0,5 h = 30 min Einwirkzeit, MeOH = negativ Kontrolle

Die Membranintegrität von *C. glutamicum* (grampositiv) wird durch das Quenching stärker beeinträchtigt als bei *E. coli* (gramnegativ). Weiterhin kann abgeleitet werden, dass die Ergebnisse nach Einwirkung von methanolischer Lösung (im untersuchten Zeitrahmen von ca. 10 und 40 min) unabhängig von der Penetrationszeit sind. Wahrscheinlich erfolgt die Zerstörung der Membran bereits innerhalb weniger Sekunden. Entscheidend ist jedoch, dass sich die Methanolbehandlung sowohl bei *E. coli*, als auch bei *C. glutamicum* signifikant negativ auf die Membranintegrität auswirkt.

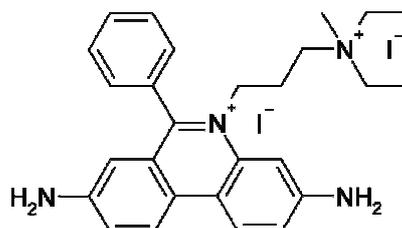


Abbildung 5.40: Struktur von Propidiumiodid

## Ergebnisse und Diskussion

Da der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid mit 668,4 g/mol ein höheres Molekulargewicht als die meisten untersuchten Metabolite aufweist, und vergleichsweise unpolar ist (Struktur s. *Abbildung 5.40*), können durch die erhaltenen Ergebnisse keine direkten Rückschlüsse auf die Durchlässigkeit der Membran für kleine polare Moleküle gezogen werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Metabolite des Zentralstoffwechsels sowie anabole Metabolite wie Aminosäuren eine perforierte Membran leichter passieren können als der eingesetzte Fluoreszenzmarker. Somit besteht der Verdacht, dass Methanolquenching bei *E. coli* und *C. glutamicum* gleiche negative Auswirkungen auf den Verlust primärer Metabolite haben könnte.

Die Zerstörung der Membranintegrität durch Kälteschock konnten Wellerdiek et al. (2009) bei Experimenten mit einem Mikro-Wärmetauscher für *C. glutamicum* zeigen. Sie fanden heraus, dass Metabolite des Zentralstoffwechsels bei schneller Abkühlung auf 0 °C ( $\Delta T = 30$  °C) bereits 1 s nach dem Kälteschock ausbluten. Die untersuchten Metabolitkonzentrationen im Zellüberstand stiegen auf das 1,5 bis 3-fache der Gehalte vor dem Kälteschock an. Villas-Bôas et al. (2005b) beschreiben Experimente mit *Saccharomyces cerevisiae*, wie bei *E. coli* und *C. glutamicum* wird die Membranintegrität der Hefen durch den Kontakt mit kaltem Methanol (60 %ig, -40 °C) beeinträchtigt. Mittels eines Membranintegritäts-Assays zeigten sie, dass alle untersuchten Varianten methanolischer Quenchinglösung (gepuffert (Hepes / EDTA - pH 7), ungepuffert, MeOH 60 und 70 %ig) die Zellmembran gleichermaßen angreifen. Die Autoren verzeichneten insbesondere bei einigen Aminosäuren hohe Verluste. Ein Ausbluten von Zuckerphosphaten und Nukleotiden wurde beim Quenchingvorgang hingegen nicht beobachtet. Dies hängt möglicherweise mit der Polarität der Aminosäuren zusammen. Weiterhin konnten Villas-Bôas et al. (2005b) ableiten, dass das Ausbluten der Zellen zeitabhängig ist, je länger die Einwirkzeit der Quenchinglösung, desto höher der Extraktionsgrad intrazellulärer Metabolite.

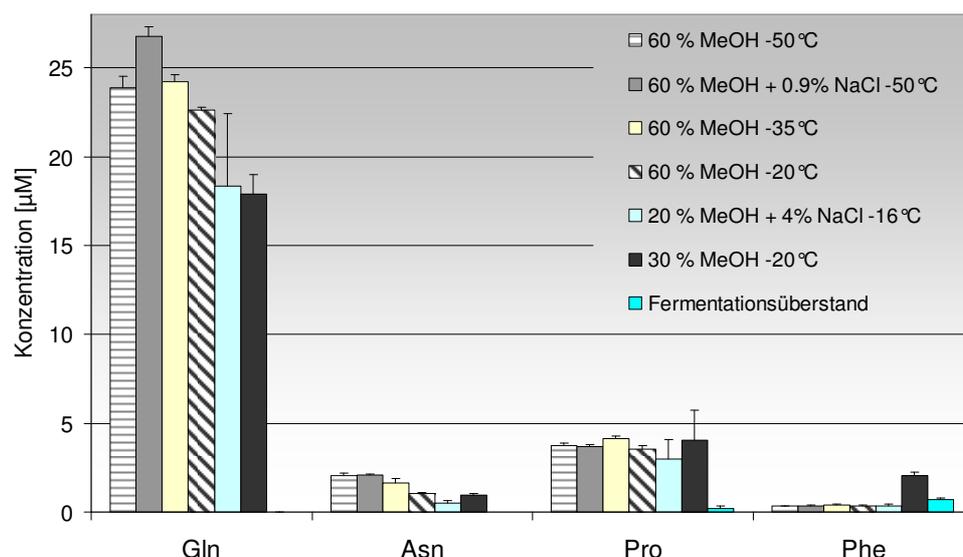


Abbildung 5.41: Einfluss des Quenchings auf das Ausbluten von Aminosäuren ( $n = 3$ )

Um einen Eindruck zu gewinnen, wie stark das Ausbluten der *E. coli* Zellen bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist, wird ein Experiment durchgeführt, in dem der Methanolgehalt, die Osmolarität und die Temperatur der Quenchinglösung variiert werden. Die Ergebnisse einiger Aminosäuren sind in *Abbildung 5.41* dargestellt. Die Metabolitkonzentrationen der verschiedenen Quenchinglösungen werden mit der Ausgangskonzentration im Fermentationsüberstand verglichen. Die Aminosäuren Glutamin und Asparagin sind im Fermentationsüberstand nicht nachweisbar. Nach dem Quenchingvorgang beträgt die extrazelluläre Glutaminkonzentration bis zu 27  $\mu\text{M}$  und auch Asparagin wird detektiert. Geringe Mengen der Aminosäuren Prolin und Phenylalanin sind bereits im Fermentationsüberstand nachweisbar. Nach dem Quenchingvorgang steigt die Prolinkonzentration im Überstand um den Faktor 4, die Phenylalaninkonzentration hingegen scheint kaum beeinflusst zu werden. Grundsätzlich wird das Ausbluten der Zellen kaum von der Beschaffenheit der methanolischen Lösung beeinflusst. Bei jeglichen untersuchten Methanolgehalten, Osmolaritäten und Temperaturen der Quenchinglösung (s. *Abbildung 5.41*) sind signifikante Metabolitverluste zu verzeichnen, diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen von Winder et al. (2008). Aus den Untersuchungen lässt sich ableiten, dass die Verluste durch Ausbluten der Zellen beim Abstoppen des Stoffwechsels metabolitspezifisch sind. Um die Ergebnisse unterschiedlicher Kultivierungen und Produktionsstämme miteinander vergleichen zu können, wird die Probenaufarbeitung deshalb nach einem Standardprotokoll durchgeführt (s. *Kapitel 4.6*), so dass vergleichbare Zeiträume für einzelne Aufarbeitungsschritte gewährleistet sind.

### 5.4.1 Energieladung in *E. coli* Wildtyp und L-Threoninproduzenten

Um zu verdeutlichen, wie essentiell das Abstoppen des Zellstoffwechsels zum Zeitpunkt der Probenahme ist, werden im Folgenden die intrazellulären Energiezustände verschiedener *E. coli* Stämme miteinander verglichen. Hierzu werden parallele Kultivierungen in Schüttelkolben (jeweils in Doppelbestimmung) durchgeführt.

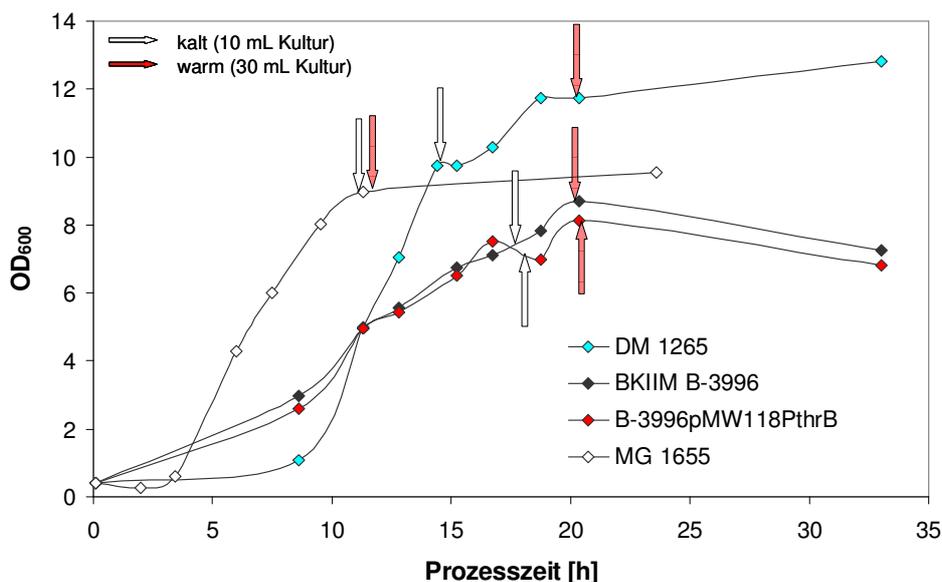


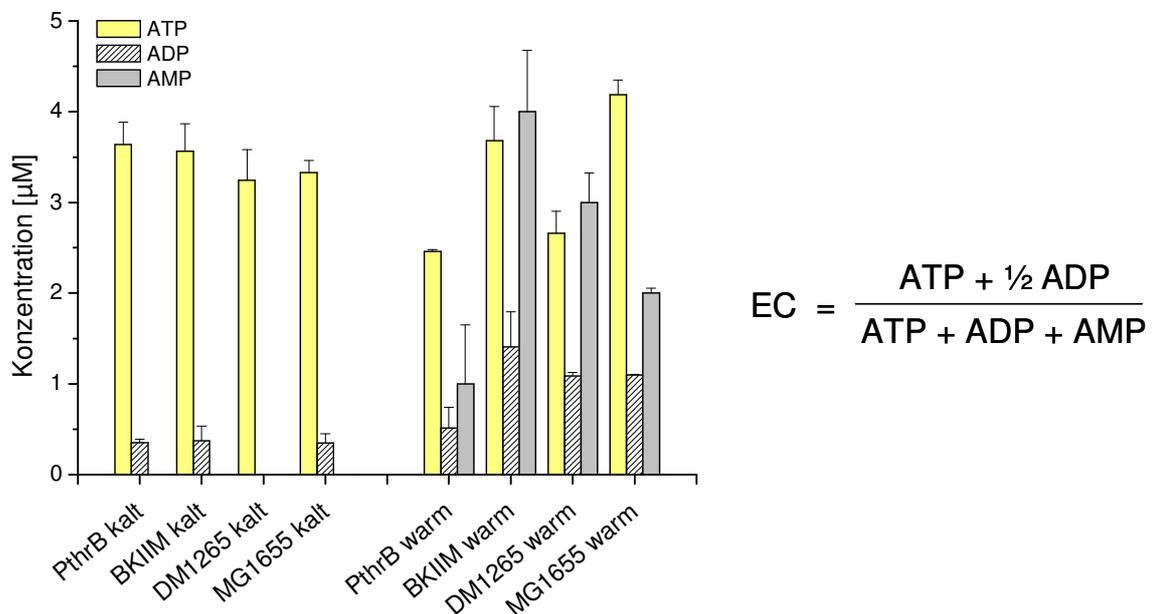
Abbildung 5.42: Verlauf der optischen Zelldichte ( $OD_{600}$ ) im Schüttelkolben

## Ergebnisse und Diskussion

Die Wachstumskurven der vier untersuchten Stämme *E. coli* BKIIM, *E. coli* DM 1265, *E. coli* PthrB und dem Wildtyp *E. coli* MG 1655 (s. Kapitel 4.1) sind in *Abbildung 5.42* dargestellt. *E. coli* MG 1655 und *E. coli* DM 1265 zeigen ähnliches Wachstumsverhalten, wobei das Wachstum von *E. coli* DM 1265 erst nach einer längeren Lag-Phase beginnt und insgesamt höhere Zelldichten erreicht. Das Wachstum von *E. coli* BKIIM und *E. coli* PthrB zeigt einen eher linearen statt exponentiellen Verlauf, allerdings mit einer sehr viel geringeren Wachstumsrate als der Wildtyp. Dies kann an wachstumshemmenden Effekten einiger Intermediate der Threoninbiosynthese und des Produktes Threonin liegen (Hama et al. 1991, Kotre et al. 1973).

Bei den, mit weißen Pfeilen markierten Zeitpunkten werden 10 mL Kultur steril aus den Schüttelkolben entnommen, in eiskaltem Methanol gequenchet, abzentrifugiert und das verbleibende Pellet mit kaltem Methanol über Nacht aufgeschlossen und extrahiert ( $\Rightarrow$  kalt, s. *Abbildung 5.42* und *Kapitel 4.7*). Die roten Pfeile markieren Zeitpunkte zu denen 30 mL Kultur steril aus den Schüttelkolben entnommen und bei 4 °C abzentrifugiert werden. Das verbleibende Zellpellet wird wie in *Kapitel 4.7* beschrieben mit Methanol aufgeschlossen und extrahiert ( $\Rightarrow$  warm, s. *Abbildung 5.42*).

In den Extrakten werden Metabolite des Zentralstoffwechsels gemessen (s. *Kapitel 4.9.2*). Aus den Konzentrationen von Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) wird die Energieladung (*Energy Charge*, EC) der Zellen nach der in *Abbildung 5.43* (rechts) dargestellten Formel berechnet.



*Abbildung 5.43: Adenylatsystem nach kalter und warmer Probenahme (n = 2)*

Nach Atkinson (1968) ist das Adenylatsystem, bestehend aus AMP, ADP und ATP, vergleichbar mit einer elektrochemischen Speicherzelle die Energie aufnimmt, speichert und wieder frei gibt. Dabei ist die „Währung“ der Phosphorylierungsgrad und nicht die Oxidationsstufe wie z. B. bei Batterien. Auf diese Weise werden über den Energiezustand einer Zelle viele Stoffwechselreaktionen kontrolliert. Atkinson (1968) zeigte, dass ATP erzeugende

(katabole) Stoffwechselwege durch eine hohe Energieladung gehemmt, ATP verbrauchende (anabole) hingegen angeregt werden. Durch diese Steuerung wird die Energieladung einer Zelle innerhalb enger Grenzen gehalten, so dass sie wie der pH-Wert gepuffert wird (Berg et al. 2007). Die Energieladung der vitalen Zelle sollte dabei nach Atkinson (1968) oberhalb eines Wertes von 0,85 liegen.

Die Ergebnisse der untersuchten *E. coli* Stämme sind in *Abbildung 5.43* dargestellt. Die sehr unterschiedlichen Konzentrationen der kalt bzw. warm aufgearbeiteten Zellextrakte verdeutlichen, dass eine schnelle Deaktivierung der Enzymaktivität in den Zellen notwendig ist, um einen Einblick in den metabolischen Zustand zum Zeitpunkt der Probenahme zu gewinnen. In den warm aufgearbeiteten Extrakten ist die Umsetzung des vorhandenen ATP zu ADP und AMP zum Zeitpunkt der Probenahme sehr deutlich erkennbar. Dies spiegelt sich auch in den berechneten Energieladungen wider, die in *Tabelle 5.12* dargestellt sind. Offensichtlich kann die natürliche Pufferung des Energiehaushaltes der Zelle während der warmen Probenaufarbeitung nicht aufrechterhalten werden.

*Tabelle 5.12: Energieladung nach kalter und warmer Probenaufarbeitung*

	Kalt (Quenching)	Warm
<i>E. coli</i> PthrB	0,96	0,41
<i>E. coli</i> BKIIIM	0,95	0,32
<i>E. coli</i> DM 1265	1,00	0,34
<i>E. coli</i> MG 1655	0,95	0,50

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Inaktivierung des Stoffwechsels ein essentielles Element der Probenvorbereitung ist. Die Energieladungen liegen weit unter dem von Atkinson (1968) definierten Wert von > 0,85 für einen lebenden Organismus. Der Energiezustand nach warmer Probenahme entspricht somit nicht mehr dem einer „lebenden“ Zelle. Durch das Quenchen der Zellen mit kalter methanolischer Lösung hingegen, wird der Zustand der Probenahme eingefroren. Hier betragen die Energiebilanzen aller *E. coli* Stämme Werte nahe 1. Durch den Kälteschock wird die enzymatische Aktivität offensichtlich abrupt gestoppt, so dass sich der Stoffwechselzustand zum Zeitpunkt der Probenahme in den Messdaten widerspiegelt.

Winder et al. (2008) kommen in ihren Untersuchungen zu dem Schluß, dass Methanolquenching (60 %, - 48 °C) am besten geeignet ist, um den Stoffwechselzustand für intrazelluläre Metabolomanalysen einzufangen. Auch Wellerdiek et al. (2009) konnten zeigen, dass Methanolquenching mit einer schnellen Probenahmetechnik, wie sie auch in dieser Arbeit eingesetzt wird, effektiv den Zellstoffwechsel abstoppt. Bei ihren Experimenten wurde der vorgelegten Quenchinglösung <sup>13</sup>C-markierte Glucose zugesetzt, die bei aktivem Stoffwechsel sofort von den Zellen aufgenommen wird (s. *Kapitel 5.7*). Die Autoren beobachteten nach dem Quenchen keine enzymatische Aktivität, da keine Markierungsanreicherung in intrazellulären Intermediaten erfasst werden konnte. Dies deckt sich mit den hier vorgestellten Ergebnissen der Energieladung in *E. coli* nach kalter und warmer Probenahme. Die in den *Kapiteln 5.6* und *5.7* dargestellten Ergebnisse entsprechen somit realen Momentaufnahmen des Stoffwechsels der untersuchten *E. coli* Stämme.

## 5.5 Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung ist ein sehr wichtiger Schritt auf dem Weg zur *quantitativen* Metabolomanalyse. Gelingt es nicht, den Zustand der Probenahme bis zur Messung der intrazellulären Metabolite zu erhalten, ist es unmöglich eine Momentaufnahme des Stoffwechsels einzufangen. Für die Darstellung dieses Schnappschusses sind Kriterien wie eine sofortige Inaktivierung der enzymatischen Aktivität ohne Beeinflussung des Stoffwechsels (s. *Kapitel 5.4*), die Stabilität der Metabolite und die Vermeidung von Metabolitverlusten unumgänglich. Eine Probenaufarbeitung welche die genannten Kriterien bestmöglich erfüllt wird im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

### 5.5.1 Extraktionsverfahren

In der Literatur sind verschiedene Extraktionsverfahren für intrazelluläre Metabolite beschrieben (Villas-Bôas et al. 2005b, De Koning und van Dam 1993, Leder 1972, Wittmann 2004, Maharjan und Ferenci 2003, Krömer et al. 2004). Zur Inaktivierung enzymatischer Umsetzungen werden die Zellen zunächst stark abgekühlt (z. B. durch kaltes Methanol, Atkinson 1968, De Koning und van Dam 1993, Leder 1972) oder erhitzt (z. B. durch siedendes Ethanol (Villas-Bôas et al. 2005b) oder Wasser (Krömer et al. 2004)). Die Abtrennung vom Nährmedium erfolgt in den meisten Fällen durch Zentrifugation (Villas-Bôas et al. 2005b, Wittmann 2004), alternativ ist aber auch die Filtration (Wittmann 2004, Krömer et al. 2004) einsetzbar. Der Zellaufschluss erfolgt dann in der Regel chemisch. Hierfür werden z. B. Perchlorsäure, Kaliumhydroxid, Chloroform, Ethanol oder Methanol verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit werden Aufschlussexperimente mit vier unterschiedlichen Methoden getestet. Die Erfahrungen mit den untersuchten Aufschluss- und Extraktionsverfahren (s. *Kapitel 4.7*) sind in *Tabelle 5.13* zusammengefasst.

*Tabelle 5.13: Bewertung unterschiedlicher Zellaufschlussmethoden*

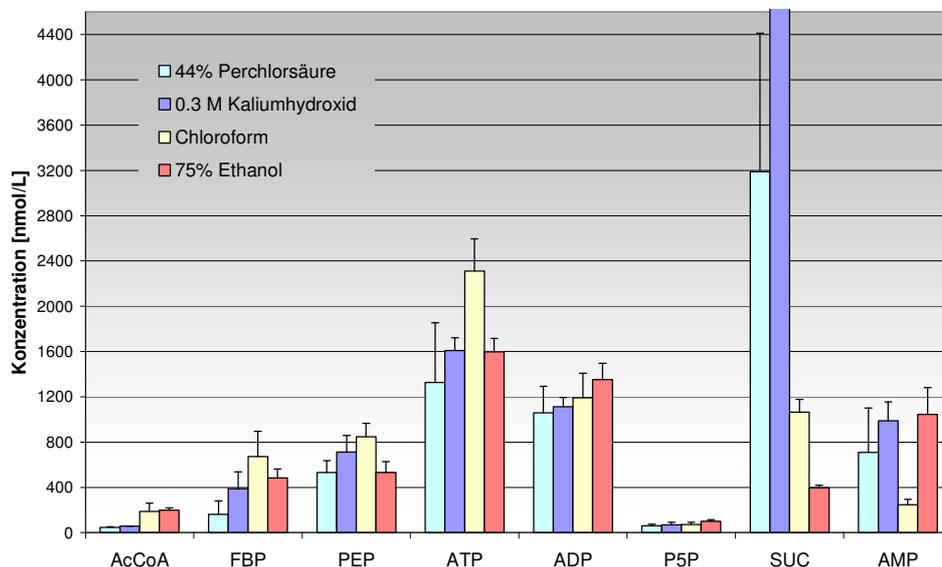
	Aufschluss-effizienz	Handhabung	Reproduzier-barkeit	Metabolit-stabilität	Kompatibilität mit LC-MS
Perchlorsäure	✓				
Kaliumhydroxid	✓	✓	✓		✓
Ethanol	✓		✓	✓	✓
Chloroform	✓	✓	✓	✓	✓

Um die vier Zellaufschlussverfahren zu bewerten, werden die Kriterien *Aufschlusseffizienz*, *Handhabung*, *Reproduzierbarkeit*, *Metabolitstabilität* und *Kompatibilität mit der LC-MS-Analytik* gegenübergestellt. Die Aufschlusseffizienz wird optisch durch Vergleich der Zellen vor und nach dem Aufschluss überprüft, dabei wird bei allen Methoden eine Zerstörung der Zellen festgestellt. Bei der Handhabung zeigen sich erste Unterschiede der Verfahren. Beim Chloroform- und Kaliumhydroxidaufschluss sind die Arbeitsschritte vergleichsweise einfach. Die Neutralisation der Proben beim Perchlorsäureaufschluss hingegen erfordert Fingerspitzengefühl, da aufgrund starker Schaumbildung mit flüssigem Stickstoff gekühlt werden

muss. Auch bei der Zugabe des siedendheißen Ethanol zum Zellpellet und dem anschließenden Kochen im Wasserbad kommt es leicht zu Siedeverzügen. Außerdem ist die Zugabe des heißen Ethanol zu jeder Probe relativ zeitaufwendig, da jeweils ein Auf- und Zuschrauben der heißen Falcon Tubes erforderlich ist. Aufgrund der beschriebenen schwierigen Handhabung kann bei Unachtsamkeit die Reproduzierbarkeit leiden. Beim Perchlorsäureaufschluss z. B. können Verluste bei der Abtrennung des Niederschlages (Kaliumperchlorat) oder durch Übersäumen, beim Ethanol-aufschluss durch Siedeverzüge auftreten.

Villas-Bôas et al. (2005b) und Maharjan und Ferenci (2003) beschreiben eine starke Abhängigkeit der Metabolitprofile von *S. cerevisiae* und *E. coli* von der gewählten Extraktionsmethode. Beim Perchlorsäureaufschluss werden Metabolite wie z. B. Pyruvat, NAD und NADH<sup>+</sup>, Indol und andere durch den extrem sauren pH-Wert zerstört (Gonzalez et al. 1997, Shryock et al. 1986). Auch wenn die Proben anschließend neutralisiert werden um weiterer Zerstörung vorzubeugen, können die Metabolite bei der Präzipitation von Kaliumperchlorat adsorbieren und mitgerissen werden, was zu weiteren Verlusten führt. Außerdem ist die akkurate Neutralisation der ungepufferten Zellextrakte nach saurem und alkalischem Aufschluss nicht einfach.

Villas-Bôas et al. (2005b) ordneten die Aufschlussmethoden anhand ihrer Ergebnisse nach dem „Diskriminierungsgrad“ in der Reihenfolge Chloroform < Ethanol < Kaliumhydroxid < Perchlorsäure. Sie leiteten ab, dass saure und alkalische Extraktionsmethoden nicht für die globale Metabolomanalyse geeignet sind, aber sehr effizient in der *Target* Analyse eingesetzt werden können. Einige der beschriebenen Phänomene spiegeln sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit wider (s. *Abbildung 5.44*).



*Abbildung 5.44: Vergleich intrazellulärer Konzentrationen nach dem Zellaufschluss*

*Abkürzungen:* AcCoA: Acetyl-Coenzym A, FBP: Fructose-1,6-bisphosphat, PEP: Phosphoenolpyruvat, ATP: Adenosintriphosphat, ADP: Adenosindiphosphat, P5P: Pentose-5-phosphat, SUC: Succinat, AMP: Adenosinmonophosphat

Bei den meisten Metaboliten, ausgenommen Succinat und AMP, ist die Konzentration im Perchlorsäureextrakt am geringsten. Insbesondere die Succinatgehalte der untersuchten Aufschlussmethoden unterscheiden sich stark, dieses Phänomen wird eingehender an Ab-

## Ergebnisse und Diskussion

*bildung 5.50* diskutiert. Die größten Verluste treten mit Perchlorsäure- und Kaliumhydroxid-aufschluss bei labilen Metaboliten wie AcetylCoA und FBP auf. Bei anderen Metaboliten scheint die Extraktionseffizienz von der Aufschlussmethode unabhängig zu sein. Bei vielen Metaboliten werden im Chloroformextrakt die höchsten Konzentrationen gemessen, was generell für eine gute Extraktionseffizienz unterschiedlicher Metabolitklassen spricht.

Die Extraktion mit siedendem Ethanol und Chloroform hat die Vorteile, dass (1.) Proteine und Polysaccharide denaturiert werden und ausfallen, (2.) dem Zellextrakt keine Salze zugefügt werden, (3.) die Zellextrakte einfach aufkonzentriert werden können, (4.) nur geringe Veränderungen des pH-Wertes eintreten und (5.) die Kompatibilität der Extrakte mit der LC-MS Analytik gegeben ist. Somit eignen sich diese Methoden für die Extraktion einer Vielzahl von Metaboliten. Maharjan und Ferenci (2003) sowie Rod et al. (1988) konnten in ihren Experimenten zeigen, dass einige Metabolite hitzelabil sind. Somit ist der Aufschluss mittels Chloroform zur globalen Metbolitextraktion am besten geeignet.

Zur Beurteilung des Einflusses auf die Analytik werden die Zellextrakte mittels LC-MS vermessen (s. *Kapitel 4.9.2*). Eine Auswahl von vier Analyten welche die Metabolitklassen - *Aminosäuren, Organische Säuren, Co-Faktoren* und *Zuckerphosphate* - repräsentieren ist in *Abbildung 5.45* dargestellt. Während die Massenchromatogramme der Kaliumhydroxid-, Chloroform- und Ethanolauflüsse symmetrische Peaks mit guter Auflösung zeigen, wird die Chromatographie durch den Perchlorsäureextrakt beeinträchtigt.

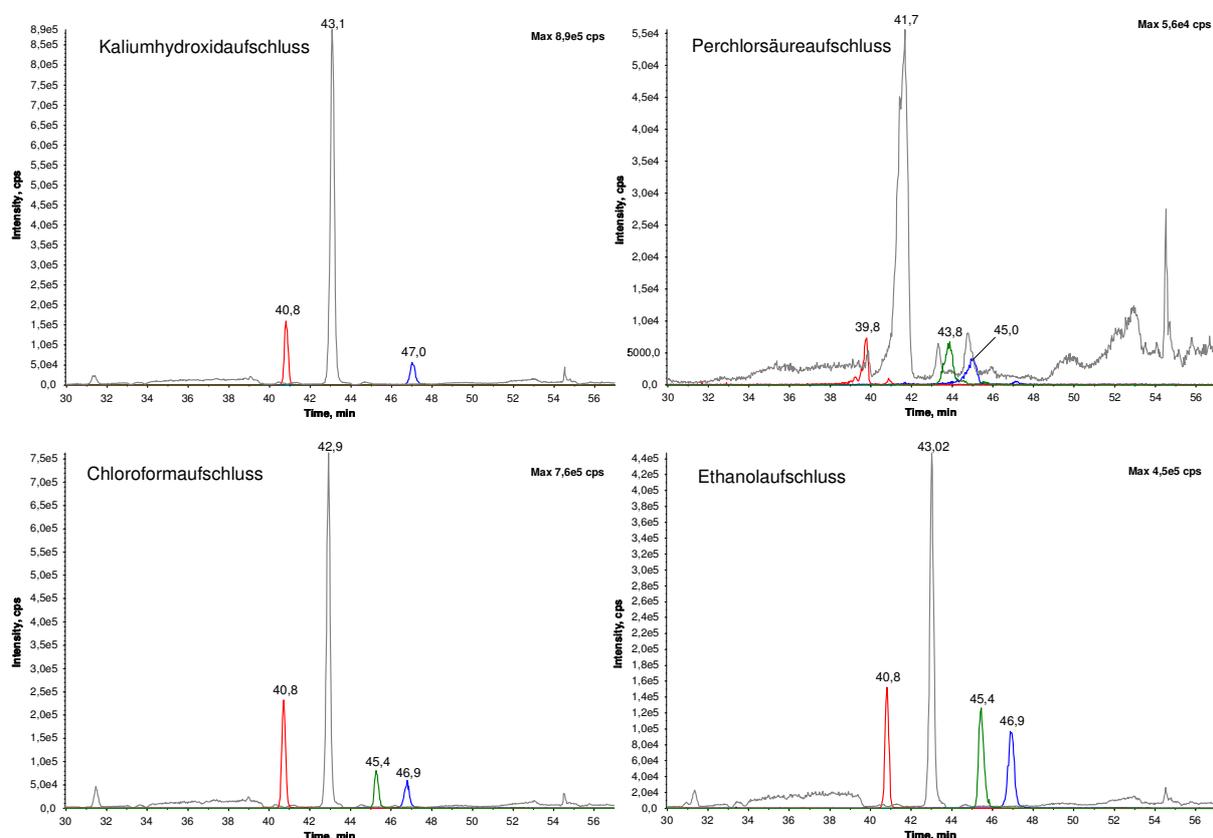


Abbildung 5.45: Einfluss der Aufschlussmethoden auf die Analytik - Asp, AKG, NADP und FBP

Durch die geringe Signalintensität kommt das Rauschen des MS/MS-Übergangs von  $\alpha$ -Ketoglutarat beim Perchlorsäureaufschluss vergleichsweise stark zur Geltung. Auch die Massenübergänge der anderen Metabolite zeigen starkes Rauschen und unsymmetrische Peaks aufgrund schlechter chromatographischer Wechselwirkungen. Wie in der Literatur beschrieben, wird die Metabolitstabilität durch die extremen pH-Werte beim Kaliumhydroxid- und Perchlorsäureaufschluss beeinflusst (Villas-Bôas et al. 2005b, Maharjan und Ferenci 2003). So ist z. B. Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP) nach Kaliumhydroxid-aufschluss nicht mehr nachweisbar und nach Perchlorsäureaufschluss im Vergleich zu Chloroform- und Ethanol-aufschluss deutlich reduziert. Die Behandlung mit Perchlorsäure wirkt sich ebenfalls negativ auf die Extraktion von Fructose-1,6-bisphosphat (FBP),  $\alpha$ -Ketoglutarat (AKG) und Aspartat aus.

Die besten Ergebnisse werden nach Chloroform- Ethanol- und Kaliumhydroxid-aufschluss erzielt. Obwohl sich der Ethanol-aufschluss sehr gut für die Metabolitextraktion eignet, wird die Aufarbeitungsmethode wegen der aufwendigen Handhabung, die besonders bei großen Probenzahlen zum Tragen kommt, und des vergleichsweise hohen Zeitbedarfs nicht weiterverfolgt. Chloroform- und Kaliumhydroxid-aufschluss verbinden die einfache Handhabung mit guter Reproduzierbarkeit und die Extrakte zeigen eine gute Kompatibilität mit der Chromatographie. Aus diesen Gründen wird der Zellaufschluss mittels Chloroform und Kaliumhydroxid nach dem Quenching der Zellen (s. Kapitel 4.6) eingehender untersucht. Gewonnene Extrakte werden mit den in Kapitel 4.9.1 und 4.9.2 beschriebenen Methoden massenspektrometrisch analysiert. Die Bereitstellung der Biomasse erfolgt durch Fermentation von *E. coli* BKIIM (Lussem 2006). Die Zellen werden bis zu einer optischen Zelldichte von 33 kultiviert (BTM ~ 10 g/L).

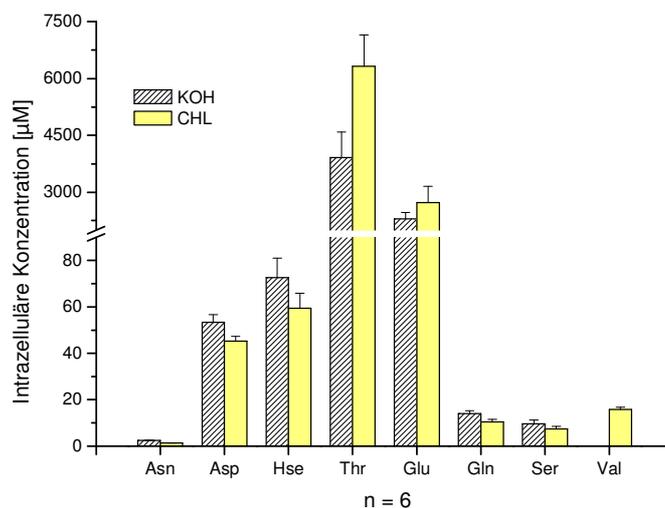


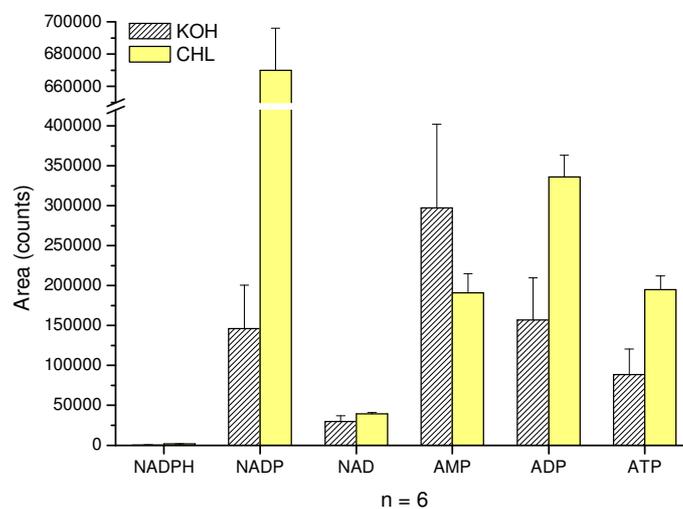
Abbildung 5.46: Vergleich einiger intrazellulärer Aminosäuren

Die Konzentrationen einiger freier intrazellulärer Aminosäuren, nach Chloroform- und Kaliumhydroxid-aufschluss, sind in *Abbildung 5.46* dargestellt. Die mittels beiden Extraktionsverfahren erhaltenen Aminosäurepools sind vergleichbar. Auch die Standardabweichungen der 6-fach Bestimmungen liegen in vergleichbaren Größenordnungen. Somit eignen sich beide

## Ergebnisse und Diskussion

Methoden für den Zellaufschluss und die Extraktion freier Aminosäuren aus dem Zytoplasma.

Bei der Extraktion der Cofaktoren hingegen zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Aufschlussverfahren. Insgesamt sind die gemessenen Konzentrationen der Cofaktoren nach Chloroformaufschluss mit Ausnahme von AMP höher. Dabei ist die Standardabweichung der 6-fach Bestimmungen beim Chloroformaufschluss für alle untersuchten Cofaktoren geringer. Einige Metabolite wie z. B. NADPH sind unter alkalischen Bedingungen nicht beständig und somit nach Kaliumhydroxidaufschluss nicht nachweisbar. Es liegt nahe, dass sie während der Aufarbeitung abgebaut werden (Gonzalez et al. 1997, Shryock et al. 1986). Insgesamt ist die Extraktion mit Chloroform bei neutralem pH die schonendere Aufarbeitungsmethode für die untersuchten Cofaktoren, deshalb ist sie bei der Aufarbeitung hydrolyse empfindlicher Metabolite vorzuziehen (s. *Abbildung 5.47*).



*Abbildung 5.47: Vergleich intrazellulärer Cofaktoren*

Was schon bei den Cofaktoren deutlich wird, ist auch für die Intermediate der Glykolyse und des Pentosephosphatwegs erkennbar. Die Zuckerphosphate in den Chloroformextrakten weisen insgesamt höhere Konzentrationen bei geringerer Standardabweichung auf. In Kaliumhydroxidextrakten wird neben den sehr geringen Metabolitkonzentrationen (s. *Abbildung 5.48*), ein für die chromatographische Auflösung nachteiliger Matrixeffekt beobachtet. Dieser spiegelt sich besonders in der Chromatographie der Pentosephosphate wider (s. *Abbildung 5.49*), da Ribulose- und Xylulose-5-phosphat nach Kaliumhydroxidaufschluss nur als Summenpool auswertbar sind (Luo et al. 2007). Nach Aufarbeitung bei neutralem pH-Wert hingegen, wird eine Trennung von Ribulose- und Xylulose-5-phosphat erzielt, die mit der Auflösung einer Standardlösung vergleichbar ist.

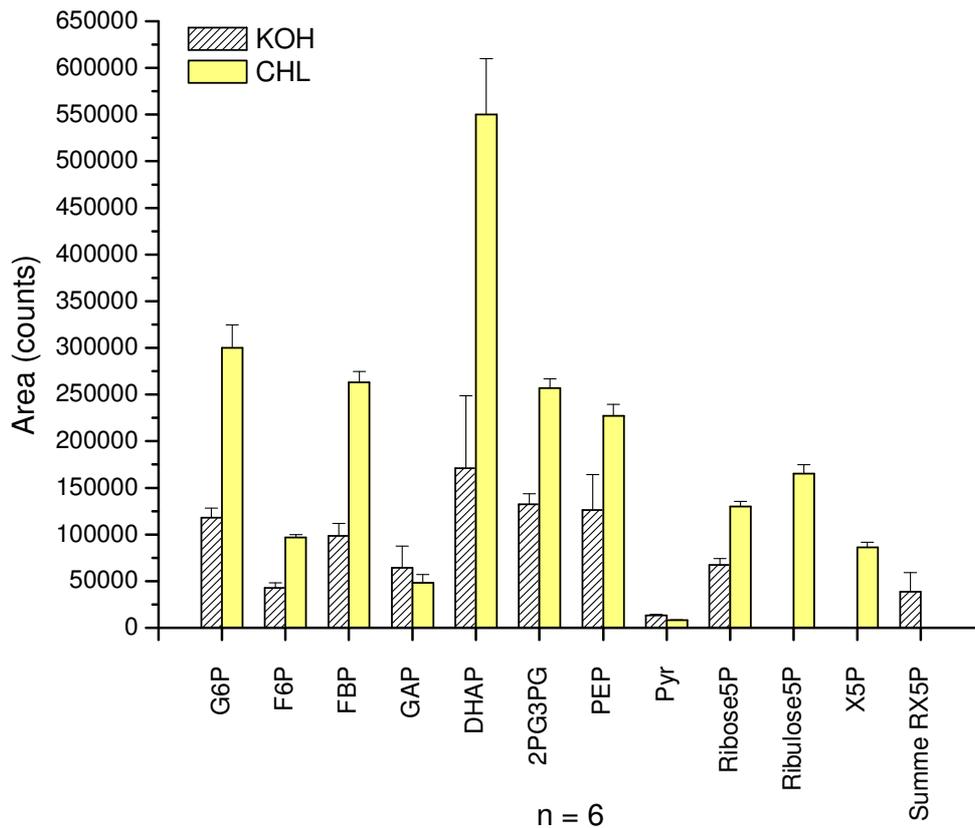


Abbildung 5.48: Vergleich intrazellulärer Metabolite in Glykolyse und Pentosephosphatweg

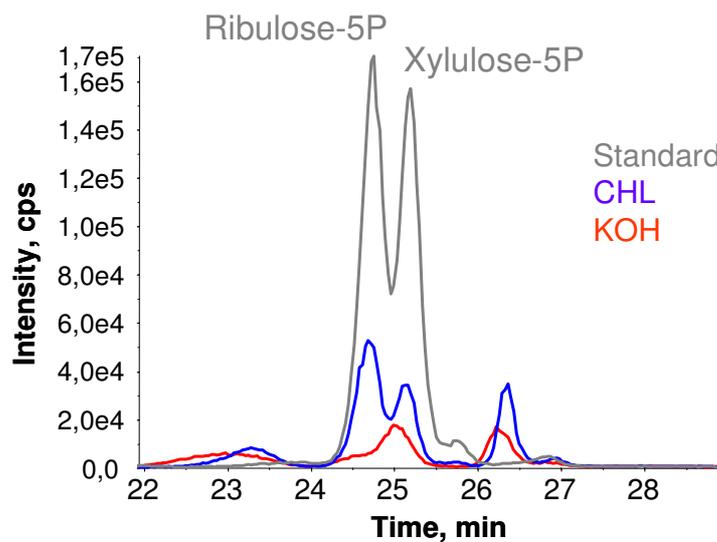
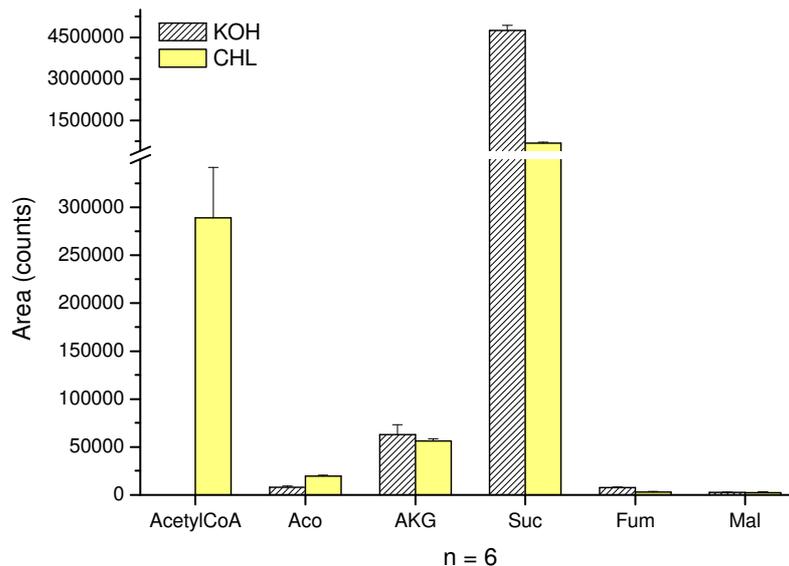


Abbildung 5.49: Chromatographische Auflösung von Ribulose- und Xylulose-5-phosphat

Aus der Literatur (Beyer et al. 1998) ist bekannt, dass das Gleichgewicht zwischen Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat bei der alkoholischen Gärung zu 70 % auf Seiten von Glucose-6-phosphat liegt. Wenn man davon ausgeht, dass unter aeroben Bedingungen eine

ähnliche Verteilung zu erwarten ist, wird diese durch die Messdaten (s. *Abbildung 5.48*) bestätigt. Gleiches gilt für Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat, hier liegt das Gleichgewicht bei der alkoholischen Gärung zu 97 % auf Seiten des Dihydroxyacetonphosphat. Das aus den Chloroformextrakten ermittelte Verhältnis bewegt sich ebenfalls in dieser Größenordnung. Da in diesem Fall keine Konzentrationen sondern Peakflächenverhältnisse der Isomere miteinander verglichen werden, basiert der Vergleich auf der Annahme eines ähnlichen MS-Responseverhaltens der jeweiligen Analyten.



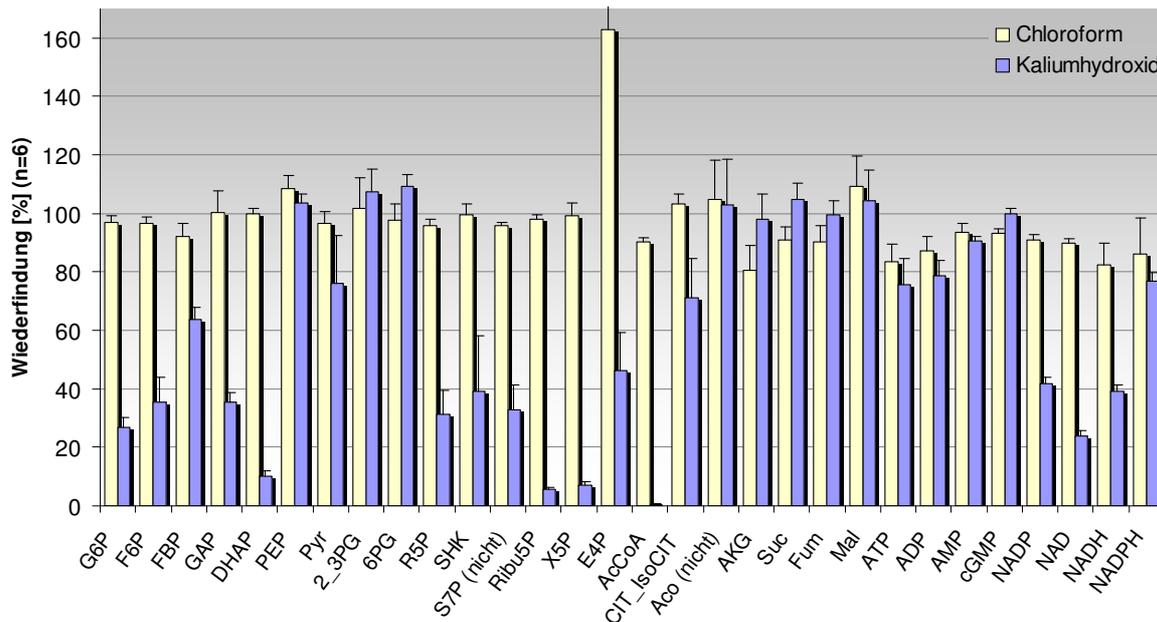
*Abbildung 5.50: Vergleich intrazellulärer Metabolite des Zitronensäurezyklus*

In *Abbildung 5.50* sind die Ergebnisse einiger Intermediate des Zitronensäurezyklus dargestellt. Mit Ausnahme der Metabolite AcetylCoA und Succinat, sind die Ergebnisse beider Zellaufschlüsse vergleichbar. AcetylCoA wird beim Kaliumhydroxidauflschluss fast vollständig zerstört, wohingegen es nach Chloroformaufschluss eindeutig erfassbar ist. Besonders fällt aber der signifikant höhere Succinatpool nach Kaliumhydroxidextraktion (Achse wurde geschnitten) ins Auge. Dieses, in 6-fach Bestimmung mit geringer Standardabweichung beobachtete Phänomen, könnte durch die alkalische Hydrolyse von Succinyl Coenzym A (SuccinylCoA) während der Extraktion mit Kaliumhydroxid erklärt werden. Voraussetzung hierfür ist eine hohe intrazelluläre SuccinylCoA Konzentration. Bei Versuchen zur Messung von SuccinylCoA stellte sich heraus, dass die Standardsubstanz bereits bei der Elektrospray Ionisierung zerfällt und nicht mittels LC-ESI-MS detektiert werden kann. Zusammenfassend zeigen die experimentellen Untersuchungen, dass die Ergebnisse nach Zellaufschluss mit Chloroform weniger fehlerbehaftet, die Matrixeffekte geringer und die Extraktion der meisten Metabolite effektiver ist.

### 5.5.2 Stabilität der Metabolite während der Aufarbeitung

Um abschätzen zu können, wie hoch die Aufbereitungsverluste von Zuckerphosphaten, organischen Säuren und Aminosäuren sind, werden Referenzstandards mit den Aufschlussmethoden Chloroform und Kaliumhydroxid aufgearbeitet (s. *Kapitel 4.7*). Pro Methode

werden sechs Standardlösungen parallel aufgeschlossen, um Extraktionsverluste (z. B. durch Einwirkung extremer pH-Werte oder Umsetzungen) berücksichtigen zu können. Die aufgearbeiteten Lösungen werden mit den in *Kapitel 4.9.1* und *4.9.2* beschriebenen Methoden analysiert und die Peakflächen (innerhalb des linearen Bereiches) mit den ursprünglich eingesetzten Standardlösungen verglichen. Die Ergebnisse für die Metabolite des Zentralstoffwechsels sind in *Abbildung 5.51* dargestellt, die Wiederfindungsraten der Aminosäuren werden in *Abbildung 5.52* zusammengefasst.



*Abbildung 5.51: Wiederfindung der Zentralstoffwechselmetabolite nach der Aufarbeitung*

Abkürzungen: G6P: Glucose-6-phosphat, F6P: Fructose-6-phosphat, FBP: Fructose-1,6-bisphosphat, GAP: Glycerinaldehyd-3-phosphat, DHAP: Dihydroxyacetonphosphat, PEP: Phosphoenolpyruvat, Pyr: Pyruvat, 2\_3PG: 2-/3-Phosphoglycerat, 6PG: 6-Phosphogluconat, R5P: Ribose-5-phosphat, SHK: Shikimat, S7P: Seduheptulose-7-phosphat, Ribul5P: Ribulose-5-phosphat, X5P: Xylulose-5-phosphat, E4P: Erythrose-4-phosphat, AcCoA: Acetyl-Coenzym A, CIT\_IsoCIT: Citrat/Isocitrat, Aco: Aconitat, AKG:  $\alpha$ -Ketoglutarat, Suc: Succinat, Fum: Fumarat, Mal: Malat, ATP: Adenosintri-phosphat, ADP: Adenosindiphosphat, AMP: Adenosinmonophosphat, cGMP: cyclic Guanosinmonophosphat, NADP: Nicotinamadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form), NAD: Nicotinamadenindinukleotid (oxidierte Form), NADH: Nicotinamadenindinukleotid (reduzierte Form), NADPH: Nicotinamadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form), (nicht): Standard wurde nicht zugegeben

Bei sechs Metaboliten (Phosphoenolpyruvat, 2-/3-Phosphoglycerat, Erythrose-4-phosphat, Citrat/Isocitrat, Aconitat\* und Malat) wird die Messung durch die Aufarbeitung mit Chloroform falsch positiv beeinflusst, ihre Wiederfindung beträgt mehr als 100 % des ursprünglich eingesetzten Standards. Dieses Phänomen könnte durch positive Beeinflussung der Chromatographie oder Ionisierung erklärt werden. Beispielsweise durch den Verlust von ursprünglich enthaltenen lipophilen Substanzen, die sich negativ auf die Chromatographie und / oder Ionisierung auswirken und bei der Flüssig / Flüssig-Extraktion in die Chloroformphase übergehen. Eine Ausnahme bildet Erythrose-4-phosphat dessen Wiederfindung mit 162,7 % deutlich über der ursprünglich eingesetzten Konzentration liegt. Nach Blackmoore et al. (1976) und Williams et al. (1979) tritt E4P in verschiedenen Formen, als Mono- bzw. Dimer auf. Es ist zu vermuten, dass Chloroform eine Änderung des bevorzugten Oligomerisierungsgrades bedingt und das Gleichgewicht während der Aufarbeitung zu Gunsten des

## Ergebnisse und Diskussion

gemessenen Monomers ( $m/z$  199) verschoben wird. Die schlechteste Wiederfindung aller untersuchten Metabolite des Zentralstoffwechsels nach Chloroformaufschluss, zeigt  $\alpha$ -Ketoglutarat mit einem Verlust von 19,6 %.

Chloroformextrakte zeigen eine sehr gute Kompatibilität mit der angewendeten Ionenpaar-chromatographie (s. *Kapitel 4.9.2*, Luo et al. 2007). Sogar die Auflösung labiler Metabolite wie Xylulose-5-phosphat und Ribulose-5-phosphat verhält sich ähnlich wie eine in Wasser angesetzte Standardlösung. Nach Kaliumhydroxidextraktion hingegen werden die Pentosephosphate nicht chromatographisch aufgelöst (s. *Abbildung 5.49*). Die Chloroformextraktion erweist sich als schonende Aufschlussmethode, die für alle untersuchten Substanzklassen des Zentralstoffwechsels geeignet ist. Besonders bei den Intermediaten der Glykolyse und des Pentosephosphatwegs können sehr gute Wiederfindungsraten zwischen 92 und 109 % erzielt werden (vergl. *Abbildung 5.51*).

Beim Aufschluss mit Kaliumhydroxid zeigt der Cofaktor Acetyl Coenzym A mit einer Wiederfindung von 0,3 % den höchsten Verlust (99,7 %). Es ist zu vermuten, dass die Bindung des Acetylrestes während der Aufarbeitung alkalisch gespalten wird. Mit unwesentlich höheren Wiederfindungsraten folgen Ribulose-5-phosphat mit 5,7 %, Xylulose-5-phosphat mit 7,3 % und Dihydroxyacetonphosphat mit 10,0 % Wiederfindung. Für sechs Metabolite (Phosphoenolpyruvat, 2-, 3-Phosphoglycerat, 6-Phosphogluconat, Aconitat\*, Succinat und Malat) hat die Kaliumhydroxid-aufarbeitung einen falsch positiven Einfluss auf das Messergebnis. Die Wiederfindung dieser Metabolite ist > 100 % des ursprünglich eingesetzten Standards. Lediglich für zehn Metabolite wird eine Wiederfindung > 80 % (schlechteste Wiederfindung nach Chloroformaufschluss, vergl. *Abbildung 5.51*) beobachtet. Die Ergebnisse zeigen, dass der Kaliumhydroxid-aufschluss besonders für die Extraktion organischer Säuren geeignet ist, diese werden im Alkalischen als Salze stabilisiert.

Bei den untersuchten Cofaktoren, Glykolyseintermediaten (außer PEP und 2-/3-PG) und Pentosephosphatweg Metaboliten (außer 6PG) treten sehr große Verluste auf. Die Messung dieser intrazellulär in nur geringen Konzentrationen vorliegenden Metabolite, ist nach Kaliumhydroxid-aufschluss stark fehlerbehaftet und müsste um die hier ermittelten Verluste korrigiert werden. Die Wiederfindungen der Adenylat-Energiemetabolite sind mit 75,7 - 99,8 % vertretbar.

Die Metabolite Seduheptulose-7-phosphat\* und Aconitat\* werden dem untersuchten Standardgemisch nicht zugegeben. Trotzdem sind sie chromatographisch und massenspektrometrisch in der angesetzten Standardlösung sowie in den Chloroform- und Kaliumhydroxid-extrakten in sehr gut detektierbaren Mengen nachweisbar (s. *Abbildung 5.51*). Dies ist wahrscheinlich auf einige kommerziell erworbene Standards ungenügender Reinheit zurückzuführen. Der Gehalt von Xylulose-5-phosphat wird vom Hersteller mit ~75 % angegeben, die Standardsubstanz Erythrose-4-phosphat weist eine Reinheit von lediglich 61 % auf. Die Gehalte der anderen Standardsubstanzen aus dem Zentralstoffwechsel liegen zwischen 95 und 100 %. Die Herstellung der Referenzsubstanzen erfolgt meist biochemisch, somit liegt eine Verunreinigung mit biologisch aktiven Substanzen nahe. Beim Ansetzen eines Standardgemisches summieren sich gleichartige Verunreinigungen unterschiedlichen Ursprungs zu einer Gesamtkonzentration auf, die nachweisbar sein kann. Ein weiterer Nebeneffekt ist,

\*wurde nicht zur Standardlösung zugegeben

dass die tatsächliche Konzentration einiger Metabolite im Standardgemisch unter diesen Umständen möglicherweise nicht der eingewogenen Konzentration entspricht. Dieser Gegebenheit ist sich die Autorin bewusst, allerdings wird dies in dieser Arbeit nicht weitergehend untersucht. Die Untersuchungen zur Stabilität der Metabolite machen deutlich, dass es erforderlich ist, Einzelstandards anzusetzen und zu vermessen, um akkurate Konzentration der Analyten zu bestimmen.

Auf die Messung von Aminosäuren hat die Aufarbeitung mit Chloroformextraktion einen falsch positiven Einfluss. Die Wiederfindungen liegen durchschnittlich bei ca. 120 % und sind bei allen untersuchten Aminosäuren (außer Cystin) > 100 % (s. *Abbildung 5.52*). Die höchste Wiederfindungsrate, von über 160 % hat das Tryptophanbiosynthese-Intermediat Indol. Nach Kaliumhydroxidauflösung hingegen werden sehr gute Wiederfindungsraten von annähernd 100 % für die Aminosäuren: Homoserin, Threonin, Glutamat, Serin, Glycin, Asparagin, Alanin, Lysin, Histidin und Tyrosin erzielt. Bei einigen Aminosäuren werden jedoch auch Verluste von bis zu 94,5 % (Leucin/Isoleucin) verzeichnet.

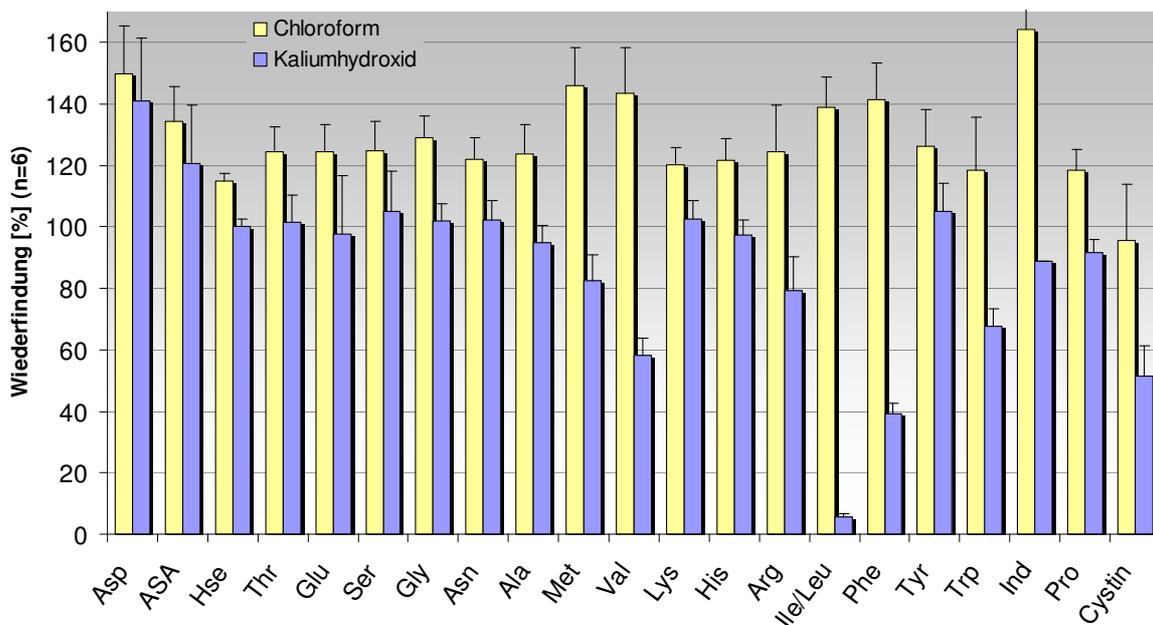


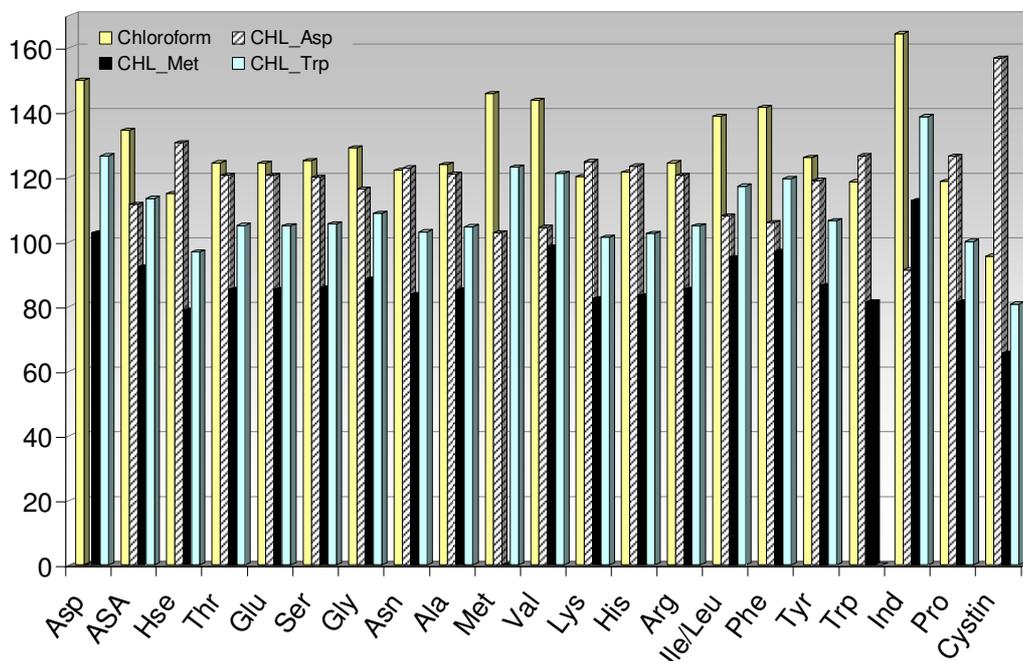
Abbildung 5.52: Wiederfindung der Aminosäuren nach der Aufarbeitung

Abkürzungen: Asp: Aspartat, ASA: Aspartatsemialdehyd, Hse: Homoserin, Thr: Threonin, Glu: Glutamat, Ser: Serin, Gly: Glycin, Asn: Asparagin, Ala: Alanin, Met: Methionin, Val: Valin, Lys: Lysin, His: Histidin, Arg: Arginin, Ile: Isoleucin, Leu: Leucin, Phe: Phenylalanin, Tyr: Tyrosin, Trp: Tryptophan, Ind: Indol, Pro: Prolin

Wie bereits in *Kapitel 5.3* beschrieben, können Probenaufbereitungsverluste oder Matrixeffekte durch den Einsatz Interner Standards kompensiert werden. Auf diese Weise lässt sich auch die Wiederfindung der Analyten nach Chloroformextraktion beeinflussen. Entscheidend ist dabei allerdings die Wahl des Internen Standards. Der Einfluss verschiedener Interner Standards soll in *Abbildung 5.53* verdeutlicht werden.

## Ergebnisse und Diskussion

Analog der *Isotope Dilution Mass Spectrometry* (s. Kapitel 4.10.4) werden die Peakflächen der Aminosäuren mit denen Interner Standards, in diesem Fall Aspartat, Methionin und Tryptophan, ins Verhältnis gesetzt. Über den Vergleich der Flächenverhältnisse der Aminosäuren im Chloroformextrakt mit denen der angesetzten Standardlösung können so die Ergebnisse der Wiederfindung korrigiert werden. Wie in *Abbildung 5.53* deutlich wird, ist nicht jeder Interne Standard für die Korrektur aller 21 Analyten geeignet. Abhängig von den physikalischen und chemischen Eigenschaften passt ein Interner Standard zu einem Analyten oder auch nicht. Aspartat z. B. korrigiert die ehemals zu hohen Werte von Methionin, Aspartatsemialdehyd, Valin, Leucin/Isoleucin, Phenylalanin und Indol sehr gut. Methionin zeigt ähnliche Eigenschaften wie Aspartat und eignet sich zur Korrektur der Gehalte von Aspartat, Aspartatsemialdehyd, Valin, Leucin/Isoleucin, Phenylalanin und Indol.



*Abbildung 5.53: Korrektur der Wiederfindung nach Chloroformaufschluss mittels Interner Standards*

*Chloroform: Ergebnisse der Wiederfindung nach Chloroformaufschluss, CHL\_Asp: Wiederfindung korrigiert über Aspartat, CHL\_Met: Wiederfindung korrigiert über Methionin, CHL\_Trp: Wiederfindung korrigiert über Tryptophan*

Am besten werden die Effekte des Chloroformaufschlusses von der Aminosäure Tryptophan kompensiert. So kann Tryptophan für die Quantifizierung der Aminosäuren Homoserin, Threonin, Glutamat, Serin, Glycin, Asparagin, Alanin, Lysin, Histidin, Arginin, Tyrosin und Prolin eingesetzt werden. Unter Verwendung geeigneter Interner Standards können die Einflüsse während der Probenaufarbeitung so gut kompensiert werden, dass sich die in *Abbildung 5.54* gezeigten korrigierten Wiederfindungen ergeben. Somit kann die Wiederfindung der untersuchten Aminosäuren nach Chloroformaufschluss, durch Zugabe Interner Standards vor dem Zellaufschluss, von durchschnittlich  $129 \pm 15 \%$  auf  $100 \pm 6 \%$  verbessert werden.

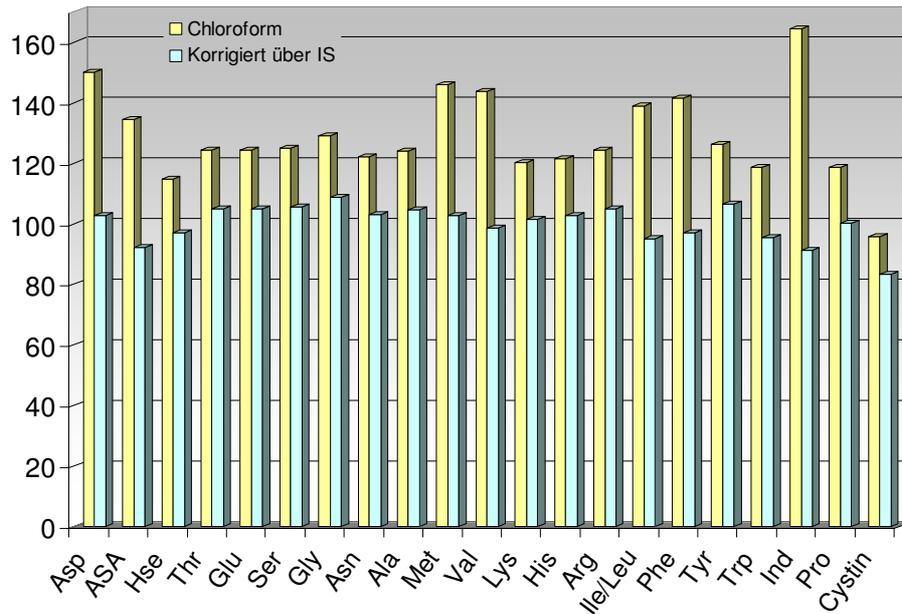


Abbildung 5.54: Korrigierte Wiederfindungen nach Chloroformaufschluss

Die Untersuchungen zur Stabilität der Metabolite während der Aufarbeitung verdeutlichen die Vor- und Nachteile der beiden Zellaufschlussmethoden. Grundsätzlich ist der Chloroformaufschluss deutlich besser für die Metabolitextraktion geeignet. Dies zeigt sich insbesondere bei den Zentralstoffwechselmetaboliten (vergl. *Kapitel 5.5.1*). Bei den Aminosäuren muss allerdings beachtet werden, dass die gemessenen Konzentrationen erst nach Korrektur durch Interne Standards (z. B. markierte Aminosäuren) verwendet werden sollten. Der Kaliumhydroxidaufschluss sollte aufgrund der teilweise gravierenden Metabolitverluste, nur für die Targetanalyse organischer Säuren und einiger Aminosäuren eingesetzt werden, er eignet sich nicht für *Metabolic Profiling* Ansätze.

## 5.6 Fermentationen im Fed-Batch Betrieb

Im folgenden Kapitel werden Fermentationen mit *E. coli* Wildtyp und *E. coli* Threoninproduzenten beschrieben. Zur Gewährleistung konstanter Stoffflüsse und ausreichend konzentrierter Metabolitextrakte wird die Probenahme für Zellextraktionsexperimente und Poolgrößenbestimmungen in der exponentiellen Wachstumsphase bei optischen Zelldichten von  $\sim 30$  ( $OD_{600}$ ) durchgeführt. Die verwendeten Kulturmedien sowie Informationen zum Bioreaktor können *Kapitel 4.4* entnommen werden. Der Faktor zur Berechnung der intrazellulären Konzentrationen wird in *Kapitel 4.11.4* erläutert.

Die in *Kapitel 5.1* beschriebene Methode zur Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen wird für die Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *E. coli* Stämme (s. *Kapitel 4.1*) eingesetzt. Die Ergebnisse werden im folgenden Kapitel vorgestellt und diskutiert.

### 5.6.1 Wildtyp - *E. coli* MG1655

Um die phänotypischen Effekte der genetischen Modifikationen in den untersuchten *E. coli* Threoninproduzenten auf Metabolomebene zu verstehen, wird der zugrunde liegende Wildtyp *E. coli* MG 1655 aus der Stammsammlung des Instituts für Biotechnologie 1 der Forschungszentrum Jülich GmbH kultiviert (s. *Kapitel 4.1*). Die Vorkultivierung erfolgt für 14,3 h und erzielt während dieser Zeit eine optische Zelldichte von 4,4 ( $OD_{600}$ ).

Das Wachstumsverhalten und die Produktion extrazellulärer Metabolite während des Fermentationsverlaufs sind in *Abbildung 5.55* dargestellt. Die Quantifizierung der intrazellulären Poolgrößen mittels LC-MS/MS erfolgt nach den Methoden der externen Kalibrierung und mit  $U^{13}C_4$ -Aspartat als Internem Standard.

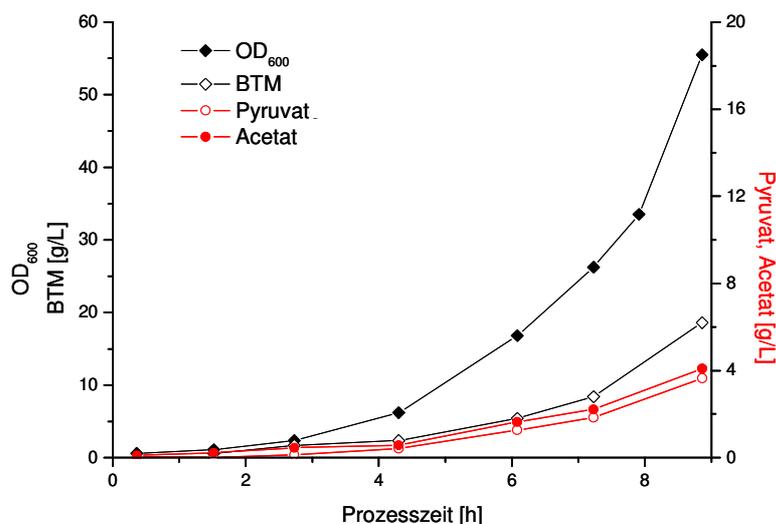


Abbildung 5.55:  $OD_{600}$ , BTM und extrazelluläre Pyruvat-, und Acetatkonzentration

Das Wachstum des Wildtyps beträgt mit einer Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  von  $0,57 \text{ h}^{-1}$  (berechnet über die optische Zelldichte) das 6-8-fache der Threoninproduktionsstämme *E. coli* DM 1265 und BKIIM (s. Kapitel 5.6.2 und 5.6.3). Dies ist hauptsächlich darauf zurück zu führen, dass der Wildtypstamm das Substrat direkt für die Biomasseproduktion einsetzen kann, da die Threoninbildung auf natürliche Weise reguliert wird (s. Kapitel 3.4.6). Aminosäuren werden nur in den für die Aminosäurebiosynthese notwendigen Mengen gebildet.

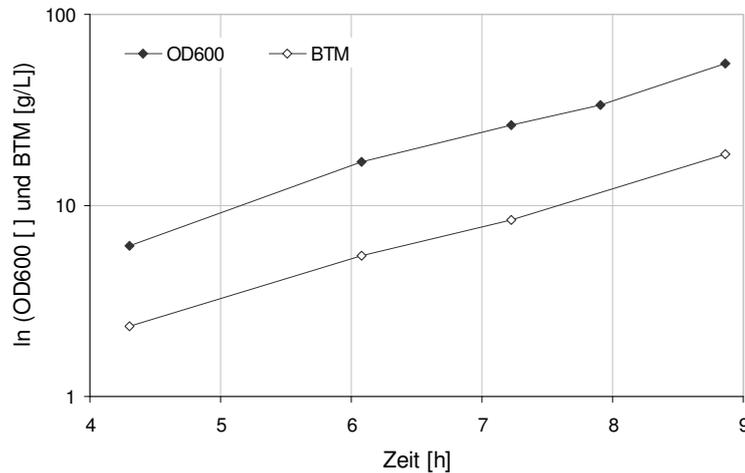


Abbildung 5.56: Exponentielles Wachstum von *E. coli* MG 1655 – metabolisch quasi-stationärer Zustand

Nach 5,7 h tritt eine kurzzeitige Glucoselimitierung auf, die keine messbaren Auswirkungen auf das Wachstum hat (s. Abbildung 5.56). Extrazellulär detektierte Nebenprodukte sind Acetat und Pyruvat (s. Abbildung 5.55). Die Probenahme für die Bestimmung der intrazellulären Aminosäuren erfolgt nach 7,9 h bei einer optischen Zelldichte ( $OD_{600}$ ) von 34 (Ergebnisse s. Kapitel 5.6.1.1, 5.3 und 5.6.5). Die Fermentation wird bis zu einer optischen Zelldichte von 55,5 ( $OD_{600}$ ) weitergeführt.

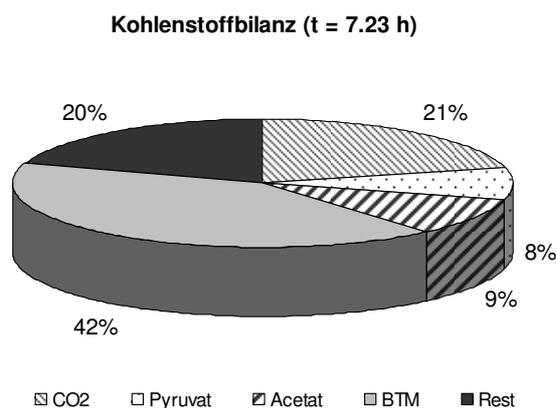


Abbildung 5.57: Kohlenstoffbilanz direkt vor der Probenahme

Die Lücke in der Kohlenstoffbilanz beträgt zum Zeitpunkt der Probenahme für die Untersuchung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen ca. 20% (s. Abbildung 5.57). Ursachen für Bilanzlücken können Ungenauigkeiten bei der Verdünnung und / oder HPLC-Messung der Produkte und Nebenprodukte sein, ein weiterer Aspekt sind nicht erfasste Stoffwechselprodukte. Außerdem kommt auch die CO<sub>2</sub>-Messung als Fehlerquelle in Frage. Im Vergleich

zum Threoninproduktionsstamm DM 1265 ist die biomassebezogene Ausbeute am verstoffwechselten Kohlenstoff bei *E. coli* MG 1655 ca. 65 % besser. Die CO<sub>2</sub>-Bildung von *E. coli* MG 1655 liegt ca. 40 % niedriger, der Anteil an Acetat 9-fach über dem von *E. coli* DM 1265 nach 24,6 h Kultivierung (s. *Abbildung 5.61*).

### 5.6.1.1 Intrazelluläre Poolgrößen

Die Threoninbiosynthese wird in *E. coli* Wildtypstämmen sowohl auf Ebene der Enzymaktivität als auch der Enzymsynthese stark reguliert. Der Biosyntheseweg unterliegt der *Feedback* Inhibierung durch Threonin und die Enzymsynthese von 4 der 5 an der Threoninbiosynthese beteiligten Enzyme wird durch eine Kombination der beiden Endprodukte Threonin und Isoleucin reprimiert (Nelson und Cox 2001, Gardner 1979, s. *Kapitel 3.4.6*). Das native Enzym Aspartatkinase I / Homoserindehydrogenase I wird durch das Produkt Threonin allosterisch *feedback* inhibiert (Fazel et al. 1983). Somit wird im Wildtyp aufgrund der Regulation eine geringe Threoninkonzentration erwartet. Die Expression des nativen Isoenzym Aspartatkinase II / Homoserindehydrogenase II wird über die intrazelluläre Methioninkonzentration reguliert (Falkoz-Kelly et al. 1969). Erwartungsgemäß liegen die gemessenen intrazellulären Threonin- und Methioninkonzentrationen zwischen 10 und 50 µM, also verglichen mit den restlichen Aminosäuren im unteren Konzentrationsbereich (s. *Abbildung 5.58*). Die Expression der Aspartatsemialdehyd Dehydrogenase, des zweiten Enzyms der Threoninbiosynthese, wird primär über Lysin reguliert. Das Reaktionsprodukt Aspartatsemialdehyd ist im Zellextrakt von *E. coli* MG 1655 nicht nachweisbar, somit wird gebildetes Aspartatsemialdehyd über die Homoserindehydrogenase I und II (s. *Kapitel 3.4.6*) zügig zu Homoserin umgesetzt.

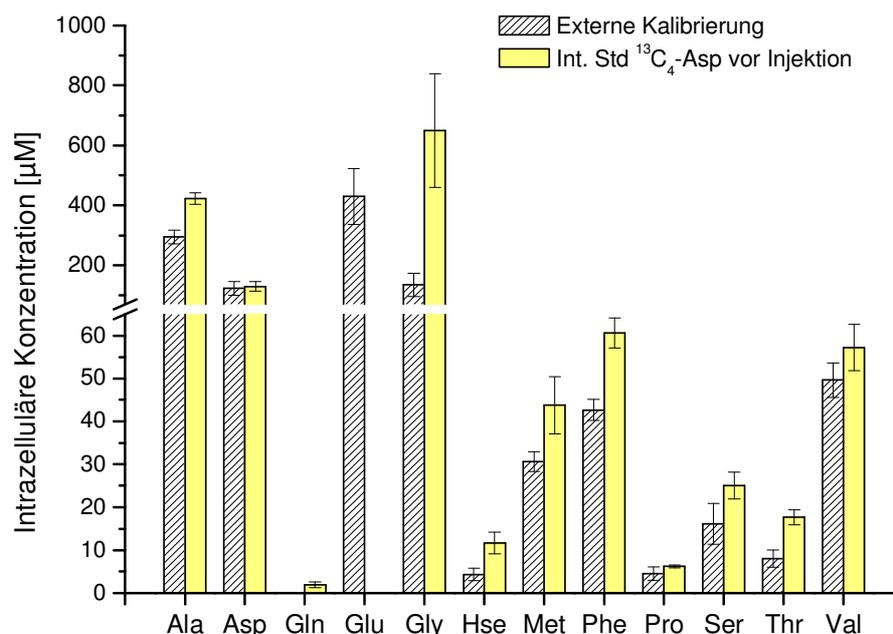


Abbildung 5.58: Intrazelluläre Aminosäurekonzentrationen von *E. coli* MG 1655

Das vierte Enzym der Threoninbiosynthese, die Homoserinkinase katalysiert die Phosphorylierung der Aminosäure Homoserin. Burr et al. (1976) und Thèze et al. (1974) fanden heraus, dass die Kinase hohe Magnesium- und Kaliumkonzentrationen (20-30 mM  $Mg^{2+}$  und 0,1-0,5 M  $K^+$ ) benötigt, um Homoserin zu binden und die maximale Aktivität zu erreichen. Nach Shames und Wedler (1984) besitzt die HK eine katalytische und eine inhibitorische Bindungsstelle für Homoserin. Substratinhibierung tritt allerdings erst bei hohen Homoserinkonzentrationen ( $> 1$  mM) ein. Neben Homoserin haben auch die Endprodukte Threonin und Isoleucin eine inhibierende Wirkung auf die Homoserinkinase. Die gemessene intrazelluläre Homoserinkonzentration liegt mit ca. 10  $\mu$ M im unteren Konzentrationsbereich, so dass das Enzym im Wildtyp weder durch das Substrat noch das Produkt inhibiert wird. Die Threoninsynthase ist das letzte Enzym der Threoninbiosynthese. Chassagnole et al. (2001) fanden heraus, dass die katalysierte Reaktion einer Michaelis Menten Kinetik erster Ordnung folgt und nicht durch das Produkt Threonin inhibiert wird. Die im Zellextrakt des Wildtyps *E. coli* MG 1655 gemessenen intrazellulären Poolgrößen stehen im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Effekten der Regulation der Threoninbiosynthese in *E. coli*. Alle weiteren erfassten intrazellulären Aminosäuren in *E. coli* MG 1655 liegen ebenfalls im  $\mu$ M Konzentrationsbereich, wobei Alanin, Aspartat, Glutamat und Glycin vergleichsweise große intrazelluläre Pools ( $> 100$   $\mu$ M) aufweisen (s. *Abbildung 5.58*).

### 5.6.2 Threoninproduzent - *E. coli* DM 1265

*E. coli* DM 1265 ist im *United States Patent* 6,562,601 beschrieben (s. *Kapitel 4.1*). Während einer 40 h Fermentation produziert der Stamm 70 g/L L-Threonin (Hermann und Rieping 2003). Um Einblick in den Produktstoffwechsel des Threoninproduzenten zu gewinnen werden Fermentationsexperimente im 2 L Sensor Reaktor durchgeführt. Nach einer Vorkultivierung von 16 h wird der Bioreaktor (s. *Kapitel 4.4.1*) mit einer Zelldichte von 8,5 ( $OD_{600}$ ) angeimpft. Während der Fermentation werden die Produktion extrazellulärer Metabolite und das Wachstumsverhalten verfolgt. Über den Prozessverlauf treten keine Sauerstoff- oder Glucoselimitierungen auf. Die Quantifizierung der intrazellulären Poolgrößen mittels LC-MS/MS (s. *Kapitel 5.6.2.1*) erfolgt nach den Methoden der externen Kalibrierung, mit  $U^{13}C_4$ -Aspartat als Internem Standard, der Isotope Dilution und der Standardaddition (s. *Kapitel 4.10*).

In *Abbildung 5.59* ist der Fermentationsverlauf bezüglich Biomasse-, L-Threonin- und Acetatbildung dargestellt. Unter aeroben Bedingungen ohne Sauerstofflimitierung wird kaum Acetat gebildet. Der Stamm verbraucht das im Medium verfügbare Phosphat in ca. 40 h und erreicht eine maximale BTM von 29 g/L. Bis zum Ende der Fermentation nach 43 h werden 57 g/L L-Threonin gebildet. Somit beträgt die Produktausbeute 71 - 85 % der von Hermann und Rieping (2003) publizierten Ausbeuten zwischen 67 und 80 g/L. Die dort beschriebenen Produktivitäten von 2,8 g/h aus fünf Fermentationen weisen eine relative Standardabweichung von 10 % auf.

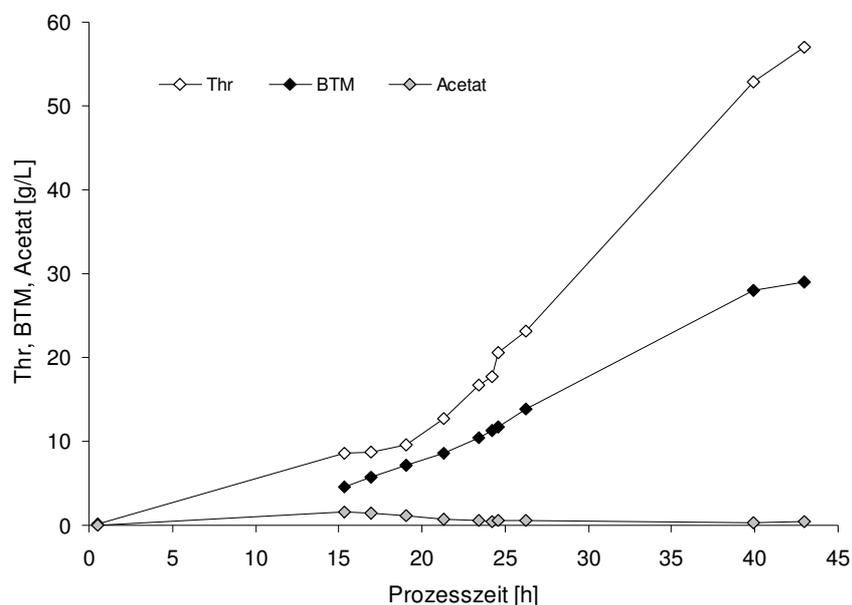


Abbildung 5.59: Vergleich von Biomasse-, Threonin- und Acetatbildung

Nach ca. 25 Stunden ( $OD_{600}$  27) werden Proben für die Bestimmung der intrazellulären Poolgrößen genommen. Zu diesem Zeitpunkt in der exponentiellen Wachstumsphase wird von einem metabolisch quasi-stationären Zustand ausgegangen; diese Annahme wird durch den linearen Verlauf der logarithmischen Auftragung der optischen Zelldichte ( $OD_{600}$ ) und Biotrockenmasse unterstützt (s. *Abbildung 5.60*).

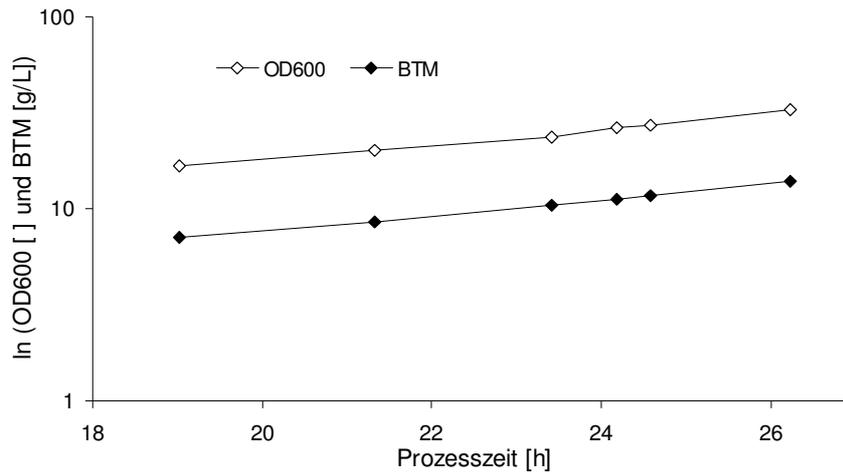


Abbildung 5.60: Exponentielles Wachstum – metabolisch quasi-stationärer Zustand

Die über die optische Dichte und die Biotrockenmasse bestimmte maximale spezifische Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  während des exponentiellen Wachstums beträgt  $0,10 \text{ h}^{-1}$ . Die Ausbeuten an Substrat, Biomasse und Produkt sind in der folgenden *Tabelle 5.14* aufgeführt (Berechnung s. *Kapitel 4.11.3*).

Tabelle 5.14: Ertragskoeffizienten zum Poolexperiment und am Ende der Fermentation

Prozesszeit [h]	$Y_{S/X}$ [g/g]	$Y_{P/X}$ [g/g]	$Y_{P/S}$ [g/g]
24,59	4,22	1,76	0,42
42,99	5,62	1,97	0,35

Die Raumzeitausbeute (RZA) des Produktes Threonin steigt während der Fermentation stetig an (s. *Abbildung 5.62*). Nach 43 h wird eine RZA von  $11,1 \text{ mmol/L}\cdot\text{h}$  erzielt. In *Abbildung 5.61* sind die Kohlenstoffbilanzen der Fermentation zum Zeitpunkt der Probenahme für die Bestimmung der intrazellulären Poolgrößen und am Endpunkt der Fermentation gegenübergestellt.

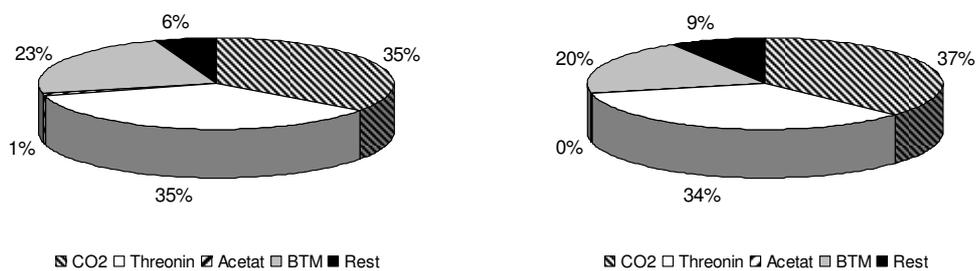


Abbildung 5.61: Kohlenstoffbilanz für *E. coli* DM 1265 nach 24,6 h (links) und 43 h (rechts)

Die Wiederfindung des verstoffwechselten Kohlenstoffs ist mit Bilanzlücken unterhalb von 9 % zufrieden stellend. Der Anteil an gebildetem Produkt ist mit 35 % nach 24,6 h und 34 % nach 43 h sehr hoch.

### 5.6.2.1 Intrazelluläre Poolgrößen

Im Folgenden werden die intrazellulären Poolgrößen zweier unabhängiger Fermentationen von *E. coli* DM 1265 miteinander verglichen. Dabei handelt es sich einmal um die in Kapitel 5.6.2 vorgestellte Fermentation (Ferm 1) und um die in Kapitel 5.7.2 vorgestellte Fermentation (Ferm 2). Bei der Durchführung der beiden Fermentationen liegt der Zeitpunkt der Probenahme in der exponentiellen Wachstumsphase. Es wird davon ausgegangen, dass sich die Zellen im Zustand des metabolischen Fließgleichgewichts (*steady state*) befinden und die zeitliche Änderung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen Null beträgt (s. *Abbildung 5.60* und *5.82*). Somit werden vergleichbare Stoffwechselbedingungen angenommen und ähnliche intrazelluläre Konzentrationen erwartet. Das Wachstumsverhalten der beiden in *Abbildung 5.62* dargestellten Fermentationen von DM 1265 ist vergleichbar. Die etwas geringeren optischen Zelldichten in Ferm 2 gegenüber Ferm 1 können im Bereich des Pipettierfehlers bei der Probenverdünnung liegen. Die berechneten spezifischen Wachstumsraten liegen in Ferm 1 mit  $0,10 \text{ h}^{-1}$  35 % oberhalb von Ferm 2 ( $0,065 \text{ h}^{-1}$ ).

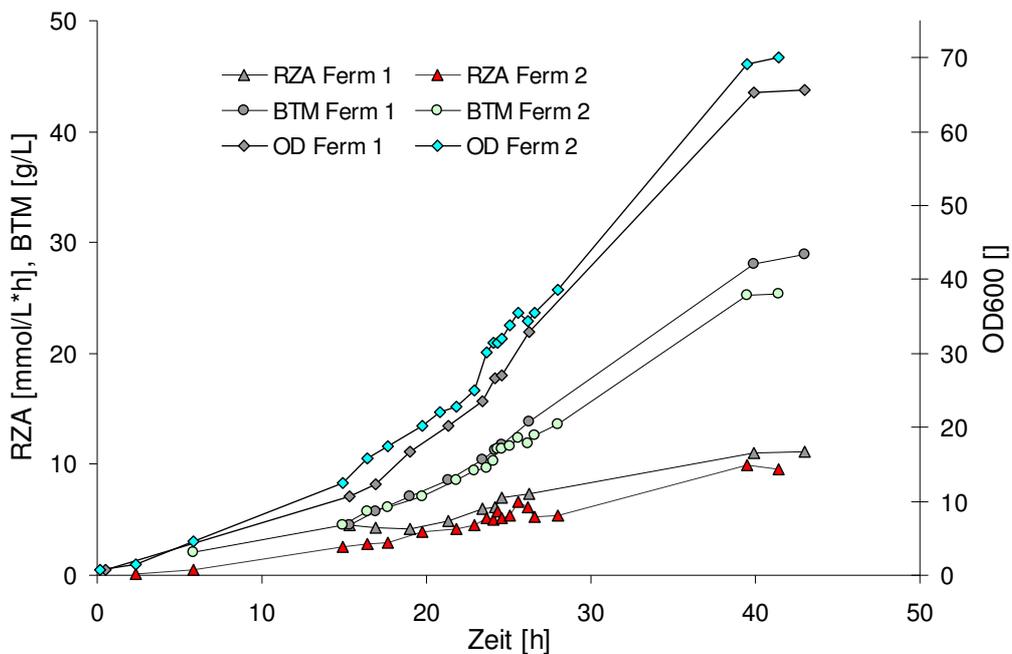


Abbildung 5.62: Verläufe zweier unabhängiger Fermentationen von *E. coli* DM 1265

Das im Medium enthaltene Phosphat wird in beiden Fermentationen innerhalb von ca. 40 h verbraucht. Da Phosphat für die Produktion von Biomasse notwendig ist, erreichen die Kulturen anschließend durch die Phosphatlimitierung die stationäre Wachstumsphase. Die Threoninproduktion in Ferm 1 ist etwas besser, somit liegt auch die Raumzeitausbeute (s. *Abbildung 5.62*) zwischen 10-20 % höher als in Ferm 2.

Zum Zeitpunkt der Probenahme zur Erfassung der intrazellulären Poolgrößen ist die Biomasse bezogene Ausbeute  $Y_{S/X}$  in Ferm 1 ca. 10 % besser als in Ferm 2 (s. *Tabelle 5.15*). Die spezifischen Produktausbeuten bezogen auf die Biomasse  $Y_{P/X}$  und das Substrat  $Y_{P/S}$  liegen in Ferm 1 sogar 30-45 % oberhalb von Ferm 2. Dies relativiert sich allerdings bis zum

Ende der Fermentation wieder, so dass die Vergleichbarkeit der beiden Fermentationen gegeben ist.

Tabelle 5.15: Ertragskoeffizienten zweier Fermentationen von *E. coli* DM 1265

Prozesszeit [h]	$Y_{S/X}$ [g/g]	$Y_{P/X}$ [g/g]	$Y_{P/S}$ [g/g]
24,6 (Ferm 1)	4,22	1,76	0,42
22,9 (Ferm 2)	4,65	1,32	0,28
43,0 (Ferm 1)	5,62	1,97	0,35
41,6 (Ferm 2)	5,51	1,86	0,34

Auch die CO<sub>2</sub>-Bildung ist bis zu einer Prozesszeit von 25 h in beiden Fermentationen vergleichbar (s. *Abbildung 5.63*). Gegen Ende der Kultivierungen liegt die CO<sub>2</sub>-Bildung in Ferm 2 dann ca. 10 % höher. In Ferm 1 wird etwas weniger Acetat gebildet, grundsätzlich liegt die Acetatbildung aber in vergleichbaren Größenordnungen.

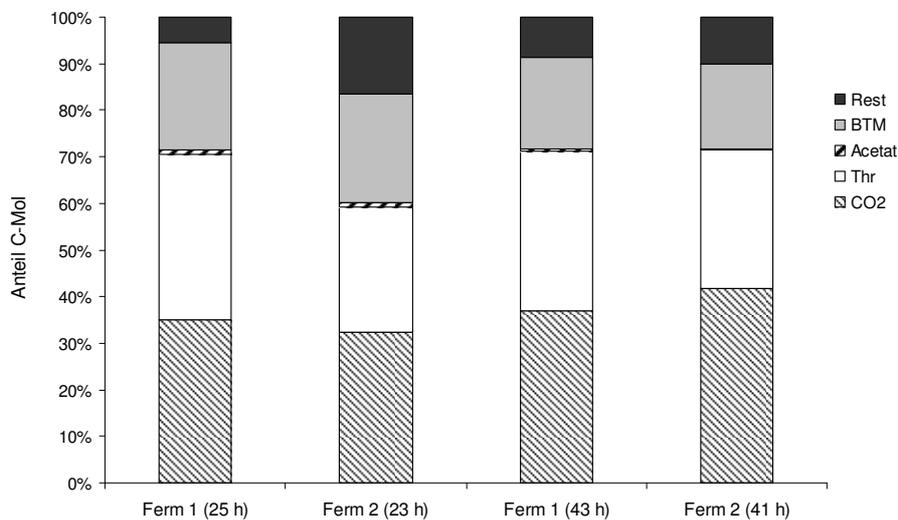


Abbildung 5.63: Kohlenstoffbilanzen zweier unabhängiger Fermentationen von *E. coli* DM 1265

Beim intrazellulären Vergleich der beiden unabhängigen Kultivierungen von *E. coli* DM 1265 zeigen die gemessenen Aminosäurekonzentrationen Abweichungen von minimal 3 % (Threonin, Prolin und Glycin) bis maximal 86 % (Glutamin, s. *Tabelle 5.16* sowie *Abbildungen 5.64* und *5.65*). Mit Ausnahme der Aminosäuren Threonin, Prolin und Glycin sind die Differenzen größer als 30 %. Dies deutet darauf hin, dass entweder der Metabolismus trotz vergleichbarer Produktbildung und Kultivierungsverläufen von nicht erfassten intra- und extrazellulären Faktoren beeinflusst wird, oder die Abweichungen auf Verluste beim Abstoppen des Zellstoffwechsels (s. *Kapitel 5.4*) oder Variationen bei der LC/MS-Analyse zurückzuführen sind. Um den Einfluss dieser potentiellen Fehlerquellen auszugleichen, sind mehrere Kultivierungen unter vergleichbaren Bedingungen notwendig (für eine aussagekräftige Standardabweichung  $n = 6$ ).

Aufgrund der ähnlichen Kultivierungsverläufe (s. *Abbildung 5.62*) ist zu erwarten, dass die beiden Fermentationen innerhalb der statistischen Schwankungsbreite liegen. Insbesondere bei den Intermediaten der Threoninbiosynthese sowie den daran anknüpfenden Aminosäuren Methionin, Serin und Glycin liegen die intrazellulären Konzentrationen der unabhängigen

## Ergebnisse und Diskussion

Kultivierungen in der gleichen Größenordnung. Außer der natürlichen biologischen Schwankung hat aber auch die Probenaufarbeitung Einfluss auf die gemessene intrazelluläre Konzentration (s. Kapitel 5.5).

Tabelle 5.16: Vergleich zweier Fermentationen von *E. coli* DM 1265

Aminosäure	Intrazelluläre Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]		Abweichung [%]
	Ferm 1	Ferm2	
Thr	90485	92580	2,3
Pro	3,3	3,2	-2,6
Gly	1215	1180	-3,0
ASA	2,7	3,9	31,3
Asp	180,4	266,5	32,3
Met	15,2	11,0	-37,7
Glu	3242	2265	-43,1
Hse	1925	1261	-52,6
Ser	33,9	75,8	55,3
Val	151,1	495,5	69,5
Phe	6,3	23,5	73,2
Ala	62,5	236,7	73,6
Gln	2,9	20,6	85,8

Beim direkten Vergleich der intrazellulären Pools von *E. coli* DM 1265 und *E. coli* MG 1655 zeigen sich insbesondere an den Aspartatsemialdehyd-, Homoserin- und Threoninkonzentrationen Effekte genetischer Modifikationen auf Metabolomebene (s. Abbildung 5.65). Durch die Überexpression des *thrABC* Operon (s. Kapitel 3.4.6) wird die Bildung von L-Aspartylphosphat, L-Homoserin, L-Homoserinphosphat und L-Threonin erhöht, was sich signifikant auf die intrazellulären Poolgrößen auswirkt.

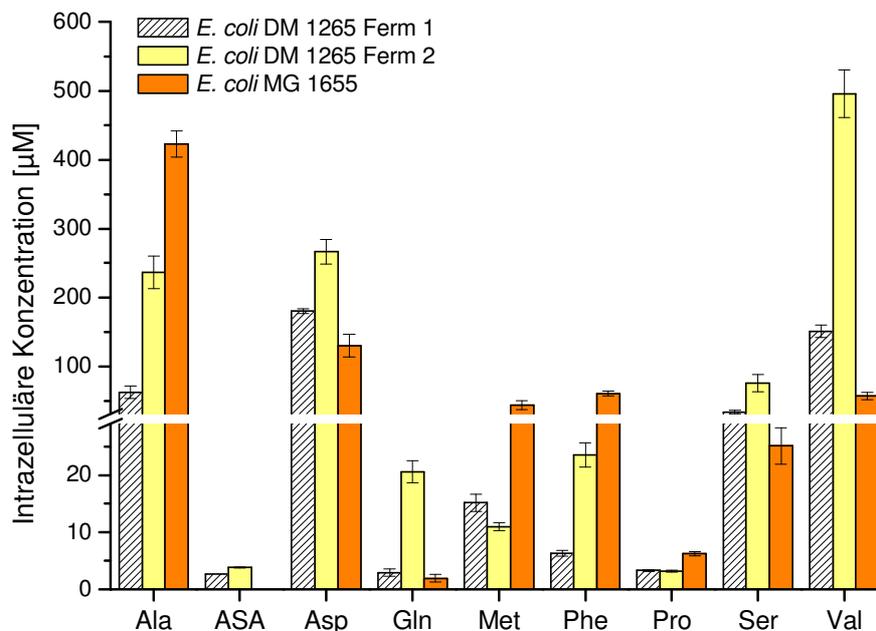


Abbildung 5.64: *E. coli* DM 1265 vs. *E. coli* MG 1655 (Wildtyp)

Die Aspartatkinase I / Homoserindehydrogenase I in *E. coli* DM 1265 ist im Gegensatz zum Wildtyp MG 1655 resistent gegen *Feedback* Inhibierung durch das Produkt Threonin. Somit wird die Umsetzung von Aspartat und Aspartatsemialdehyd durch AK I / HDH I nicht mehr reguliert und die intrazellulären Aspartatkonzentrationen liegen in beiden Stämmen in vergleichbaren Größenordnungen. Die Methioninkonzentration im *E. coli* Wildtyp beträgt das 3,3-fache des Threoninproduzenten DM 1265 somit ist nicht zu erwarten, dass die Expression des Isoenzym Aspartatkinase II / Homoserindehydrogenase II in *E. coli* DM 1265 reguliert wird (Drysch et al. 2004, s. *Abbildung 5.64*). Im Threoninproduzenten ist Aspartatsemialdehyd im Zellextrakt nachweisbar, da es nicht akkumuliert wird kann davon ausgegangen werden, dass es wie im Wildtyp über die Homoserindehydrogenase I und II (s. *Kapitel 3.4.6*) zügig zu Homoserin umgesetzt wird. Die Homoserinkonzentration in *E. coli* DM 1265 hingegen ist gegenüber dem Wildtyp stark erhöht. In *Tabelle 5.17* werden die gemessenen Poolgrößen des Threoninproduzenten mit denen des Wildtyps ins Verhältnis gesetzt.

*Tabelle 5.17: Vergleich von E. coli MG 1655 (Wildtyp) und E. coli DM 1265*

	<i>E. coli</i> MG 1655	<i>E. coli</i> DM 1265
Aspartat	1	2,4
Aspartatsemialdehyd	1	3,3
Homoserin	1	136
Threonin	1	3293

Im Threoninproduzenten sind die Konzentrationen aller Threoninbiosynthese-Intermediate erhöht. Während die Aspartat- und Aspartatsemialdehydkonzentrationen noch in der gleichen Größenordnung liegen wie im Wildtyp, sind die Homoserin- und Threoninkonzentrationen in *E. coli* DM 1265 um den Faktor 136 und 3293 erhöht. Die Akkumulation des Intermediates Homoserin ist ein Indiz für eine geringe Umsetzung zum Threonin. Da die intrazelluläre Konzentration > 1 mM ist, könnte die Anreicherung einerseits durch Substrat-, andererseits durch Produktinhibierung ausgelöst werden. Denn neben Homoserin haben auch die Endprodukte Threonin und Isoleucin eine inhibierende Wirkung auf die Homoserinkinase. Die für die maximale Aktivität der Homoserinkinase benötigten Salze ( $Mg^{2+}$  und  $K^+$ , Burr et al. 1976, Thèze et al. 1974) stehen im Medium in ausreichender Menge zur Verfügung (s. *Anhang*, Hermann und Rieping 2003). Da die Isoleucinkonzentration in DM 1265 sehr gering ist (nicht dargestellt), liegt somit eine Inhibierung der Homoserinkinase durch Homoserin und Threonin nahe.

## Ergebnisse und Diskussion

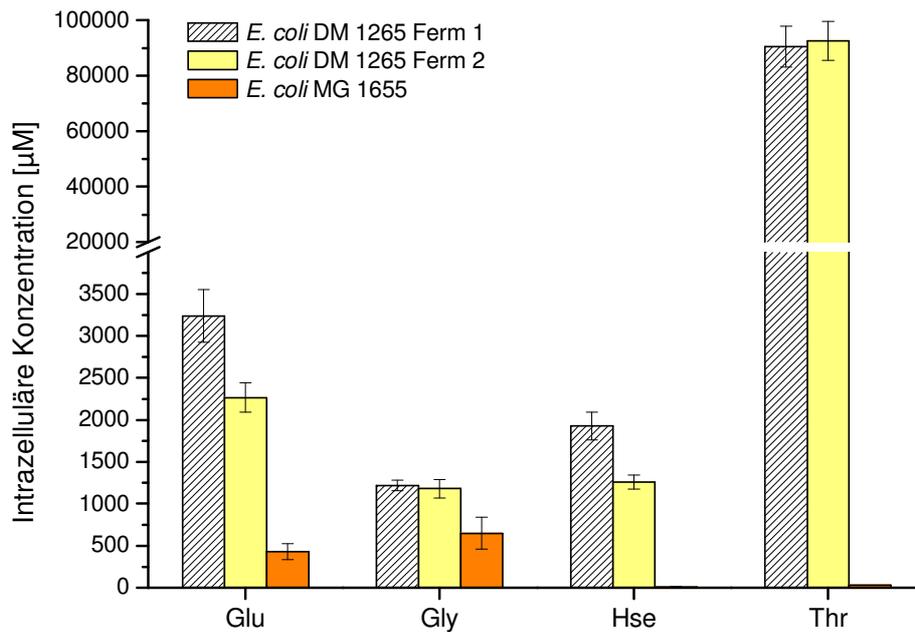


Abbildung 5.65: *E. coli* DM 1265 vs. *E. coli* MG 1655 (Wildtyp)

Weiterhin ist die gemessene L-Glutamatkonzentration im Aminosäureproduzenten ca. 6-fach höher als im Wildtyp. Die Aminosäure wird für die Transaminierung benötigt, im Fall von Threoninproduzenten insbesondere für die Bildung von L-Aspartat, welches den Aminosäurevorläufer der Threoninbiosynthese darstellt. Durch den Threoninabbauweg zum Glycin (s. Kapitel 3.4.7), ist auch das Abbauprodukt gegenüber dem Wildtyp um ca. Faktor zwei erhöht. Für *E. coli* DM 1265 werden im Vergleich zum Wildtyp sehr hohe L-Homoserin- und L-Threoninkonzentrationen detektiert (s. Abbildung 5.65). Somit akkumuliert *E. coli* DM 1265 das Produkt L-Threonin und den Vorläufer L-Homoserin.

### 5.6.3 Threoninproduzent - *E. coli* BKIIM B-3996

Der Stamm *E. coli* BKIIM wurde von Debabov et al. entwickelt und ist im *United States Patent* 5,175,107 beschrieben (s. *Kapitel 4.1*). Er produziert während einer 36 h Fermentation 70 - 85 g/L L-Threonin (Debabov et al. 1992). Um die intrazellulären Stoffwechsellvorgänge in *E. coli* BKIIM zu untersuchen, werden Fermentationsexperimente im 2 L Sensor Reaktor (s. *Kapitel 4.4.1*) durchgeführt. Der prinzipielle Ablauf der Fermentationsprozesse ist in *Kapitel 4.4.3* beschrieben. Der Bioreaktor wird aus einer Vorkultur mit einer optischen Zelldichte von 5,2 ( $OD_{600}$ ) beimpft. Während der Fermentation treten keine Limitierungen auf, Produktbildung und Wachstumsverhalten sind in *Abbildung 5.66* dargestellt. Bis zum Abbruch der Fermentation nach ca. 40 h werden 27,1 g/L L-Threonin gebildet. Die Threonin-ausbeute liegt mit 33 - 60 % deutlich unterhalb der im *United States Patent* 6,562,601 von Hermann und Rieping (2003) publizierten Produktausbeuten zwischen 45 und 82 g/L. Die beschriebenen Produktivitäten von 1,8 g/h aus sechs Fermentationen weisen eine relative Standardabweichung von 24 % auf. Die Schwankungen deuten darauf hin, dass eine reproduzierbare Kultivierung von *E. coli* BKIIM nicht einfach ist.

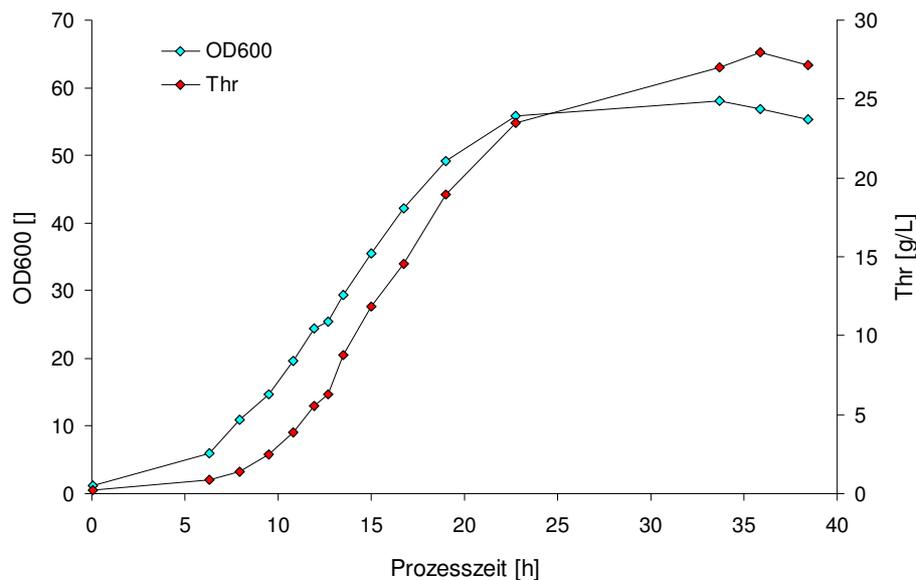


Abbildung 5.66: Vergleich von Biomasse- und L-Threoninbildung

Nach einer Kultivierungsdauer von 13,5 h werden Proben für die Bestimmung der intrazellulären Poolgrößen genommen (s. *Kapitel 5.4* und *5.5*). Zu diesem Zeitpunkt in der exponentiellen Wachstumsphase wird von einem metabolisch quasi-stationären Zustand ausgegangen. Diese Annahme wird durch den linearen Verlauf der logarithmischen Auftragung der optischen Zelldichte ( $OD_{600}$ ) und Biotrockenmasse unterstützt (s. *Abbildung 5.67*). Die maximale spezifische Wachstumsrate  $\mu_{max}$  während des exponentiellen Wachstums beträgt  $0,19 \text{ h}^{-1}$ . Die Ausbeuten an Substrat, Biomasse und Produkt sind in *Tabelle 5.18* aufgeführt.

Tabelle 5.18: Ertragskoeffizienten zum Zeitpunkt der Probenahme

Prozesszeit [h]	$Y_{S/X}$ [g/g]	$Y_{P/X}$ [g/g]	$Y_{P/S}$ [g/g]
13,5	5,0	0,92	0,52

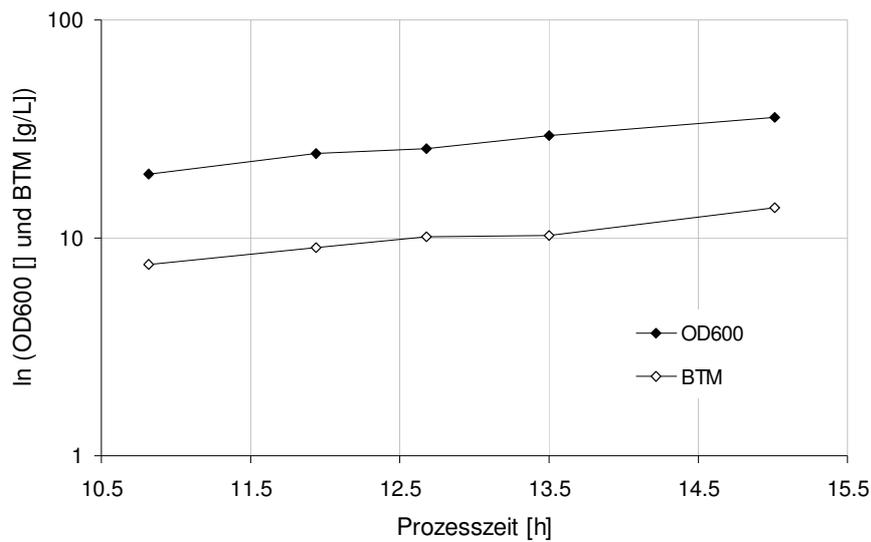


Abbildung 5.67: Exponentielles Wachstum – metabolisch quasi-stationärer Zustand

In *Abbildung 5.68* ist die Kohlenstoffbilanz am Ende der Fermentation dargestellt. Betrachtet am Zeitpunkt von 38,4 h, ist sie mit 92 % annähernd geschlossen. Der hohe Anteil am Produkt L-Threonin von 21 % deutet auf eine hohe Produktivität der Kultur hin. Somit spiegeln die Ergebnisse den Stoffwechsel unter Produktionsbedingungen wider.

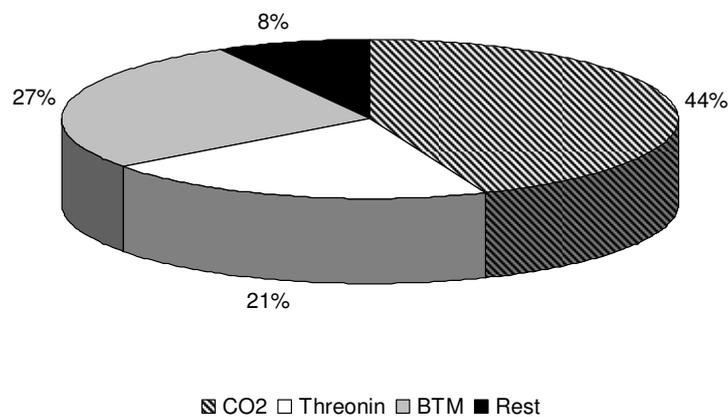


Abbildung 5.68: Kohlenstoffbilanz bei  $t = 38,4$  h für *E. coli* BKIIIM

### 5.6.3.1 Intrazelluläre Poolgrößen

Die intrazellulären Poolgrößen zweier unabhängiger Fermentationen von *E. coli* BKIIIM werden im Folgenden miteinander verglichen. Dabei handelt es sich einmal um die in *Kapitel 5.6.3* vorgestellte Fermentation (Ferm 3) und um die in *Kapitel 5.7.3* vorgestellte Fermentation (Ferm 4). Bei der Durchführung der beiden Kultivierungen liegt der Zeitpunkt der Probenahme in der exponentiellen Wachstumsphase. Es wird davon ausgegangen, dass

sich die Kultur zum Zeitpunkt der Probenahme im metabolischen Fließgleichgewicht befindet und die erhaltenen intrazellulären Metabolitkonzentrationen einen quasi stationären Zustand widerspiegeln (s. *Abbildung 5.67* und *5.94*). Das Wachstumsverhalten der beiden in *Abbildung 5.69* dargestellten Fermentationen von BKIIM ist vergleichbar. Die über die optischen Zelldichten berechneten spezifischen Wachstumsraten stimmen mit  $0,20 \text{ h}^{-1}$  in Ferm 4 und  $0,19 \text{ h}^{-1}$  in Ferm 3 sehr gut überein.

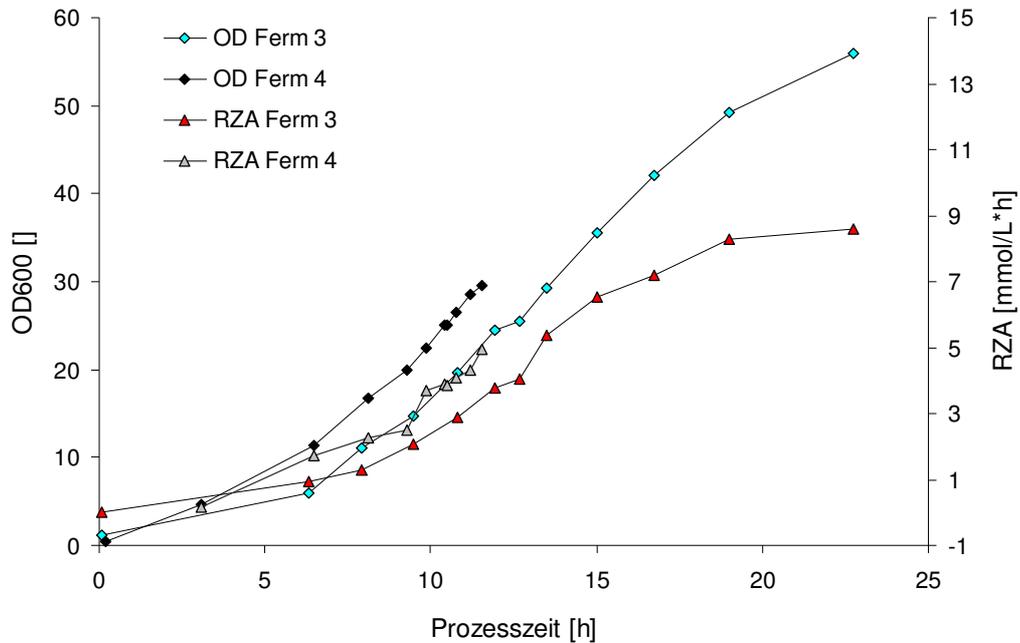


Abbildung 5.69: Verläufe zweier unabhängiger Fermentationen von *E. coli* BKIIM

Die Produktivität ist in Ferm 4 etwas höher, so dass die Raumzeitausbeute ca. 25 % über der in Ferm 3 liegt (s. *Abbildung 5.69*).

Zum Zeitpunkt der Probenahme ist die Biomasse bezogene Ausbeute  $Y_{S/X}$  in Ferm 3 ca. 14 % besser als in Ferm 4 (s. *Tabelle 5.19*). Die spezifische Produktausbeute bezogen auf das Substrat  $Y_{P/S}$  liegt in Ferm 3 sogar 42 % oberhalb von Ferm 4. Da die Probenahmezeitpunkte der beiden Fermentationen 3 h auseinander liegen, lassen sich die Ausbeuten allerdings nicht direkt miteinander vergleichen.

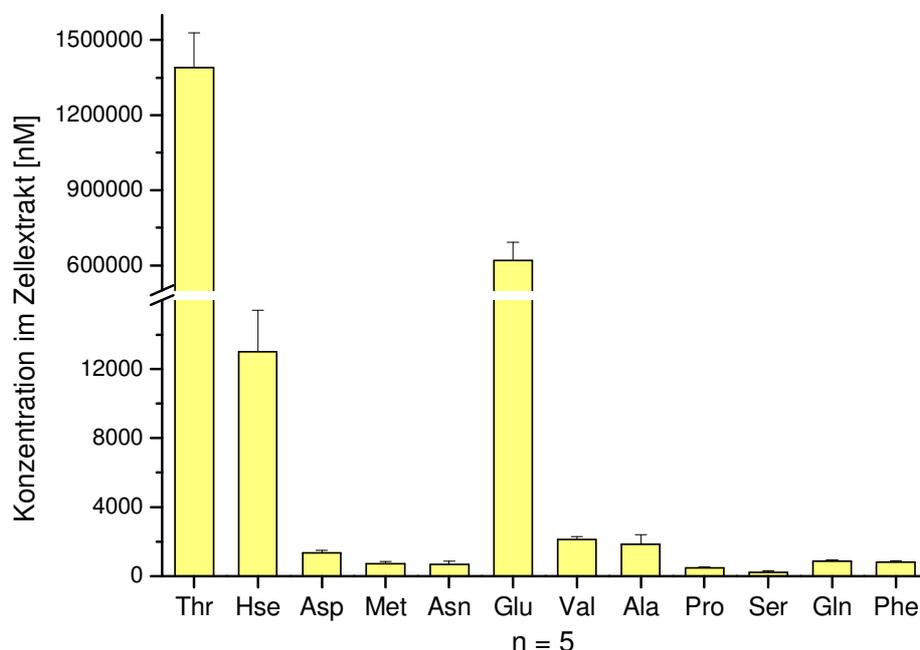
Tabelle 5.19: Ertragskoeffizienten zweier unabhängiger Fermentationen von *E. coli* BKIIM

Prozesszeit [h]	$Y_{S/X}$ [g/g]	$Y_{P/X}$ [g/g]	$Y_{P/S}$ [g/g]
13,5 (Ferm 3)	5,0	0,92	0,52
10,5 (Ferm 4)	4,3	0,96	0,22

Auch bei den Fermentationen von *E. coli* BKIIM sollten mehrere Kultivierungen unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt werden, um biologische und messtechnische Schwankungen sowie Verluste bei der Probenaufarbeitung über Durchschnittswerte auszugleichen. Aufgrund der ähnlichen Kultivierungsverläufe (s. *Abbildung 5.69*) ist aber auch hier zu erwarten, dass beide Fermentationen innerhalb der statistischen Schwankungsbreite liegen (Hermann und Rieping 2003).

## Ergebnisse und Diskussion

Die gemessenen intrazellulären Aminosäurekonzentrationen in den aufgearbeiteten Zellextrakten von *E. coli* BKIIM (Ferm 3) sind in *Abbildung 5.70* dargestellt. Einen Überblick über die Zentralstoffwechselmetabolite und Cofaktoren gibt *Kapitel 5.5.1*. Die Konzentrationen des Produktes L-Threonin, seines Vorläufers L-Homoserin und der Aminosäure L-Glutamat sind im Vergleich zu anderen intrazellulären Aminosäuren sehr hoch. L-Glutamat übernimmt die wichtige Aufgabe der Aminierung von Vorläufermetaboliten aus dem Zentralstoffwechsel. Aus diesem Grund ist die physiologische Konzentration des L-Glutamats in Aminosäureproduzenten allgemein, aber auch im Wildtyp vergleichsweise hoch. In vielen Aminosäurebiosynthesewegen wird die Einführung der Aminogruppe von Transaminasen katalysiert. Im Fall der Threoninbiosynthese übernimmt die Aspartat-Transaminase diese Reaktion. Hierbei wird die Aminogruppe von L-Glutamat auf Oxalacetat übertragen, so dass neben Aspartat auch  $\alpha$ -Ketoglutarat gebildet wird.



*Abbildung 5.70: Aminosäurekonzentrationen in *E. coli* BKIIM (Ferm 3)*

Die Wachstums- und Produktbildungsraten beider Fermentationen von *E. coli* BKIIM sind vergleichbar. Durch die unterschiedlichen Probenahmezeitpunkte innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase unterscheiden sich die Konzentrationen der Biotrockenmasse (s. *Tabelle 5.20*). Betrachtet man die Intermediate der Threoninbiosynthese fällt auf, dass die intrazellulären Konzentrationen in Ferm 4 durchgehend höher sind, dies wird besonders an den Homoserin- und Threoninpools deutlich. Die Asp : Hse : Thr Verhältnisse zeigen in Ferm 4 eine stärkere Homoserinakkumulation. Daraus könnte man ableiten, dass die Produktivität mit der Homoserinkonzentration korreliert - je höher die Produktivität, desto größer der Homoserinpool im Zytoplasma. Eine mögliche Ursache für die Anreicherung von Homoserin (Ferm 4) wäre ein Rückstau, den der Threoninpool (122 mM) auf die Biosynthesevorläufer ausübt. Auf diese Weise wären auch die kleineren Pools in Ferm 3 erklärbar, denn dort ist

die Produktkonzentration und somit auch das Konzentrationsgefälle mit 40 mM deutlich geringer.

Tabelle 5.20: Vergleich zweier Fermentationen von *E. coli* BKIIM

	Ferm 3	Ferm 4
Zeitpunkt der Probenahme [h]	10,4	13,5
spezifische Wachstumsrate $\mu$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	0,20	0,19
spezifische Produktbildungsrate [ $\text{mmol/g}\cdot\text{h}$ ]	0,50	0,53
BTM [g/L]	7,9	10,3
Aspartat [mM]	0,04	0,13
Homoserin [mM]	0,36	2,23
Threonin (intra) [mM]	40,20	122,30
Verhältnis <sub>Asp:Hse:Thr (intra)</sub>	1 : 8,8 : 980	1 : 17,2 : 941

Wie bei *E. coli* DM 1265 sind die Effekte genetischer Modifikationen auf Metabolomebene auch beim direkten Vergleich der intrazellulären Pools von *E. coli* BKIIM und *E. coli* MG 1655 erkennbar. Durch die Überexpression des *thrABC* Operon (s. Kapitel 3.4.6) ist die Bildung von L-Aspartylphosphat, L-Homoserin, L-Homoserinphosphat und L-Threonin gegenüber dem Wildtyp auch in *E. coli* BKIIM signifikant erhöht (s. Abbildung 5.71).

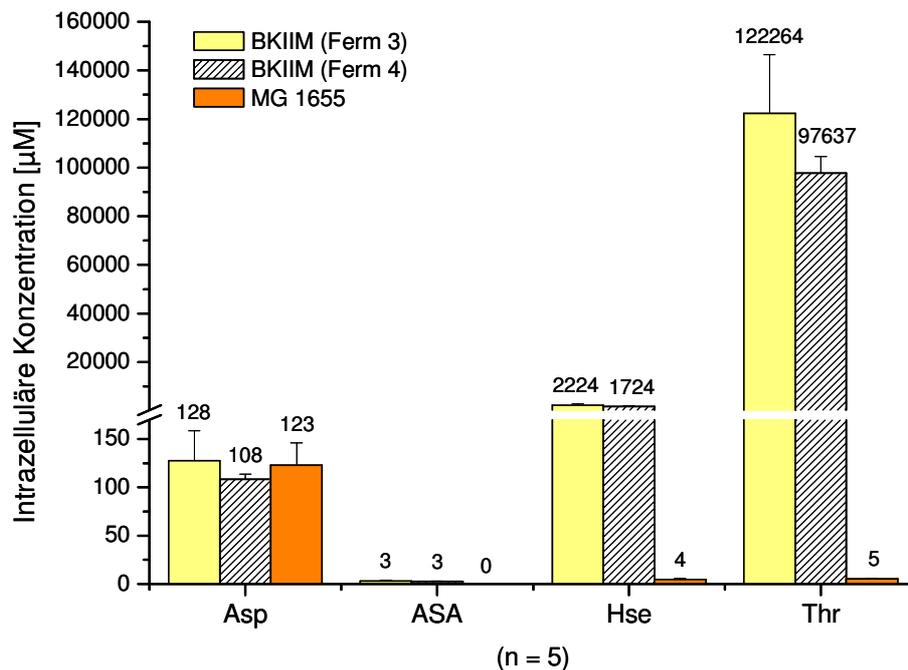


Abbildung 5.71: Intrazelluläre Konzentrationen *E. coli* BKIIM (Ferm 3 und Ferm 4) vs. Wildtyp

In *E. coli* BKIIM ist die Aspartatkinase I / Homoserindehydrogenase I resistent gegen *Feed-back* Inhibierung durch das Produkt Threonin. Somit wird die Umsetzung von Aspartat und Aspartatsemialdehyd durch AK I / HDH I nicht reguliert. Trotz der hohen Produktkonzentration liegt die intrazelluläre Aspartatkonzentration sogar 20 % unterhalb der Konzentration des Wildtyps. Die Methioninkonzentration im *E. coli* Wildtyp liegt mit 30 - 44  $\mu\text{M}$  in der gleichen Größenordnung wie im Zellextrakt des Threoninproduzenten BKIIM somit ist nach Falkoz-

## Ergebnisse und Diskussion

Kelly et al. (1969) nicht zu erwarten, dass eine Regulierung der Expression des Isoenzym Aspartatkinase II / Homoserindehydrogenase II erfolgt (s. *Abbildung 5.70*). Das Threoninbiosyntheseintermediat Aspartatsemialdehyd ist im Zellextrakt des Threoninproduzenten zwar nachweisbar, wird aber wie in *E. coli* DM 1265 gezeigt nicht akkumuliert, so dass man davon ausgehen kann, dass das Zwischenprodukt wie im Wildtyp über die Homoserindehydrogenase I und II (s. *Kapitel 3.4.6*) schnell zu Homoserin umgesetzt wird. Der Homoserinpool in *E. coli* BKIIM ist gegenüber dem Wildtyp stark erhöht. In der folgenden *Tabelle 5.21* werden die Poolgrößen der beiden Stämme zum besseren Vergleich ins Verhältnis gesetzt.

*Tabelle 5.21: Vergleich von Wildtyp *E. coli* MG 1655 und *E. coli* BKIIM (Ø Ferm 3/4)*

	<i>E. coli</i> MG 1655	<i>E. coli</i> BKIIM
Aspartat	1	0,9
Aspartatsemialdehyd	1	3
Homoserin	1	168
Threonin	1	3962

Beim Vergleich der Poolgrößen aus Ferm 3 und 4 mit denen des *E. coli* Wildtyps MG 1655 fällt auf, dass die Aspartat- und Aspartatsemialdehydkonzentrationen im Zytoplasma beider *E. coli* Stämme in derselben Größenordnung liegen. Die Poolgrößen von Homoserin und Threonin hingegen sind im Produktionsstamm deutlich erhöht. Das Homoserinverhältnis von Wildtyp zu Threoninproduzent von 1 : 168 verdeutlicht die intrazelluläre Akkumulation des Vorläufers Homoserin unter Produktionsbedingungen (s. *Abbildung 5.71*). Wahrscheinlich kann Homoserin nicht schnell genug zu L-Threonin umgesetzt werden (s. *Kapitel 5.6.2.1*). Beim Vergleich der Threoninproduzenten DM 1265 und BKIIM (vergl. *Tabelle 5.17* und *5.21*) fällt das unterschiedliche Aspartatverhältnis zum Wildtyp auf. Der Aspartatpool in DM 1265 ist 2,6-fach größer als in BKIIM, somit liegt nahe, dass sich (1.) die Anaplerose, (2.) der Zitronensäurezyklus und / oder (3.) die Expression der Aspartatkinase I in den beiden Threoninproduzenten unterscheiden.

### 5.6.3.2 Optimierungsansatz

Die in den beiden Threoninproduzenten *E. coli* DM 1265 und BKIIM beobachtete Akkumulation des Threoninvorläufers L-Homoserin deutet auf einen Engpass in der Threoninbiosynthese hin. Möglicherweise führen die hohen intrazellulären Threonin- und Homoserinkonzentrationen sogar zur Repression von *thrB* und / oder Inhibierung der Homoserinkinase (s. Kapitel 3.4.6). Shames et al. (1984) machten Experimente mit aufgereinigten Enzymen, um die Stoffflüsse im Threoninbiosyntheseweg zu untersuchen. Sie entdeckten, dass bei Zugabe von Inhibitoren immer das Biosyntheseintermediat direkt vor der inhibierten Reaktion akkumulierte. Übertragen auf die gemessenen zytoplasmatischen Poolgrößen bedeutet dies, dass die Homoserinkinase das akkumulierte Substrat Homoserin nicht effizient zu Threonin umsetzt.

Um eine Erhöhung der Produktivität zu erzielen, kann einer möglichen Repression von *thrB* durch Überexpression der Homoserinkinase begegnet werden. Sollte allerdings eine Inhibierung der HK durch Homoserin und Threonin die Ursache für die Akkumulation sein, wäre die Klonierung einer *feedback* resistenten Mutante erforderlich. Die Ergebnisse von Rais et al. (2001) und Szczesiul und Wampler (1976) deuten darauf hin, dass die HK kaum durch das Produkt Threonin inhibiert wird, da sie in ihren *in vitro* Experimenten keine Akkumulation von Homoserin beobachten. Die AK hingegen ist sensitiv gegenüber hohen Produktkonzentrationen.

Aufgrund dieser, durch den Einblick in die intrazelluläre Threoninbiosynthese, gewonnenen Erkenntnisse erfolgt die Klonierung des Threoninproduzenten *E. coli* B-3996 pMW118P*thrB* (*E. coli* P*thrB*, s. Kapitel 4.1) mit überexprimierter Homoserinkinase, um die Threoninproduktion gezielt zu steigern. Ein Schema der Optimierung ist in *Abbildung 5.72* dargestellt.

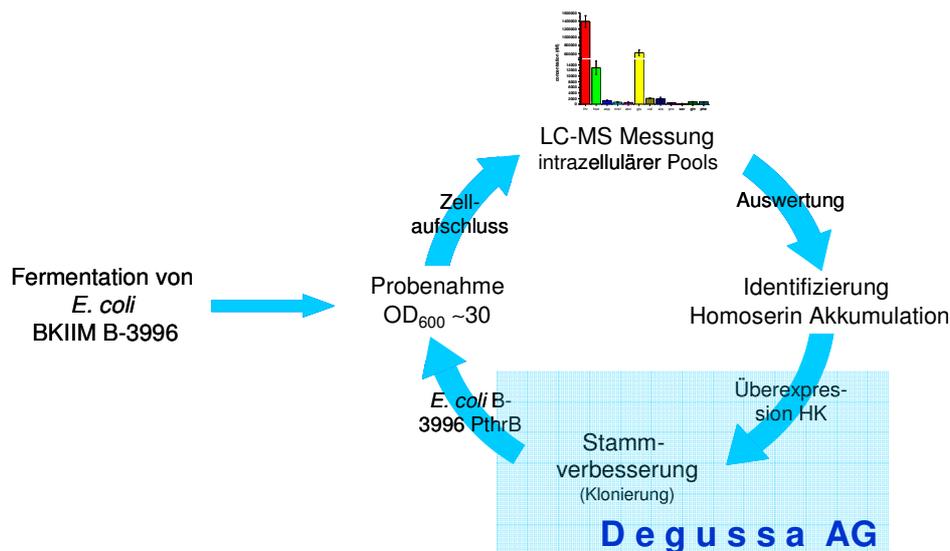
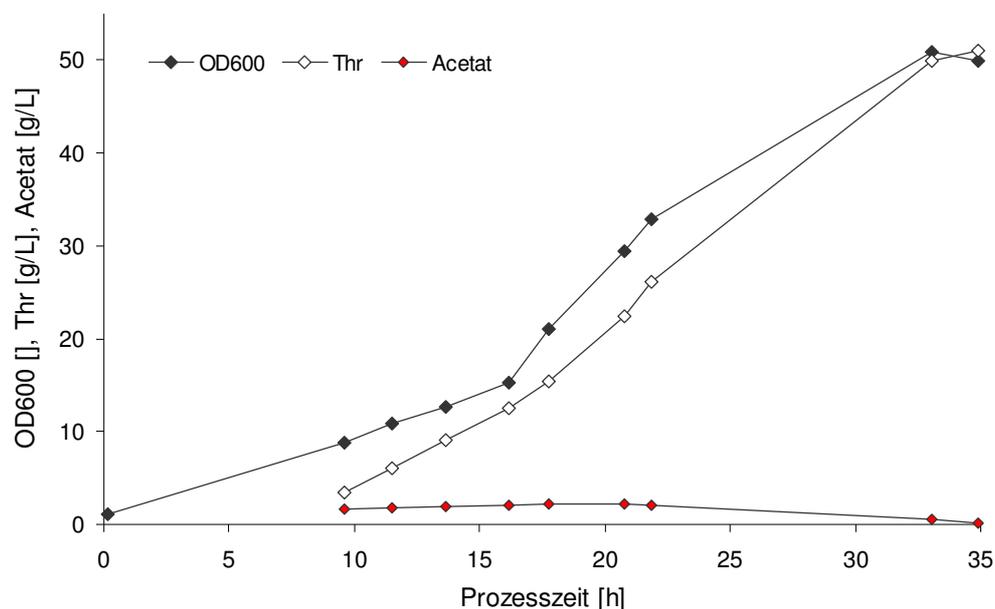


Abbildung 5.72: Optimierungsschema des Threoninproduzenten *E. coli* BKIIM

### 5.6.4 Die optimierte Mutante *E. coli* PthrB

Die anhand der Ergebnisse aus *Kapitel 5.6.3.1* und *5.6.3.2* abgeleitete Mutante *E. coli* B-3996 pMW118PthrB (*E. coli* PthrB) ist ein *E. coli* BKIIM Derivat, welches ein zweites Plasmid enthält, auf dem die Homoserinkinase zusätzlich exprimiert wird. Das Gen *thrB* wurde bei der Degussa AG (Kantstraße 2, 33790 Halle, Deutschland) in den *low copy* Vektor pMW118 (mit Ampicillinresistenz) kloniert und in *E. coli* BKIIM transformiert (s. *Kapitel 4.1*). Der Stamm wird analog seinem Vorläufer *E. coli* BKIIM im Sensor Reaktor kultiviert (s. *Kapitel 4.4*). In *Abbildung 5.73* ist der Fermentationsverlauf bezüglich Biomasse-, Threonin- und Acetatbildung dargestellt. Der Stamm erreicht eine maximale BTM von 30 g/L. Bis zum Ende der Fermentation nach 35 h werden 51 g/L Threonin gebildet. Die Threoninausbeute liegt somit innerhalb der, im *United States Patent* 6,562,601 von Hermann und Rieping (2003) für *E. coli* BKIIM, publizierten Produktausbeuten zwischen 45 und 82 g/L.



*Abbildung 5.73: Vergleich von Biomasse-, Threonin- und Acetatbildung*

Bis zu einer Prozesszeit von 22 h ist der Fermentationsverlauf mit dem der anderen Threoninproduzenten vergleichbar (vergl. *Kapitel 5.6*). Die spezifische Wachstumsrate während des exponentiellen Wachstums beträgt  $0,11 \text{ h}^{-1}$ . Durch Einführung des zweiten Plasmids wird die Wachstumsrate im Vergleich zu *E. coli* BKIIM (s. *Kapitel 5.6.3*) also um  $0,08 \text{ h}^{-1}$  reduziert. Über Nacht sinkt der Substratverbrauch, so dass der eingestellte Glucosezulauf zu hoch ist und Substrat bis zu einer Konzentration von 95 g/L im Medium akkumuliert. Der osmotische Stress führt dazu, dass nicht die erwartete optische Zelldichte von 70 ( $\text{OD}_{600}$ ) erreicht wird, sondern das Wachstum des Stammes bei einer Zelldichte von 50 ( $\text{OD}_{600}$ ) stagniert. Trotz der hohen extrazellulären Glucosekonzentration bildet der Organismus kein Acetat sondern weitere 25 g/L L-Threonin (s. *Abbildung 5.73*). In *Tabelle 5.22* ist die Produktivität der drei untersuchten Threoninproduzenten gegenübergestellt.

Tabelle 5.22: Vergleich der Produktivität von *E. coli* DM 1265, BKIIM und PthrB

	Prozesszeit [h]	Threonin [g]	Produktivität [g/h]
DM 1265 (Ferm 1)	43	57	1,33
BKIIM (Ferm 3)	36	28	0,78
PthrB	35	51	1,46

Der direkte Vergleich zeigt eine deutliche Steigerung der Produktivität durch die Überexpression der Homoserinkinase in *E. coli* PthrB von 87 % bezogen auf *E. coli* BKIIM (Ferm 3). Die Produktivität von 1,46 g/h für *E. coli* PthrB liegt allerdings immer noch 17,4 % unter dem durchschnittlichen von Hermann und Rieping (2003) für *E. coli* BKIIM publizierten Wert. Auch für *E. coli* DM 1265 kann die durchschnittliche Produktivität von 2,83 g/h nicht erreicht werden, hier liegt das Ergebnis 53 % unterhalb des publizierten Wertes.

Tabelle 5.23: Vergleich der Threonin RZA von *E. coli* DM 1265, BKIIM und PthrB

	Prozesszeit [h]	RZA [mmol/L*h]
DM 1265 (Ferm 2)	22,9	4,5
	39,5	9,9
BKIIM (Ferm 3)	22,7	8,6
	35,9	6,5
PthrB	21,9	10,1
	33,1	12,7

Vergleicht man die Raum-Zeit-Ausbeute für Threonin bei einer Prozesszeit von ca. 22 h und am Ende der Fermentation ist die höhere Produktivität der optimierten Mutante *E. coli* PthrB ebenfalls erkennbar (s. Tabelle 5.23 und Abbildung 5.74). Die höchste RZA vergleichbarer Fermentationen der untersuchten Threoninproduzenten wird von der optimierten Mutante *E. coli* PthrB überschritten.

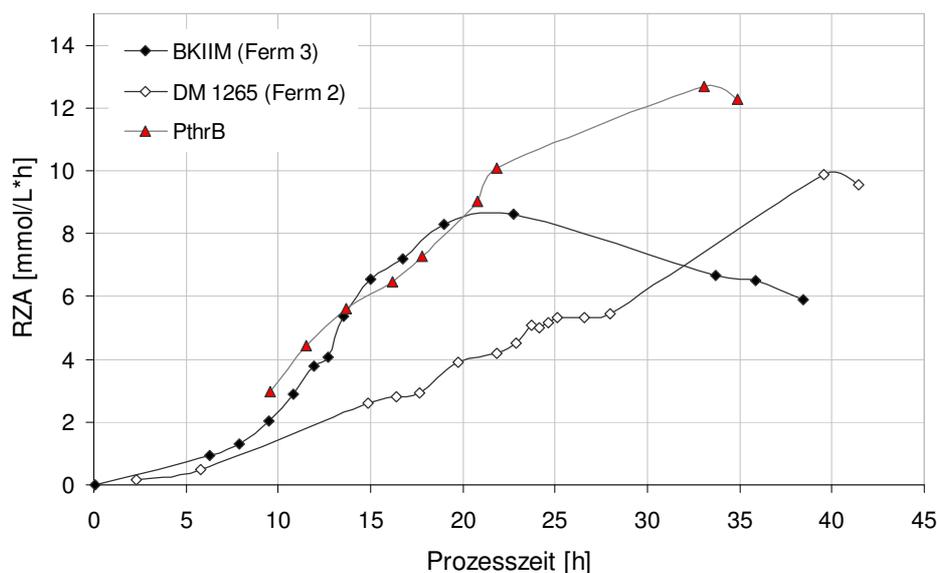


Abbildung 5.74: Raum-Zeit-Ausbeute in Fermentationen der drei untersuchten Threoninproduzenten

## Ergebnisse und Diskussion

Zum Zeitpunkt der Probenahme zur Bestimmung der intrazellulären Poolgrößen (21,14 h) befindet sich die Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase. Die logarithmische Auftragung der optischen Dichte und der Biotrockenmasse zeigt einen linearen Verlauf (s. *Abbildung 5.75*). Es wird davon ausgegangen, dass sich die Zellen im *steady state* befinden und die zeitliche Änderung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen gleich Null ist. Somit sind die erhaltenen Daten (s. *Kapitel 5.6.5*) auf vergleichbare Fermentationen übertragbar.

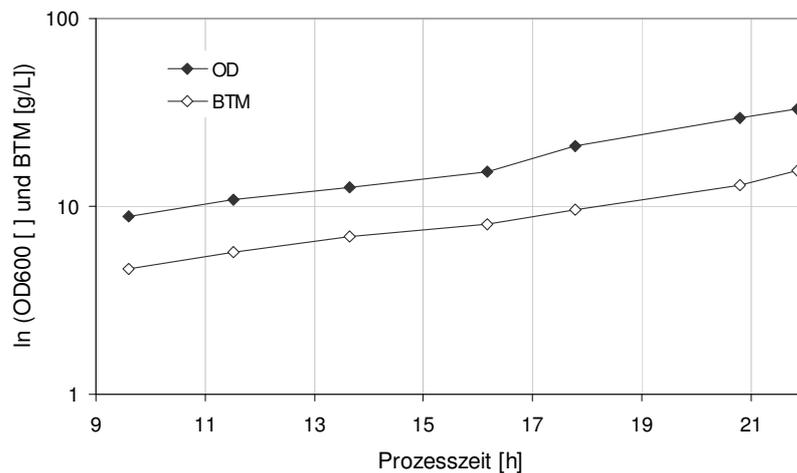


Abbildung 5.75: Exponentielles Wachstum – metabolisch quasi-stationärer Zustand

Die Kohlenstoffbilanz vor der Probenahme zur Extraktion intrazellulärer Metabolite (s. *Abbildung 5.76 links*) weist mit 18 % eine Bilanzlücke auf. Trotzdem ist der Produktanteil von 35 % im Vergleich zu den oben genannten Fermentationen von *E. coli* BKIIM Ferm 4 (23 % nach 10,5 h, s. *Abbildung 5.92*) und DM 1265 Ferm 2 (27 % nach 22,9 h, s. *Abbildung 5.84*) hoch.

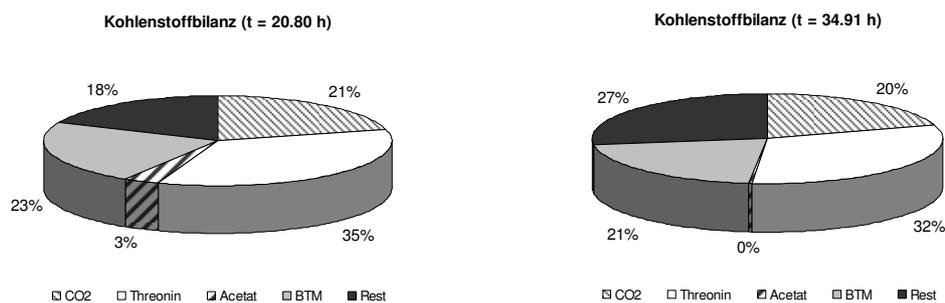
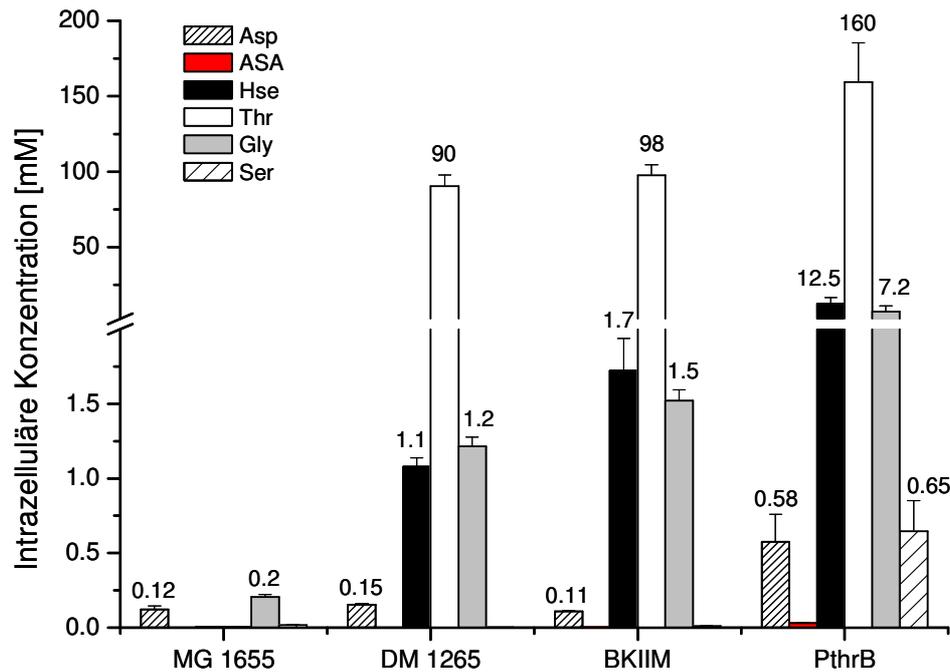


Abbildung 5.76: Kohlenstoffbilanz für *E. coli* PthrB nach 20,8 h (links) und 34,9 h (rechts)

Aufgrund der hohen Substratkonzentration und der Bilanzlücke von 27 % nach 34,9 h wird vermutet, dass *E. coli* PthrB unter Stressbedingungen ein nicht erfasstes Nebenprodukt bildet. Die Identifizierung könnte z. B. mittels eines *Metabolic Footprinting* Ansatzes (s. *Kapitel 3.1.1*) verfolgt werden.

### 5.6.5 Vergleich der intrazellulären Poolgrößen der *E. coli* Threoninproduzenten

Die ermittelten intrazellulären Konzentrationen der Threoninbiosynthese-Intermediate der drei untersuchten Threoninproduzenten werden in *Abbildung 5.77* gegenübergestellt. Bei der neuen Mutante *E. coli* PthrB fällt nicht nur die hohe Threoninkonzentration sofort ins Auge, sondern ebenfalls die sehr hohen Aspartat-, Homoserin-, Glycin- und Serinkonzentrationen.



*Abbildung 5.77: Intrazelluläre Konzentrationen der drei untersuchten Threoninproduzenten - DM 1265 (Ferm 2), BKIIM (Ferm 4)*

Bereits am Eingang des Biosyntheseweges wird der Vorläufer Aspartat im Gegensatz zu den anderen Threoninproduzenten in *E. coli* PthrB angereichert. Der Pool ist bezogen auf den Wildtyp um Faktor 4,7 erhöht. In den beiden Threoninproduzenten DM 1265 und BKIIM hingegen liegen die intrazellulären Aspartatkonzentrationen in der gleichen Größenordnung wie im Wildtyp. Zum leichteren Vergleich werden die intrazellulären Poolgrößen der drei Threoninproduzenten in *Tabelle 5.24* mit denen von *E. coli* MG 1655 ins Verhältnis gesetzt. Die Aspartatkinase I / Homoserindehydrogenase I aus BKIIM ist *feedback* resistent (Debabov et al. 1992), somit ist nicht zu erwarten, dass die hohe Threoninkonzentration der Auslöser für die Akkumulation des Aspartats in der Zelle ist. Die Expression der Aspartatsemialdehyd Dehydrogenase, des zweiten Enzyms im Threoninbiosyntheseweg wird primär über Lysin reguliert. James und Viola (2002) untersuchten eine mögliche *Channeling*-Funktion der ASD durch Zugabe von inaktiviertem Enzym, welches zwar keine oder lediglich geringe katalytische Aktivität besitzt, aber Substrate und Produkte binden kann. Sie konnten zeigen, dass gebildetes Aspartylphosphat in wässriger Lösung zu einem gewissen Maße von der Aspartatkinase direkt an die Aspartatsemialdehyd Dehydrogenase weitergegeben wird.

Daraus zogen sie den Schluss, dass ASD als Brücke fungiert, die von der AK I gebildetes Aspartylphosphat direkt umsetzt und an die katalytische Domäne der HDH I weiter gibt. Ein solcher Enzymkomplex hätte die Vorteile, dass Verluste von Aspartylphosphat durch Hydrolyse minimal und die Biosynthese effizienter wären. Die Annahme eines Channelings würde auch eine Erklärung liefern, warum das Intermediat Aspartylphosphat mittels LC-MS in keinem der Threoninproduzenten nachgewiesen werden kann (s. *Kapitel 5.1*). Das Produkt der ASD katalysierten Reaktion, Aspartatsemialdehyd wird im Zellextrakt von *E. coli* BKIIM und PthrB nachgewiesen. Auch dieses Intermediat ist im Zellextrakt von *E. coli* PthrB angereichert. Im Vergleich zum Vorläuferstamm BKIIM ist der Aspartatsemialdehydpool der optimierten Mutante um den Faktor 10 höher (s. *Tabelle 5.24*). Laut Patte et al. (1996) wurde keine Aminosäure gefunden, welche die Aspartatsemialdehyd Dehydrogenase inhibiert. Somit ist unwahrscheinlich, dass die Aspartatsemialdehydkonzentration in *E. coli* PthrB aufgrund einer Inhibierung des Enzyms höher ist als im Vorläuferstamm.

Hama et al. (1991) beschreiben die Inhibierung der Homoserindehydrogenase I durch die Aminosäure Serin. Der Serinpool in *E. coli* PthrB ist gegenüber den Threoninproduzenten BKIIM und DM 1265 stark angereichert. Die Konzentration übersteigt die des Wildtyps um Faktor 40. Bleibt die Reaktion der HDH I aus, wird das gebildete Aspartatsemialdehyd nicht weiter umgesetzt. Beim Modell des *Channelings* würden somit nicht (oder nur in geringem Maße) Aspartylphosphat und ASA, sondern das Substrat der AK I also Aspartat akkumuliert werden, wie es im Zellextrakt von *E. coli* PthrB der Fall ist.

*Tabelle 5.24: Verhältnisse gemessener intrazellulärer Aminosäurekonzentrationen*

	<i>E. coli</i> MG 1655	<i>E. coli</i> DM 1265 (Ferm 2)	<i>E. coli</i> BKIIM (Ferm 4)	<i>E. coli</i> PthrB
Asp	1	1,3	0,9	4,7
ASA	-	-	1*	9,9*
Hse	1	248,2	397,2	2860,7
Thr	1	17742,1	19144,5	31263,0
Gly	1	5,9	7,4	35,0
Ser	1	0,1	0,7	40,0

\* bezogen auf *E. coli* BKIIM

Auch wenn die Homoserinkinase in *E. coli* PthrB überexprimiert wurde, um die Akkumulation des Intermediates Homoserin zu unterbinden, ist der zytoplasmatische Homoserinpool angestiegen. Während die Akkumulation in *E. coli* DM 1265 und BKIIM mit Faktor 250 und 400 bereits deutlich erkennbar war, ist der Homoserinpool in *E. coli* PthrB fast 3000-fach so groß wie im Wildtyp. Kotre et al. (1973) beschreiben die Inhibierung der NADP-abhängigen Glutamatdehydrogenase, welche die Eingangsreaktion der Assimilation von anorganischem Ammonium katalysiert, durch Homoserin. Da die Glutamatkonzentrationen in allen untersuchten Threoninproduzenten einige hundert Millimol betragen, ist trotz des großen Homoserinpools nicht davon auszugehen, dass die Ammoniumassimilation in *E. coli* DM 1265, BKIIM und PthrB limitierend ist. Auch der Threoninpool der Mutante ist um ca. ein Drittel angestiegen. Da die Threoninsynthese nicht durch das Produkt Threonin inhibiert wird (Chassagnole et al. 2001), muss die Homoserinkinase der Grund für die Akkumulation des Vorläufers Homoserin sein. Somit wird in *E. coli* PthrB ein noch stärkerer Rückstau auf den Biosynthe-

seweg ausgeübt als im Vorgängerstamm *E. coli* BKIIM. Das Intermediat Homoserinphosphat (s. *Kapitel 5.1*) konnte wie Aspartylphosphat in keinem der Threoninproduzenten nachgewiesen werden. Auch Baxter et al. (2007) gelang der Nachweis von Homoserinphosphat im Zellextrakt von *Arabidopsis* nicht. Von einer Produktinhibierung der HK wäre laut Burr et al. (1976) aber auch bei hohen Homoserinphosphatkonzentrationen nicht auszugehen.

Neben den Intermediaten der Threoninbiosynthese ist auch der zytoplasmatische Pool des Threoninabbauproduktes Glycin deutlich gestiegen. *E. coli* DM 1265 besitzt eine aktive Threonindehydrogenase, so dass der Threoninabbau Richtung Glycin ungehindert erfolgen kann. *E. coli* BKIIM und PthrB hingegen enthalten Transposons im *tdh*-Gen, d. h. beide Stämme weisen keine Threonindehydrogenase Aktivität auf (s. *Kapitel 3.4.9*). Aus diesem Grund ist der Glycinpool in *E. coli* PthrB unerwartet hoch. Während die Glycinkonzentration in *E. coli* DM 1265 und BKIIM 6- bzw. 7-fach höher ist als im Wildtyp, ist sie in *E. coli* PthrB um Faktor 35 erhöht.

Die in den Zellextrakten der Threoninproduzenten gemessenen intrazellulären Poolgrößen stehen im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Effekten der Regulation der Threoninbiosynthese in *E. coli*. Aus den vorliegenden Messdaten könnte man schlussfolgern, dass die Transformierung des zweiten Plasmids in *E. coli* B-3996 zu einer gesteigerten Threoninbildung führt. Diese wäre allerdings durch den Transport des Produktes aus der Zelle heraus limitiert, wodurch eine Akkumulation der Metabolite in Nachbarschaft zum Threonin zu beobachten wäre. Zudem ist die Aktivität der Homoserinkinase in *E. coli* PthrB nicht bekannt. Da das Enzym nicht *feedback* resistent ist, kann es bei den hohen gemessenen Homoserinkonzentrationen auch zur Inhibierung durch das Substrat L-Homoserin und das Produkt L-Threonin kommen.

In *Tabelle 5.26* sind ermittelte kinetische Parameter der Threoninbiosynthese-Intermediate von Chassagnole et al. (2001) dargestellt. Vergleicht man die Literaturdaten mit den in *Tabelle 5.25* und *Abbildung 5.77* gegenübergestellten Ergebnissen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Fermentationen von *E. coli* DM 1265, BKIIM, PthrB und MG 1655 wird deutlich, dass die detektierten intrazellulären Konzentrationen, außer beim Homoserin, unterhalb der beschriebenen  $K_M$ -Werte der Enzyme liegen. Dies würde bedeuten, dass die meisten intrazellulären enzymatischen Umsetzungen in der Threoninbiosynthese unterhalb der maximal möglichen Geschwindigkeit ablaufen.

*Tabelle 5.25: Intrazelluläre Konzentrationen vs.  $K_M$*

	<i>E. coli</i> MG 1655	<i>E. coli</i> DM 1265	<i>E. coli</i> BKIIM	<i>E. coli</i> PthrB	$K_M$
Asp [ $\mu$ M]	122,8	0,15	108,3	575,7	970
ASA [ $\mu$ M]	-	-	2,9	28,7	240
Hse [ $\mu$ M]	4,3	1,0773	1723,7	12415,3	110

Da diese Beobachtungen allerdings auch für den Wildtyp zutreffen, stellt sich die Frage, ob dies nicht ein Hinweis auf ein Ausbluten der Zellen und somit den Verlust intrazellulärer Metabolite während des Quenchingvorgangs ist (Wellerdiek et al. 2009). Möglicherweise

## Ergebnisse und Diskussion

könnte eine *in vitro* Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten in der Threoninbiosynthese der untersuchten *E. coli* Stämme diese Fragestellung aufklären.

Tabelle 5.26: Kinetische Parameter der Enzyme der Threoninbiosynthese (bei pH 7,5 und 37 °C, Chassagnole et al. 2001)

Enzym	$K_M$ (mM)	Inhibierung	$K_{eq}$
AK I	Aspartat	$0,97 \pm 0,48$ mM	$6,4 \cdot 10^{-4}$
	ATP	$0,98 \pm 0,5$ mM	
	Aspartylphosphat	$0,017 \pm 0,004$	
	ADP	0,25	
AK III	Aspartat	$0,32 \pm 0,08$	$6,4 \cdot 10^{-4}$
	ATP	$0,22 \pm 0,02$	
	Aspartylphosphat	$0,017 \pm 0,004$	
	ADP	0,25	
ASD	Aspartylphosphat	$0,022 \pm 0,001$	$2,84 \cdot 10^5$
	NADPH	$0,029 \pm 0,002$	
	ASA	$0,11 \pm 0,008$	
	NADP <sup>+</sup>	$0,144 \pm 0,02$	
	Phosphat	$10,2 \pm 1,4$	
HD	ASA	$0,24 \pm 0,03$	$1 \cdot 10^{11} M^{-1}$
	NADPH	$0,037 \pm 0,006$	
	Homoserin	$3,39 \pm 0,33$	
	NADP <sup>+</sup>	$0,067 \pm 0,006$	
HK	Homoserin	0,11	$K_{iThr} 1,09$ mM
	ATP	0,072	
TS	Homoserinphosphat	$0,31 \pm 0,03$	$K_{iLys} 9,45$ mM
			$K_{iHse} 4,7$ mM
			$K_{iATP} 4,35$ mM

## 5.7 Ergebnisse der $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente

Voraussetzung für  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente ist der stabile Zustand des metabolischen Fließgleichgewichts (*steady state*) einer Kultur über die gesamte Markierungsdauer. In diesem Zustand ist die zeitliche Änderung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen gleich Null. Quasi-stationäre Bedingungen werden im Batch oder Fed-Batch Betrieb ohne Substratlimitierung auch in der exponentiellen Wachstumsphase erfüllt (Nöh und Wiechert 2005). Industriell relevante Applikationen laufen im Fed-Batch Betrieb, somit müssen langsame Veränderungen der Flüsse in Kauf genommen werden. Da im Rahmen dieser Arbeit Threoninproduzenten untersucht werden deren Produktion während der Markierungszeit weiterläuft, steigt die Threoninkonzentration während der Dauer der Experimente vergleichsweise stark an.

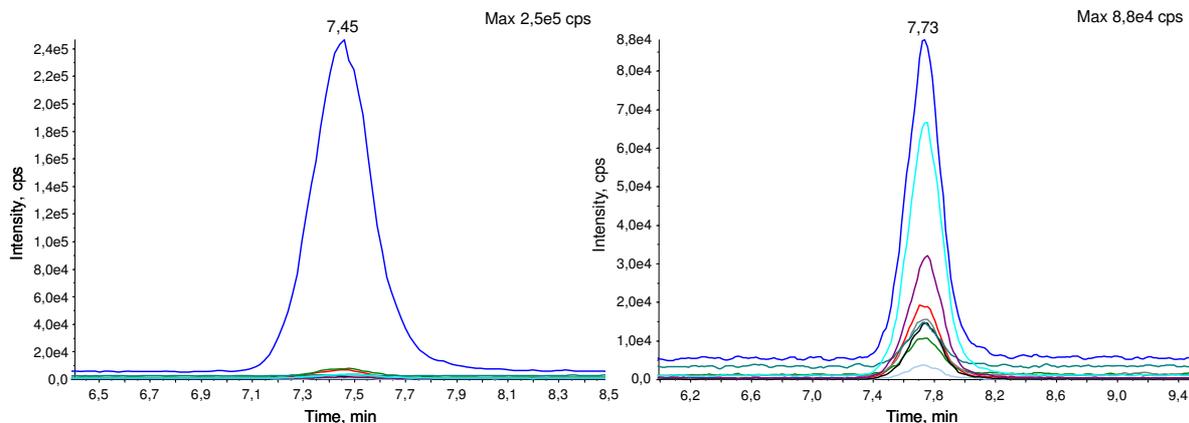
Grundvoraussetzungen für die Durchführung von  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimenten sind ein geeigneter Bioreaktor mit automatisch betriebener schneller Probenahmeinheit, die es ermöglicht mehrere Proben innerhalb weniger Sekunden zu nehmen (s. Kapitel 4.4.1) und eine analytische Methode zur Erfassung der Markierungsverteilung im Metabolom (s. Kapitel 5.2). Im Rahmen dieser Arbeit werden drei  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente am Sensor Reaktor mit  $\text{U}^{13}\text{C}_6$ -Glucose als Substrat durchgeführt, die in den folgenden Kapiteln diskutiert werden. Anhand des Zellaufschlusses und der anschließenden Messung ausgewählter intrazellulärer Metabolite wird der Einbau des markierten Substrats im Organismus verfolgt. Aus den auf diese Weise erhaltenen Markierungsverläufen lassen sich erstmalig Informationen über die intrazellulären Vorgänge während der Produktbildung ableiten. Zudem kann verfolgt werden, mit welcher Zeitverzögerung das Markierungssignal im Produktstoffwechsel ankommt und sich im Threoninbiosyntheseweg fortpflanzt. Auch Einblicke in parallele oder abzweigende Stoffwechselwege sind möglich.

### 5.7.1 Analytische Erfassung der intrazellulären Markierungsdynamik

Mit den Stämmen *E. coli* BKIIM und DM 1265 werden unter Fed-Batch Bedingungen isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente durchgeführt. Nach einer bestimmten Kultivierungsdauer wird der Markierungszustand des Substrats innerhalb von 700 ms geändert (vorher Glucose mit natürlichem Isotopenverhältnis, nachher einheitlich  $^{13}\text{C}$ -markierte Glucose -  $\text{U}^{13}\text{C}_6$ ). Die Anreicherung des Mediums mit  $\text{U}^{13}\text{C}_6$ -Glucose hat dabei keinen Effekt auf die metabolischen Flüsse, dies wurde von Kruger et al. (2007) am Beispiel von *Arabidopsis thaliana* gezeigt. Die Sättigung des Substrataufnahmesystems des Organismus bleibt durch die Änderung des isotopischen Zustands der Kultur unbeeinflusst (s. Kapitel 5.7.2 und 5.7.3), so dass konstante metabolische Flüsse über die Dauer des Markierungsexperiments angenommen werden. Die Probenahme folgt einem annähernd exponentiell steigenden Profil, während der ersten 20 sec werden mit Hilfe der schnellen Probenahmetechnik (s. Kapitel 4.4.1) 11 Proben aus dem Bioreaktor entnommen. Diese werden direkt in methanolische Lösung (s. Kapitel 4.6) gesprüht, so dass eine sofortige Inaktivierung der enzymatischen Aktivität erfolgt. Anschließend werden die intrazellulären Extrakte der Kultur nach

## Ergebnisse und Diskussion

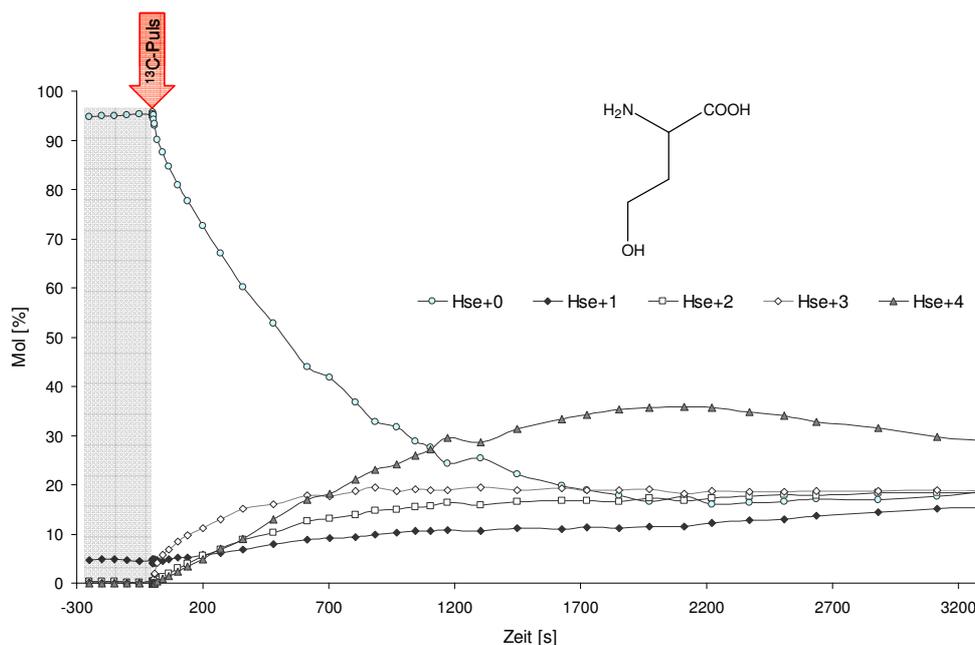
Kapitel 4.7 gewonnen. In der folgenden *Abbildung 5.78* sind Chromatogramme der intrazellulären Massenisotopomere im Aspartatpool (s. Anhang) unmittelbar vor dem  $^{13}\text{C}$ -Markierungspuls (links) und nach einer Markierungszeit von 22 min (rechts) dargestellt.



*Abbildung 5.78: Massenchromatogramme der Isotopomerverteilung im Aspartatpool – links: vor dem Markierungsexperiment, rechts: 22 min nach der  $^{13}\text{C}$ -Pulsaufgabe*

Schon optisch ist die Änderung des isotopischen Zustands im Laufe des Markierungsexperiments in den Rohdaten erkennbar. Deutlich werden auch hier die, bereits in *Kapitel 5.2.1.1* diskutierten, variierenden Basislinien unterschiedlicher Isotopomere. Allerdings bleibt der Einfluss auf die Isotopenverteilung gering, so lange der Untergrund des unmarkierten Isotopomer (wie im Beispiel von Aspartat, vergl. *Abbildung 5.78*) am höchsten ist.

Die im Folgenden zeitlich aufgelöste Darstellung der oben gezeigten Markierungsmessungen demonstriert die Eignung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode zur Erfassung intrazellulärer Markierungsdynamiken in  $^{13}\text{C}$ -Experimenten (s. *Kapitel 5.2*). In *Abbildung 5.79* sind Ergebnisse für den intrazellulären Homoserinpool (ohne Glättung) über die Dauer eines solchen Markierungsexperiments dargestellt.



*Abbildung 5.79: Gemessene intrazelluläre Markierungsdynamik im Homoserinpool*

Innerhalb von 37 min (2220 s) sinkt der Anteil des unmarkierten Homoserin auf 16 %. Zu diesem Zeitpunkt beträgt die extrazelluläre Glucosekonzentration ca. 2 g/L. Anschließend deuten die intrazellulären Homoserin-Markierungsverhältnisse auf eine Veränderung der Stoffwechsellage hin, wahrscheinlich ist die Sättigung des Glucoseaufnahme-systems nicht mehr ausreichend. Der Anteil an unmarkiertem Isotopomer beginnt nach einer Markierungszeit von 37 min wieder zu steigen. Nach einer Markierungszeit von 1105 s (18,4 min) ist das unmarkierte m+0 Isotopomer soweit abgereichert, dass sich das unmarkierte und das vollmarkierte (m+4) Isotopomer des Homoserin überschneiden (s. *Abbildung 5.79*).

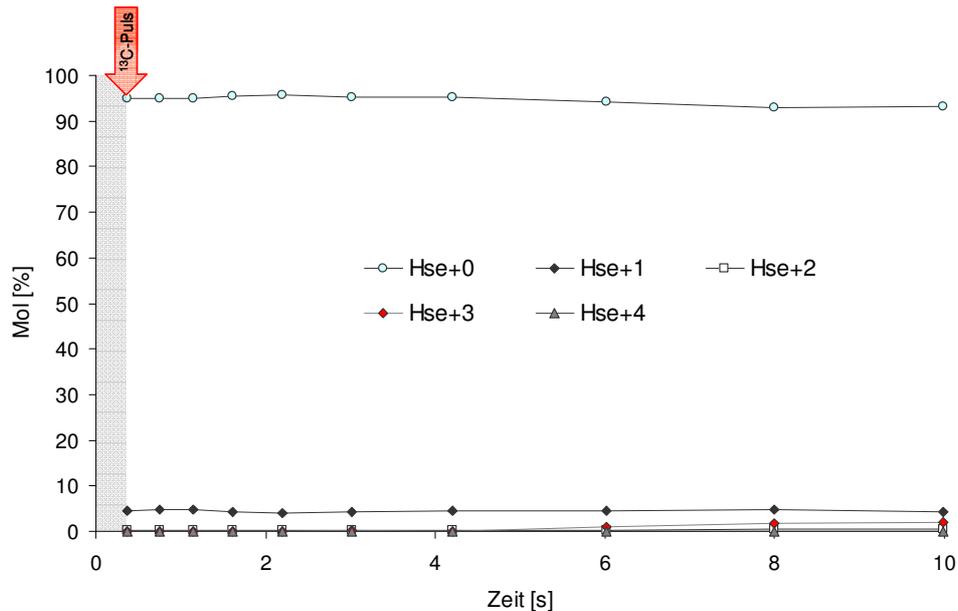


Abbildung 5.80: Ausschnitt der Markierungsdynamik im Homoserinpool aus *Abbildung 5.79*

Die erste signifikante Änderung des Markierungszustandes im Homoserinpool, also die Reaktionszeit auf den Markierungspuls, wird in den Messdaten nach 6 s (im unmarkierten und 3-fach markierten Isotopomer, s. *Abbildung 5.80*) erfasst. Solange ist die Verzögerung des Markierungspulses durch die Enzymkaskade vom Substrat  $U^{13}C$ -Glucose bis zum Threoninbiosynthese Intermediat Homoserin (mindestens 12 enzymatische Umsetzungen).

Durch die Verfolgung der zeitabhängigen Zunahme der markierten Reaktionsprodukte im jeweiligen Metabolitpool, lassen sich Reaktionsgeschwindigkeiten untersuchen. Dabei ist die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit ( $v_0$ ) der  $^{13}C$ -Markierungsanreicherung, als die Mol markiertes Produkt die pro Sekunde gebildet werden, sehr schwierig. Die Anfangsgeschwindigkeit wird von der Steigung der Kurve (der Markierungsanreicherung) zu Beginn einer Reaktion bestimmt, wenn die Rückreaktion noch vernachlässigbar ist. Man kann auf diese Weise also die Geschwindigkeiten enzymatischer Stoffwechselreaktionen unter Fließgleichgewichtsbedingungen untersuchen, ohne Enzym- bzw. Substratkonzentrationen zu verändern. Im Fließgleichgewicht bleibt die Konzentration des Zwischenprodukts (Enzym-Substratkomplex) sogar dann konstant, wenn sich die Konzentrationen der Ausgangsstoffe und Produkte ändern. Dies tritt ein, wenn die Geschwindigkeiten von Bildung und Zerfall des Enzym-Substratkomplexes gleich groß sind. Bei der hier durchgeführten *in vivo*

## Ergebnisse und Diskussion

$^{13}\text{C}$ -Markierung werden die enzymatischen Umsetzungen allerdings nicht losgelöst betrachtet, sondern sind Teil einer Kaskade von enzymatischen Reaktionen im komplexen Stoffwechselnetzwerk. Aus diesem Grund verteilt sich die Markierungsanreicherung auf verschiedene Markierungszustände, was das Ableiten von Anreicherungs-geschwindigkeiten erschwert. Durch die Entfernung der Aminosäuren zur Glycolyse und die sehr unterschiedlichen Kinetiken kann kein einheitlicher Zeitbereich für das Anlegen einer Gerade zur Erfassung der Anfangsgeschwindigkeiten definiert werden, deshalb wird in der folgenden Auswertung darauf verzichtet Steigungen abzuleiten. Stattdessen werden z. B. Reaktionszeiten auf den Markierungspuls, isotopisch quasi stationäre Zustände, Eintritt von Isotopenverdünnungseffekten, maximale Markierungsabreicherungen und Zeitpunkte der Überschneidung von markierten und unmarkierten Isotopomeren gegenübergestellt.

### 5.7.2 Dynamische $^{13}\text{C}$ -Markierung von *E. coli* DM 1265

Nach einer Vorkultivierung von 31 h wird der 2 L Bioreaktor (s. *Kapitel 4.4.1*) mit einer Zelldichte von 3,1 ( $\text{OD}_{600}$ ) angeimpft. Untersucht werden die Produktion extrazellulärer Metabolite und das Wachstumsverhalten. Während der Kultivierung treten weder Sauerstoff- noch Glucoselimitierungen auf. Die Quantifizierung der intrazellulären Poolgrößen mittels LC-MS/MS (s. *Kapitel 5.6.2.1*) erfolgt nach den Methoden der externen Kalibrierung, mit  $\text{U}^{13}\text{C}_4$ -Aspartat als Internem Standard und der Standardaddition (s. *Kapitel 5.3* und *4.10*). In der *Abbildung 5.81* ist der Fermentationsverlauf bezüglich Biomasse-, L-Threonin- und Acetatbildung dargestellt. Ohne Sauerstofflimitierung wird kaum Acetat gebildet. Der Stamm verbraucht das im Medium verfügbare Phosphat in ca. 40 h und erreicht eine maximale BTM von 25 g/L.

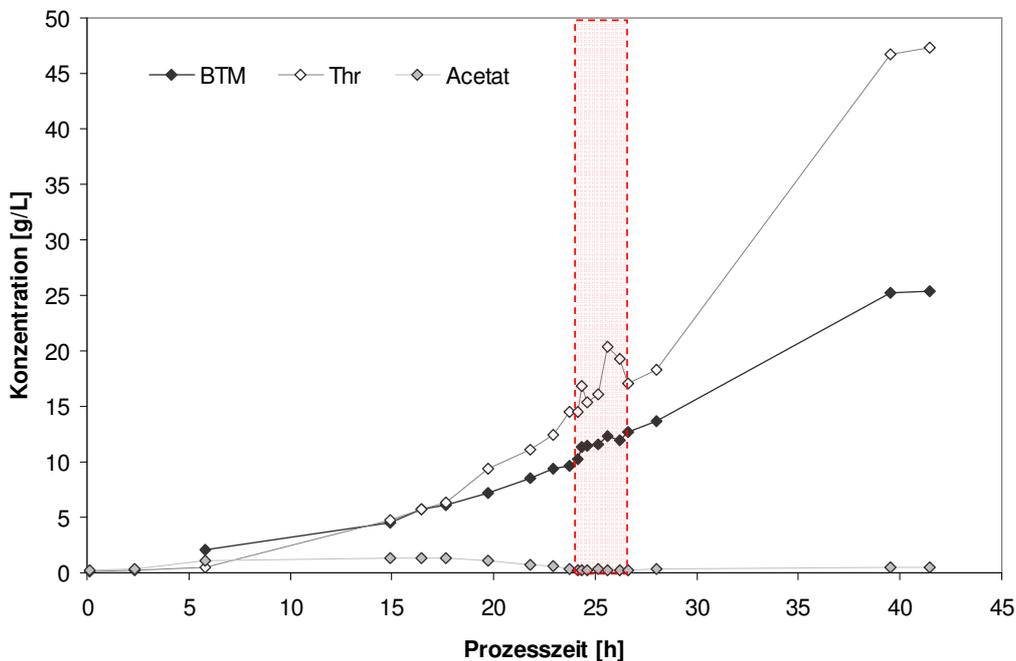


Abbildung 5.81: Vergleich von Biomasse-, Threonin- und Acetatbildung

Bis zum Abbruch der Fermentation nach 41,4 h werden 47,3 g/L L-Threonin gebildet. Die Produktausbeute liegt somit 10 g/L unterhalb der Ausbeute in Ferm 1 (s. *Kapitel 5.6.2*) und beträgt 59 - 71 % der von Hermann und Rieping (2003) publizierten Produktausbeuten zwischen 67 und 80 g/L.

Nach ca. 24 Stunden wird ein  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment durchgeführt (s. rote Markierung in *Abbildung 5.81*). Während der Dauer des Markierungsexperiments wird von einem metabolisch quasi-stationären Zustand ausgegangen; diese Annahme wird durch den linearen Verlauf der logarithmischen Auftragung der optischen Zelldichte ( $\text{OD}_{600}$ ) und Biotrockenmasse unterstützt (s. *Abbildung 5.82*).

## Ergebnisse und Diskussion

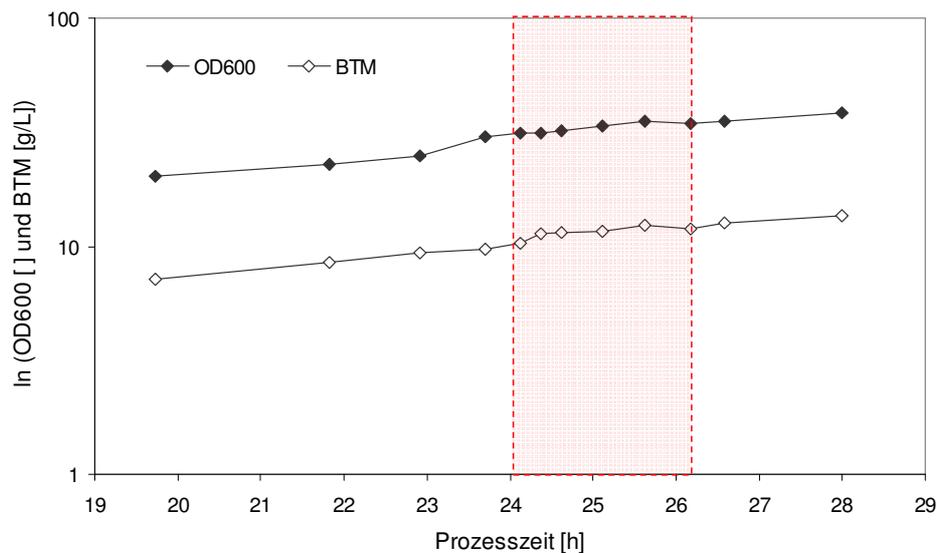


Abbildung 5.82: Exponentielles Wachstum – metabolisch quasi-stationärer Zustand

Die maximale spezifische Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  während des exponentiellen Wachstums beträgt  $0,065 \text{ h}^{-1}$ . Die Ausbeuten an Substrat, Biomasse und Produkt sind in der folgenden Tabelle 5.27 aufgeführt.

Tabelle 5.27: Ertragskoeffizienten zum  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment und am Ende der Fermentation

Prozesszeit [h]	$Y_{S/X}$ [g/g]	$Y_{P/X}$ [g/g]	$Y_{P/S}$ [g/g]
22,9	4,65	1,32	0,28
41,4	5,51	1,86	0,34

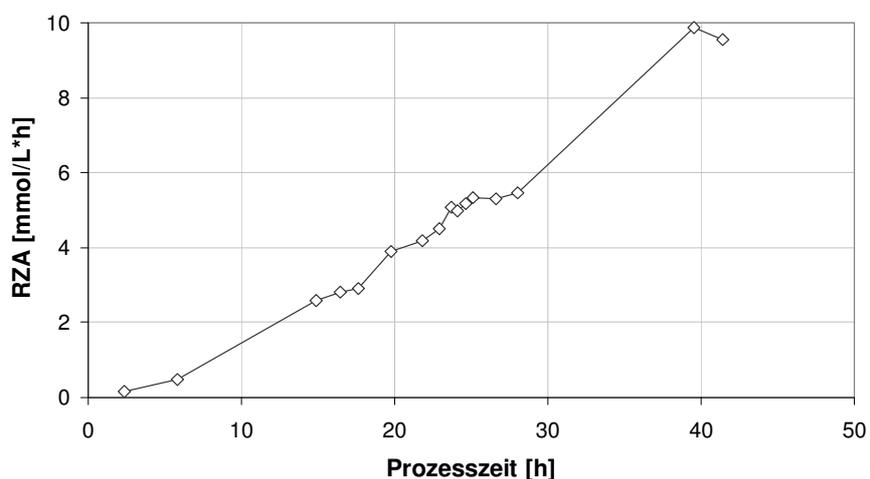


Abbildung 5.83: Raumzeitausbeute Threonin

Die Raumzeitausbeute (RZA) des Produktes Threonin steigt während der Fermentation stetig an. Nach 40 h wird eine RZA von  $9,9 \text{ mmol/L}\cdot\text{h}$  erzielt (s. Abbildung 5.83). In der Abbildung 5.84 sind die Kohlenstoffbilanzen der Fermentation zum Zeitpunkt der Probenahme (Metabolitkonzentrationen s. Kapitel 5.6.2.1) bzw. Startpunkt des Markierungsexperiments und am Endpunkt der Fermentation gegenübergestellt.

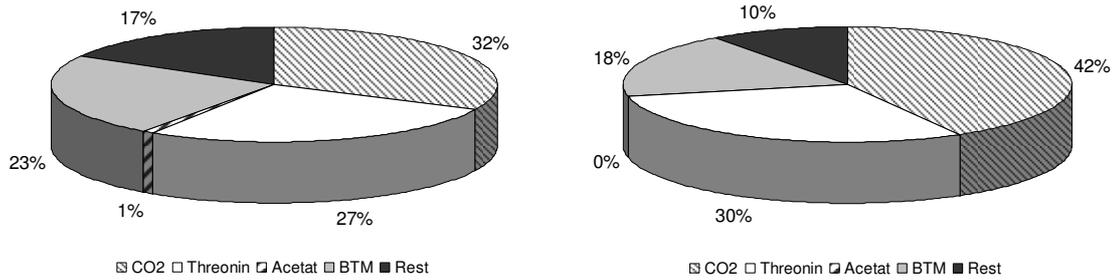


Abbildung 5.84: Kohlenstoffbilanz für *E. coli* DM 1265 nach 22,9 h (links) und 41,4 h (rechts)

Die Bilanzlücken liegen bei 17 % betrachtet in der exponentiellen Wachstumsphase am Zeitpunkt von 22,9 h und bei 10 % in der stationären Phase bei 41,4 h. Trotz der nicht geschlossenen Kohlenstoffbilanz ist der Anteil an gebildetem Produkt mit 27 (22,9 h) und 30 % (41,4 h) hoch.

Während der Fed-Batch Fermentation wird nach 23,7 h in der exponentiellen Wachstumsphase ein U<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Glucosepuls aufgegeben. Um eine Auslenkung des Stoffwechsels durch den Markierungspuls zu vermeiden, beträgt die Glucosekonzentration vor dem Puls ca. 3 g/L. Die Markierungsdauer beträgt ca. 2,5 h und richtet sich nach dem Glucoseverbrauch der über den Verlauf des Experiments linear abnimmt. Der Markierungszeitraum ist in *Abbildung 5.85* rot markiert.

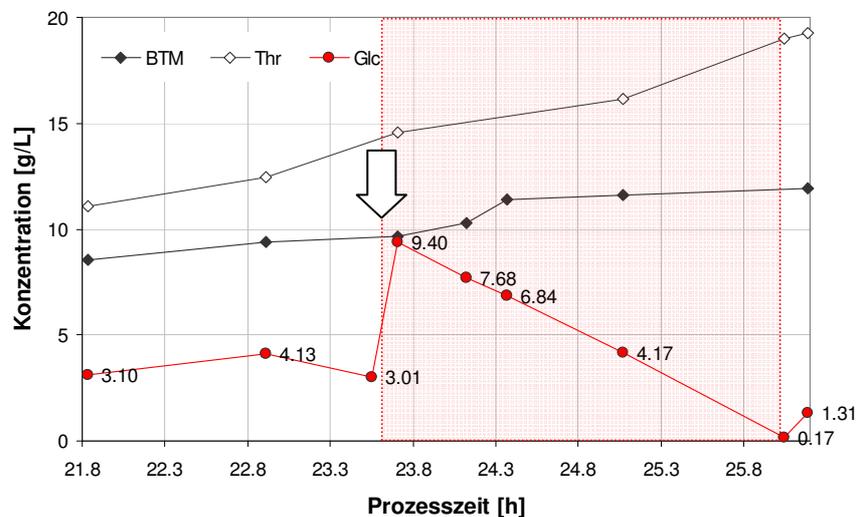


Abbildung 5.85: Verlauf von Substrat-, Biomasse- und Produktkonzentration während des <sup>13</sup>C-Markierungsexperiments

Die Verläufe der Biotrockenmasse, Glucose- und Threoninkonzentration sind in der *Abbildung 5.85* dargestellt. Der Anstieg der Glucosekonzentration von 3,0 g/L (unmarkiert) vor dem Puls, auf 9,4 g/L nach der Pulsaufgabe ist deutlich erkennbar. Das zugegebene markierte Substrat wird innerhalb von 2,5 Stunden von den Zellen aufgenommen und die Fermentation anschließend weitergeführt. Die Kultur ist vor der Pulsaufgabe nicht limitiert, Produkt- und Biomassebildung bleiben durch die Pulsaufgabe unbeeinflusst. Die extrazelluläre

Threoninkonzentration steigt während des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiments von 14,6 auf 20,4 g/L.

Die Steuerung der Pulszugabe erfolgt über den Prozessrechner. Der Puls  $\text{U}^{13}\text{C}_6$  markierter Glucose wird nach 23,7 h ausgelöst, indem die Verbindungsventile zwischen Vorlagebehälter und Sensor Reaktor (s. *Abbildung 4.1*, 1-3) für 100 ms geöffnet werden, so dass markiertes Substrat in das Fermentationsmedium eintritt (Luftzeitdauer 50 ms, Mischzeit 700 ms).

Unmittelbar an die Pulsaufgabe schließt sich die automatische Probenahme mit Hilfe des drehbaren Proben Tellers (s. *Abbildung 4.1*, 4) an. Zur Bestimmung der Markierungsverteilung intrazellulärer Metabolite werden nach der Pulsaufgabe 48 Proben entnommen. Diese werden wie in *Kapitel 4.7* beschrieben mit Chloroform aufgeschlossen und die Zellextrakte aufgearbeitet. Die Ventilöffnungszeit für die schnelle Probenahme beträgt 100 ms. Die Probenahmezeitpunkte (s. *Tabelle 5.28*) werden, wie in den vorangegangenen Experimenten, entsprechend der intrazellulären Dynamik zunächst im ms-Bereich, anschließend in Abständen von mehreren Sekunden bis hin zu 10 min programmiert.

*Tabelle 5.28: Probenahmezeitpunkte des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiments*

Probe	Zeit nach dem Puls [s]	Probe	Zeit nach dem Puls [min]	Probe	Zeit nach dem Puls [min]
1	0,37	18	6,00	35	58,56
2	0,76	19	8,00	36	63,60
3	1,15	20	9,60	37	68,58
4	1,61	21	11,58	38	73,56
5	2,19	22	13,56	39	78,60
6	3,02	23	15,60	40	83,58
7	4,20	24	17,58	41	88,56
8	6,02	25	19,56	42	93,60
9	8,00	26	21,60	43	103,56
10	10,00	27	23,58	44	113,58
11	20,00	28	25,56	45	123,60
12	40,00	29	29,58	46	133,56
13	65,00	30	33,60	47	142,56
14	100,00	31	38,58	48	161,58
15	140,00	32	43,56		
16	200,00	33	48,60		
17	270,00	34	53,58		

Zur Bestimmung der Poolgrößen werden vor dem Puls insgesamt 12 Proben entnommen und parallel aufgearbeitet. Sechs dieser Proben werden vor der Extraktion mit  $\text{U}^{13}\text{C}_4$ -Aspartat als Internem Standard versetzt, um mögliche Aufarbeitungsverluste erfassen zu können. Auf einen Teil der Proben wird zudem die Methode der Standardaddition angewendet um den Einfluss der Matrix zu erfassen (s. *Kapitel 5.3*).

### **5.7.2.1 Ergebnisse des $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiments**

In den gewonnenen Proben werden die Markierungsdynamiken der anabolen Metabolite Alanin, Asparagin, Aspartat, Glutamat, Glycin, Homoserin, Methionin, Serin, Threonin und Valin untersucht (s. *Tabelle 5.29* und *Abbildung 5.86*). Dabei liegt der Fokus bei der

Erfassung intrazellulärer Metabolitdynamiken auf dem Produktstoffwechsel der Aminosäure L-Threonin.

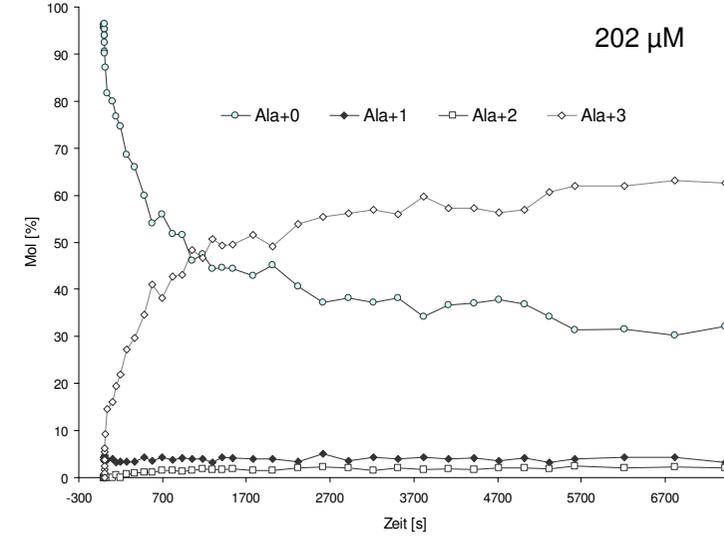
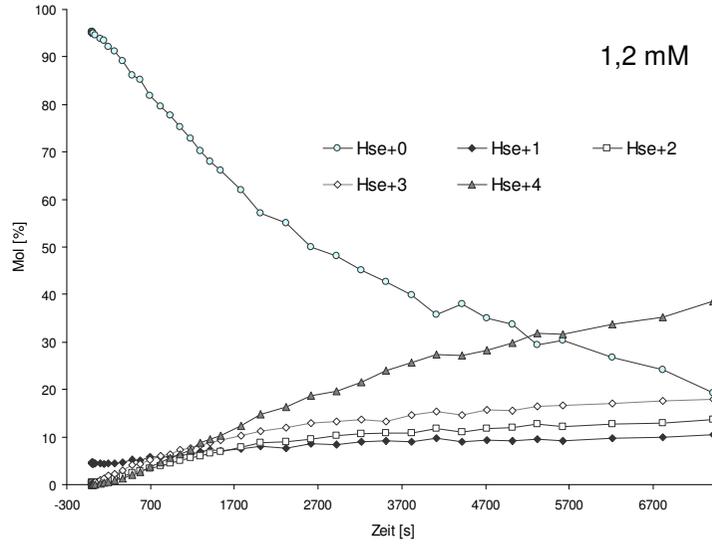
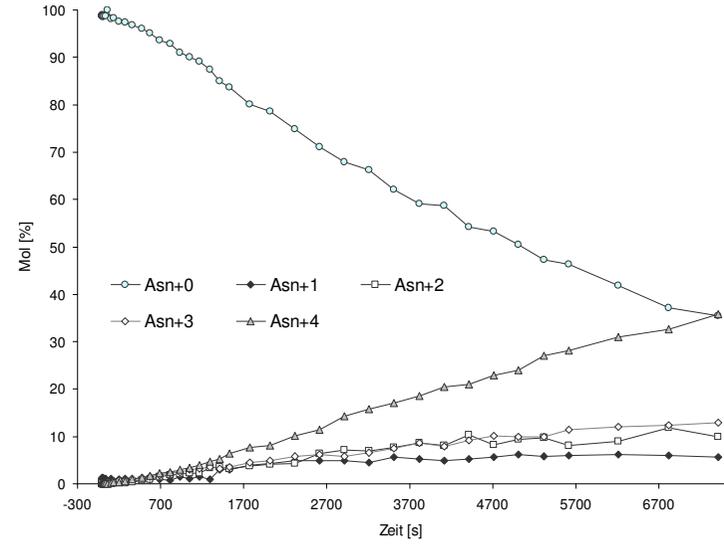
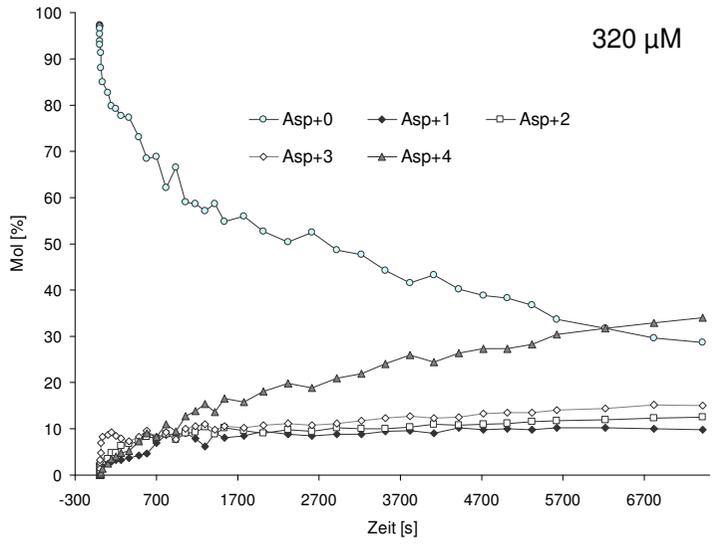
Für die Intermediate der Threoninbiosynthese stellt sich während des Markierungszeitraums kein isotopisch quasi stationärer Zustand ein. Dies liegt wahrscheinlich an den relativ hohen intrazellulären Konzentrationen und an Isotopenverdünnungseffekten die stärker werden je weiter man sich vom Aufgabepunkt der  $^{13}\text{C}$ -Markierung entfernt. Der Anteil an unmarkiertem Isotopomer der Metabolite Aspartat, Homoserin, Threonin, Glycin, Asparagin und Glutamat nimmt bis zum Abbruch des Experiments nach 162 min stetig ab. Die einzigen Metabolite, die innerhalb des Markierungsexperiments einen isotopisch quasi stationären Zustand erreichen, sind Alanin, Serin und Glutamat. Diese Aminosäuren weisen vergleichsweise geringe intrazelluläre Poolgrößen auf, sie liegen näher am Zentralstoffwechsel und sind nach 39 (Ser) und 94 min (Ala) isotopisch quasi stationär (s. *Tabelle 5.29*).

Dicht an den Zentralstoffwechsel anknüpfende Metabolite wie Alanin, Aspartat und Serin zeigen bereits nach 1,6, 1,6 und 4,2 s die erste Reaktion auf den Markierungspuls. Mit einer Zeit von lediglich 8 s ist aber auch die Reaktion des Homoserin auf den Puls schnell. Vor allem, wenn man bedenkt, dass die Poolgröße 1,2 mM beträgt und zu erwarten wäre, dass die Reaktion auf das Markierungssignal dementsprechend träge ist. Da das Intermediat der Threoninbiosynthese im Stoffwechsel relativ weit von der Glykolyse entfernt liegt, könnte der schnelle Markierungseinbau durch den Eintrag von markiertem Kohlenstoff aus der Methioninbiosynthese erklärt werden.

*Tabelle 5.29: Poolgrößen und Reaktion auf den Puls im  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment*

	Erste Reaktion auf den Puls [s]	Poolgröße [ $\mu\text{M}$ ]	Isotopisch quasi Stationär [min]
Alanin	1,6	202	93,6
Aspartat	1,6	320	-
Serin	4,2	8	38,6
Homoserin	8,0	1214	-
Asparagin	20,0	-	-
Glutamat	20,0	2265	103,6
Glycin	40,0	1180	-
Threonin	65,0	92580	-
Valin	100,0	110	-

Auch die Reaktion des Glutamats auf die Umstellung des Markierungszustandes ist mit 20 s schnell. Die intrazelluläre Konzentration ist mit 2,3 mM vergleichsweise hoch. Das bedeutet, dass auch der Stofffluss in den Glutamatpool hoch sein muss (s. *Abbildungen 5.86 und 5.88*). Diese Annahme wird durch das Erreichen des isotopisch quasi stationären Zustands nach 104 min Markierungsdauer unterstützt. Beim Start des Markierungsexperiments beträgt die intrazelluläre Threoninkonzentration bereits 93 mM. Trotzdem gelangt das Markierungssignal schon nach 65 s durch den Zentralstoffwechsel und die Threoninbiosynthese bis zum Produkt. Dies lässt analog zum Glutamat auf einen hohen Stofffluss in die Threoninbiosynthese schließen.



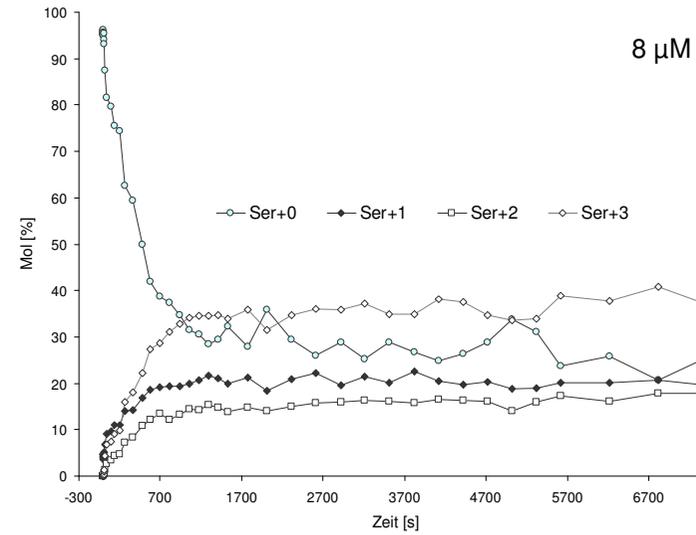
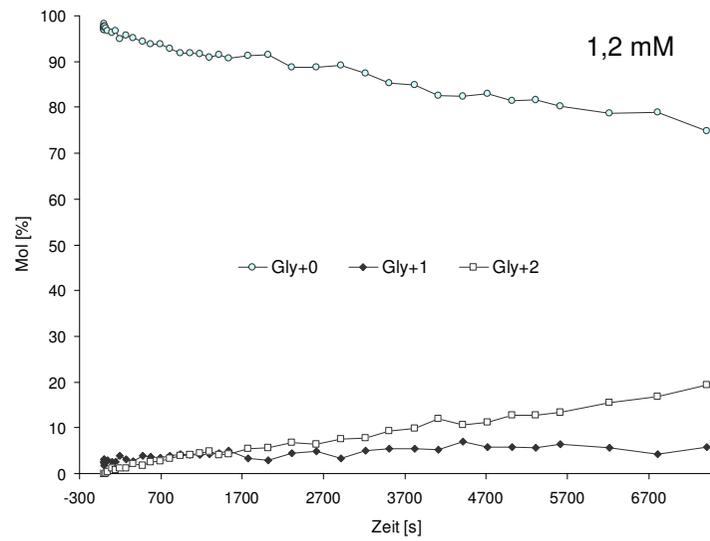
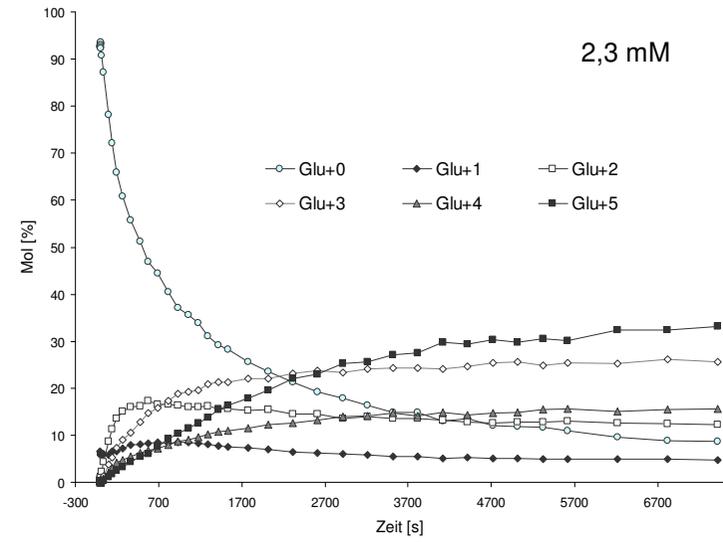
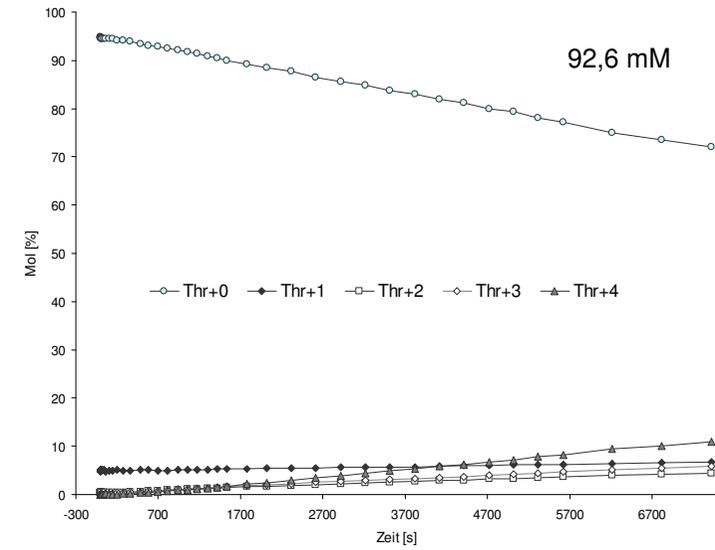


Abbildung 5.86: Markierungsdynamiken der intrazellulären Aminosäuren Asp, Hse, Thr, Gly, Asn, Ala, Glu und Ser

## Ergebnisse und Diskussion

Glycin ist ein Abbauprodukt des Threonin (s. *Kapitel 3.4.7*), deshalb erfolgt die Markierung aufgrund von Isotopenverdünnung durch den großen unmarkierten Threoninpool langsam. Serin, das fast 10-fach schneller auf das Pulssignal reagiert, ist über die Serin-Hydroxymethyltransferase (Gen *glyA*) direkt mit der Aminosäure Glycin verknüpft. Eine Rückreaktion vom Glycin zum Serin kann anhand der Markierungsverläufe ausgeschlossen werden. Denn, wäre dies der Fall, müsste eine Verzögerung der Markierungsanreicherung im Serinpool durch unmarkiertes Material aus dem Threoninpool beobachtet werden. Auffallend ist die Aminosäure Valin (s. *Abbildung 5.87*), welche sich zwar vom Pyruvat ableitet, aber vergleichsweise weit vom Zentralstoffwechsel und der Threoninbiosynthese entfernt liegt. Neben einer unerwartet langen Reaktionszeit von 100 s auf den Puls erfolgt auch die Markierungsanreicherung im Valinpool unerwartet langsam.

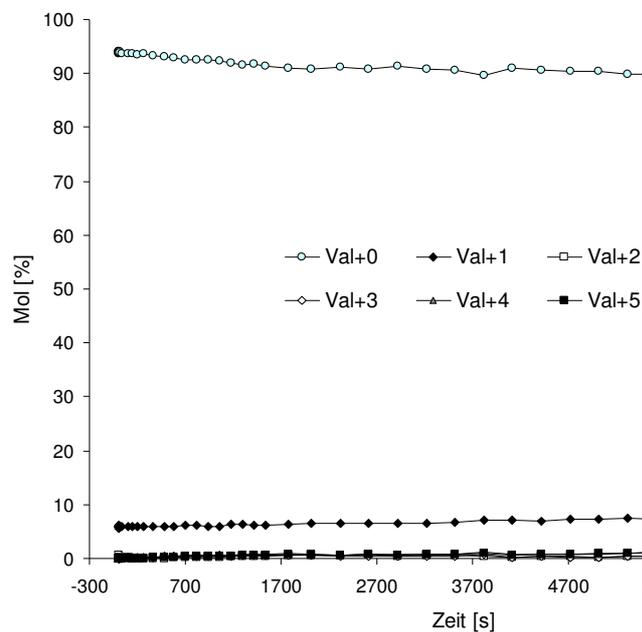


Abbildung 5.87: Markierungsdynamik im Valinpool

Dies kann mehrere Ursachen haben: (1.) der Fluss zum Valin ist sehr langsam, (2.) Valin steht im Austausch mit einem Metaboliten, über den unmarkierter Kohlenstoff in den Valinpool gelangt oder (3.) Valin steht im Austausch mit dem Produkt Threonin. Letzteres wäre theoretisch über die Threonindeaminase (Gen *ilvA*) und mehrere Folgereaktionen denkbar. Ein direkter Threoninabbau zum Valin ist aber weder in der Datenbank KEGG <sup>[9]</sup> (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) noch bei der *E. coli* K 12 MG 1655 Datenbank EcoCyc <sup>[8]</sup> beschrieben. Eine Erklärung könnte die Regulation des Stoffflusses in der Valinbiosynthese durch das Produkt liefern. Liegt Valin im Überschuss vor, wird die von der Acetolactatsynthase katalysierte Reaktion in *E. coli* inhibiert <sup>[8]</sup>.

Vergleicht man die Anreicherungsdynamiken der untersuchten Aminosäuren innerhalb der ersten Sekunden nach der <sup>13</sup>C-Pulsaufgabe sind deutliche Unterschiede der Kinetiken erkennbar. Die Anreicherung der vollmarkierten Isotopomere von Serin und Alanin (s. *Abbildung 5.86* und *Abbildung 5.102*) verläuft schneller als beim Aspartat. Neben der Reak-

tionsgeschwindigkeit könnten die Nähe zum Zentralstoffwechsel und das C<sub>3</sub>-Gerüst der beiden Aminosäuren Ursachen hierfür sein (s. Kapitel 5.7.4). In *Abbildung 5.88* ist die Markierungsanreicherung in den intrazellulären Metaboliten Aspartat, Homoserin, Threonin, Glutamat und Asparagin während der ersten 6 Minuten des Markierungsexperiments dargestellt. Die Anreicherungsgeschwindigkeit innerhalb der Threoninbiosynthese nimmt wie erwartet von Aspartat über Homoserin zum Threonin hin ab. Leider ist die Erfassung von Markierungsinformationen für das Threoninbiosynthese-Intermediat Aspartatsemialdehyd aufgrund der sehr geringen intrazellulären Konzentration nicht möglich. Die geringe Poolgröße lässt aber darauf schließen, dass die Homoserindehydrogenase in der Threoninbiosynthese keinen *Bottleneck* darstellt, da Aspartatsemialdehyd in diesem Fall angereichert werden würde und gut messbar wäre.

Zwischen Aspartat und Asparagin findet ein sehr langsamer Austausch statt. Während im Aspartatpool innerhalb der ersten 40 s eine sehr schnelle Anreicherung des m+3 Isotopomers auf 8,3 % erfasst wird, verläuft die Anreicherung im Asparaginpool langsam und beträgt zum gleichen Zeitpunkt lediglich 0,1 %. Obwohl die Metabolite im Stoffwechselnetzwerk direkt miteinander verknüpft sind, wird in *Abbildung 5.88* deutlich, dass sich die Anreicherungskinetiken stark voneinander unterscheiden.

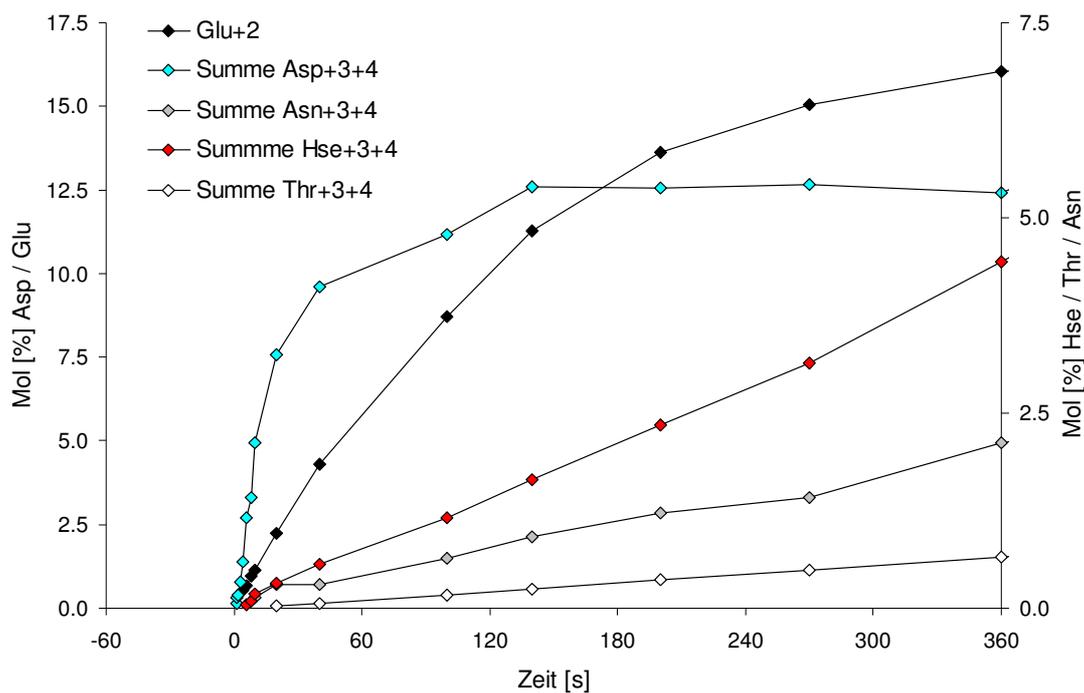


Abbildung 5.88: Vergleich der Dynamik von Asp, Hse, Thr, Glu und Asn

Erstaunlich ist die Markierungsdynamik des Glutamatpools: erste Isotopenverdünnungseffekte, die eine Reduktion der anfänglichen Anreicherungsgeschwindigkeit verursachen, werden erst nach 40 s beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt beträgt die Markierung des Glutamatpools bereits 4,3 Mol % (s. Tabelle 5.30). Eine Erklärung für den hohen Stofffluss könnte die Hochregulierung der Glutamatproduktion im Aminosäureproduzenten *E. coli* DM 1265 sein, um zu gewährleisten, dass ausreichend Aminodonor für die Bereitstellung des Threoninbiosynthesevorläufers Aspartat zur Verfügung steht. Im Gegensatz zu allen anderen Metaboliten deren

## Ergebnisse und Diskussion

intrazelluläre Konzentration im mM Bereich gemessen wurde, erreicht der Glutamatpool innerhalb des Markierungsexperiments nicht nur einen isotopisch quasi stationären Zustand, sondern wird mit verbleibenden 8,7 % unmarkiertem Isotopomer auch annähernd komplett markiert (s. *Tabelle 5.31*). Die Überschneidung von markiertem und unmarkiertem Isotopomer erfolgt beim Glutamat nach 2315 s (38,6 min) bei 21,7 Mol %.

Die nahe am Zentralstoffwechsel liegenden Aminosäuren Alanin und Serin zeigen bis 20 s nach dem Markierungsexperiment eine konstante Anreicherungs-geschwindigkeit. In diesem Zeitraum wird eine Anreicherung von 9,3 (Ala) und 4,4 Mol % (Ser) erreicht. Beide Pools werden schnell markiert, so dass die Überschneidung von markiertem und unmarkiertem Isotopomer bereits nach 1055 s (18 min, Ala) und 1000 s (17 min, Ser) erfolgt. Am Ende des Markierungsexperiments beträgt die Abnahme des unmarkierten Isotopomers 70 % (Ala) und 75 % (Ser).

Der im Aspartat abgebildete Fluss in den Produktstoffwechselweg ist verglichen mit dem anderer Metabolite sehr hoch, nach 20 s sind bereits 7,6 % des Aspartatpools markiert. Zu diesem Zeitpunkt treten auch Isotopenverdünnungseffekte durch reversible Reaktionen, Austausch mit anderen Pools oder Verdünnung des Markierungssignals z. B. durch Eintrag von unmarkiertem Kohlenstoff über den Zitronensäurezyklus oder aus dem *Protein turnover* auf (s. *Abbildung 5.88*). Bei Letzterem werden proteingebundene Aminosäuren in freie Aminosäuren überführt (Gancedo et al. 1982), die dann erneut für die Metabolit- oder Proteinbiosynthese zur Verfügung stehen. Eine Überschneidung markierter und unmarkierter Isotopomere erfolgt erst nach 6214 s (103,6 min) bei 35,9 Mol %, obwohl Aspartat ein C-Atom weniger enthält als Glutamat, und der Glutamatpool 7-fach größer ist. Somit erfolgt die Markierungsanreicherung im Aspartatpool 2,7-fach langsamer als beim Glutamat. Die maximale Abreicherung an unmarkiertem Isotopomer beträgt 28,6 % (s. *Tabelle 5.31*), der Aspartatpool wird also zu ~75 % markiert.

*Tabelle 5.30: <sup>13</sup>C-Markierungsanreicherung in den ersten Sekunden des Markierungsexperiments*

	Isotopenverdünnungseffekte [s]	Markierung bis <sup>1</sup> [Mol %]	Überschneidung [s]	Markierung bis <sup>2</sup> Mol [%]
Alanin	20	9,3	1055	48,5
Aspartat	20	7,6	6214	32,0
Serin	20	4,4	1000	33,5
Homoserin	10	0,2	5314	31,8
Asparagin	-	-	7416	35,9
Glutamat	40	4,3	2315	21,7
Glycin	-	-	-	-
Threonin	-	-	-	-
Valin	-	-	-	-

<sup>1</sup> = Zeitpunkt des Eintretens von Isotopenverdünnungseffekten

<sup>2</sup> = Zeitpunkt bei dem sich markiertes und unmarkiertes Isotopomer überschneiden

Im Homoserinpool zeigt sich bereits nach 10 s ein Isotopenverdünnungseffekt. Anschließend verläuft die Markierungsanreicherung aber mit einer etwas langsameren Kinetik annähernd linear weiter bis die Anreicherungs-geschwindigkeit nach ca. 2000 s (33 min) abnimmt (s. *Abbildung 5.86*). Die Überschneidung von markiertem und unmarkiertem Isotopomer tritt nach 5314 s (89 min) ein, also noch eher als beim Biosynthesevorläufer Aspartat. Homoserin

erreicht mit 19,2 % verbleibendem unmarkiertem Isotopomer eine Markierung des Pools von 80 % was ähnlich wie beim Glutamat auf einen schnellen Fluss durch den Homoserinpool hindeutet.

Tabelle 5.31: Maximale Markierungsabweichung des m+0 Isotopomers

	Mol [%] m+0	Poolgröße [ $\mu$ M]
Glutamat	8,7	2265
Homoserin	19,2	1214
Serin	24,9	8
Aspartat	28,6	320
Asparagin	35,9	-
Alanin	30,2	202
Threonin	72,1	92580
Glycin	74,8	1180
Valin	89,4	110

Beim direkt mit dem Aspartat verknüpften Asparagin werden keine Isotopenverdünnungseffekte beobachtet. Im Gegenteil, die Anreicherung verläuft anfänglich etwas langsamer und erst nach ca. 1300 s (22 min) scheint sich eine konstante Markierungsgeschwindigkeit einzustellen (s. *Abbildung 5.86*). Eine Überschneidung von markiertem und unmarkiertem Isotopomer tritt erst am Ende des Markierungszeitraums nach 7416 s (124 min) ein. Der intrazelluläre Asparaginpool wird dabei zu 64 % markiert.

Interessant ist die Markierungsanreicherung im Glutamatpool, hier erkennt man eine wellenförmige Zunahme der unterschiedlichen Isotopomere. Zunächst wird das Glu+2 Isotopomer mit einer schnellen Kinetik angereichert. Nach 800 s (13,3 min) übernimmt dann das Glu+3 Isotopomer und nach 2700 s (45 min) das Glu+5 Isotopomer die Führung. Die Glu+3, +4 und +5 Isotopomere steigen im Glutamatpool bis zum Ende des Markierungsexperiments stetig an (s. *Abbildung 5.86* und *5.89*).

Aus diesen Beobachtungen lassen sich Informationen über den Zitronensäurezyklus (s. *Kapitel 3.4.5*) ableiten, in welchen die Markierung aus der Glykolyse zunächst über 2-fach markiertes AcetylCoA eingeschleust wird. Das daraus gebildete 2-fach markierte Citrat ( $C_6$ ) wird weiter bis zu  $\alpha$ -Ketoglutarat verstoffwechselt und dann in den Glutamatpool geschleust. Bei der Reaktion vom Isocitrat ( $C_6$ ) zum  $\alpha$ -Ketoglutarat ( $C_5$ ) findet neben einer Oxidation die Abspaltung eines Kohlenstoffatoms in Form von  $CO_2$  statt. Somit gibt es theoretisch zwei mögliche Varianten des entstehenden  $\alpha$ -Ketoglutarat, da entweder unmarkiertes Kohlendioxid oder markiertes Kohlendioxid abgespalten werden kann. Auf diese Weise würde 1- oder 2-fach markiertes Glutamat entstehen. Die Zunahme des Glu+1 Isotopomers zwischen 250 und 2000 s ist nur schwach erkennbar. Der Verlauf des einfach markierten Isotopomers erreicht nach 1050 s (17,5 min) mit einer Anreicherung von 2,4 % einen Höchstwert. Das Glu+2 Isotopomer hingegen erreicht nach 580 s (9,7 min) eine maximale Anreicherung von 16,6 %. Dies lässt darauf schließen, dass die Isocitratdehydrogenase bevorzugt unmarkiertes  $CO_2$  abspaltet, oder anders ausgedrückt die Carboxylgruppen des Isocitratmoleküls nicht gleichwertig sind, sondern bevorzugt die aus dem Vorläufer Oxalacetat stammende Carboxy-

## Ergebnisse und Diskussion

funktion abgespalten wird. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Wood et al. (1941) und Ogston (1948) aus Versuchen mit  $^{13}\text{C}$ -markierten Substraten.

Die Glu+3 und +4 Isotopomere werden angereichert wenn  $^{13}\text{C}_2$ -markiertes  $\alpha$ -Ketoglutarat nicht in die Aminosäurebiosynthese abfließt, sondern den Zitronensäurezyklus durchläuft und am Ende  $^{13}\text{C}_2$ -markiertes Oxalacetat als Vorläufer für eine neue Runde durch den Zyklus bereitstellt. Das 2-fach markierte Oxalacetat bildet dann  $^{13}\text{C}_4$ -markierte Zitronensäure. Je nachdem ob die beiden  $^{13}\text{C}$ -Atome endständig oder mittig in das Zitronensäuremolekül eingebaut werden entsteht dann 3- oder 4-fach markiertes  $\alpha$ -Ketoglutarat. Eine weitere Möglichkeit ist der direkte Markierungseinbau von m+3 Isotopomeren des Oxalacetat über die Anaplerose. In diesem Fall entsteht Oxalacetat über die Phosphoenolpyruvat Carboxylase aus 3-fach markiertem PEP und  $^{12}\text{CO}_2$ . Auf diese Weise entsteht ebenfalls 5-fach markierte Zitronensäure die zu 4-fach markiertem  $\alpha$ -Ketoglutarat weiter verstoffwechselt werden kann.

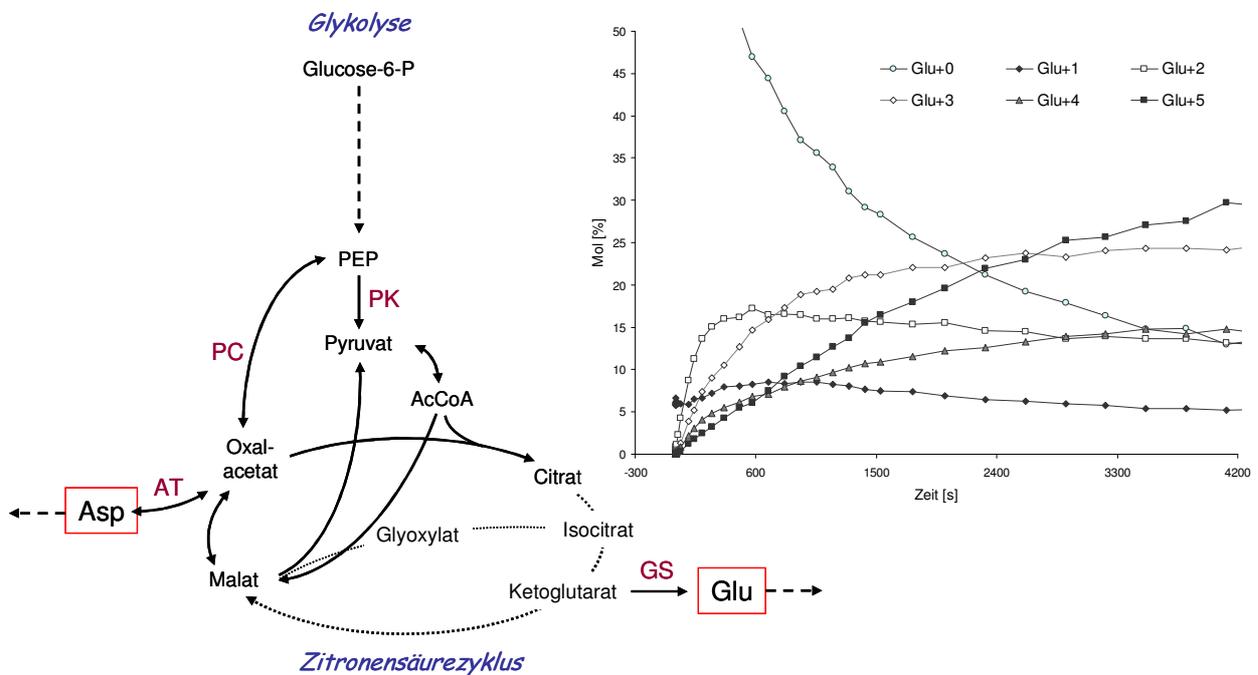


Abbildung 5.89:  $^{13}\text{C}$ -Markierungsanreicherung im Glutamatpool – AT: Aspartat-Aminotransferase, PC: Phosphoenolpyruvat Carboxylase, PK: Pyruvatkinase, GS: Glutamatsynthase

Erst wenn 1 Molekül entweder (1.) den Zyklus zwei Runden komplett durchläuft und dabei keine Markierung durch die Abspaltung von  $^{13}\text{CO}_2$  verliert oder (2.) über die Anaplerotik nach Einbau von  $^{13}\text{CO}_2$  vollmarkiertes Oxalacetat entsteht, kann 5-fach markiertes Glutamat gebildet werden. In diesem Fall entsteht dann  $^{13}\text{C}_6$ -markierte Zitronensäure aus den vollmarkierten Vorläufern Oxalacetat und AcetylCoA.

In Transaminierungsreaktionen, übertragen Aminosäuren, über Zentralstoffwechselmetabolite wie z. B.  $\alpha$ -Ketoglutarat, Pyruvat und Oxalacetat, Stickstoff auf andere Metabolite. Grotkjær et al. (2004) simulierten die Markierungsanreicherung für  $\alpha$ -Ketoglutarat mit und ohne Transaminierungsreaktion und zeigten, dass der Pool ohne Transaminierung schnell einen isotopisch stationären Zustand erreicht. Mit der Transaminierungsreaktion hingegen erfolgt die Markierungsanreicherung nach einem anfänglich schnellen Austausch stark ver-

zögert. Dies ist auf den Eintrag von unmarkiertem Glutamat aus dem großen intrazellulären Pool zurückzuführen. Die Transaminierung führt dazu, dass die Markierungsanreicherung im  $\alpha$ -Ketoglutarat verzögert erfolgt, freies Glutamat und auch proteingebundenes Glutamat hingegen werden deutlich schneller markiert. Aufgrund des relativ langsamen Rückflusses wird die Markierungsanreicherung von  $\alpha$ -Ketoglutarat und Glutamat durch den *Protein turnover* kaum beeinflusst. Die in *E. coli* DM 1265 beobachtete schnelle  $^{13}\text{C}$ -Markierungsanreicherung des Glutamats lässt also auf einen hohen Austauschfluss zwischen  $\alpha$ -Ketoglutarat und Glutamat schließen, der zu einer vergleichsweise schnellen Markierungsanreicherung im Glutamatpool führt. Die schnellen Reaktionen des Alanins und Aspartats auf den Puls könnten ebenfalls auf hohen Austauschflüssen durch Transaminase-Reaktionen der beiden Aminosäuren basieren.

Die Stoffflüsse in abzweigende Biosynthesewege führen zur Isotopenvermischung und Verdünnung des Markierungssignals im Zitronensäurezyklus. Dieser ist besonders an Verzweigungspunkten abfließender Biosynthesewege, wie z. B. beim Oxalacetat und  $\alpha$ -Ketoglutarat, sehr komplex reguliert. Deshalb lassen sich nur Phänomene die in den ersten Sekunden nach dem Markierungspuls eintreten zuordnen, ausschließlich bei diesen ist es möglich *in vivo* Reaktionsgeschwindigkeiten unter Produktionsbedingungen abzuleiten.

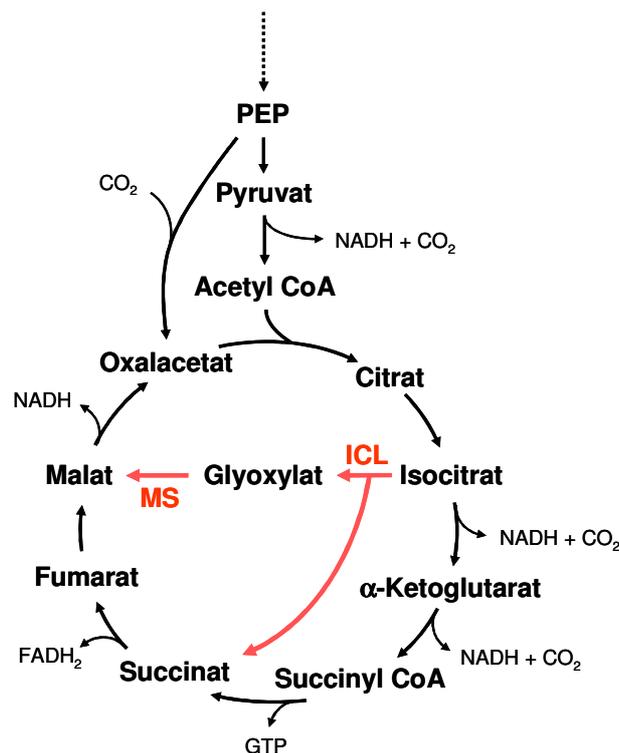


Abbildung 5.90: Anaplerose und Zitronensäurezyklus mit Glyoxylatweg in *E. coli*  
MS: Malatsynthase, ICL: Isocitratlyase

Bei den beschriebenen Abläufen im Zitronensäurezyklus liegt die Annahme zugrunde, dass der Glyoxylatweg (s. *Abbildung 5.90*) unter aeroben Kultivierungsbedingungen mit Glucose als Kohlenstoffquelle inaktiv ist. Lee et al. (2007) leiten aus ihren Experimenten allerdings ab, dass der Glyoxylatweg in Threoninproduzenten aufgrund des erhöhten Bedarfs an Oxalacetat aktiv ist. Sie beobachten die Hochregulierung der am Glyoxylatweg beteiligten *aceBA*

## Ergebnisse und Diskussion

Gene. Die Autoren konnten zeigen, dass die Threoninproduktion durch Deletion des Transkriptionsregulators *iclR* positiv beeinflusst wird. Ohne den Regulator *iclR* erfolgt eine erhöhte Expression der *aceBA* Gene welche für die Isocitratlyase (ICL) und Malatsynthase (MS) kodieren. Dies bedeutet, dass der Glyoxylatweg in dem auf *E. coli* WL3110 basierenden Threoninproduzenten unter aeroben Bedingungen aktiv ist und die Threoninbildung beeinflusst. Um herauszufinden, ob der Glyoxylatweg auch in *E. coli* DM 1265 unter aeroben Bedingungen aktiv ist, müsste die Expression der *aceBA* Gene über Transkriptomanalysen überprüft werden.

### 5.7.3 Dynamische $^{13}\text{C}$ -Markierung von *E. coli* BKIIM B-3996

Um die intrazellulären Stoffwechselforgänge in *E. coli* BKIIM zu untersuchen, werden basierend auf Erfahrungen aus Testfermentationen im 7,5 L Maßstab (Lussem 2006) Markierungsexperimente im 2 L Sensor Reaktor (s. Kapitel 4.4.1) durchgeführt. Der prinzipielle Ablauf der Fermentationsprozesse ist in Kapitel 4.4.3 beschrieben.

Der Sensor Reaktor wird mit 70 mL einer Luria Bertani Vorkultur ( $\text{OD}_{600} = 5,2$ ) beimpft (Startvolumen 0,7 L). Der Sauerstoffpartialdruck während der Fermentation wird über die Rührerdrehzahl geregelt und auf 30 % gehalten. Der Reaktor wird mit 0,2 bar Überdruck und einer Belüftungsrate zwischen 1,5 und 2 L/min betrieben. Der pH-Wert von 6,8 wird über eine automatische Regelung eingestellt. Produktbildung und Wachstumsverhalten während der Fermentation sind in *Abbildung 5.91* dargestellt. Bis zum Abbruch der Fermentation nach dem Markierungsexperiment (11,5 h) werden 7,0 g/L L-Threonin gebildet.

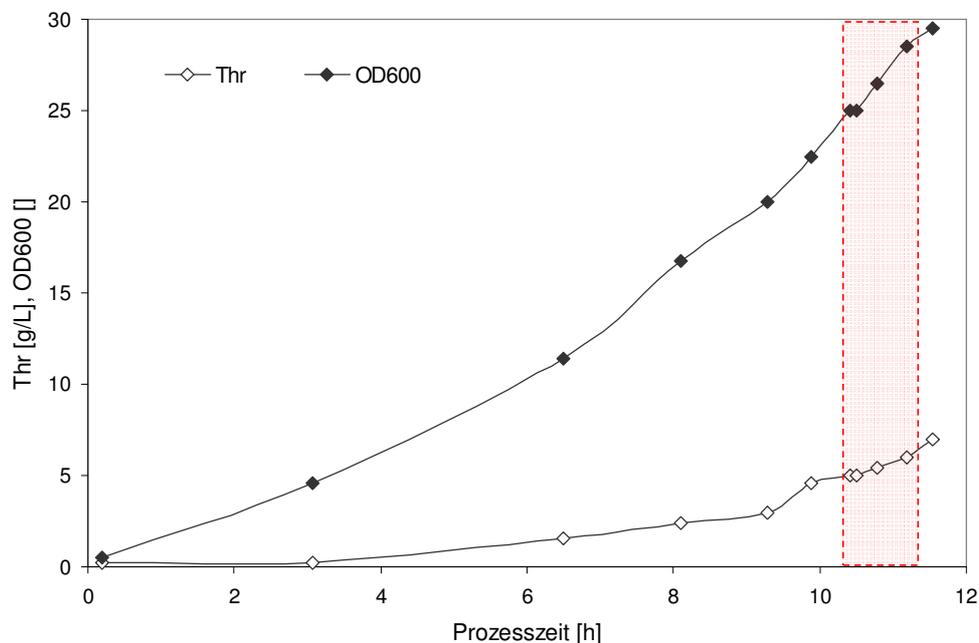


Abbildung 5.91: Vergleich von Biomasse- und Threoninbildung

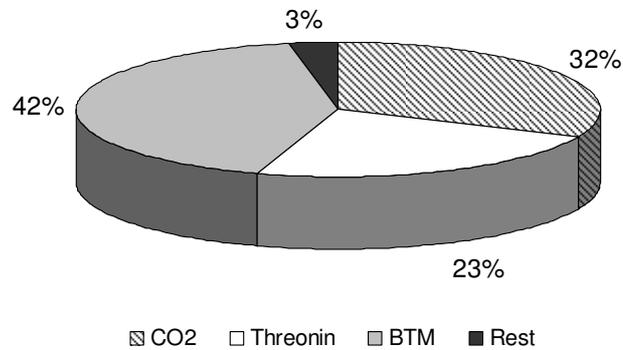
Nach einer Kultivierungsdauer von 10,4 Stunden wird das  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment gestartet. Der Zeitraum ist in *Abbildung 5.91* rot markiert hervorgehoben. Während der Dauer des Markierungsexperiments wird von einem metabolisch quasi-stationären Zustand ausgegangen. Diese Annahme wird durch den linearen Verlauf der logarithmischen Auftragung der optischen Zelldichte ( $\text{OD}_{600}$ ) und Biotrockenmasse unterstützt (s. *Abbildung 5.94*). Die maximale spezifische Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  beträgt während des exponentiellen Wachstums  $0,2 \text{ h}^{-1}$ . Die Ausbeuten an Substrat, Biomasse und Produkt sind in *Tabelle 5.32* aufgeführt.

Tabelle 5.32: Ertragskoeffizienten zu Beginn des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiments

Prozesszeit [h]	$Y_{S/X}$ [g/g]	$Y_{P/X}$ [g/g]	$Y_{P/S}$ [g/g]
10,5	4,31	0,96	0,22

## Ergebnisse und Diskussion

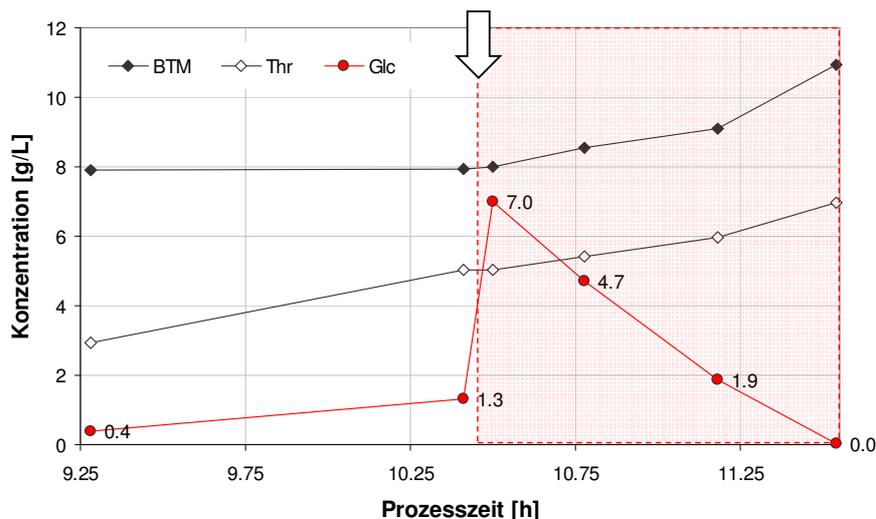
In der *Abbildung 5.92* ist die Kohlenstoffbilanz der Fermentation vor dem Start des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiments dargestellt.



*Abbildung 5.92: Kohlenstoffbilanz bei  $t = 10,5 \text{ h}$  für *E. coli* BKIIM*

Die Kohlenstoffbilanz, betrachtet zum Zeitpunkt 10,5 h, ist mit 97 % geschlossen. Der hohe Anteil am Produkt L-Threonin von 23 % deutet auf eine hohe Produktivität der Kultur hin. Somit spiegeln die Ergebnisse des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiments den Stoffwechsel unter Produktionsbedingungen wider.

Nach 10,35 h werden Proben zur quantitativen Bestimmung ( $n = 5$ ) der intrazellulären Poolkonzentrationen entnommen. Diese werden, analog der 35 Proben nach dem Puls, wie in *Kapitel 4.6 und 4.7* beschrieben aufgearbeitet. Der Puls  $\text{U}^{13}\text{C}_6$  markierter Glucose wird nach einer Prozesszeit von 10,42 h ausgelöst. In der *Abbildung 5.93* sind die Verläufe von Biotrockenmasse, Glucose- und Threoninkonzentration bis zum Ende der Markierungsperiode dargestellt.

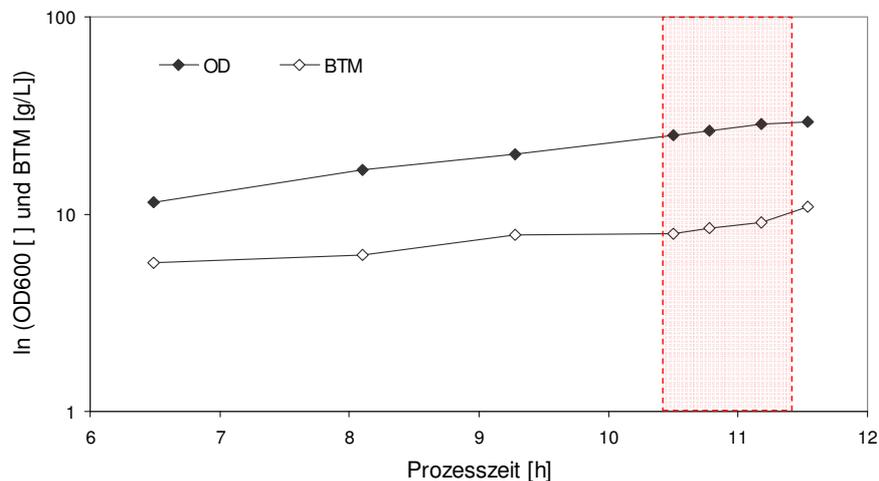


*Abbildung 5.93: Verlauf von Substrat-, Biomasse- und Produktkonzentration während des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiments*

Um eine Auslenkung des Stoffwechsels zu vermeiden, wird darauf geachtet, dass der Stamm beim Start des Markierungsexperiments nicht substratlimitiert ist ( $c_{\text{Glc}} \geq 1 \text{ g/L}$ ). Die

Erhöhung der Substratkonzentration durch den markierten Puls beträgt 6 g/L. Der Anstieg des Glucosegehaltes von 1,3 g/L (unmarkiert) vor dem Puls, auf 7,0 g/L nach der Pulsaufgabe ist deutlich zu erkennen (s. *Abbildung 5.93*). Das zugegebene markierte Substrat wird innerhalb von einer Stunde von den Zellen aufgenommen und die Fermentation anschließend beendet.

Anhand der Glucosekonzentration ist erkennbar, dass die Kultur vor der Pulsaufgabe nicht substratlimitiert war. Die extrazelluläre Threoninkonzentration steigt während des Experiments von 5 auf 7 g/L. Biomasse- und Produktbildung bleiben durch den Glucosepuls unbeeinflusst. Zum Zeitpunkt der Pulsaufgabe in der exponentiellen Wachstumsphase beträgt die Biotrockenmasse 8 g/L ( $OD_{600}$  25). *E. coli* BKIIM befindet sich während der gesamten Markierungsperiode in einem quasi stationären Zustand (vergl. *Abbildung 5.94*). Dies bedeutet, dass der metabolische Status (Konzentration der Intermediate) über die Dauer des Experiments konstant bleibt und die Proben vor und nach dem Puls vergleichbar sind (Nöh und Wiechert 2005, Drysch et al. 2004).



*Abbildung 5.94: Exponentielles Wachstum – metabolisch quasi-stationärer Zustand von *E. coli* BKIIM*

Probenahme und Verarbeitung der Proben sind bis auf die Zellaufschlussmethode vergleichbar mit der Durchführung des Markierungsexperiments von *E. coli* DM 1265 (s. *Kapitel 5.7.2*). Das Markierungsexperiment von *E. coli* BKIIM liegt zeitlich vor den Untersuchungen der unterschiedlichen Zellaufschlussmethoden (s. *Kapitel 5.5.1*) weshalb die Probenvorbereitung noch nach Magnus et al. (2006) mittels Kaliumhydroxidaufschluss erfolgte. Beim Experiment von *E. coli* DM 1265 (s. *Kapitel 5.7.2*) wurden die Erkenntnisse aus *Kapitel 5.5.1* einbezogen und der schonendere Chloroformaufschluss verwendet. Für die Auswertung der <sup>13</sup>C-Markierungsanreicherung in den intrazellulären Aminosäurepools können die Kaliumhydroxidextrakte bedenkenlos verwendet werden (vergl. *Abbildungen 5.46 und 5.52*). Größer sind die Effekte auf die Metabolite des Zentralstoffwechsels, da die Markierungsanreicherung aber relativ auf den Metabolitpool bezogen wird, werden Verluste durch den Zellaufschluss ausgeglichen. Die Probenahmezeitpunkte sind in der folgenden *Tabelle 5.33* dargestellt.

Tabelle 5.33: Probenahmezeitpunkte des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiments

Probe	Zeit nach dem Puls [s]	Probe	Zeit nach Dem Puls [min]	Probe	Zeit nach dem Puls [min]
1	0,38	13	1,08	25	19,02
2	0,76	14	1,67	26	20,34
3	1,15	15	2,33	27	21,96
4	1,62	16	3,33	28	29,76
5	2,20	17	4,50	29	33,60
6	3,03	18	6,00	30	36,96
7	4,21	19	8,00	31	39,96
8	6,03	20	10,92	32	45,96
9	8,00	21	12,36	33	56,16
10	10,00	22	13,80	34	62,16
11	20,00	23	15,96	35	66,12
12	40,00	24	17,46		

Die Ventilöffnungsdauer beträgt 100 ms und entspricht einem Probevolumen von 4,6 mL. Der Zellaufschluss und die weitere Probenaufarbeitung der insgesamt 40 Proben erfolgt sofort nach dem Quenching mit Kaliumhydroxid wie in *Abschnitt 4.7* beschrieben. Die Methoden der LC-MS/MS Messung sind in *Kapitel 4.9* beschrieben. Die Ergebnisse der intrazellulären Poolgrößen werden in *Kapitel 5.6.3.1* diskutiert.

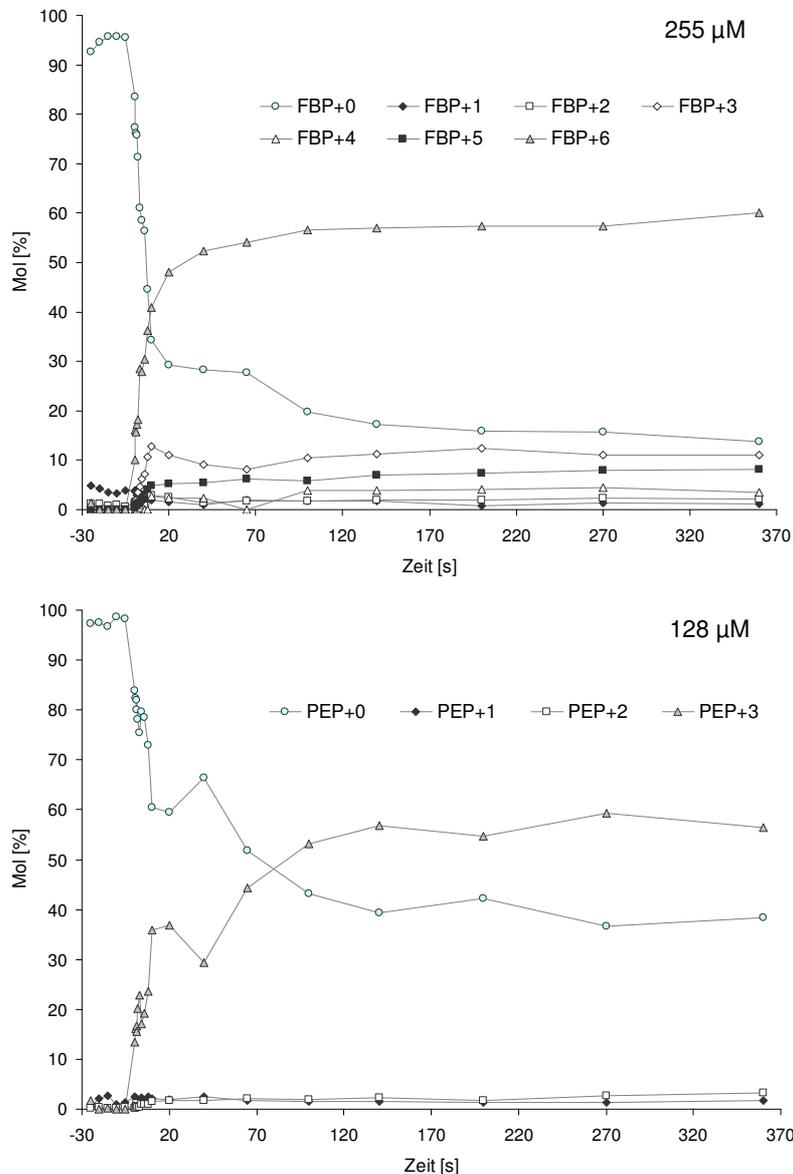
### 5.7.3.1 Ergebnisse des $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiments

Der Fokus bei der Erfassung intrazellulärer Metabolitdynamiken liegt auf dem, in *E. coli* komplex regulierten, Produktstoffwechsel der Aminosäure L-Threonin. Zudem wird versucht, Markierungsdynamiken der Zentralstoffwechselvorläufer aus der Glykolyse (s. *Kapitel 3.4.4*) zu erfassen, allerdings stellt sich hierbei heraus, dass die intrazellulären Konzentrationen der Intermediate der Glykolyse im *E. coli* Threoninproduzenten, anders als im Wildtyp (Nöh et al. 2007), sehr gering sind. Dies könnten Effekte des beschriebenen Verlustes an Zuckerphosphaten während der basischen Probenaufarbeitung und / oder Auswascheffekte des Methanolquenchings sein (s. *Kapitel 5.4* und *5.5.2*). Wenn die Konzentration des unmarkierten Isotopomers gering ist, wird die Erfassung markierter Isotopomere schwierig, da diese bis zu einer fortgeschrittenen Markierungszeit unterhalb der analytisch erfassbaren Nachweisgrenzen liegen. Diese Problematik ist nicht auf die Metabolite des Zentralstoffwechsels beschränkt, sondern gilt z. B. gleichermaßen für das Threoninbiosynthese-Intermediat Aspartatsemialdehyd.

Analog dem in *Abbildung 5.79* dargestellten Markierungsprofil für den intrazellulären Homoserinpool, werden Dynamiken für die Zentralstoffwechselmetabolite FBP und PEP (s. *Abbildung 5.95*) sowie für die anabolen Metabolite Aspartat, Methionin, Homoserin, Asparagin, Glutamat, Alanin, Valin, Serin, Glycin und Threonin abgeleitet (s. *Abbildung 5.96* und *5.97*). Einen Überblick über die Markierungsanreicherung in den untersuchten zytoplasmatischen Metaboliten geben die *Tabellen 5.34* und *5.35*.

Aus den Messungen kataboler Metabolite des Zentralstoffwechsels (Luo et al. 2007, s. *Kapitel 4.9.2*), werden die Markierungsprofile der Glykolyseintermediate FBP und PEP abgeleitet

(s. *Abbildung 5.95*). Die beiden Intermediate der Glykolyse sind an wichtigen Regulationsreaktionen beteiligt, die Bildung von FBP erfolgt über die Phosphofruktokinase und PEP ist Substrat der Pyruvatkinase (s. *Kapitel 3.4.4*). Außerdem fungiert PEP durch die anaplerotische Reaktion zu Oxalacetat als direkter Vorläufer für die Aminosäurebiosynthese der Aspartatfamilie.



*Abbildung 5.95: Markierungsdynamiken der Glykolyseintermediate FBP und PEP – in den ersten 6 min des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiments*

Im Zentralstoffwechsel stellt sich bereits nach wenigen Sekunden ein isotopisch quasi stationärer Markierungszustand ein, für FBP und PEP nach ca. 2,3 min (s. *Abbildung 5.95*). Hier zeigt sich, dass die schnelle Probenahme und die Inaktivierung der Stoffwechselaktivität mittels Methanolquenching geeignet ist, ein repräsentatives Bild der schnellen Anreicherungskinetiken einzufangen.

Die Anreicherungskinetiken der zytoplasmatischen Aminosäuren Methionin und Valin (s. *Abbildung 5.96*) sind sehr unterschiedlich. Obwohl beide Metabolitpools klein sind, erfolgt die Markierung im Methionin sehr viel schneller. Dies ist wahrscheinlich auf den gerichteten

## Ergebnisse und Diskussion

Fluss in die Biosynthese des Produktes Threonin und auf den Eintrag von  $^{13}\text{C}_1$ -Einheiten in die Methioninbiosynthese (über Tetrahydrofolat, s. *Kapitel 5.8.2*) zurückzuführen. Im Valinpool hingegen wird eine sehr langsame Markierungsanreicherung beobachtet, die sich hauptsächlich auf das 5-fach markierte Isotopomer beschränkt. Dies ergibt sich aus der Valinbiosynthese die über die Vorstufe Pyruvat erfolgt. Auffallend ist trotzdem die sehr langsame Anreicherungskinetik im Valinpool, die auf eine Signalverdünnung durch Austausch mit unmarkierten Metbaolpools hindeutet. Neben der Proteinbiosynthese ist Valin Vorläufer für die Pantothenat und Coenzym A-Biosynthese, so dass in der exponentiellen Wachstumsphase ein hoher Stofffluss in den Pool zu erwarten ist.

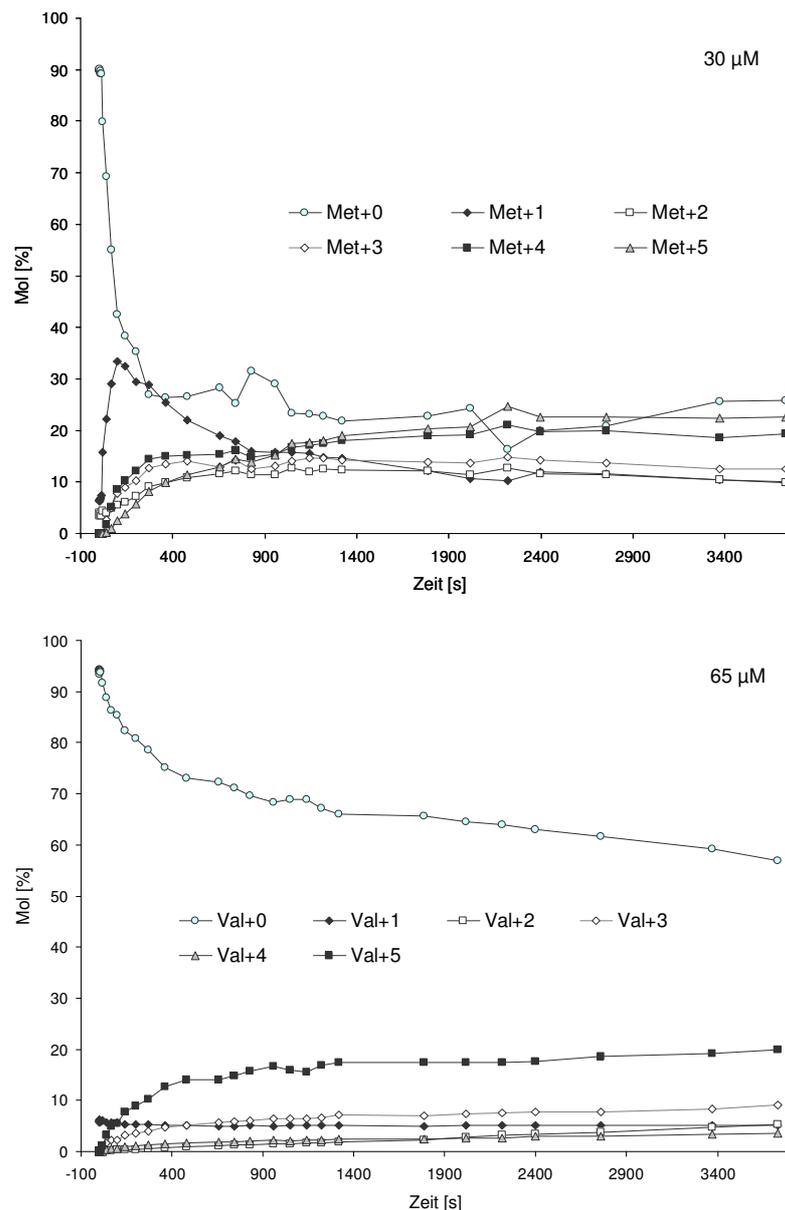
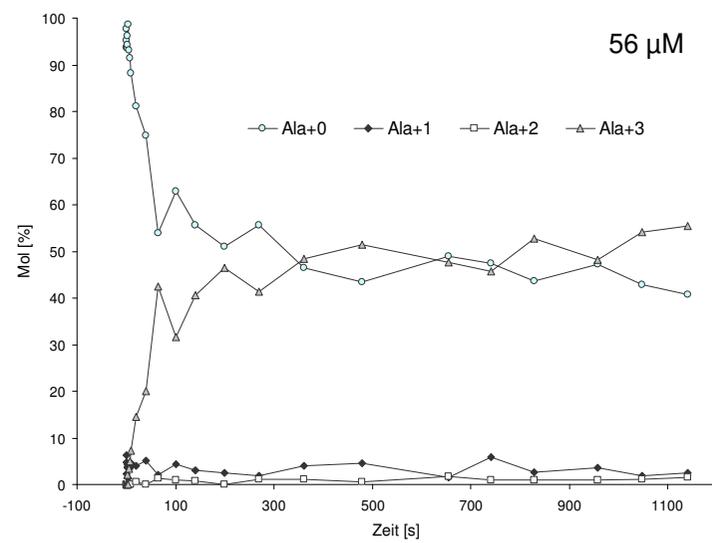
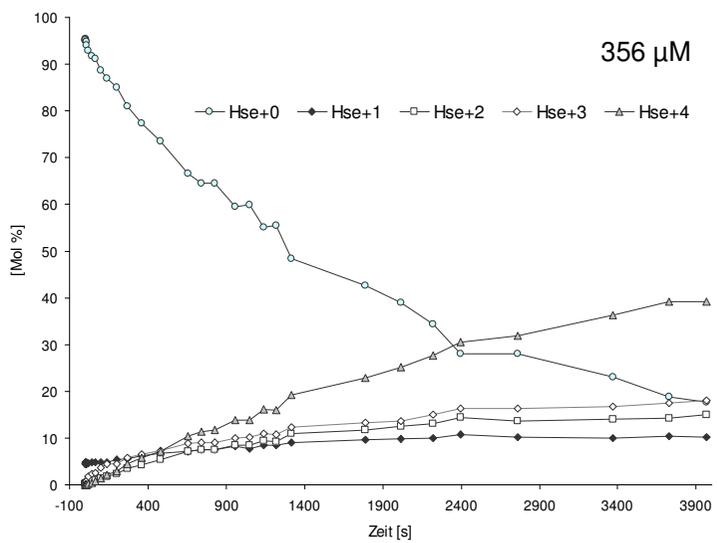
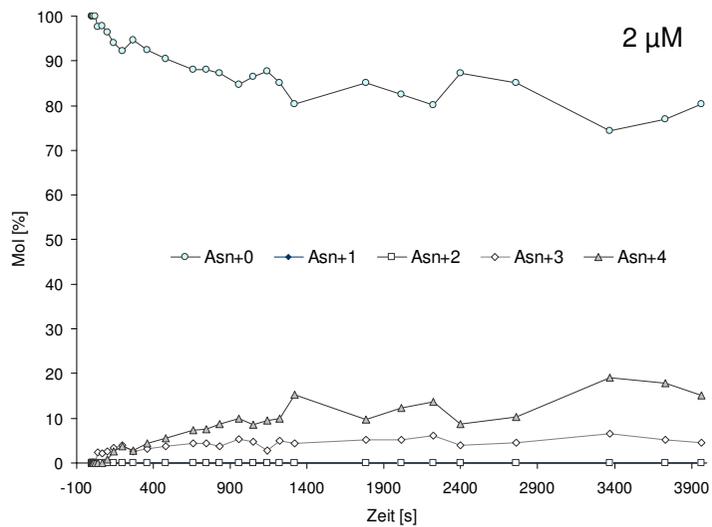
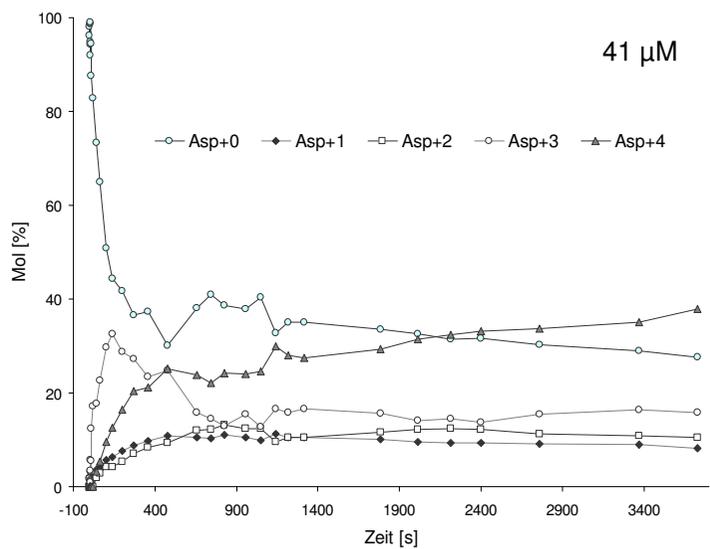


Abbildung 5.96: Markierungsdynamiken der intrazellulären Aminosäuren Met und Val

Grotkjær et al. (2003) erklären das beobachtete Phänomen in ihren Simulationen über die unidirektionale Beschaffenheit des Valinbiosynthesewegs. Sie führen die langsame Markierungsanreicherung auf den Rückfluss von unmarkiertem Material aus dem proteingebundenen Valinpool zurück. Für Aminosäuren wie z. B. Asparat und Glutamat, die eine wichtige

Rolle als Aminodonoren in Transaminierungsreaktionen spielen, zeigen die Simulationen eine schnellere Einstellung des isotopisch stationären Zustands.

Für die Intermediate der Threoninbiosynthese stellt sich während des Markierungszeitraums kein isotopisch quasi stationärer Zustand ein (s. *Abbildung 5.97*). Dies liegt wahrscheinlich am unidirektionalen Biosyntheseweg und an Isotopenverdünnungseffekten die stärker werden je weiter man sich vom Aufgabepunkt der  $^{13}\text{C}$ -Markierung entfernt. Der Anteil an unmarkiertem Isotopomer der Metabolite Aspartat, Homoserin, Threonin, Glycin und Valin nimmt bis zum Abbruch des Experiments nach 66 min stetig ab. Die Aminosäuren Serin und Methionin hingegen weisen vergleichsweise geringe intrazelluläre Poolgrößen auf: sie erreichen den quasi stationären Markierungszustand bereits nach 7 und 22 min. Wie bei der Aminosäure Serin, stellt sich auch im direkt mit dem Glykolyseintermediat Pyruvat verknüpften Alaninpool nach 6 min sehr schnell ein quasi stationärer Markierungszustand ein. Die Markierungsanreicherung der weiter vom Zentralstoffwechsel entfernten Aminosäurepools Asparagin, Glutamat und Valin verläuft hingegen langsamer (s. *Abbildung 5.96* und *5.97*).



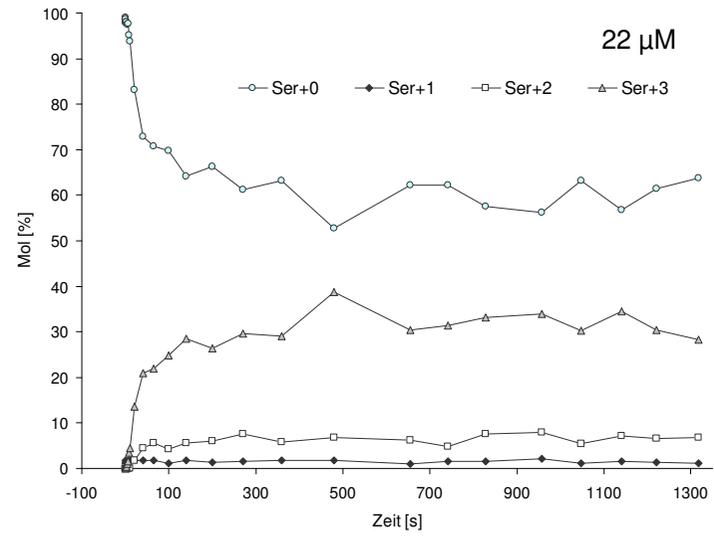
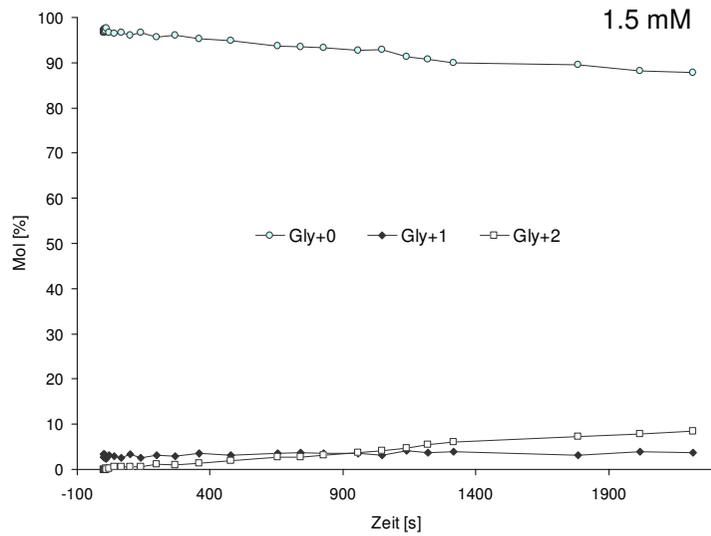
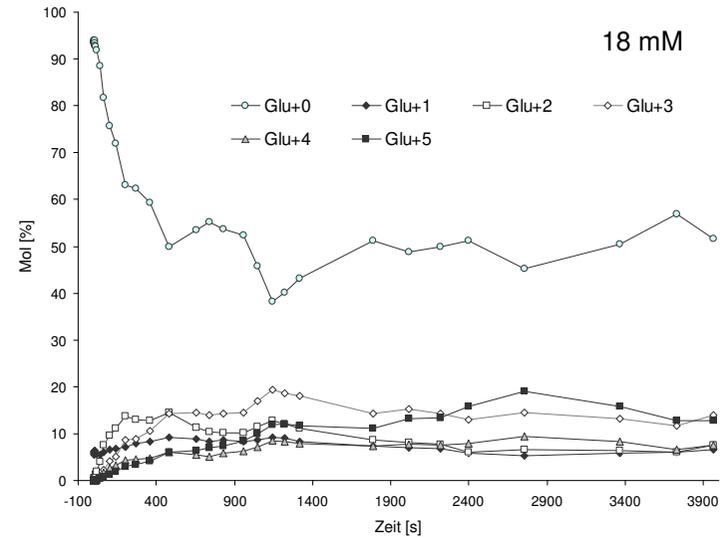
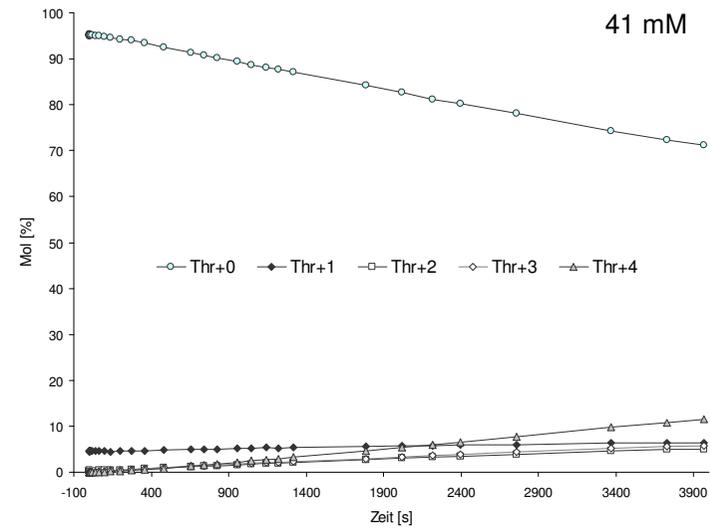


Abbildung 5.97: Markierungsdynamiken der Aminosäuren Asp, Hse, Thr, Gly, Asn, Ala, Glu und Ser – (ohne Glättung)

## Ergebnisse und Diskussion

Für diese weiter vom Zentralstoffwechsel entfernten anabolen Metabolite stellt sich während des Markierungsexperiments kein quasi stationärer Zustand ein. Dies kann beim Glutamat durch die vergleichsweise hohe intrazelluläre Konzentration von 18 mM und die reversible Reaktion der Aminotransferase bedingt sein. Da der Asparaginpool mit 2  $\mu\text{M}$  sehr klein ist, muss ein langsamer Austauschfluss mit dem Vorläufer Aspartat die Erklärung für die langsame Markierungsanreicherung sein.

Allgemein zeigt sich, dass das Pulssignal anabole Metabolite im Vergleich zur Glykolyse um Größenordnungen verzögert erreicht. Dieser Effekt wird wahrscheinlich durch Isotopenverdünnung an Verzweigungspunkten im Stoffwechsel sowie Austauschflüsse mit unmarkierten Metabolitpools außerhalb des Zentralstoffwechsels, und die teilweise sehr großen intrazellulären Metabolitpools (vergl. *Tabelle 5.34*) hervorgerufen. Ein Beispiel für einen „unmarkierten Pool“ ist der *Protein turnover* welcher zu einer Verdünnung des Markierungssignals jeder proteinogenen Aminosäure führt.

*Tabelle 5.34: Poolgrößen und Reaktion auf den Puls im  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment*

	Erste Reaktion auf den Puls [s]	Poolgröße [ $\mu\text{M}$ ]	Isotopisch quasi stationär [min]
FBP	0,4	255	2,3
PEP	0,4	128	2,3
Serin	1,2	22	7
Alanin	2,2	56	6
Homoserin	6,0	356	-
Valin	6,0	65	-
Aspartat	8,0	41	-
Glutamat	8,0	18000	-
Methionin	10,0	30	22
Glycin	20,0	1500	-
Threonin	40,0	41000	-
Asparagin	40,0	2	-

Die erste Reaktion auf den Markierungspuls zeigen die Glykolyse Intermediate gefolgt von an den Zentralstoffwechsel anknüpfenden Aminosäuren. Beim PEP+3 Isotopomer ist bereits nach 3,8 s, also in der ersten Probe nach Aufgabe des Markierungspulses, eine Markierungsanreicherung von 13,7 % erfassbar (s. *Tabelle 5.33* und *Abbildung 5.95*). Serin und Alanin zeigen nach 1,2 und 2,2 s die erste Reaktion auf den  $\text{U}^{13}\text{C}_6$ -Glucosepuls. Besonders schnell sind mit 6 und 8 s die Reaktionen von Homoserin, Valin und Aspartat. Auch im Glutamatpool ist erstaunlicherweise bereits nach 8 s eine Reaktion auf den Puls erfassbar. Der Pool ist mit 18 mM vergleichsweise groß, was darauf schließen lässt, dass der Stofffluss dementsprechend hoch sein muss. Zwei Sekunden später wird auch im Methioninpool die erste Markierungsanreicherung detektiert. Threonin hat zu Beginn des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiments bereits eine Poolgröße von 41 mM. Trotz der Größe erreicht das Markierungssignal den Produktpool bereits nach 40 s. Mit ebenfalls 40 s Verzögerung, also genauso lange wie beim 20500-fach größeren Threoninpool, ist der Markierungseintrag im Asparagin erstaunlich langsam. Hier scheint entweder der Austausch mit dem, bereits nach 8 s markierten, Vorläufer Aspartat sehr gering zu sein oder die markierten Spezies liegen aufgrund der geringen Poolgröße von 2  $\mu\text{M}$  anfänglich unterhalb der Nachweisgrenze.

Unerwartet langsam erfolgt die Markierungsanreicherung im Glycinpool. Obwohl Glycin, durch die Serinhydroxymethyltransferase, über Serin vergleichsweise dicht mit dem Zentralstoffwechsel verknüpft ist, reagiert der Vorläufer Serin fast 17-fach schneller auf den Puls. Diese langsame Reaktion (s. *Abbildung 5.98*) kann mehrere Ursachen haben: (1.) der Fluss zum Glycin ist sehr langsam – hierfür spricht die mit 20 s langsame Reaktion auf den Markierungspuls. (2.) Glycin steht im Austausch mit einer Quelle die nicht markierten Kohlenstoff in den Pool einbringt – z. B. proteingebundenes Glycin aus dem *Protein turnover*.

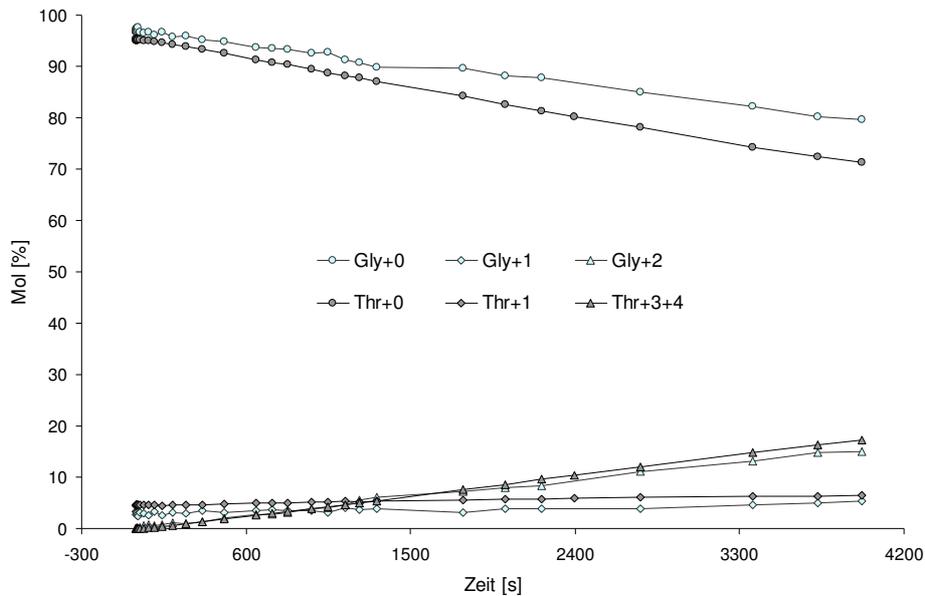


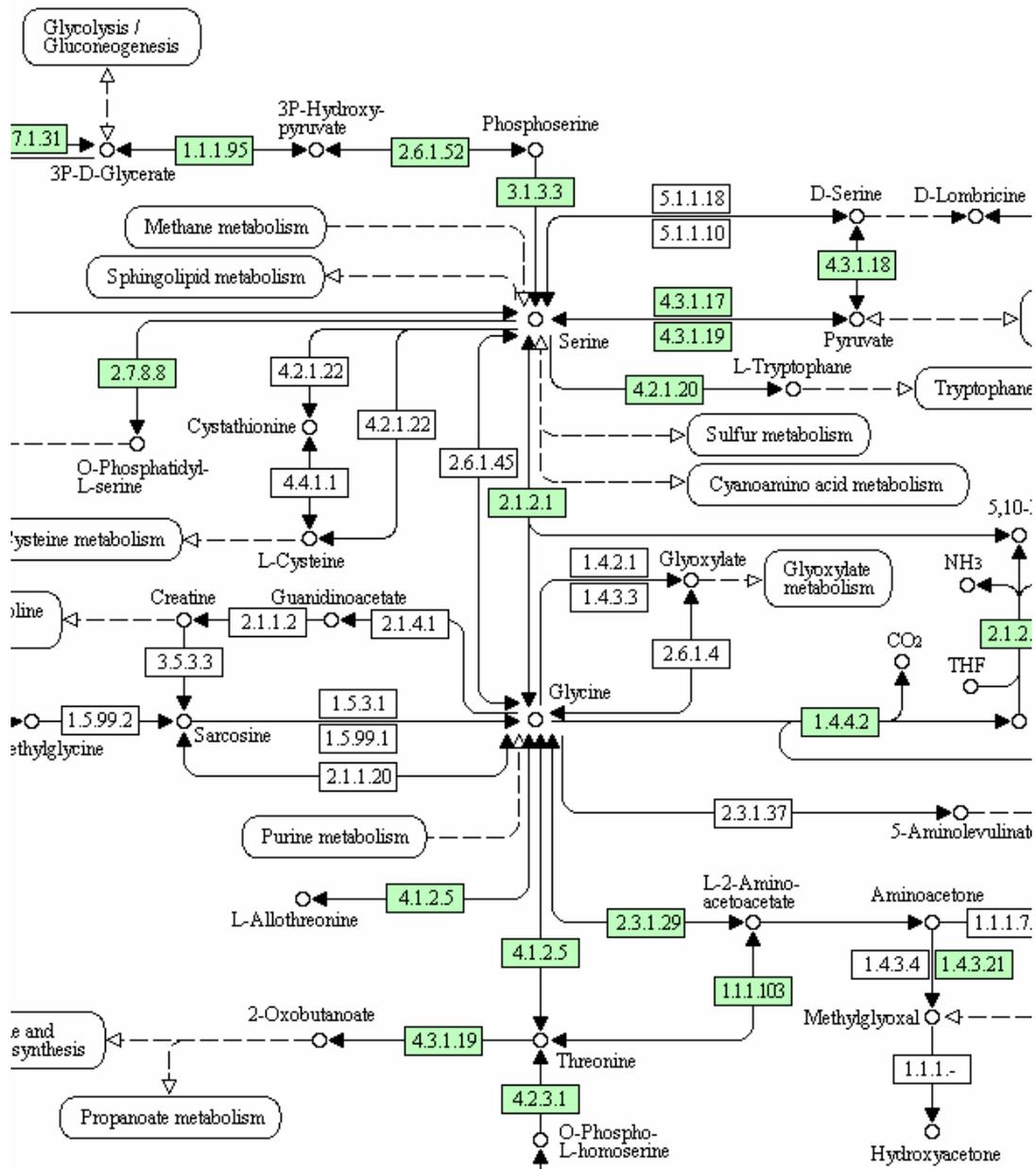
Abbildung 5.98: Vergleich der Markierungsanreicherung im Glycin- und Threoninpool

(3.) Glycin steht im Austausch mit dem Produkt Threonin – dies sollte in *E. coli* BKIIM nicht möglich sein, da der Hauptabbauweg zum Glycin über die Threonindehydrogenase (Transposon im *tdh*-Gen) geblockt wurde (s. *Abbildung 3.16* und *Kapitel 3.4.9*). Nach Marcus und Dekker (1993) wurde die Aktivität der Threoninaldolase, dem zweiten Enzym das Threonin zu Glycin und Acetaldehyd abbauen kann, in *E. coli* nicht nachgewiesen (s. *Kapitel 3.4.7*). Auch Liu et al. (1998) zeigen, dass ein Knockout des Gens *ItaA* im *E. coli* Wildtypstamm keine Auswirkung auf das Wachstum hat. Die Deletion von *ItaA* in einer Serinhydroxymethyltransferase negativen Mutante führt allerdings zu einer signifikanten Reduktion der Wachstumsrate. Aus diesen Ergebnissen leiten Liu et al. (1998) ab, dass die Threoninaldolase zwar nicht die Hauptquelle der Glycinbildung in *E. coli* ist, aber möglicherweise einen alternativen Glycinbiosyntheseweg darstellt, insbesondere wenn der Syntheseweg über die Serinhydroxymethyltransferase geblockt ist. Die Aktivität des Enzyms ist allerdings gering (3 mU/mg, L-Serin), so dass sie durch die vergleichsweise hohe Aktivität der Serinhydroxymethyltransferase (210 mU/mg, L-Threonin) wahrscheinlich verdeckt wird (Liu et al. 1998).

In *E. coli* BKIIM sollte die Serinhydroxymethyltransferase aktiv sein, dennoch ist die Ähnlichkeit der Anreicherungsprofile von Threonin und Glycin beim Vergleich der zytoplasmatischen Pools verblüffend (s. *Abbildung 5.98*). Die Verläufe aller Isotopomere ( $m+0$ ,  $m+1$  und  $m+3/+4$ ) zeigen eine ähnliche Taktung der Kinetik. Dies deutet auf vergleichbare Reaktionsordnungen hin. Es liegt also nahe, dass die beiden Pools über die Threoninaldolase (4.1.2.5,

## Ergebnisse und Diskussion

s. *Abbildung 5.99*) im direkten Austausch miteinander stehen. Wäre diese Annahme richtig, sind die von Liu et al. (1998) beschriebenen Aktivitätsunterschiede der Serinhydroxymethyltransferase und der Threoninaldolase von 70:1 nicht auf *E. coli* BK11M übertragbar. Die Anreicherungsprofile deuten eher darauf hin, dass die Aktivitäten der beiden Enzyme in diesem Fall genau umgekehrt sein müssten.



*Abbildung 5.99: Stoffwechsellauschnitt aus der Serin-, Glycin- und Threoninbiosynthese* <sup>[9]</sup>

Grün markierte Kästen: in *E. coli* K-12 MG 1655 aktive Enzyme

Eine weitere Reaktion die eine Rolle in der Glycinsynthese spielen könnte, ist die Transaminierung von Glyoxylat zu Glycin. Die Aktivität der Glycin-Aminotransferase und der Alanin-glyoxylat Transaminase ist für Human- und Rattenleber sowie Rattenniere beschrieben (Nakada 1964, Thompson und Richardson 1966, Okuno et al. 1982). In *E. coli* MG 1655 sind die Enzyme laut der KEGG<sup>[9]</sup> Datenbank nicht aktiv (s. *Abbildung 5.99*). Lee et al. (2007) beschreiben die Hochregulation der am Glyoxylatweg beteiligten Enzyme, und erklären

dieses Phänomen über den erhöhten Bedarf des Threoninbiosynthese-Vorläufers Oxalacetat (s. *Kapitel 5.7.2*). Dies widerspricht der Lehrmeinung, dass der Glyoxylatweg nur unter anaeroben Bedingungen, in Abwesenheit von Glucose aktiv ist (Yamamoto und Ishihama, 2003). Neben diesen unerwarteten Erkenntnissen wäre es ebenfalls vorstellbar, dass eine Transaminierungsreaktion zwischen Glycin und Glyoxylat, unter aeroben Bedingungen in Anwesenheit von Glucose, ablaufen könnte. Grotkjær et al. (2003) berechneten in ihren Simulationen eine signifikante Verlängerung der Markierungszeiten für Metabolite im Zitronensäurezyklus. Diese führten sie auf den Austausch von Kohlenstoff in Transaminierungsreaktionen zurück. Somit könnte die langsame Markierungsanreicherung im Glycinpool auch durch Signalverdünnung im Zitronensäurezyklus erklärt werden, vorausgesetzt Glycin und Glyoxylat stehen unter den experimentellen Bedingungen im Austausch miteinander. Dieses Modell der Glycinsynthese würde allerdings keine Erklärung für die bereits angesprochenen sehr ähnlichen Markierungsverläufe von Glycin und Threonin in *E. coli* liefern.

Beim Vergleich der Anreicherungsdynamiken innerhalb der ersten Sekunden nach der  $^{13}\text{C}$ -Pulsaufgabe sind Unterschiede in den Kinetiken der untersuchten Aminosäuren erkennbar. Die Anreicherung der vollmarkierten Isotopomere von Serin und Alanin ist langsamer als die des Threoninbiosynthesevorläufers Aspartat (s. *Abbildung 5.97*). Der Stofffluss in *E. coli* BKIIIM scheint also gezielt in den Produktstoffwechsel gerichtet zu sein.

Tabelle 5.35:  $^{13}\text{C}$ -Markierungsanreicherung in den ersten Sekunden des Markierungsexperiments

	Isotopenverdünnungseffekte [s]	Markierung bis <sup>1</sup> [Mol %]	Überschneidung [s]	Markierung bis <sup>2</sup> Mol [%]
Alanin	10	7,3	360	48,5
Aspartat	10	17,1	2016	29,8
Homoserin	10-20	2,0	2398	30,6
Serin	20	13,5	-	-
Methionin	20	15,7	270	26,9
Asparagin	140	5,9	-	-
Glutamat	65	7,5	-	-
Glycin	40	0,6	-	-
Valin	40	3,3	-	-
Threonin	-	-	-	-

<sup>1</sup> = Zeitpunkt des Eintretens von Isotopenverdünnungseffekten

<sup>2</sup> = Zeitpunkt bei dem sich markiertes und unmarkiertes Isotopomer überschneiden

Aufgrund der Nähe zur Glykolyse erreichen Alanin und Serin innerhalb der ersten 10-20 s trotzdem eine hohe Markierungsanreicherung von 7,3 und 13,5 %. Die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung im Aspartat beträgt nach 10 s bereits 17,1 %, sie erfolgt somit 2,3-fach bzw. 1,3-fach schneller als bei Alanin und Serin (s. *Tabelle 5.35*). Innerhalb der Markierungsperiode sinkt der Anteil der unmarkierten Isotopomere Ala+0 auf 40,7 %, Ser+0 auf 52,7 % und Asp+0 auf 24,7 %, somit spiegelt sich auch in der  $^{13}\text{C}$ -Markierungsanreicherung der höhere Stofffluss in die Threoninbiosynthese wider.

## Ergebnisse und Diskussion

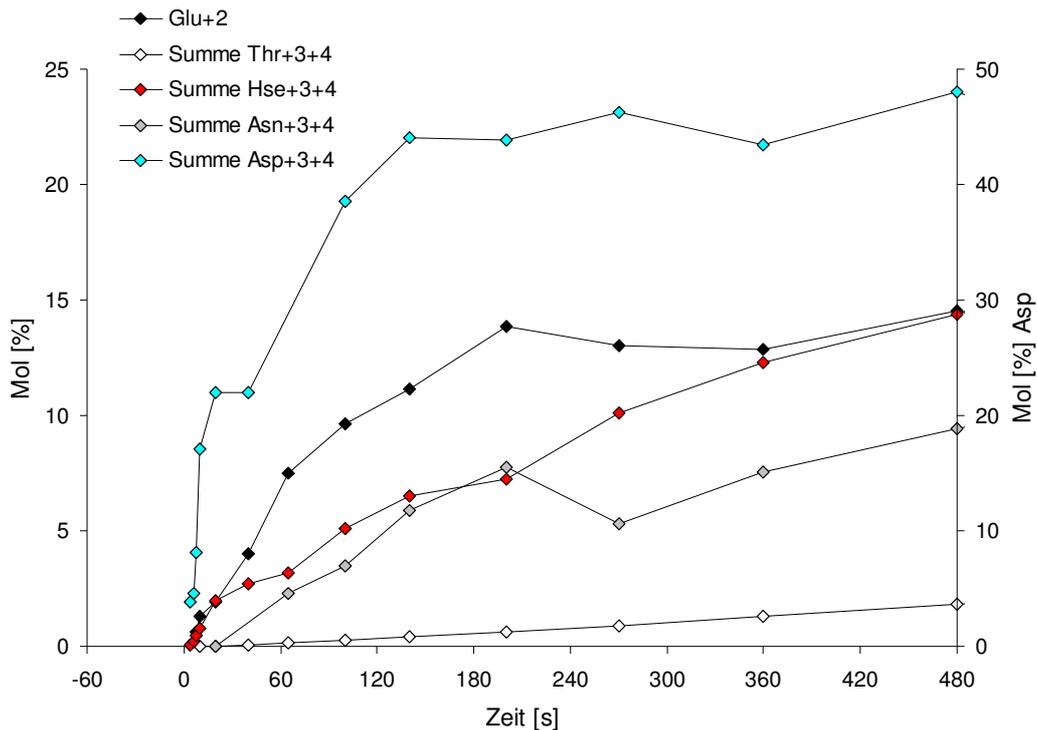


Abbildung 5.100: Vergleich der Dynamiken von Asp, Hse, Thr, Glu und Asn

Die Markierungsanreicherung in den intrazellulären Metaboliten Aspartat, Homoserin, Threonin, Glutamat und Asparagin ist in *Abbildung 5.100* dargestellt. Die Anreicherungsgeschwindigkeiten innerhalb der Threoninbiosynthese nehmen vom Vorläufer Aspartat zum Produkt Threonin hin ab. Auch bei *E. coli* BKIIIM kann aufgrund der geringen intrazellulären Konzentration keine Anreicherungsgeschwindigkeit für das Threoninbiosyntheseintermediat Aspartatsemialdehyd erfasst werden. Während Aspartat und Homoserin bereits nach 10 bis 20 s Isotopenverdünnungseffekte in Form einer Änderung der Steigung im Anreicherungsprofil zeigen, scheint die Anreicherung im Threoninpool linear zu erfolgen. Aspartat erreicht in diesen ersten 10 Sekunden eine sehr hohe Markierung im Asp+3 Isotopomer von 17,1 % (s. *Tabelle 5.35*). Ähnlich schnell erfolgt nur die Markierungsanreicherung im Methioninpool von 15,7 % innerhalb der ersten 20 s. Homoserin wird deutlich langsamer markiert, bis zum Eintreten erster Isotopenverdünnungseffekte nach 20 s wird eine Markierung von 2 % erfasst. Trotz der anfänglich geringen Anreicherung erreicht der Homoserinpool am Ende des Experiments mit 17,7 % verbleibendem Hse+0 Isotopomer die höchste Markierungsanreicherung aller untersuchten Metabolite (s. *Tabelle 5.36*).

Neben der Threoninbiosynthese zeigt auch die Glutamatsynthese eine schnelle Anreicherungskinetik. Erste Isotopenverdünnungseffekte im Glutamat werden nach 65 s beobachtet. Trotzdem nimmt die Markierung im Glutamatpool nur langsam zu. Während des Markierungszeitraumes von 66 min wird keine Überschneidung der unmarkierten und markierten Isotopomere des Glutamats beobachtet. Nach 1200 s (20 min) wird eine Markierungsanreicherung von 60 % erreicht.

Überschneidungen markierter und unmarkierter Isotopomere werden lediglich bei den Metaboliten Alanin, Aspartat, Homoserin und Methionin beobachtet. In allen anderen untersuch-

ten Metaboliten nimmt die Markierung in den intrazellulären Pools nur langsam zu. Dabei werden mit Ausnahme der Aminosäure Serin während des Markierungsexperiments keine isotopisch quasi stationären Zustände erreicht (s. *Abbildung 5.96* und *5.97*).

*Tabelle 5.36: Maximale Markierungsabreicherung des m+0 Isotopomers*

	Mol [%] m+0	Poolgröße [ $\mu$ M]
Homoserin	17,7	356
Methionin	21,8	30
Aspartat	24,7	41
Glutamat	40,2	18000
Alanin	40,7	56
Serin	52,7	22
Valin	57,0	65
Threonin	71,3	41000
Asparagin	74,4	2
Glycin	79,7	1500

Der Markierungseintrag in den Methioninpool erfolgt anfänglich fast genauso schnell wie bei Aspartat. Die maximale Markierungsanreicherung von 78 % im Methionin wird allerdings bereits nach 1318 s (22 min) erfasst. Im Aspartatpool hingegen steigt die Markierung während des gesamten Experiments an.

Zwischen den direkt miteinander verknüpften Metaboliten Aspartat und Asparagin findet lediglich ein geringer Austausch statt. Erst nach 140 s werden Isotopenverdünnungseffekte, die im Aspartat bereits nach 10 s erfasst werden, im Asparaginpool registriert. Zwischen Aspartat und Asparagin besteht somit eine Zeitverzögerung von 130 s. Während der ersten 140 s wird im Asparaginpool eine Markierung von 5,2 % angereichert. Im Aspartat hingegen beträgt die Markierung schon nach 10 s 17,1 %, also wird im Aspartatpool die 3,3-fache Markierung in einem 14tel der Zeit angereichert. Asparagin erreicht am Ende des Markierungsexperiments eine  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung von  $\sim 25$  %, die Anreicherung im Aspartat (75 %) erfolgt somit um Faktor 3 schneller.

Sehr träge reagiert wie oben bereits beschrieben der Glycinpool auf den Markierungspuls. In den ersten 40 s wird eine Markierung von lediglich 0,6 % erfasst. Am Ende des Experiments weist der Glycinpool mit 20 % den geringsten Markierungseintrag aller untersuchten Metabolite auf.

In *Abbildung 5.101* sind die Ergebnisse der Markierungsverteilung im zytoplasmatischen Aspartatpool und ein kleiner Ausschnitt des Stoffwechsels von *E. coli* dargestellt. In der Graphik links ist die rasche Abnahme des Anteils an unmarkiertem Isotopomer nach Aufgabe des  $\text{U}^{13}\text{C}$ -Markierungspulses (zum Zeitpunkt 0 s) erkennbar. Auffallend ist, dass zunächst lediglich das dreifach markierte Massenisotopomer ansteigt. Die anderen Markierungszustände des intrazellulären Aspartat zeigen erst nach ca. 100 s eine deutliche Reaktion auf den  $^{13}\text{C}$ -Markierungspuls.

## Ergebnisse und Diskussion

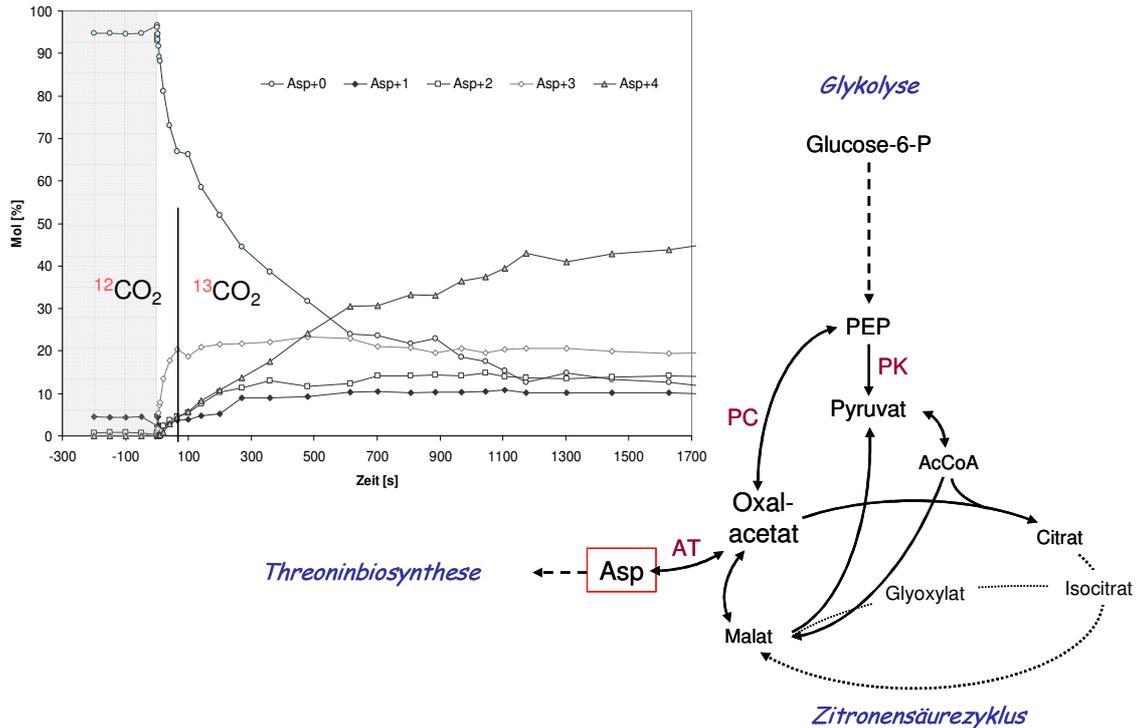


Abbildung 5.101: Markierungsverteilung im Aspartatpool (links), Ausschnitt des Stoffwechsels von *E. coli* (rechts) – AT: Aspartat-Aminotransferase, PC: Phosphoenolpyruvat Carboxylase, PK: Pyruvatkinase

Betrachtet man die mögliche Weiterleitung des Glucoseeingangssignals im Stoffwechsellnetzwerk von *E. coli* (s. Abbildung 5.101 rechts) wird deutlich, dass über die anaplerotische Reaktion von Phosphoenolpyruvat zu Oxalacetat bei Aufnahme von unmarkiertem  $^{12}\text{CO}_2$  zunächst nur dreifach markiertes Produkt entsteht. Nach einiger Zeit, wenn das unmarkierte  $^{12}\text{CO}_2$  intrazellulär komplett gegen markiertes  $^{13}\text{CO}_2$  ausgetauscht ist, beginnt die Bildung des vierfach markierten Oxalacetat als Vorläufer des Aspartat. Ab diesem Zeitpunkt (ca. 80 s) stagniert der Anteil an dreifach markiertem Massenisotopomer und das vierfach markierte Massenisotopomer des Aspartat beginnt anzusteigen. Durch diese, aus den Markierungsdaten abgeleiteten Informationen besteht erstmalig die Möglichkeit *in vivo* Reaktionsgeschwindigkeiten unter Produktionsbedingungen zu untersuchen, messtechnisch zu erfassen und abzubilden.

### 5.7.4 Vergleich der $^{13}\text{C}$ -Markierung in *E. coli* DM 1265 und BKIIM B-3996

Bei der Auswertung der Markierungsdaten der Stämme *E. coli* DM 1265 und BKIIM wurden Unterschiede, aber auch Gemeinsamkeiten der intrazellulären Vorgänge in den beiden Threoninproduzenten aufgedeckt. Grundsätzlich scheinen intrazelluläre Poolgrößen einen eher kleinen Einfluss auf die Markierungsanreicherungskinetik zu haben, möglicherweise kommt dieser aufgrund der hohen Durchflussgeschwindigkeit kaum zum tragen. Beim Vergleich der Reaktionen der intrazellulären Aminosäurepools in *E. coli* DM 1265 und BKIIM fällt auf, dass die  $^{13}\text{C}$ -Markierung in BKIIM deutlich schneller durch den Zentralstoffwechsel in die Threoninbiosynthese gelangt. Mit Ausnahme von Alanin, Aspartat und Asparagin erfolgt die initiale Markierungsanreicherung in *E. coli* BKIIM schneller (s. Tabelle 5.37). Die-

ser erste Eindruck spiegelt sich auch beim Erreichen des isotopisch quasi stationären Zustands wider. *E. coli* BKIIM ist bei Serin 5,6-fach und bei Alanin 15,7-fach schneller als DM 1265. Der dritte Pool der einen isotopisch stationären Zustand erreicht unterscheidet sich, in *E. coli* DM 1265 ist es Glutamat, in BKIIM Methionin. Diese Beobachtung ist ein erstes Indiz für eine unterschiedliche Flussverteilung in den beiden Threoninproduzenten. Es scheint als ob neben der Threoninbiosynthese in *E. coli* DM 1265 auch die Glutamatsynthese im Vordergrund steht. Wie bereits in *Kapitel 5.7.2.1* diskutiert, scheint die Glutamatproduktion hochreguliert zu sein um zu gewährleisten, dass ausreichend Aminodonor für die Bereitstellung des Threoninbiosynthesevorläufers Aspartat verfügbar ist.

Tabelle 5.37: Vergleich der Reaktion auf den  $^{13}\text{C}$ -Markierungspuls

	Erste Reaktion auf den Puls [s]		Isotopisch quasi stationär [min]	
	DM 1265	BKIIM	DM 1265	BKIIM
Serin	4,2	1,2	39	7
Alanin	1,6	2,2	94	6
Homoserin	8,0	6,0	-	-
Valin	100,0	6,0	-	-
Aspartat	1,6	8,0	-	-
Glutamat	20,0	8,0	104	-
Methionin	100,0	10,0	-	22
Glycin	40,0	20,0	-	-
Threonin	65,0	40,0	-	-
Asparagin	20,0	40,0	-	-

Sobald Isotopenmischungseffekte z. B. durch bidirektionale Flüsse, an Verzweigungspunkten im Stoffwechsel oder durch unmarkierte Austauschpools einsetzen, nimmt die initiale Steigung der  $^{13}\text{C}$ -Markierungsanreicherung ab. Wie schon bei der ersten Reaktion, zeichnet sich auch bei den Isotopenverdünnungseffekten und bis dahin erreichten Markierungsanreicherungen (s. *Tabelle 5.38*) ab, dass die Stoffflüsse in *E. coli* BKIIM höher sind. Dies ist besonders deutlich im Homoserinpool erfassbar, die Markierungsanreicherung bei *E. coli* DM 1265 beträgt nach 10 Sekunden 0,2 %. BKIIM erreicht in derselben Zeit mit 2 % die 10-fache Anreicherung. Sogar bei der Markierung des direkt am Zentralstoffwechsel liegenden Alanin-pools ist *E. coli* BKIIM 1,6-fach schneller.

Tabelle 5.38:  $^{13}\text{C}$ -Markierungsanreicherung in den ersten Sekunden des Markierungsexperiments

	Isotopenverdünnungseffekte		Markierung [Mol %/s]		Markierung BKIIM / DM 1265
	DM 1265 [s]	BKIIM [s]	DM 1265	BKIIM	
Alanin	20	10	0,47	0,73	1,57
Aspartat	20	10	0,38	1,71	4,50
Serin	20	20	0,22	0,68	3,07
Homoserin	10	10	0,02	0,20	10
Glutamat	40	65	0,11	0,12	1,07
Asparagin	-	140	-	0,04	-
Glycin	-	40	-	0,02	-
Valin	-	40	-	0,08	-
Threonin	-	-	-	-	-

## Ergebnisse und Diskussion

Das markierte Substrat  $U^{13}C_6$ -Glucose wird in der Glykolyse in die zwei  $C_3$ -Körper Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat gespalten. Bei den dicht mit dem Zentralstoffwechsel verknüpften  $C_3$ -Aminosäuren Alanin und Serin können die vollständig markierten Intermediate der Glykolyse (Pyruvat  $\rightarrow$  Alanin, 3-Phosphoglycerat  $\rightarrow$  Serin) direkt in die Aminosäuren umgesetzt werden. Das Aspartatmolekül hingegen enthält 4 C-Atome, somit besteht bei der Synthese die Notwendigkeit den  $C_3$ -Vorläufern der Glykolyse ein C-Atom hinzu zu fügen (s. *Abbildung 5.101*). Um die  $^{13}C$ -Markierungsanreicherungen im Alanin Serin und Aspartat trotzdem miteinander vergleichen zu können, wurde der Anteil der m+3 und m+4 Isotopomere im Aspartatpool in *Abbildung 5.102* aufsummiert dargestellt.

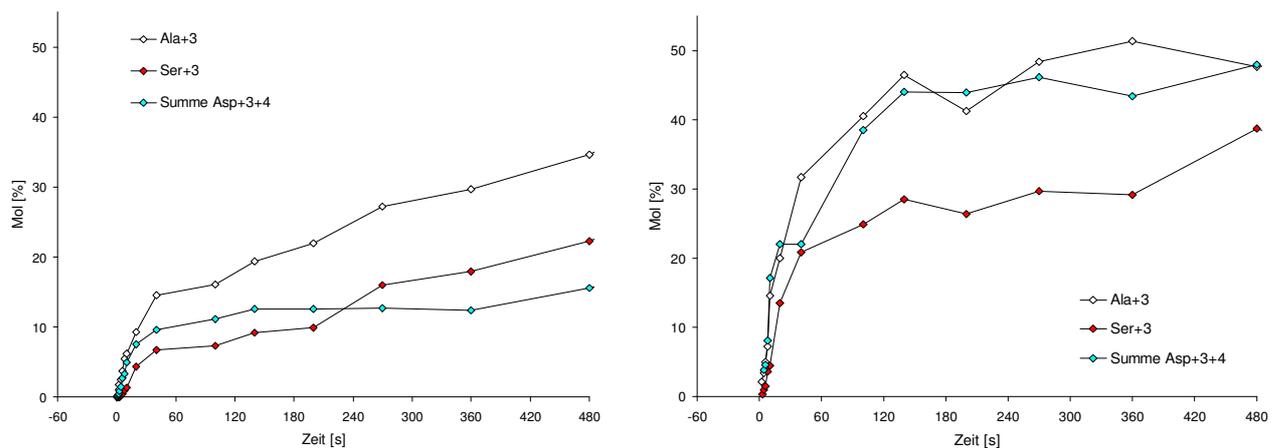


Abbildung 5.102: Vergleich der Dynamik von Ala, Ser und Asp - DM 1265 (links) BKIIM (rechts)

Bei der Gegenüberstellung der Anreicherungsverläufe in den Alanin-, Serin- und Aspartatpools der beiden Threoninproduzenten innerhalb der ersten 480 s (8 min) nach dem Markierungspuls wird deutlich, dass sich die Kinetiken stark voneinander unterscheiden. Während der Markierungseinbau in *E. coli* DM 1265 beim Alanin am schnellsten ist, liegt Aspartat bei *E. coli* BKIIM anfänglich vorne. Aber auch die Kinetiken der Anreicherung in Alanin und Serin sind bei *E. coli* BKIIM schneller. Die Anaplerose scheint in *E. coli* BKIIM hochreguliert zu sein, da die Anreicherung im Aspartat trotz Durchlaufen der Glykolyse und Anaplerose bzw. Zitronensäurezyklus schneller erfolgt als bei Serin und annähernd vergleichbar mit Alanin ist. Lee et al. (2007) schreiben, dass die Phosphoenolpyruvat Carboxylase (PC) in einem optimalen Level zur Verfügung stehen sollte. Sie konnten zeigen, dass die Threoninproduktion mit *ppc* amplifizierten Stämmen (9,3-fach höhere PC-Aktivität) um 17,1 % verringert wird, mit *ppc*-Deletionsmutanten beträgt die Reduktion der Produktivität sogar 87 %. Das heißt, weder zuviel noch zuwenig Phosphoenolpyruvat Carboxylase führen zu einer optimierten Produktivität. Aus diesen Beobachtungen leiten Lee und seine Mitarbeiter ab, dass die Expression des *ppc* Gens nur bis zu einem bestimmten Level erhöht werden sollte. Durch Austausch des nativen Promotors gegen den *trc* Promotor erzielten sie einen höheren PC-Fluss, der zu einer um 27 % erhöhten Threoninproduktion führte. Anhand der gemessenen  $^{13}C$ -Anreicherungsprofile in *E. coli* DM 1265 und BKIIM wird vermutet, dass die Unterschiede in den Aspartatpools (s. *Abbildung 5.103*) auf die unterschiedlichen Phosphoenolpyruvat Carboxylase Konzentrationen der beiden Threoninproduzenten zurückzuführen sind. Diese

Interpretation wird auch von Debabov (2003) unterstützt, der eine Erhöhung der Threonin-ausbeute nach Mutagenese der Phosphoenolpyruvat Carboxylase beschreibt (das native Enzym wird durch Aspartat inhibiert).

Beim Vergleich der in der *Abbildung 5.103* dargestellten intrazellulären Markierungsverläufe in der Threoninbiosynthese und im Glutamatpool, fällt besonders die langsame Anreicherung im Aspartatpool von *E. coli* DM 1265 auf. Diese pflanzt sich weiter in den Homoserinpool fort, welcher vergleichsweise groß ist und somit zu einer weiteren Verzögerung des Markierungssignals führt.

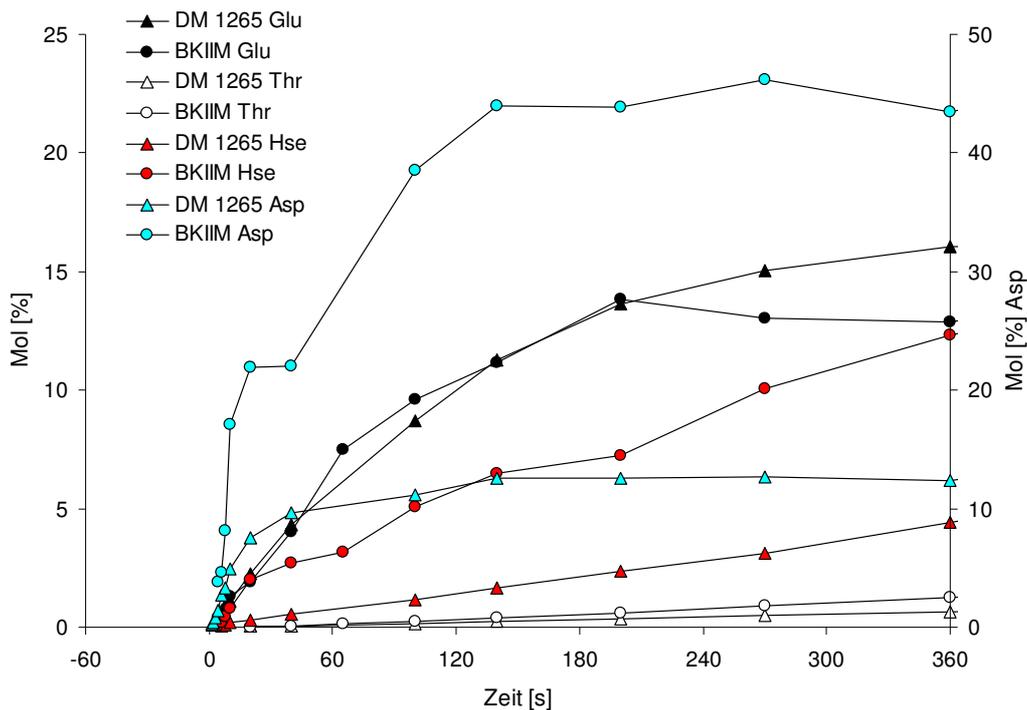


Abbildung 5.103: Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -Markierungsanreicherung in *E. coli* DM 1265 und BKIIM

Die deutlich langsameren Dynamiken der Vorläufer der Threoninbiosynthese in *E. coli* DM 1265, spiegeln sich auch in den Produktverläufen der beiden Threoninproduzenten wider. Im Experiment von *E. coli* BKIIM beträgt der Anteil an unmarkiertem Threoninisotopomer nach 56 min 71 %, bei *E. coli* DM 1265 hingegen werden 72 % erst nach einer Markierungsdauer von 134 min, also der doppelten Zeit erreicht.

Der Markierungsaustausch im Glutamatpool verläuft in *E. coli* DM 1265 deutlich schneller als bei *E. coli* BKIIM. Die Markierungsanreicherung erfolgt sogar annähernd vollständig, nach einer Markierungszeit von 124 min verbleiben intrazellulär lediglich 8,7 % an unmarkiertem Glutamat. Dies ist wahrscheinlich auf die relativ geringe zytoplasmatische Glutamatkonzentration zurückzuführen, die um Faktor 7,9 kleiner ist als im Markierungsexperiment von *E. coli* BKIIM. Trotzdem verläuft die initiale Markierungsanreicherung im Glutamatpool beider Stämme erstaunlicherweise mit annähernd gleicher Geschwindigkeit (s. *Abbildung 5.103*).

## Ergebnisse und Diskussion

In der *Tabelle 5.39* ist die Markierungsabreicherung der m+0 Isotopomere in den beiden Threoninproduzenten gegenübergestellt. Durch die gebildeten Verhältnisse BKIIM / DM 1265 fällt auf, dass alle Intermediate der Threoninbiosynthese Werte < 1 haben. Diese intrazellulären Pools werden in *E. coli* BKIIM also während des Markierungsexperiments stärker markiert als in *E. coli* DM 1265. Die anderen Aminosäuren hingegen haben Faktoren > 1, somit überwiegt dort die Markierungsanreicherung in *E. coli* DM 1265. Eine Ausnahme ist die, bereits in *Kapitel 5.7.2.1* diskutierte Aminosäure Valin. Bei diesem Vergleich muss bedacht werden, dass sich die Menge an aufgegebenem markiertem Substrat und auch die Dauer der beiden Markierungsexperimente unterscheiden.

*Tabelle 5.39: Maximale Markierungsabreicherung der m+0 Massenisotopomere*

	m+0 [Mol %]		Faktor BKIIM / DM 1265
	DM 1265	BKIIM	
Glutamat	8,7	40,2	4,62
Homoserin	19,2	17,7	0,92
Serin	24,9	52,7	2,12
Aspartat	28,6	24,7	0,86
Asparagin	35,9	74,4	2,07
Alanin	30,2	40,7	1,35
Threonin	72,1	71,3	0,98
Glycin	74,8	79,7	1,07
Valin	89,4	57,0	0,64

*Faktor > 1: Pool im Stamm E. coli DM 1265 ist stärker markiert als in E. coli BKIIM, Faktor = 1: Markierung ist in den Pools der beiden Stämme identisch, Faktor < 1: Pool im Stamm E. coli BKIIM ist stärker markiert als in E. coli DM 1265 (Werte kursiv) - Unterschiede der Poolgrößen wurden nicht berücksichtigt*

Wie schon an den Anreicherungskinetiken der beiden Stämme erkennbar war (s. *Abbildung 5.103*), deuten auch die gebildeten Faktoren darauf hin, dass der Stofffluss in *E. coli* BKIIM direkt in die Threoninbiosynthese geleitet wird. Hier ist in den ersten Sekunden eine schnelle und, über die gesamte Markierungsperiode, effektive Anreicherung der Markierung im Aspartat (75 %) und Homoserin (82 %) zu beobachten. Die Markierungsanreicherung in den anderen Aminosäuren hingegen erfolgt vergleichsweise langsam, dies bleibt bis zum Ende des Markierungsexperiments so und spiegelt sich in den maximalen Markierungsabreicherungen wider (s. *Tabelle 5.39*). Bei *E. coli* DM 1265 liegt der Fokus auf der Biosynthese von Glutamat (91 % Markierung), erst an zweiter Stelle folgen die Serin- und Threoninbiosynthese. An der Markierungsabreicherung wird auch die unterschiedliche Gewichtung der Asparaginbildung in den beiden Stämmen deutlich. Während die <sup>13</sup>C-Markierung in *E. coli* BKIIM kaum in den Asparaginpool geleitet wird (25 %), ist dieser in *E. coli* DM 1265 zum Ende des Markierungsexperiments zu fast 65 % markiert.

Auch beim Vergleich der Überschneidung unmarkierter und vollmarkierter Massenisotopomere ist bei *E. coli* BKIIM die gerichtete Metabolisierung des Substrates in die Threoninbiosynthese erkennbar. Während bei *E. coli* DM 1265 der Markierungseinbau in sechs Metaboliten so weit erfolgt, dass der markierte Anteil überwiegt, sind es bei BKIIM nur drei (s. *Tabelle 5.40*). Von diesen Dreien sind zwei Intermediate der Threoninbiosynthese und der dritte, Alanin knüpft über Pyruvat direkt an die Glykolyse an. In den drei Metaboliten erfolgt

die Überschneidung im Stoffwechsel von BKIIM 2,9-fach (Ala), 2,2-fach (Asp) und 3,1-fach (Hse) schneller als in DM 1265.

Tabelle 5.40: Überschneidung der Isotopomere  $m+0$  und  $m+n$

	Überschneidung [s]		Mol [%]		Faktor <sup>Überschneidung</sup> DM 1265 / BKIIM
	DM 1265	BKIIM	DM 1265	BKIIM	
Serin	1000	-	33,5	-	-
Alanin	1055	360	48,5	48,5	2,9
Glutamat	2315	-	21,7	-	-
Homoserin	5314	2400	31,8	30,5	2,2
Aspartat	6214	2016	32,0	29,8	3,1
Asparagin	7416	-	35,9	-	-
Glycin	-	-	-	-	-
Threonin	-	-	-	-	-
Valin	-	-	-	-	-

Aus dieser Beobachtung lässt sich ableiten, dass in *E. coli* DM 1265 hohe Stoffflüsse in andere Bereiche des Stoffwechsels als die Threoninbiosynthese gerichtet werden. Somit wird das Substrat nicht optimal für die Threoninproduktion genutzt. In diesem Punkt ist *E. coli* BKIIM gegenüber DM 1265 deutlich überlegen. Allerdings scheint der Threoninabbau zum Glycin, im Widerspruch zur Literatur, in *E. coli* BKIIM nicht effektiv geblockt zu sein. In *Abbildung 5.104* ist die Markierungsanreicherung in den Glycinpools der beiden untersuchten Threoninproduzenten gegenübergestellt. In *E. coli* BKIIM wird für Glycin nach 56 min ein Anteil an unmarkiertem Isotopomer von 85 % erreicht, bei *E. coli* DM 1265 beträgt dieser nach einer Markierungsdauer von 143 min 71 %. Die Anreicherungsprofile der Glycinpools beider Stämme sind untereinander und auch mit den Verläufen des Produktes Threonin vergleichbar (s. *Abbildung 5.98*). Somit besteht der Verdacht, dass der Threoninabbau zum Glycin in beiden Stämmen auf ähnliche Weise erfolgt.

Der Hauptabbauweg von Threonin zu Glycin über die Threonindehydrogenase wurde in *E. coli* BKIIM durch Transduktion des Bacteriophagen P1 geblockt (s. *Kapitel 3.4.7* und *3.4.9*), trotzdem zeigt die Anreicherung der <sup>13</sup>C-Markierung einen ähnlich langsamen Verlauf wie bei *E. coli* DM 1265. Da die Aktivität des alternativen Abbauweges von Threonin über die Threoninaldolase zu Glycin und Acetaldehyd in *E. coli* bisher nicht nachgewiesen wurde (Marcus und Dekker 1993, s. *Kapitel 3.4.7*) gibt es keine Erklärung für dieses Phänomen. Allerdings lassen die Ergebnisse der Gruppe von Lee et al. (2007) vermuten, dass Enzyme die normalerweise nur unter anaeroben Bedingungen aktiv sind wie der Glyoxylatweg (s. *Kapitel 5.7.2.1*) und das *TdcC*-System (s. u.) bei Threoninproduzenten möglicherweise auch unter aeroben Bedingungen exprimiert werden.

## Ergebnisse und Diskussion

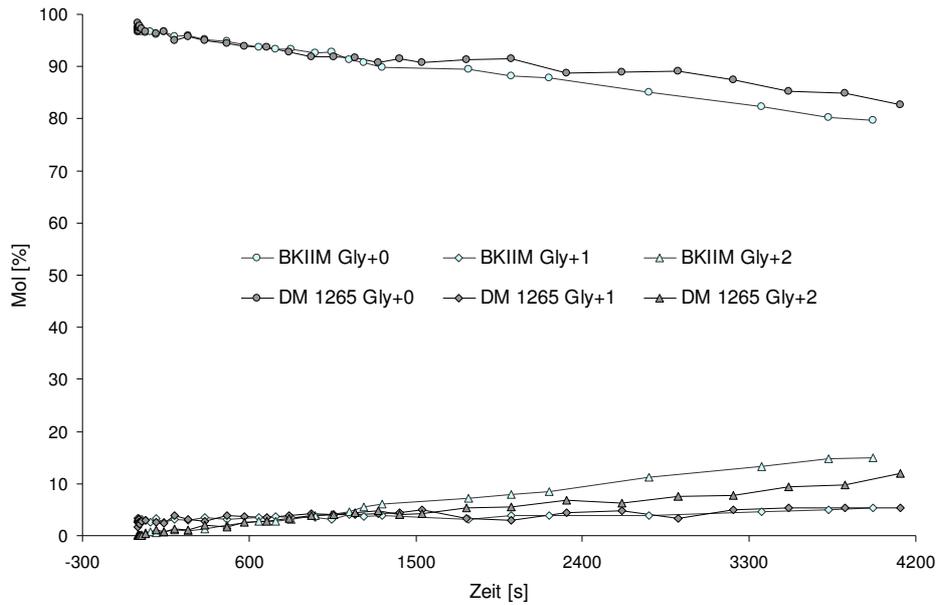


Abbildung 5.104: Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -Markierungsanreicherung im Glycinpool

Neben dem auffälligen Verhalten der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung im Glycinpool erfolgt auch die Markierung des Valinpools von DM 1265 erstaunlich langsam. Dies wird besonders beim Vergleich der Valinanreicherungsprofile der beiden Threoninproduzenten in *Abbildung 5.105* deutlich.

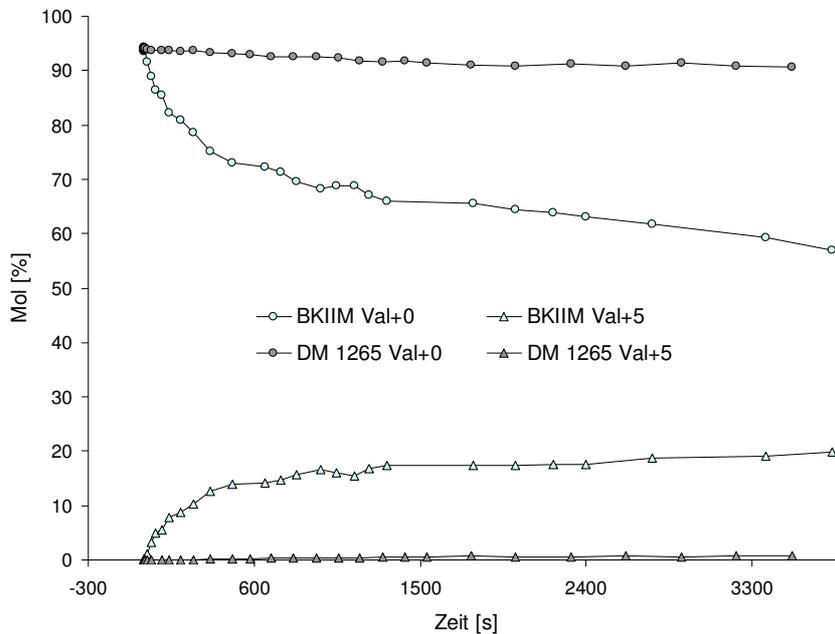


Abbildung 5.105: Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -Markierungsanreicherung im Valinpool

Während bei *E. coli* DM 1265 fast keine Markierungsanreicherung beobachtet wird, nimmt diese bei *E. coli* BKIIM bis zum Ende des Markierungsexperiments ab. Beim Vergleich der intrazellulären Valinpools in DM 1265 (110  $\mu\text{M}$ ) und BKIIM (65  $\mu\text{M}$ ) könnte die Regulation der Acetolactatsynthase für die unterschiedlichen Stoffflüsse in den beiden Threoninproduzenten

verantwortlich sein (s. Kapitel 5.7.2.1)<sup>[8]</sup>. Um die sehr langsame Anreicherung im intrazellulären Valinpool von *E. coli* DM 1265 aufzuklären, müsste die Valinbiosynthese gezielt untersucht werden.

Bisher ist keine detaillierte Studie über die diffusionsgesteuerte Exkretion der Aminosäure L-Threonin beschrieben, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Threonin lediglich aktiv aus der Zelle transportiert wird (Čamajová et al. 2002). Lee et al. (2007) untersuchten eine *tdcC*-Deletionsmutante und stellten fest, dass die Deletion die Threoninaufnahme verhindert. Diese Beobachtung steht kontrovers zur Čamajová et al. (2002) die beschreiben, das *TdcC*-System sei nur unter anaeroben Bedingungen aktiv. Die Verläufe der <sup>13</sup>C-Anreicherung in den Threoninpools von *E. coli* DM 1265 und BKIIM sind linear (s. Abbildung 5.106). Daraus könnte abgeleitet werden, dass kein unmarkiertes Threonin in die Zelle aufgenommen wird, da weder Rückvermischungs- noch Isotopenverdünnungseffekte offensichtlich sind.

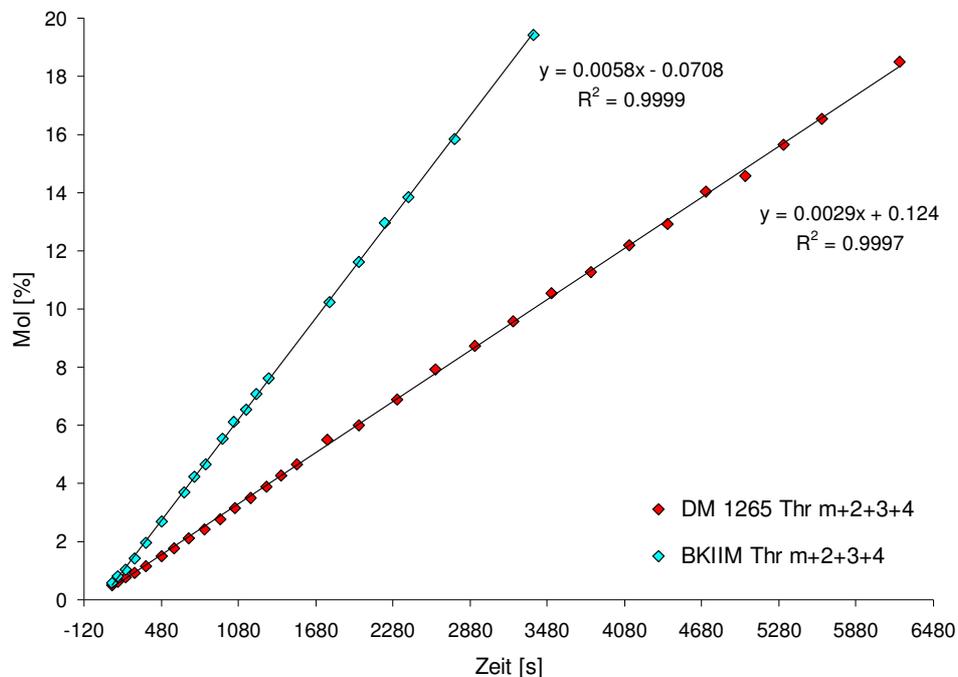


Abbildung 5.106: <sup>13</sup>C-Markierungsanreicherung im Threoninpool von *E. coli* DM 1265 und BKIIM

Lee et al. (2007) untersuchten den Threonintransport aus der Zelle und stellten fest, dass die Expression von *rhtC* (s. Kapitel 3.4.8) sehr großen Einfluss auf die Threoninproduktion hat. Wahrscheinlich ist die Expression von *rhtC* in *E. coli* DM 1265 und BKIIM neben der Biosynthese verantwortlich für die unterschiedlichen Steigungen der <sup>13</sup>C-Markierungsanreicherungen in beiden Threoninproduzenten (0,0058 BKIIM und 0,0029 DM 1265). Die Gene *rhtA* und *rhtB* hingegen haben nach Lee et al. (2007) nur geringen Einfluss auf die Threoninbildung. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen von Livshits et al. (2003) die zeigten, dass die Inaktivierung von *rhtA* keinen Effekt auf die Threoninbildung hat. Durch Überexpression des Gens *rhtA* wird allerdings eine Erhöhung der Resistenz von *E. coli* Zellen gegenüber Homoserin und Threonin erzielt. Die gemessenen Poolgrößen für Homo-

serin und Threonin (s. *Tabelle 5.29* und *5.36*) weisen darauf hin, dass der Threoninexport limitierend sein könnte. Die im Vergleich zum Threoninpool geringen Homoserin Poolgrößen lassen den Schluss zu, dass der Fluss bis zum Homoserin nicht eingeschränkt ist. Um differenzieren zu können, ob die hohen intrazellulären Threoninkonzentrationen durch die Reaktion der Homoserinkinase oder den Threoninexport (*rhtC* oder andere Transportsysteme) bedingt sind, sollten entsprechende Mutanten kloniert und mit den in dieser Arbeit beschriebenen Methoden verglichen werden.

Obwohl beide untersuchten Threoninproduzenten plasmidkodiert das gleiche Threoninoperon tragen, lassen sich viele Unterschiede aus den Markierungsrohdaten der beiden Threoninproduzenten ableiten. Mit Ausnahme der Metabolite Alanin, Serin und Aspartat erfolgt die Reaktion auf den  $^{13}\text{C}$ -Markierungspuls in *E. coli* BKIIM schneller. Insgesamt scheint der Fluss durch den Zentralstoffwechsel in *E. coli* BKIIM höher zu sein als in DM 1265. Auch die zytoplasmatischen Anreicherungsdynamiken sind in *E. coli* BKIIM durchweg schneller. Dies ist besonders deutlich an den Intermediaten der Threoninbiosynthese erkennbar. Während in *E. coli* BKIIM die Anreicherung im Aspartatpool am schnellsten erfolgt, ist die Kinetik der Alaninanreicherung in DM 1265 schneller. Anders als bei *E. coli* BKIIM liegt der Fokus in *E. coli* DM 1265 neben der Threonin- auch auf der Glutamatbiosynthese. Allgemein weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Transaminierungsreaktionen in *E. coli* DM 1265 stärker gewichtet werden als in BKIIM.

Die Ergebnisse der  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente zeigen, dass der  $^{13}\text{C}_6$ -Glucosepuls, die schnelle Probenahme, die Probenaufarbeitung und die Metabolomanalyse mit den in dieser Arbeit entwickelten Methoden erfolgreich eingesetzt werden können, um genetische Modifikationen anaboler Stoffwechselwege im Metabolom von *E. coli* abzubilden. Innerhalb der ersten Sekunden nach der Pulsaufgabe können Gen regulatorische Effekte ausgeschlossen werden, so dass aus den intrazellulären Poolgrößen und den Markierungsmessungen der ersten 10-40 s *in vivo* Enzymkinetiken abgeleitet werden können. Somit sind mathematisch sehr aufwendige instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen nicht notwendig um Ansatzpunkte für das *Metabolic Engineering* aufzudecken.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Peripherie der Threoninbiosynthese und der Zentralstoffwechsel (Substrataufnahmesystem) in beiden L-Threoninproduzenten grundlegend unterscheiden. Um die Stämme vollständig charakterisieren zu können, sind Untersuchungen der Anreicherungsdynamiken weiterer Metabolite notwendig. Ein systembiologischer Ansatz, in dem neben Metabolom- auch Genom- und Transkriptomanalysen erfolgen, könnte Fragestellungen zum Threoninabbau, -export und zur Expression einiger Enzyme unter aeroben Kultivierungsbedingungen geben.

## 5.8 Statistische Methoden zur Auswertung der Markierungsdaten

Zur Erfassung von Unterschieden in den Markierungsdynamiken verschiedener Organismen und einer besseren Vergleichbarkeit ist eine Auswertung mit statistischen Hilfsmitteln notwendig. Im folgenden Kapitel werden die gewonnenen Daten mit Hilfe zweier statistischer *Softwaretools* bearbeitet, die speziell für die Auswertung der Markierungsdaten entwickelt wurden.

### 5.8.1 Zeitreihenanalyse

Die Zeitreihenanalyse der gemessenen Markierungsanreicherungen wurde von A. Brandenburg und J. Koenig (Firma Genedata, Basel, Schweiz) entwickelt und durchgeführt. In die statistische Auswertung gehen die Daten der unmarkierten Isotopomere der Metabolite Aspartat, Homoserin, Methionin, Threonin, Glycin, Serin, Alanin, Valin, Fructose-1,6-bisphosphat und Phosphoenolpyruvat von jeweils 35 Zeitpunkten des ersten  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiments mit *E. coli* BKIIM ein (s. Kapitel 5.7.3.1). Zunächst erfolgt eine Clusteranalyse, welche die Metabolite anhand der Markierungsdynamiken gruppiert (s. Abbildung 5.108). Hierbei zeigen die Ergebnisse, dass sich die beiden katabolen Metabolite FBP und PEP aus der Glykolyse deutlich von den anabolen Metaboliten abheben. Die Aminosäuren werden in eine Gruppe im direkten Einflussbereich des Produktes Threonin und den Rest unterteilt. Diese Resultate stehen im Einklang mit dem Stand des Wissens über bakterielle Stoffwechselnetzwerke.

Anschließend wird eine *Heatmap* der Abnahme des unmarkierten Isotopomer der untersuchten Metabolite für alle Zeitpunkte erstellt (s. Abbildung 5.107). In dieser Darstellung kann optisch erfasst werden, wie stark die Verzögerung des Markierungssignals in den jeweiligen Metaboliten ist.

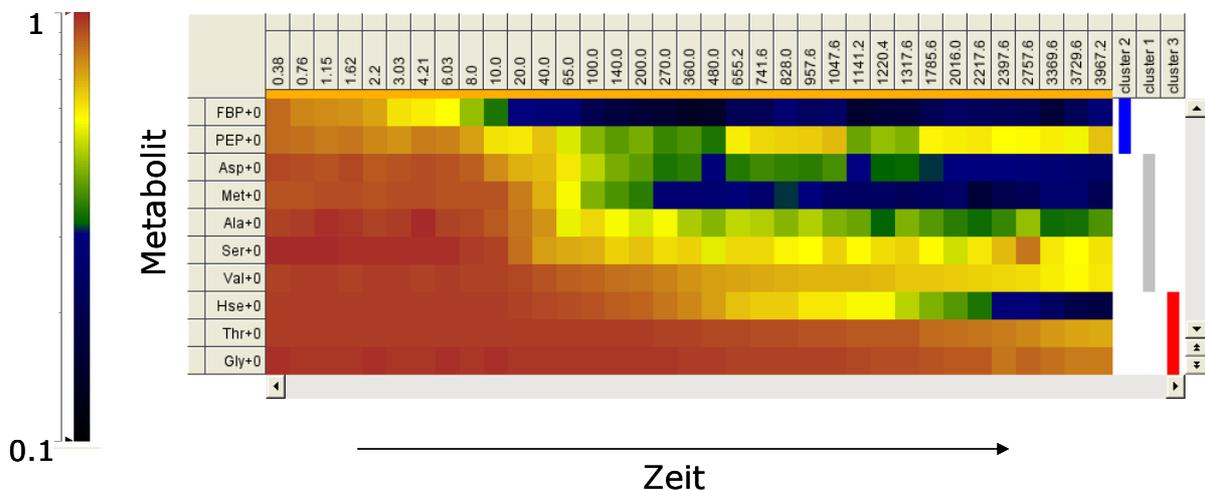


Abbildung 5.107: Heatmap - Abnahme unmarkierter Isotopomere nach Aufgabe des  $^{13}\text{C}$ -Markierungspulses

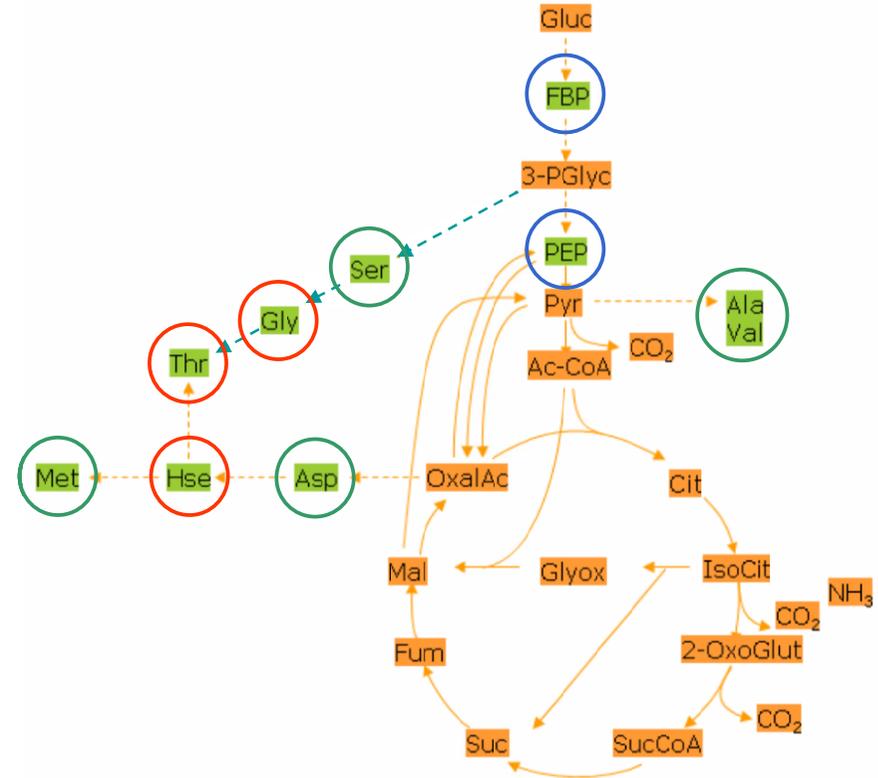
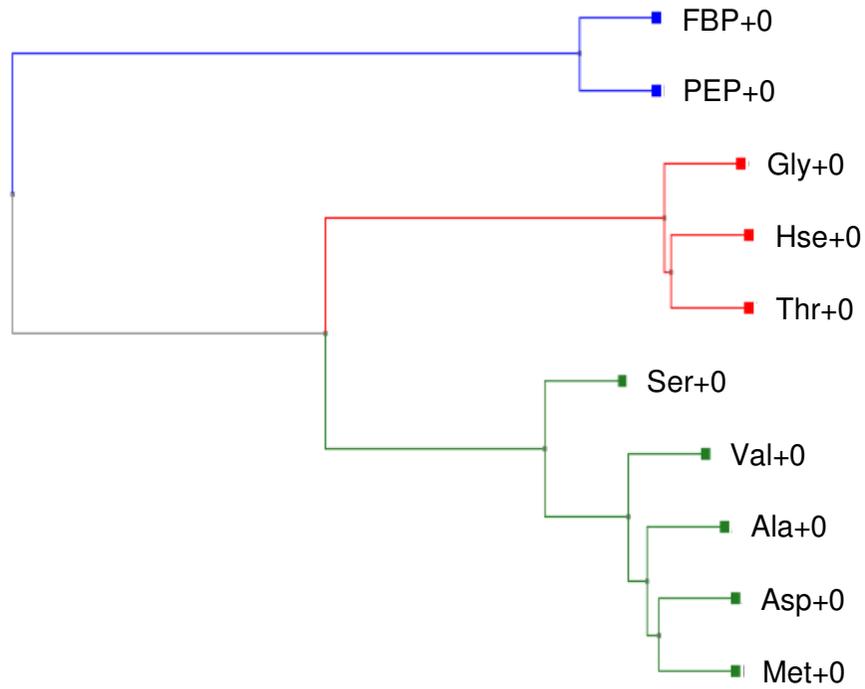
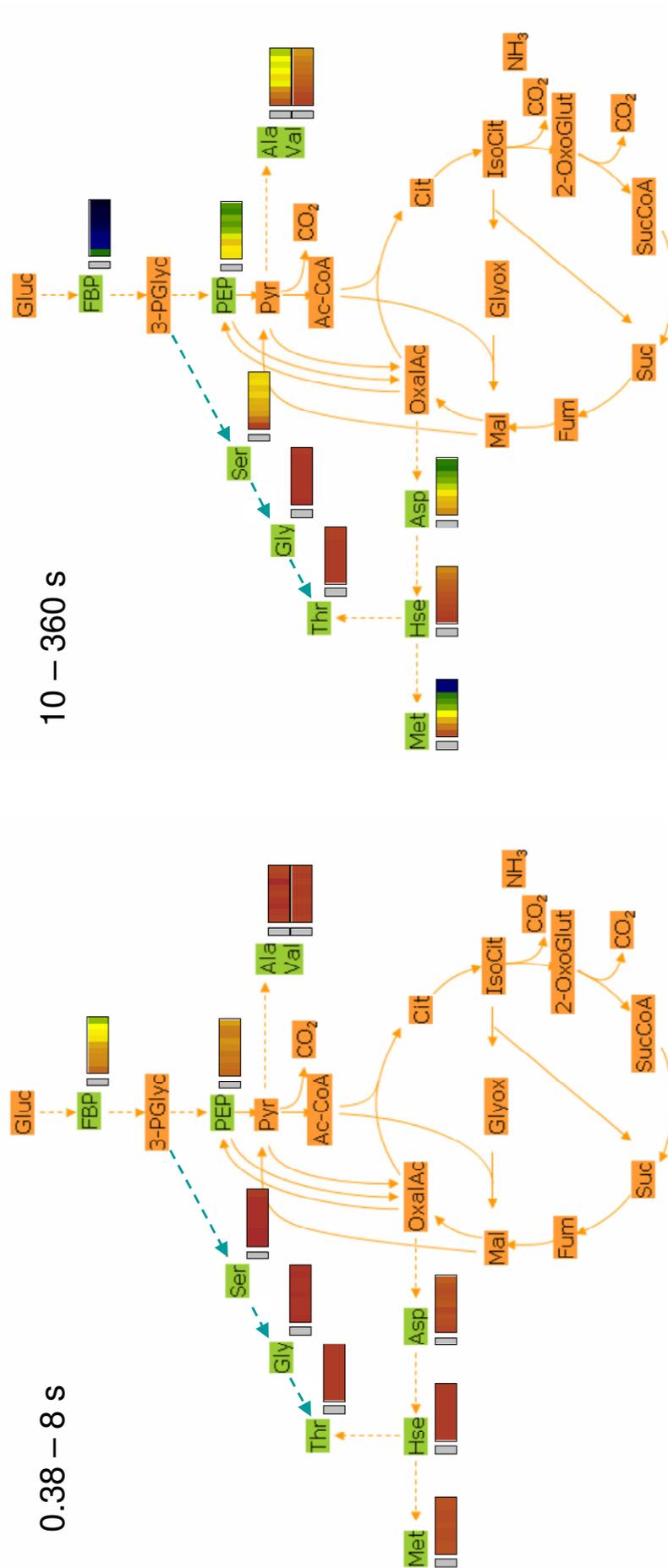


Abbildung 5.108: Clusteranalyse der Markierungsdynamik ausgewählter Metabolite

In Teilbilder aufgeschlüsselt, können in dieser Form Markierungsanreicherungen optisch am Modell des Stoffwechsels dargestellt werden. Auf diese Weise lassen sich Zusammenhänge zwischen den Metaboliten anhand der Markierungsanreicherung einfach und schnell durch optischen Vergleich erfassen. So sieht man z. B. im ersten Teilbild der *Abbildung 5.109* den Zeitbereich von 0,38 – 8 s nach der Pulsaufgabe (links oben). In diesem Zeitfenster reagiert lediglich der Zentralstoffwechsel deutlich auf das markierte Substrat. Anabole Stoffwechselwege werden in diesem Zeitbereich noch nicht merklich markiert. Im zweiten Zeitabschnitt von 10 – 360 s (*Abbildung 5.109*, rechts oben) ist die Markierung im FBP bereits stationär und das Signal hat sich bis in die anabolen Metabolite Serin, Alanin, Aspartat, Methionin und Homoserin ausgebreitet. Nach einer Markierungszeit von über 480 s (s. *Abbildung 5.109*, links unten) sind alle untersuchten Metabolite bis auf Glycin und Threonin bereits merklich markiert. Die  $^{13}\text{C}$ -Markierung des Produktes Threonin und seines Abbauproduktes Glycin ist erst nach einer Markierungszeit von über 1300 s erkennbar (vergl. *Abbildung 5.109*, rechts unten).

Mit Hilfe dieses graphischen Ansatzes der Auswertung können komplexe Markierungsdaten auf einfache Weise optisch miteinander verglichen werden. Dieser schnelle Vergleich kann z. B. bei der Untersuchung von Mutanten in der Stammentwicklung oder Selektion von Produktionsorganismen ein entscheidender Vorteil sein.



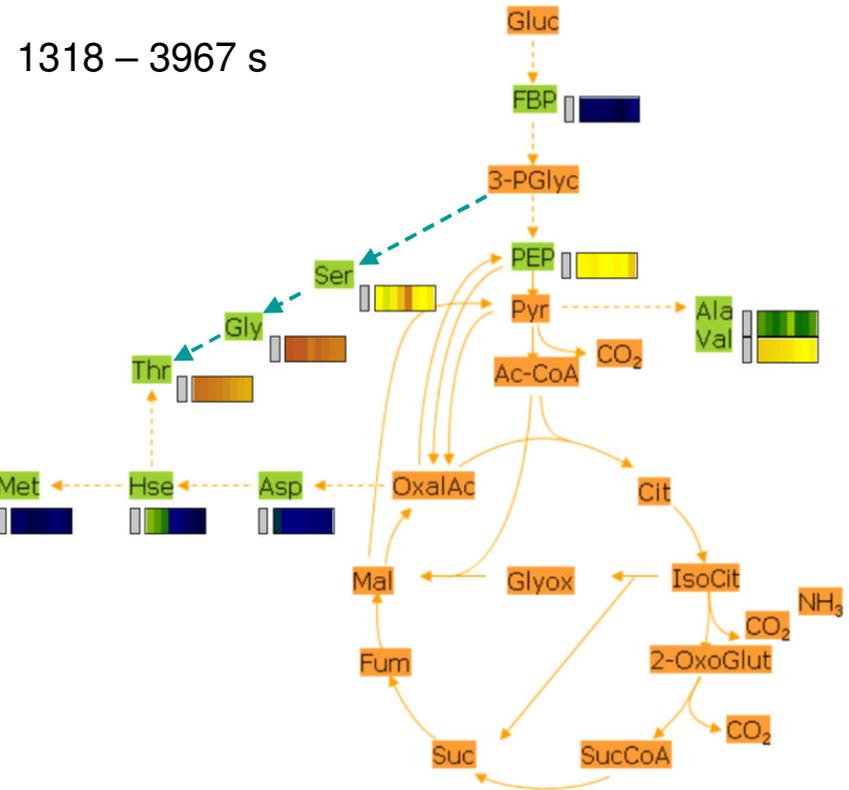
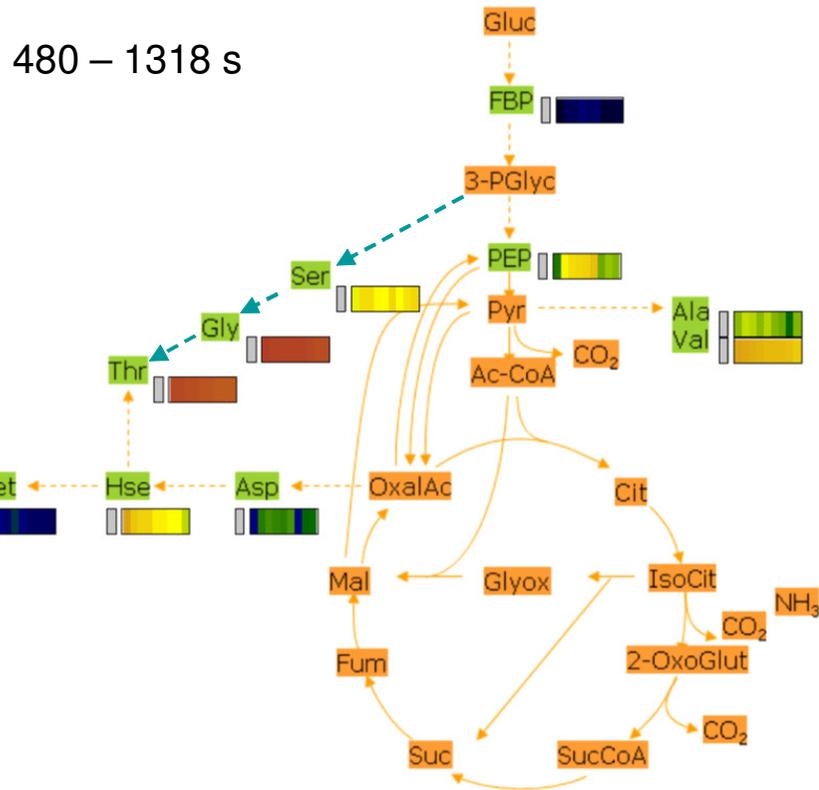


Abbildung 5.109: Abnahme unmarkierter Isotopomere nach Aufgabe des  $^{13}\text{C}$ -Markierungspulses – S. 177: 0,38 – 8 s (links) und 10 – 360 s (rechts), S. 178: 480 – 1318 s (links) und 1318 – 3967 s (rechts), (Legende s. Abbildung 5.108)

## 5.8.2 Analyse der Daten durch Cross Correlation

Ein zweiter statistischer Ansatz um Korrelationen zwischen den Markierungsdynamiken verschiedener Metabolitpools abzubilden, wurde von Aljosha Wahl <sup>[17]</sup> entwickelt. Die Berechnung von „Zeitfaktoren“ und die anschließende *Cross Correlation* gibt die Verzögerung der Pulsweiterleitung eines Intermediatpools und die Korrelation der Anreicherung zweier Metabolite wider. Das Prinzip erklärt *Abbildung 5.110*:

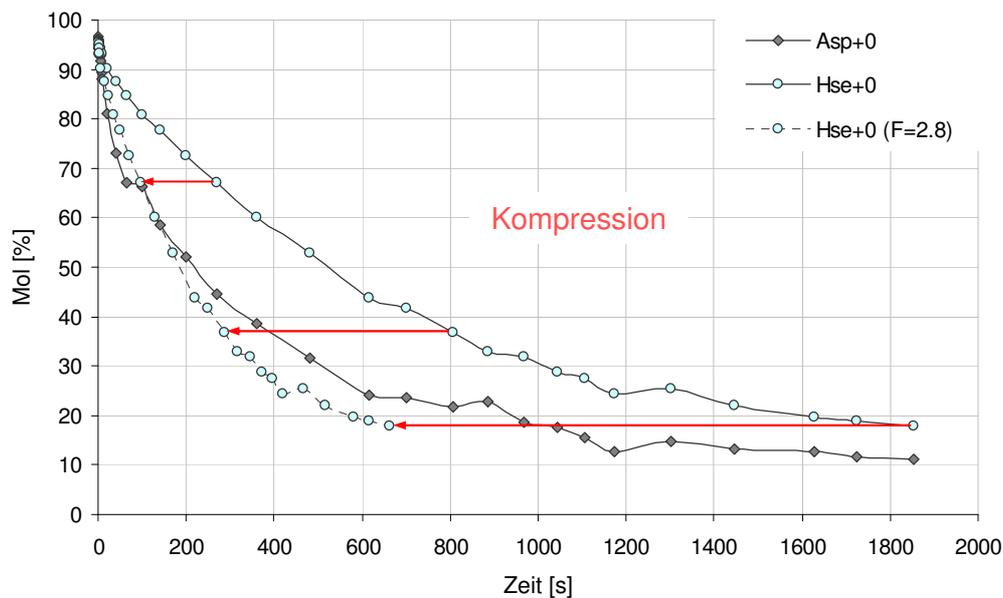


Abbildung 5.110: Entstehung der Zeitfaktoren durch Kompression der Zeitachse

Die Markierungsabnahme eines unmarkierten Metaboliten, z. B. Aspartat (Asp+0) dient als Korrelationsreferenz. Die Zeitachse eines zweiten unmarkierten Metaboliten z. B. Homoserin (Hse+0) wird durch einen Zeitfaktor  $F$  geteilt (Hse+0 ( $F = 2,8$ )) und somit dem Abreicherungsprofil des Aspartat angenähert. Auf diese Weise wird die bestmögliche Korrelation zwischen der Abreicherung der unmarkierten Isotopomere des Aspartat und Homoserin bestimmt. Das *Matlab*-basierte Programm glättet zunächst die Daten und führt die oben beschriebenen Schritte aus. In einer Schleife werden anschließend die Parameter „Zeitfaktor“ und „Korrelation“ optimiert.

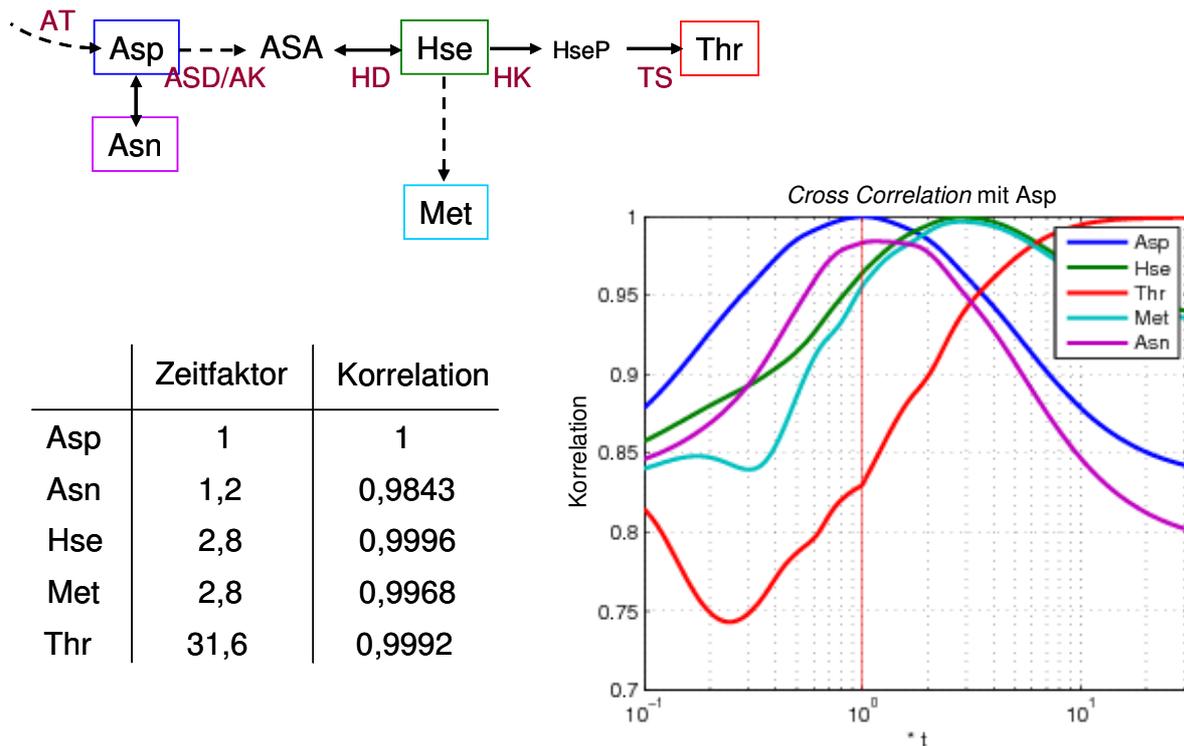


Abbildung 5.111: Ergebnisse der Cross Correlation von Hse, Thr, Met und Asn mit Asp – Biosynthese (oben links), Tabelle der Ergebnisse der Zeitfaktoren und der Korrelation (unten links) graphische Darstellung der Ergebnisse (rechts)

Mit den Markierungsdaten aus dem zweiten Pulsexperiment von *E. coli* BKIIM werden die, für die Threoninbiosynthese interessanten Intermediate Homoserin, Threonin, Methionin und Asparagin mit dem Vorläufer Aspartat korreliert (s. *Abbildung 5.111*). Bei Zeitfaktoren größer 1 erreicht das  $^{13}\text{C}$ -Markierungssignal den entsprechenden Pool später als Aspartat. Faktoren kleiner 1 deuten darauf hin, dass das entsprechende Intermediat eher als der Aspartatpool auf den Markierungspuls reagiert. Die in *Abbildung 5.111* dargestellte Tabelle verdeutlicht, dass zunächst Aspartat vom Markierungssignal erfasst wird. Aspartat stellt den Eingang der Threoninbiosynthese dar (s. Ausschnitt des Stoffwechselnetzwerks in *Abbildung 5.111* oben links). Die Reaktion der nachfolgenden Metabolite erfolgt erwartungsgemäß zeitverzögert. Das Produkt Threonin weist aufgrund der vergleichsweise hohen intrazellulären Konzentration mit 31,6 einen sehr großen Zeitfaktor auf, gleichzeitig aber auch eine gute Korrelation mit dem Vorläufer Aspartat.

Die Aminosäuren Serin und Alanin leiten sich von der Glykolyse ab. Alanin wird in einem Schritt durch Aminierung der  $\alpha$ -Ketosäure Pyruvat gebildet, für die Synthese aus Glucose sind mind. 10 enzymatische Schritte notwendig (s. *Abbildung 3.12*). Serin wird über zwei Zwischenstufen aus Glycerinaldehyd-3-phosphat hergestellt, für die Synthese aus Glucose sind somit mind. 7 enzymatische Schritte notwendig. Serin ist Vorstufe der Aminosäuren Glycin und Cystein, für die Glycinsynthese ist ein weiterer Schritt notwendig, in welchem die Methylgruppe der Serinseitenkette auf Tetrahydrofolat übertragen wird (s. *Abbildung 5.99*). Cystein wird über O-Acetylserin und Einführung des Schwefels über Hydrogensulfid in zwei weiteren Schritten aus Serin gebildet (s. *Abbildung 5.112*).

## Ergebnisse und Diskussion

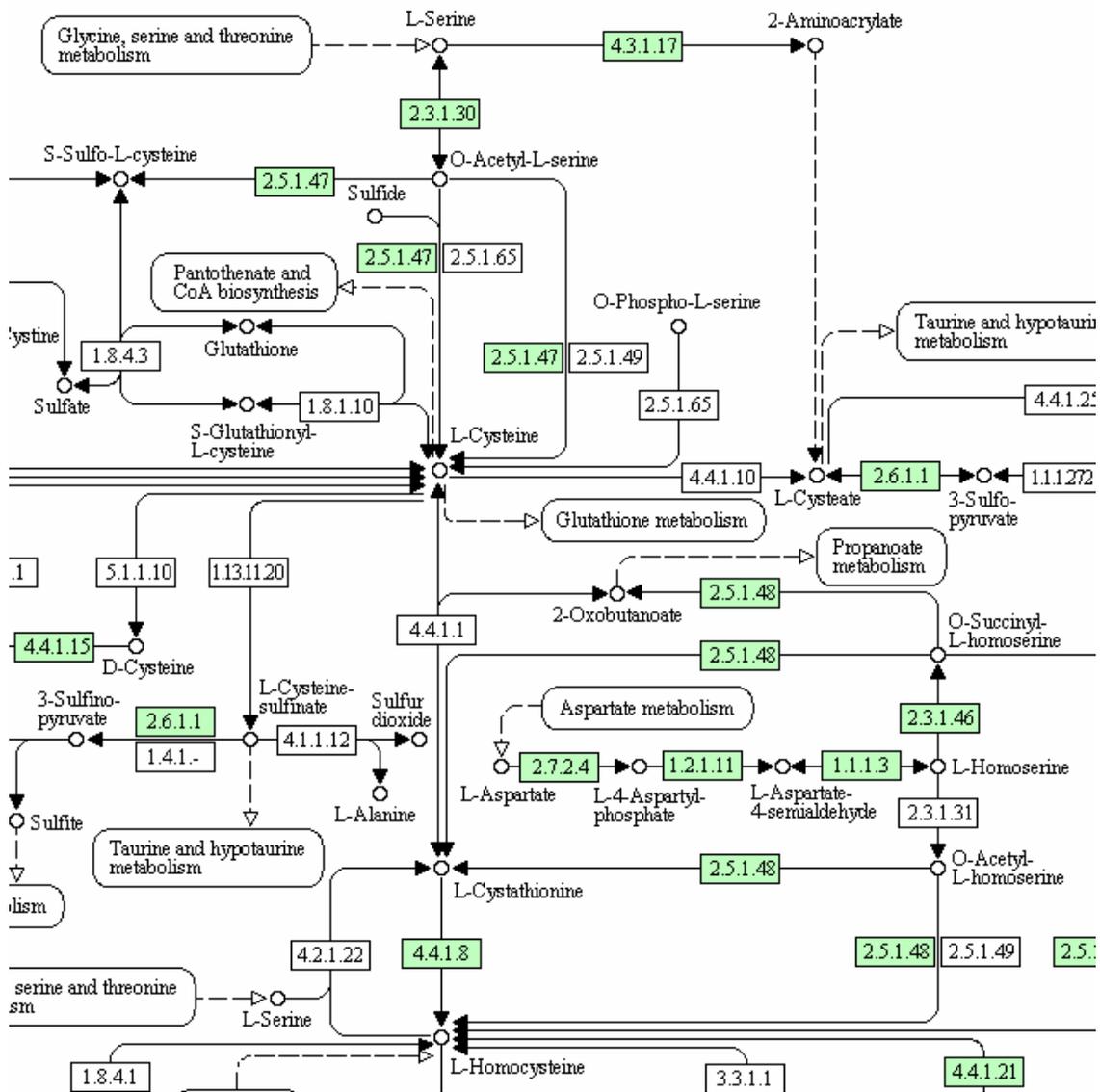


Abbildung 5.112: Stoffwechsellchnitt aus der Methionin- und Cysteinbiosynthese<sup>[9]</sup>  
Grün markierte Kästen: in *E. coli* K-12 MG 1655 aktive Enzyme

Serin und Glycin stehen über die Serin-Hydroxymethyltransferase und die Threoninaldolase (Abbau über die Threonindehydrogenase in *E. coli* BKIIM geblockt) im direkten Austausch mit Threonin (s. Ausschnitt des Stoffwechselnetzwerks in *Abbildung 5.113* oben links). Die L-Serindeaminase oder L-Threonindeaminase baut Serin in einem enzymatischen Schritt zu Pyruvat und Ammonium ab, so dass die Metabolite im direkten Austausch miteinander stehen (s. *Abbildung 5.99*). Allerdings werden die Enzyme nur unter anaeroben Bedingungen in Abwesenheit von Glucose exprimiert (Umbarger und Brown 1957, Su et al. 1989), somit kann die Reaktion unter den hier betrachteten Bedingungen vernachlässigt werden. Die Aminosäure Methionin wird aus der Vorstufe Aspartat in 7 Schritten über Homoserin synthetisiert, dabei überträgt Tetrahydrofolat eine Methylgruppe auf das Kohlenstoffgerüst. Die Hauptquelle der auf Tetrahydrofolat übertragenen C<sub>1</sub>-Einheiten aus Kohlenhydraten, ist die Umwandlung von Serin zu Glycin (Berg et al. 2007). Insgesamt sind für die Methioninbiosynthese aus Glucose mind. 17 enzymatische Schritte notwendig. Trotz dieses langen Bio-

syntheseweges führt die C<sub>1</sub>-Einheit (vermutlich aus Serin stammend) wahrscheinlich zu einer vergleichsweise schnellen Markierung des Methioninpools.

Geht man davon aus, dass der Zentralstoffwechsel ungehindert abläuft, ist unter den beschriebenen Voraussetzungen davon auszugehen, dass das Markierungssignal zuerst den Serinpool erreicht. Anschließend folgen der Glycin, Alanin und letztlich der Methioninpool.

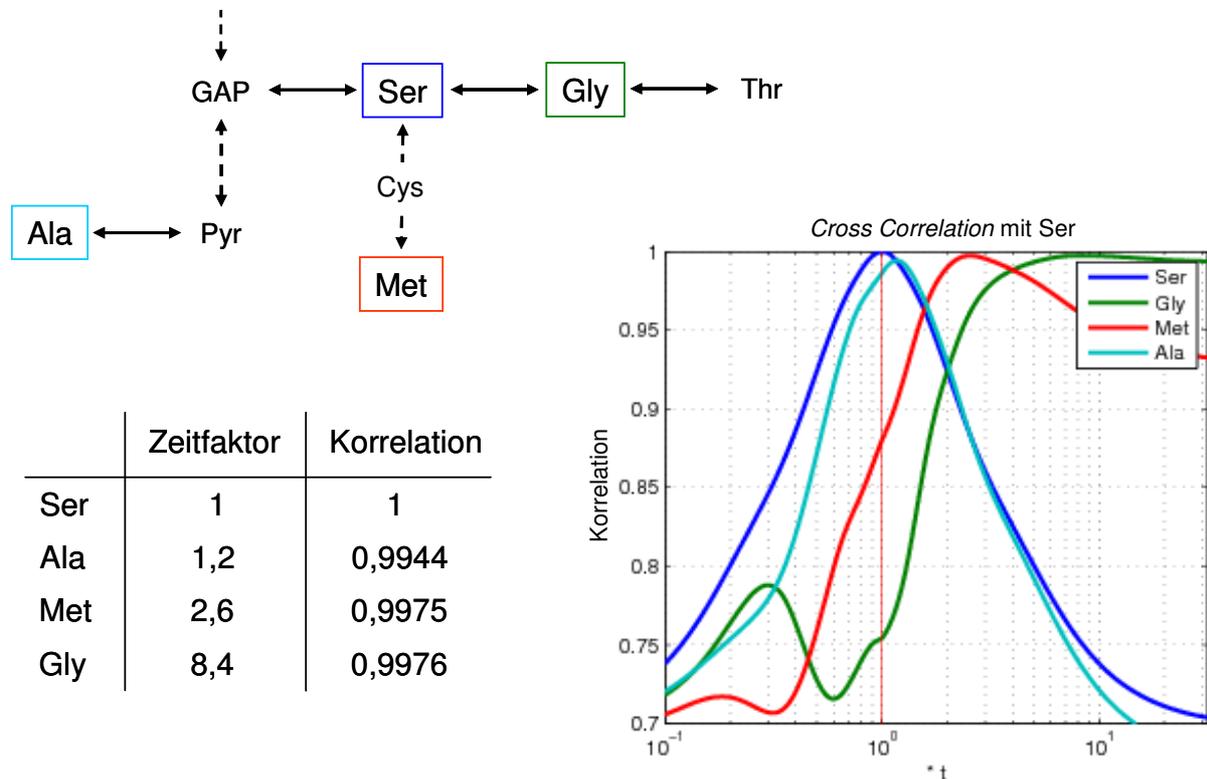


Abbildung 5.113: Ergebnisse der Cross Correlation von Gly, Met und Ala mit Ser – Verknüpfung der Metabolite im Stoffwechsel (oben links), Tabelle der Ergebnisse der Zeitfaktoren und der Korrelation (unten links) graphische Darstellung der Ergebnisse (rechts)

Durch *Cross Correlation* der Aminosäuren Glycin, Methionin und Alanin mit Serin und die ermittelten Zeitfaktoren, wird die Reihenfolge in der das <sup>13</sup>C-Markierungssignal in den untersuchten Metaboliten ankommt deutlich. Wie erwartet, wird Serin als erstes markiert, dann folgen bereits Alanin und Methionin. Glycin reagiert mit einem Zeitfaktor von 8,4 verzögert auf den Puls. Die Aminosäure liegt 8 enzymatische Umsetzungen vom Markierungseingang entfernt, und hätte erwartungsgemäß eine ähnlich schnelle Reaktionszeit zeigen sollen wie Serin. Die Ursache ist wahrscheinlich der bereits diskutierte Eintrag von unmarkiertem Material aus dem großen Threoninpool (s. Kapitel 5.7.3.1 und 5.7.4).

Unter physiologischen Bedingungen sind sowohl Glykolyse als auch Gluconeogenese aktiv. Für die simultane Aktivität der beiden entgegengesetzten Wege gibt es keine thermodynamische Barriere, allerdings wird die Enzymmenge und –aktivität der entscheidenden Enzyme jedes Weges so kontrolliert, dass nicht beide Stoffwechselwege gleichzeitig voll aktiv sind. Wenn Energie benötigt wird dominiert die Glykolyse, ist hingegen ein Überschuss an Energie vorhanden übernimmt die Gluconeogenese. Die Geschwindigkeit der Glykolyse wird außerdem von der Glucosekonzentration bestimmt (Berg et al. 2007). Im Markierungsexperiment von *E. coli* BKIIM erreicht das Pulssignal die Metabolite in Reaktionsrichtung der Glykolyse.

## Ergebnisse und Diskussion

Weiterhin ist anhand der Geschwindigkeit mit der die Markierung im Stoffwechsel verteilt wird erkennbar, dass die Aktivität des Zentralstoffwechsels (Glycolyse, Anaplerose bzw. Zitronensäurezyklus) im untersuchten L-Threoninproduzenten *E. coli* BKIIM sehr hoch ist. Dies deckt sich mit den Ergebnissen des Vergleichs der beiden untersuchten *E. coli* Threoninproduzenten in *Kapitel 5.7.4*. Somit kann aus den Ergebnissen der *Cross Correlation* abgeleitet werden, dass während des  $^{13}\text{C}$ -Pulsexperiments die Reaktionen der Glycolyse und nicht der Gluconeogenese überwiegen.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Arbeit entwickelten Techniken ermöglichen die Erfassung der Markierungsanreicherungen direkt in zytoplasmatischen Metaboliten. Dabei wird die Markierungsverteilung in anabolen Metaboliten mittels LC-ESI-MS/MS untersucht. Die entwickelte selektive Messmethode, wurde an die Anforderungen der komplexen biologischen Probenmatrix angepasst und nach DIN 32 645 validiert. Sie erlaubt die sensitive Erfassung 25 intrazellulärer, anaboler Metabolite. Die Analyten werden ohne vorhergehende Derivatisierung, innerhalb von 37 min (basische Aminosäuren 65 min), akkurat und reproduzierbar aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch detektiert. Die Anwendbarkeit wird an Zytoplasmaextrakten und Fermentationsüberständen unterschiedlicher biologischer Systeme wie Bakterien, tierischen Zellen und Pflanzen demonstriert.

In einem zweiten Schritt folgt die Auslegung der Methode für die quantitative Untersuchung der Markierungsverteilung in  $^{13}\text{C}$ -markierten zytoplasmatischen Metaboliten. Dabei zeigt die systematische Untersuchung unterschiedlicher Quantifizierungsstrategien signifikante Unterschiede zwischen den erhaltenen Metabolitkonzentrationen. Für Proben mit Verdünnungsfaktoren zwischen 2 und 20 erweisen sich die Methode mit Internem Standard und die *Isotope Dilution* Technik als geeignet, um Matrixeffekte des Probenhintergrunds auszugleichen. Außerdem wird gezeigt, dass  $\text{U}^{13}\text{C}_4$ -Aspartat als Interner Standard für die Quantifizierung verschiedener Aminosäuren in biologischen Proben geeignet ist. Bei Einsatz der *Isotope Dilution Mass Spectrometry*, bei der jeder Metabolit ein eigenes markiertes Analoges hat, kann sogar die Korrelation zwischen Konzentration und MS-Response der Analyten verbessert und der lineare Arbeitsbereich erweitert werden. Weiterhin wird gezeigt, dass zeitaufwändige Methoden wie die Standardaddition lediglich für die Messung sehr gering konzentrierter Metabolite erforderlich sind. Alternativ können solche Proben aber auch aufkonzentriert und über Interne Standards kalibriert werden. Eine externe Kalibrierung kann bei hohen Probenverdünnungen ( $> 1:20$ ) bedenkenlos zur Quantifizierung herangezogen werden, da die Messung kaum durch Matrixeffekte beeinflusst wird.

Die Probenaufarbeitung stellt einen sehr wichtigen Schritt auf dem Weg zur „quantitativen“ Metabolomanalyse dar. Gelingt es nicht, die Metabolite bis zur Messung unverändert im Zustand der Probenahme aufzuarbeiten, ist es unmöglich, eine Momentaufnahme des Stoffwechsels einzufangen. Vergleichende Experimente mit und ohne Quenching des Zellstoffwechsels zeigen, dass eine schnelle Deaktivierung der Enzymaktivität notwendig ist, um den metabolischen Zustand zum Zeitpunkt der Probenahme zu erhalten. Zur Extraktion der intrazellulären Metabolite werden verschiedene Verfahren gegenübergestellt. Dabei sind die Ergebnisse nach Zellaufschluss mit Chloroform weniger fehlerbehaftet, die Matrixeffekte geringer und die Extraktion vieler Metabolite effektiver als mit anderen getesteten Extraktionsverfahren. Auftretende Verluste werden durch die Extraktion von Standards (Zuckerphosphate, organische Säuren und Aminosäuren) abgeschätzt. Die Chloroformextraktion

dient mittlerweile als Standardprobenaufarbeitung für den Zellaufschluss und die Extraktion von Metaboliten aus bakteriellen und höheren Zellen (Wiendahl et al. 2006).

Um die phänotypischen Effekte der genetischen Modifikationen in *E. coli* L-Threoninproduzenten auf Metabolomebene zu verstehen, wird der zugrunde liegende Wildtyp *E. coli* MG 1655 mit verschiedenen L-Threoninproduzenten verglichen. Hierzu werden Fermentationen im Fed-Batch Betrieb durchgeführt und die intrazellulären Poolgrößen in der exponentiellen Wachstumsphase gegenübergestellt. Während die Metabolitpools in *E. coli* Wildtyp den in der Literatur beschriebenen Effekten der Regulation unterliegen, ist die Threoninbiosynthese in den Produktionsstämmen verändert, insbesondere das Intermediat Homoserin wird im Threoninproduzenten BKIIIM akkumuliert. Basierend auf den gemessenen Metabolitkonzentrationen im Produktstoffwechsel wird die Homoserinkinase im Stamm *E. coli* PthrB überexprimiert. Die intrazellulären Poolgrößen der optimierten Mutante zeigen, dass die Veränderung auf Genomebene neben einer gesteigerten L-Threoninkonzentration unerwartete Auswirkungen auf die Peripherie des Produktstoffwechsels haben.

Neben regulären Fed-Batch Experimenten werden metabolisch stationäre, isotopisch instationäre Markierungsexperimente mit markierter Glucose ( $U^{13}C_6$ -Glucose) durchgeführt. Dabei bleibt die Sättigung des Substrataufnahmesystems des Organismus durch die Änderung des isotopischen Zustands der Kultur unbeeinflusst, so dass konstante metabolische Flüsse über die Dauer der Markierungsexperimente angenommen werden können. Bei diesen Experimenten gelingt erstmalig die Erfassung der Vorgänge in zytoplasmatischen Metaboliten des Produktstoffwechsels unter industriell relevanten Fermentationsbedingungen. Durch eine, über die Zeit aufgelöste Darstellung der erfassten Markierungsinformation, kann mit Hilfe der etablierten Techniken die Markierungsdynamik unter *in vivo* Bedingungen direkt im Metabolitpool visualisiert werden. Trotzdem beide untersuchten Threoninproduzenten plasmidkodiert das gleiche Threoninoperon tragen, lassen sich viele Unterschiede aus den Markierungsrohdaten der beiden Threoninproduzenten ableiten. Mit Ausnahme der Metabolite Alanin, Aspartat und Asparagin erfolgt die Reaktion auf den  $^{13}C$ -Markierungspuls in einem der beiden Stämme schneller. Dies gilt für die zytoplasmatischen Anreicherungsdynamiken in den untersuchten Metaboliten und den Fluss durch den Zentralstoffwechsel, besonders aber für die Anreicherung in der Threoninbiosynthese. Während bei einem der beiden *E. coli* Threoninproduzenten die Anreicherung im Aspartat am schnellsten erfolgt, ist im anderen die Kinetik im Alaninpool schneller. Bei einem Stamm scheint der Fokus neben der Threonin- auch auf der Glutamatbiosynthese bzw. allgemein auf Transaminierungsreaktionen zu liegen. Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass die Peripherie der Threoninbiosynthese und der Zentralstoffwechsel (Substrataufnahmesystem) in beiden L-Threoninproduzenten grundlegend unterschiedlich sind. Um die Stämme vollständig charakterisieren zu können, sind Untersuchungen der Anreicherungsdynamiken weiterer Metabolite notwendig. Ein systembiologischer Ansatz in dem neben Metabolom- auch Genom- und Transkriptomanalysen erfolgen, könnte Fragestellungen zum Threoninabbau und zur Expression einiger Enzyme unter aeroben Kultivierungsbedingungen geben.

Zur Erfassung von Unterschieden in den Markierungsdynamiken wird eine Auswertung mit zwei statistischen *Softwaretools* (Zeitreihenanalyse und *Cross Correlation*) durchgeführt. Durch die *Cross Correlation* Analyse werden die Daten graphisch so aufgearbeitet, dass deutlich wird, dass die  $^{13}\text{C}$ -Markierung die Metabolite in Reaktionsrichtung der Glycolyse erreicht. Unter Produktionsbedingungen überwiegen somit die Reaktionen der Glycolyse und nicht der Gluconeogenese. Beim Vergleich der intrazellulären Zustände der beiden *E. coli* L-Threoninproduzenten zeigen sich signifikante Unterschiede im Produktstoffwechsel (wie z. B. der L-Threoninabbau zum Glycin und die Umsetzung der Homoserinkinase). Somit wird gezeigt, dass sich limitierende Reaktionsschritte in Produktionswegen mit den in dieser Arbeit entwickelten Methoden aufdecken lassen. Diese sind nicht nur auf die Aminosäurebiosynthese beschränkt, sondern auf andere Stoffwechselwege übertragbar.

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse stehen im Einklang mit dem Stand des Wissens über bakterielle Stoffwechselnetzwerke. Mit den entwickelten und vorgestellten Methoden lassen sich produktionsrelevante Stoffwechselvorgänge abbilden. Die Markierungsexperimente zeigen, dass der  $^{13}\text{C}_6$ -Glucosepuls, die schnelle Probenahme, die Probenaufarbeitung und die Metabolomanalyse erfolgreich eingesetzt werden können, um genetische Modifikationen anaboler Stoffwechselwege im Metabolom von *E. coli* abzubilden. Innerhalb der ersten Sekunden nach der Pulsaufgabe können Gen regulatorische Effekte ausgeschlossen werden, so dass aus den intrazellulären Poolgrößen und den Markierungsmessungen der ersten 10-40 s *in vivo* Enzymkinetiken abgeleitet werden könnten. Somit sind mathematisch sehr aufwendige instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen nicht notwendig um Ansatzpunkte für das *Metabolic Engineering* aufzudecken. Die beschriebenen Ansätze und Möglichkeiten sind nicht auf die Analytik des bakteriellen Stoffwechsels beschränkt, sondern können auch für die Analyse von Intermediaten höherer Zellen, oder Pflanzen (Thiele et al. 2008) eingesetzt werden. Auch das zu untersuchende Produkt ist nicht auf Aminosäuren beschränkt. Die Techniken können ebenfalls zur Abbildung anderer Produktionsabläufe eingesetzt werden, interessant wären z. B. Sekundärmetabolite aus Vorläufern wie Aminosäuren, organischen Säuren und Kohlenhydraten oder aromatische Stoffwechselintermediate wie Shikimat - sekundäre Pflanzenstoffe wie Terpene (Aroma- und Kunststoffchemie), Alkaloide, Steroide, Glycoside, Polyketide, Prostaglandine, Pyrimidine (Pharmazeutika) und Vitamine (Lebensmittel). Dabei sollten natürliche Schwankungen der metabolischen Aktivität bei vergleichbaren Fermentationen durch Mehrfachkultivierung ausgeglichen werden. Die Übertragbarkeit auf höhermolekulare Produkte wie z. B. Peptide oder Proteine ist ebenfalls denkbar und bleibt zu überprüfen.



## 7 Literatur

- Annesley TM (2003) Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical Chemistry* **49**:1041-1044
- Atkinson E (1968) The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochem* **7**:4030-4034
- Bailey JE (1991) Toward a science of metabolic engineering. *Science* **252**:1668-1674
- Baxter CJ, Liu JL, Fernie AR, Sweetlove LJ (2007) Determination of metabolic fluxes in a non-steady-state system. *Phytochem* **68**:2313-2319
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2007) *Biochemie* 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Beyer H, Francke W, Walter W (1998) *Lehrbuch der organischen Chemie*, S. Hirzel Verlag Stuttgart Leipzig, 23. Auflage
- BIOforum (1/2008), GIT Verlag
- Blackmoore PF, Williams JF, MacLeod JK (1976) Dimerization of erythrose-4-phosphate. *FEBS Letters* **64**:222-226
- Blattner FR, Plunkett III G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12, *Science* **277**:1453-1474
- Böttcher C, Roepenack-Lahaye EV, Willscher E, Scheel D, Clemens S (2007) Evaluation of matrix effects in metabolite profiling based on capillary liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* **79**:1507-1513
- Bruins AP (1998) Mechanistic aspects of electrospray ionization. *J Chrom A* **794**:345-357
- Buchholz AK, Takors R, Wandrey C (2001) Quantification of intracellular metabolites in *Escherichia coli* K12 using liquid chromatographic-electrospray ionization tandem mass spectrometric techniques. *Anal Biochem* **295**:129-137
- Buchholz AK, Hurlebaus J, Wandrey C, Takors R (2002) Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics. *Biomolecular Eng* **19**:5-15
- Buchholz AK (2002) Quantifizierung intrazellulärer Metabolitdynamiken zur Untersuchung mikrobieller Stoffwechselnetzwerke, Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Burr B, Walker J, Truffa-Bachi P, Cohen GN (1976) Homoserine kinase from *Escherichia coli* K 12. *Eur J Biochem* **62**:519-526

## Literatur

- Čamajová J, Čamaj P, Timko J (2002) Biosynthesis and transport of threonine in *Escherichia coli*. *Biologia Bratislava* **57**:695-705
- Castrillo JI, Hayes A, Mohammed S, Gaskell SJ, Oliver SG (2003) An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry. *Phytochemistry* **62**:929-937
- Chaimbault P, Petritis K, Elfakir C, Dreux M (1999) Determination of 20 underivatized proteinic amino acids by ion-pairing chromatography and pneumatically assisted electrospray mass spectrometry. *J Chrom A* **855**:191-202
- Chassagnole C, Raïs B, Quentin E, Fell DA, Mazat JP (2001) An integrated study of threonine-pathway enzyme kinetics in *Escherichia coli*. *Biochem J* **356**:415-423
- Christensen B, Nielsen J (1999) Isotopomer analysis using GC-MS. *Metabolic Eng* **1**:282-290
- Dalluge JJ, Smith S, Sanchez-Riera F, McGuire C, Hobson R (2004) Potential of fermentation profiling via rapid measurement of amino acid metabolism by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1043**:3-7
- Dauner M, Sauer U (2000) GC-MS analysis of amino acids rapidly provides rich information for isotopomer balancing. *Biotechnol Prog* **16**:642-649
- Debabov VG, Kozlov JI, Khurges EM, Livshits VA, Zhdanova NI, Gusyatiner MM, Sokolov AK, Bachina TA, Yankovsky NK, Tsygankov JD, Chistoserdov AJ, Plotnikova TG, Shakalis IO, Belareva AV, Arsatians RA, Sholin AF, Pozdnyakova TM (1992) Bacterial strain of *Escherichia coli* BKIIM B-3996 as the producer of L-threonine, United States Patent No. 5,175,107
- Debabov VG, Kozlov JI, Khurges EM, Livshits VA, Zhdanova NI, Gusyatiner M, Sokolov AK, Bachina TA (1997) Bacterial strain of *Escherichia coli* VNII genetika 472T23 as the producer of L-threonine. United States Patent No. 5,631,157
- Debabov VG (2003) The threonine story. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **79**:113-136
- De Graaf AA, Mahle M, Möllney GL, Wiechert W, Stahmann P, Sahm H (2000) Determination of full <sup>13</sup>C isotopomer distributions for metabolic flux analysis using heteronuclear spin echo difference NMR spectroscopy. *J Biotechnol* **77**:25-35
- De Hoffmann E, Stroobant V (2001) *Mass spectrometry principles and applications*, Second Edition, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England
- De Koning W, van Dam K A (1993) Method for the determination of changes in glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Anal Biochem* **204**:118-123
- Delatour T (2004) Performance of quantitative analyses by liquid chromatography–electrospray ionisation tandem mass spectrometry: from external calibration to isotopomer-based exact matching. *Anal Bioanal Chem* **380**:515-523

- Dole M, Mach LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LP, Alice MB (1968) Molecular beams of macroions. *J Chem Phys* **49**:2240-2249
- Drysch A, El Massaoudi M, Wiechert W, de Graaf AA, Takors R (2004) Serial flux mapping of *Corynebacterium glutamicum* during fed-batch L-lysine production using sensor reactor approach. *Biotechnol Bioeng* **85**(5):497-505
- Dunn WB, Bailey NJC, Johnson HE (2005) Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst* **130**:606-625
- Eggeling L, Bott M (2005) "Handbook of *Corynebacterium glutamicum*" CRC Press
- El Massaoudi M, Spelthahn J, Drysch A, de Graaf A, Takors R (2003) Production process monitoring by serial mapping of microbial carbon flux distributions using a novel sensor reactor approach: I-sensor reactor system. *Metab Eng* **5**:86-95
- El Massaoudi M (2003) Entwicklung eines Sensor Reaktor Systems für metabolische Stoffflussanalysen in instationären Fermentationen. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Escherich T (1885) Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. In: Fortschritte Med. 3, S. 515-522 und 547-554
- Falkoz-Kelly F, Van Rapenbusch R, Cohen GN (1969) The methionine-repressible homoserine dehydrogenase and aspartokinase activities of *Escherichia coli* K 12. Preparation of the homogeneous protein catalyzing the two activities. Molecular weight of the native enzyme and of its subunits. *Eur J Biochem* **8**:146-152
- Fazel A, Müller K, Le Bras G, Garel JR, Véron M, Cohen GN (1983) A triglobular model for the polypeptide chain of aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I of *Escherichia coli*. *Biochem* **22**:158-165
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989) Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**:64-71
- Fiehn O, Kopka P, Dörmann T, Altmann RN, Trethewey RN, Willmitzer L (2000) Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnol* **18**:1157-1161
- Fiehn O (2002) Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* **48**:155-171
- Gancedo JM, Lopez S, Ballesteros F (1982) Calculation of half-lives of proteins in vivo. Heterogeneity of in the rate of degradation of yeast proteins. *Mol Cell Biochem* **43**:89-95
- Gardner GF (1979) Regulation of the threonine operon: tandem threonine and isoleucine codons in the control region and translational control of transcription termination. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**:1706-1710
- Gerdes K (1988) The parB(hok/sok) locus of plasmid R1 : a general purpose plasmid stabilization system. *Bio Technol* **6**:1402-1405

## Literatur

- Gomez-Ariza JL, Villegas-Portero MJ, Bernal-Daza V (2005) Characterization and analysis of amino acids in orange juice by HPLC-MS/MS for authenticity assessment. *Anal Chim Acta* **540**:221-230
- Gonzalez B, Francois J, Renaud M (1997) A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast* **13**:1347-1355
- Grotkjær T, Åkesson M, Christensen B, Gombert AK, Nielsen J (2004) Impact of transamination reactions and protein turnover in <sup>13</sup>C-labeling experiments. *Biotechnol Bioeng* **86**:209-216
- Guo K, Ji C, Li L (2007) Stable isotope dimethylation labeling combined with LC-ESI MS for quantification of amine-containing metabolites in biological samples. *Anal Chem* **79**:8631-8638
- Hama H, Kayahara T, Tsuda M, Tsuchiya T (1991) Inhibition of homoserine dehydrogenase I by L-serine in *Escherichia coli*. *J Biochem* **109**:604-608
- Hames BD, Hooper NM (2000) *Instant notes biochemistry*, Second Edition BIOS Scientific Publishers Limited
- Haziza C, Stragier P, Patte JC (1982) Nucleotide sequence of the *asd* gene of *Escherichia coli*: absence of a typical attenuation signal. *EMBO J* **1**:379-384
- Hermann T, Rieping M (2003) Fermentation process for the preparation of L-threonine. United States Patent No. US 6,562,601 B2
- Hesse M, Meier H, Zeeh B (2002) *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 6. Auflage, Thieme, Stuttgart, New York
- Husek P, Simek P (2006) Alkyl chloroformates in sample derivatization strategies for GC analysis. Review on a decade use of the reagents as esterifying agents. *Curr Pharm Anal* **2**:23-43
- Iribane JV, Thomson BA (1976) On the evaporation of small ions from charged droplets. *J Chem Phys* **64**:2287-2294,
- James CL, Viola RE (2002) Production and characterization of bifunctional enzymes. Substrate channeling in the aspartate pathway. *Biochemistry* **41**:3726-3731
- Kaderbhai NN, Broadhurst DI, Ellis DI, Goodacre R, Kell DB (2003) Functional genomics via metabolic footprinting: monitoring metabolite secretion by *Escherichia coli* tryptophan metabolism mutants using FT-IR and direct injection electrospray mass spectrometry. *Compar Funct Genom* **4**:376-391
- Kiefer P, Nicolas C, Letisse F, Portais J-C (2007) Determination of carbon labeling distribution of intracellular metabolites from single fragment ions by ion chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* **360**:182-188
- Knippers R (2001) *Molekulare Genetik*, 8. Auflage, Thieme
- Kotre AM, Sullivan SJ, Savageau MA (1973) Metabolic regulation by homoserine in *Escherichia coli* B/r. *J Bacteriol* **116**:663-672

- Krämer R (1996) Genetic and physiological approaches for the production of amino acids. *J Biotechnol* **45**:1-21
- Krämer R (2004) Production of amino acids: physiological and genetic approaches. *Food Biotechnology* **18**:171-216
- Krömer JO, Sorgenfrei O, Klopprogge K, Heinzle E, Wittmann C (2004) In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome, and fluxome. *J Bacteriol* **186**:1769-1784
- Kruger NJ, Huddleston JE, LeLay P, Brown ND, Ratcliffe RG (2007) Network flux analysis: impact of <sup>13</sup>C-substrates on metabolism in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. *Phytochem* **68**:2176-2188
- Kruse D, Six S, Krämer R, Burkovski A (2001) Analysis of threonine uptake in *Escherichia coli* threonine production strains. *Biotechnol Lett* **23**:401-404
- Kruse D (2000) Threoninaufnahme und Threoninexkretion in *Escherichia coli*. Dissertation, Universität Köln
- Lafaye A, Labarre J, Tabet J-C, Ezan E, Junot C (2005) Liquid chromatography-mass spectrometry and <sup>15</sup>N metabolic labeling for quantitative metabolic profiling. *Anal Chem* **77**:2026-2033
- Leder IG (1972) Interrelated effects of cold shock and osmotic pressure on the permeability of the *Escherichia coli* membrane to permease accumulated substrates. *J Bacteriol* **111**:211-219
- Lee KH, Park JH, Kim TY, Kim HU, Lee SY (2007) Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production. *Molec Systems Biol*, **3**:1-8
- Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K (2005) Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* **69**:1-8
- Liu JQ, Dairi T, Itoh N, Kataoka M, Shimizu S, Yamada H (1998) Gene cloning, biochemical characterization and physiological role of a thermostable low-specificity L-threonine aldolase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, **255**:220-6
- Livshits VA, Zakataeva NP, Aleshin VV, Vitushkina MV (2003) Identification and characterization of the new gene *rhtA* involved in threonine and homoserine efflux in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **154**:123-135
- Lu W, Kimball E, Rabinowitz JD (2006) A high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitation of nitrogen-containing intracellular metabolites. *J Am Soc Mass Spectrom* **17**:37-50
- Luo B, Grönke K, Takors R, Wandrey C, Oldiges M (2007) Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1147**:153-164

## Literatur

- Lussem S (2006) Optimierung der fermentativen Threoninproduktion in *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Fachhochschule Jena
- Magnus JB, Hollwedel D, Oldiges M, Takors R (2006) Monitoring and modeling of the reaction dynamics in the valine/leucine synthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Prog* **22**:1071-1083
- Maharjan RP, Ferenci T (2003) Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*. *Anal Biochem* **313**:145-154
- Makita M, Yamamoto S, Kono M (1976) Gas-liquid chromatographic analysis of protein amino acids as N-isobutyloxycarbonylamino acid methyl esters. *J Chrom* **120**:129-140
- Marcus JP, Dekker EE (1993) Threonine formation via the coupled activity of 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A lyase and threonine dehydrogenase. *J Bacteriol* **175**:6505-6511
- Mashego MR, Wu L, Van Dam JC, Ras C, Vinke JL, Van Winden WA, Van Gulik WM, Heijnen JJ (2004) MIRACLE: mass isotopomer ratio analysis of U-<sup>13</sup>C-labeled extracts. A new method for accurate quantification of changes in concentrations of intracellular metabolites. *Biotechnol Bioeng* **85**:620-628
- Milner JL, Vink B, Wood JM (1987) Transmembrane amino acid flux in bacterial cells. *Critical Reviews in Biotechnology* **5**:1-47
- Moore S, Spackmann DH, Stein WH (1958) Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *Anal Chem* **30**:1185-1190
- Murphy AT, Brown-Augsburger P, Yu RZ, Geary R.S, Thibodeaux S, Ackermann BL (2005) Development of an ion-pair reverse-phase liquid chromatographic/tandem mass spectrometry method for the determination of an 18-mer phosphorothioate oligonucleotide in mouse liver tissue. *Eur J Mass Spectrom* **11**:209-215
- Nakada HI (1964) Glutamic-glycine transaminase from rat liver. *J Biol Chem* **239**:468-71
- Namera A (2002) Direct extract derivatisation for determination of amino acids in human urine by gas chromatography and mass spectrometry. *J Chromatography B* **776**:49-55
- Nelson DL, Cox MM, (2001) *Lehninger Biochemie*, Springer, Berlin, 3. Auflage
- Nielsen J (2001) Metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**:263-283
- Niessen WMA (1998) Advances in instrumentation in liquid chromatography-mass spectrometry and related liquid-introduction techniques. *J Chrom A* **764**:407-435
- Nikaido H (2003) Molecular basis of outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**:593-656
- Nöh K, Wiechert W (2005) From stationary to instationary metabolic flux analysis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **92**:145-172

- Nöh K, Grönke K, Luo B, Takors R, Oldiges M, Wiechert W (2007) Metabolic flux analysis at ultra short time scale: Isotopically non-stationary  $^{13}\text{C}$  labeling experiments. *J Biotechnol* **129**:249-267
- Ogston AG (1948) Interpretation of experiments on metabolic processes, using isotopic tracer elements. *Nature* **162**:963
- Okuno E, Minatogawa Y, Kido R (1982) Co-purification of alanine-glyoxylate aminotransferase with 2-aminobutyrate aminotransferase in rat kidney. *Biochim Biophys Acta* **715**:97-104
- Oldiges M (2004) Metabolomanalyse zur Untersuchung der Dynamik im Aromatenbiosyntheseweg in L-Phenylalanin Produzenten von *Escherichia coli*. Dissertation, Universität Bonn
- Oldiges M, Kunze M, Degenring D, Sprenger GA, Takors R (2004) Stimulation, monitoring, and analysis of pathway dynamics by metabolic profiling in the aromatic amino acid pathway. *Biotechnol Prog* **20**:1623-1633
- Oldiges M, Takors R (2005) Applying metabolic profiling techniques for stimulus-response experiments: chances and pitfalls. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **92**:173-96
- Oldiges M, Lütz S, Pflug S, Schroer K, Stein N, Wiendahl C (2007) Metabolomics: current state and evolving methodologies and tools. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**:495-511
- Patte JC, Biosynthesis of threonine and lysine. In Neidhardt FC (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, Washington DC, ASM Press
- Pei J, Li X (2000) Determination of underivatized amino acids by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection at an amino acid oxidase immobilized  $\text{CuPtCl}_6$  modified electrode. *Fresenius' J Anal Chem* **367**:707-713
- Peter K, Vollhardt C, Schore NE (1995) Organische Chemie. Zweite Auflage, VCH, Weinheim
- Petritis KN, Chaimbault P, Elfakir C, Dreux M (1999) Ion-pair reversed-phase liquid chromatography for determination of polar underivatized amino acids using perfluorinated carboxylic acids as ion pairing agent. *J Chrom A* **833**:147-155
- Petritis KN, Chaimbault P, Elfakir C, Dreux M (2000) Parameter optimization for the analysis of underivatized protein amino acids by liquid chromatography and ionspray tandem mass spectrometry. *J Chrom A* **896**:253-263
- Pingitore F, Tang Y, Kruppa GH, Keasling JD (2007) Analysis of amino acid isotopomers using FT-ICR MS. *Anal Chem* **79**:2483-2490
- Piraud M, Vianey-Saban C, Petritis K, Elfakir C, Steghens JP, Morla A, Bouchu D (2003) ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionisation mode. *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**:1297-1311

## Literatur

- Piraud M, Vianey-Saban C, Petritis K, Elfakir C, Steghens JP, Bouchu D (2005) Ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric analysis of 76 underivatized amino acids of biological interest: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**:1587-1602
- Qian T, Cai Z, Yang MS (2004) Determination of adenosine nucleotides in cultured cells by ion-pairing liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochemistry* **325**:77-84
- Qu J, Chen W, Luo G, Wang Y, Xiao S, Ling Z, Chen G (2002) Rapid determination of underivatized pyroglutamic acid, glutamic acid, glutamine and other relevant amino acids in fermentation media by LC-MS-MS. *Analyst* **127**:66-69
- Qu J, Wang Y, Luo G, Wu Z, Yang C (2002) Validated quantitation of underivatized amino acids in human blood samples by volatile ion-pair reversed-phase liquid chromatography coupled to isotope dilution tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **74**:2034-2040
- Raïs B, Chassagnole C, Letellier T, Fell DA, Mazat J-P (2001) Threonine synthesis from aspartate in *Escherichia coli* cell-free extracts: pathway dynamics. *J Biochem* **356**:425-432
- Rashed MS (2001) Clinical applications of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases. *J Chromatogr B* **758**:27-48
- Rees WD, Flint HJ, Fuller MF (1990) A molecular biological approach to reducing dietary amino acid needs. *Biotechnol* **8**:629-633
- Rehm H-J, Reed G (1996) *Biotechnology, volume 6, products of primary metabolism, second, completely revised edition*, VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo
- Rey MA, Pohl CA (1996) Novel cation-exchange stationary phase for the separation of amines and six common inorganic cations. *J Chrom A*, **739**:87-97
- Rod ML, Alam KY, Cunningham PR, Clark DP (1988) Accumulation of trehalose by *Escherichia coli* K-12 at high osmotic-pressure depends on the presence of amber suppressors. *J Bacteriol* **170**:3601-3610
- Rogalewicz F, Hoppilliard Y, Ohanessian G (2000) Fragmentation mechanism of  $\alpha$ -amino acids protonated under electrospray ionization: a collisional activation and ab initio theoretical study. *Int J Mass Spectrom* **195/196**:565-590
- Schlegel HG (1992) *Allgemeine Mikrobiologie, 7. überarbeitete Auflage*, Thieme, Stuttgart, New York
- Schmid RD (2006) *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik, 2. Auflage* Wiley-VCH, Weinheim, Germany

- Shames SL, Wedler FC (1984) Homoserine kinase of *Escherichia coli*: kinetic mechanism and inhibition by L-aspartate semialdehyde. *Arch Biochem Biophys* **235**:359-370
- Shames SL, Ash DE, Wedler FC, Villafranca JJ (1984) Interaction of aspartate and aspartate-derived antimetabolites with the enzymes of the threonine biosynthetic pathway of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **259**:15331-15339
- Shryock JC, Rubio R, Berne RM (1986) Extraction of adenine-nucleotides from cultured endothelial-cells. *Anal Biochem* **204**:118-123
- Strelkov S, Elstermann M, Schomburg D (2004) Comprehensive analysis of metabolites in *Corynebacterium glutamicum* by gas chromatography/mass spectrometry. *Biol Chem* **385**:853-861
- Su HS, Lang BF, Newman EB (1989) L-serine degradation in *Escherichia coli* K-12: cloning and sequencing of the sdaA gene. *J Bacteriol* **171**:5095-102
- Szczesiul M, Wampler DE (1976) Regulation of metabolic system *in vitro*: synthesis of threonine from aspartic acid. *Biochem* **15**:2236-2244
- Takors R, Bathe B, Rieping M, Hans S, Kelle R, Huthmacher K (2007) Systems biology for industrial strains and fermentation processes—example: amino acids. *J Biotechnol* **129**:181–190
- Täufel, Ternes, Tunger, Zobel (1998) *Lebensmittellexikon*, 3. neubearbeitete und aktualisierte Auflage, Behr's Verlag, Hamburg
- Thèze J, Kleidman L, Saint-Girons I (1974) Homoserine kinase from *Escherichia coli* K-12: properties, inhibition by L-threonine, and regulation of biosynthesis. *J Bacteriol* **118**:577-581
- Thiele B, Füllner K, Stein N, Oldiges M, Kuhn A, Hofmann D (2008) Analysis of amino acids without derivatization in barley extracts by LC-MS-MS. *Anal Bioanal Chem* **391**:2663-2672
- Thomson BA, Iribane JV (1979) Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *J Chem Phys* **71**:4451-4463
- Thompson JS, Richardson KE (1966) Isolation and characterization of a glutamate-glycine transaminase from human liver. *Arch Biochem Biophys* **117**:599-603
- Tolstikov VV, Fiehn O (2002) Analysis of highly polar compounds of plant origin: combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry. *Anal Biochem* **301**:289-307
- Umbarger HE, Brown B. (1957) Threonine deamination in *Escherichia coli*. II. Evidence for two L-threonine deaminases. *J Bacteriol* **73**:105-12
- Van Dam JC, Eman MR, Frank J, Lange HC, van Dedem GWK, Heijnen JJ (2002) Analysis of glycolytic intermediates in *Saccharomyces cerevisiae* using anion exchange chromatography and electrospray ionization with tandem mass spectrometric detection. *Anal Chim Acta* **460**:209-218

## Literatur

- Van Eijk HM, Rooyackers DR, Soeters PB, Deutz NE (1999) Determination of amino acid isotope enrichment using liquid chromatography - mass spectrometry. *Anal Biochem* **271**:8-17
- Van Winden WA, van Dam JC, Ras C, Kleijn RJ, Vinke JL, van Gulik WM, Heijnen JJ (2005) Metabolic-flux analysis of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D based on mass isotopomer measurements of <sup>13</sup>C-labeled primary metabolites. *FEMS Yeast Research* **5**:559-568
- Villas-Boas SG, Mas S, Akesson M, Smedsgaard J, Nielsen J (2005a) Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom Rev* **24**:613-646
- Villas-Bôas SG, Højer-Pedersen J, Akesson M, Smedsgaard J, Nielsen J (2005b) Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. *Yeast* **22**:1155-1169
- Wahl A (2005) Methoden zur Analyse metabolischer Netzwerke im stationären und instationären Zustand. Dissertation, Universität Siegen
- Wellerdiek M, Winterhoff D, Reule W, Brandner J, Oldiges M (2009) Metabolic quenching of *Corynebacterium glutamicum*: efficiency of methods and impact of cold shock. *Bioprocess Biosyst Eng* **32**:581-592
- Wendisch VF, Bott M, Kalinowski J, Oldiges M, Wiechert W (2006) Emerging *Corynebacterium glutamicum* systems biology. *J Biotechnol* **124**:74-92
- Wiechert W (2001) Minireview <sup>13</sup>C metabolic flux analysis. *Metab Eng* **3**:195-206
- Wiendahl C, Noll T, Oldiges M (2006) Probenahmetechnik für die Metabolomanalyse von Säugerzellen in Suspensionskultur. *Chem Ing Tech* **78**:1430
- Williams JF, Blackmoore PF, Duke CC, MacLeod JK (1979) Fact, uncertainty and speculation concerning the biochemistry of D-erythrose-4-phosphate and its metabolic roles. *Int J Biochem* **12**:339-344
- Winder CL, Dunn WB, Schuler S, Broadhurst D, Jarvis R, Stephens GM, Goodacre R (2008) Global metabolic profiling of *Escherichia coli* cultures: an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites. *Anal Chem* **80**:2939-2948
- Wittman C, Heinzle E (2001) Application of MALDI-TOF MS to lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* - novel approach for metabolic flux analysis. *Eur J Biochem* **268**:2441-2455
- Wittmann C (2002) Metabolic flux analysis using mass spectrometry. *Adv Biochem Eng* **74**:39-64
- Wittmann C (2004) Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria. *Anal Biochem* **327**:135-139
- Wood HG, Werkman CH, Hemingway A, Nier AO (1941) Mechanism of fixation of carbon dioxide in the Krebs cycle. *J Biol Chem* **139**:483-484

- Wu L, Mashego MR, van Dam JC, Proell AM, Vinke JL, Ras C, van Winden WA, van Gulik WM, Heijnen JJ (2005) Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly  $^{13}\text{C}$ -labeled cell extracts as internal standards. *Anal Biochem* **336**:164-171
- Yamamoto K, Ishihama A (2003) Two different modes of transcription repression of the *Escherichia coli* acetate operon by IclR. *Mol Microbiol* **47**:183–194
- Ye JN, Baldwin RP (1994) Determination of amino acids and peptides by capillary electrophoresis and electrochemical detection at a copper electrode. *Anal Chem* **66**:2669-2674
- You J, Liu L, Zhao W, Zhao X, Suo Y, Wang H, Li Y (2007) Study of a new derivatizing reagent that improves the analysis of amino acids by HPLC with fluorescence detection: application to hydrolyzed rape bee pollen. *Anal Bioanal Chem* **387**:2705-2718
- Zakataeva NP, Aleshin VV, Tokmakova IL, Troshin PV, Livshits VA (1999) The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux. *FEBS Letters* **452**:228-232
- Zeller T (2006) Comparison of quantification strategies for  $^{13}\text{C}$ -labelled metabolome analysis in *Escherichia coli*. Master Thesis, Universität Bonn

[1] <http://www.metabolomics.bbsrc.ac.uk> (Stand: August 2005)

[2] [http://www.vias.org/tmanalytik\\_germ/hl\\_ms\\_intro.html](http://www.vias.org/tmanalytik_germ/hl_ms_intro.html), (Stand: Oktober 2007)

[3] Thermo Electron european training institute, TSQ Quantum operations, course manual (Stand: August 2006)

[4] [http://de.wikipedia.org/wiki/Massenspektrometrie#Quadrupol\\_Ionenfalle](http://de.wikipedia.org/wiki/Massenspektrometrie#Quadrupol_Ionenfalle), (Stand: Oktober 2007)

[5] Proteomics technology note "Understanding the QTrap™ System Technology" Applied Biosystems MDS Sciex, 2004

[6] Applied Biosystems, Training 4000QTrap - Vortrag (Stand: Juli 2004)

[7] [http://www.neighborhoodmarket.org/site/base.php?page\\_id=132](http://www.neighborhoodmarket.org/site/base.php?page_id=132) (Stand Juli 2007)

[8] <http://biocyc.org/ECOLI/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=THREONINE-DEG2-PWY> (Stand: Februar 2008)

[9] [http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/get\\_pathway?org\\_name=eco&mapno=00260](http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/get_pathway?org_name=eco&mapno=00260) (Stand: März 2008)

[10] <http://www.fz-juelich.de/ibt/ferm/apparatus-development/> (Stand: Januar 2008)

[11] Produktpräsentation, Keofitt 2004

[12] Produktblatt "Phosphat-Test,  $\text{PO}_4^{3-}$ , Reflectoquant", 1.16978.0001, Merck KGaA, Darmstadt

## Literatur

- [13] Skript des Lebensmittelchemisches Praktikums der Universität Hamburg (Stand: 2000)
- [14] Römpp Online, Thieme Chemistry, Version 3.4 (Stand: April 2009)
- [15] Thermo MS-*Software* Xcalibur Version 2.0
- [16] Grönke K, Dissertation, Universität Düsseldorf, in Vorbereitung
- [17] Wahl A, Entwicklung einer Software, 2006, Jülich

## 8 Anhang

### 8.1 Kultivierungsmedien

#### Plattenkultur

Minimalmedium (Hermann und Rieping 2003):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	3.5	g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5	g/L
NH <sub>4</sub> Cl	1	g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.1	g/L
Saccharose	2	g/L
Agar	20	g/L
Antibiotikum	20	µg/mL

LB-Medium (Oldiges 2004):

Trypton (Pepton aus Casein)	10	g/L
Hefeextrakt	10	g/L
NaCl	5	g/L
Agar-Agar	15	g/L

#### Schüttelkolbenkultur

Vorkulturmedium (Hermann und Rieping 2003):

Hefeextrakt	2	g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.5	g/L
CaCO <sub>3</sub>	15	g/L
Saccharose	20	g/L
Antibiotikum	20	µg/mL

LB-Medium (Oldiges 2004):

Trypton (Pepton aus Casein)	10	g/L
Hefeextrakt	10	g/L
NaCl	5	g/L

## Anhang

### **Fermentationsmedien**

*E. coli* MG 1655

M9-Medium (Zeller 2006):

Glucose	11	g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.25	g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5	g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1.5	g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2	g/L
NH <sub>4</sub> Cl	0.2	g/L
Structol	1	mL/L
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	50	mg

*E. coli* DM 1265

A1-144 (Hermann und Rieping 2003):

Saccharose	30	g/L
Hefeextrakt	2	g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	g/L
NaCl	0.6	g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.4	g/L
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	20	mg/L
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	20	mg/L
Ampicillin	50	mg/L
Structol	0.3	g/L

*E. coli* BKIIM und pthrB

A1-160 (Hermann und Rieping 2003):

Saccharose	40	g/L
Hefeextrakt	2	g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.4	g/L
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	20	mg/L
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	20	mg/L
Streptomycin	100	mg/L
Structol	0.2	g/L

## 8.2 Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Abgasanalysator	Binos 100 2M	Fisher-Rosemount Systems GmbH & Co., Haan, Deutschland
Abgaskühler	Cooler ECP	M&C TechGroup Germany GmbH, Ratingen, Deutschland
Amplifier (pO <sub>2</sub> )	Type 170	Ingold / Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
Autoklav	FOF4/ Thema I AutoclaviSPA T line 2284 ED Tuttnauer Autoclave Steam Sterilizer 2540 ELV	Fedegari, Albuzzano, Italien Tuttnauer, Wesel, Deutschland
Autosampler	S5200	Sykam, Fürstenfeldbruck, Deutschland
Caps	ALS G1329A	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
	AS G1367B	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Safe-lock Tubes	
Clean bench	Hera safe 12	Heraeus, Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Degasser	G1322A G1379A G1379B	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Detektor	DAD G1315B DAD G1315B FLD G1321A	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Dosimat	UVD 3440S YFCO2Z	Dionex, Idstein, Deutschland Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Druck Sensor	PR-25HT/8931A	Keller Gesellschaft für Druckmesstechnik mbH, Jestetten, Deutschland
Einmalküvetten	PLASTIBRAND <sup>®</sup> , Halb-Mikro	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Erlenmeyerkolben	500 mL, 1000 mL	Schott AG, Mainz, Deutschland
Falcon Tubes	50 mL Centrifuge Tube 15 mL Centrifuge Tube	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Filter	Cellulose Nitrate Filter 11407-25-N 0.2 µm	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Filter	Filtereinheit FP 30/ 0,2 CA 0.2 µm	Schleicher&Schuell, Dassel, Germany
Flaschen	diverse	Schott AG, Mainz, Deutschland
Gel-pH-Elektrode	Fermprobe Housing	Broadley James, Bedford, UK
Glaspipetten Hirschmann EM	5-50 mL	Cole-Parmer, London, England
Glucose Teststreifen für Diabetiker	ACCU-CHEK <sup>®</sup> Sensor Comfort	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Inkubator	BG030 70 °C	Heraeus, Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Inkubator	U15	Memmert, Schwabach, Deutschland
Katalysator	EcoTec Converter	Bauer, München, Deutschland
Kryoröhrchen-Nalgene <sup>®</sup>	5000	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Kühl-, Gefrierschränke		Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland

## Anhang

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Magnet Rührer	IKAMAG RET-G	Jan&Kunkel GmbH&CoKG IKA ® -Labortechnik
Massenspektrometer	4000 Q Trap™ linear ion trap tandem mass spectrometer, Model 1004229	Applied Biosystems MDS Sciex, Concord, Canada
Massenspektrometer	TSQ Quantum Ultra™ LC- MS/MS	Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, USA
Mikroskop	DMLB Leica	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrotiterplatte		Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Petrischalen	DMR 90 mm	Anicrin, Scorze, Italien
pH-Elektrode	405 DPAS-SC-K8S-325 <i>combination</i>	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
pH-Meter	632 pH-Meter	Metrohm, Filderstadt, Deutschland
Phosphattest	Reflectoquant ® Phosphate test Method: reflectometric PMB 1.16978.0001	Merck, Darmstadt, Deutschland
Photometer	UV-1700 Pharma Spec UV-visible Spectrophotometer	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Pilot-Minimagnetventil	Typ 6012P	Bürkert GmbH & Co KG, Menden, Deutschland
Pipetten	Research/Reference	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Finnpipette ®	Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, USA
Pipetten	Transferpette ® -12 (5-50 µL; 30-300 µL)	Molecular Devices Beckman, Sunnyvale, CA, USA
Plattenreader	ThermoMax	Molecular Devices Beckman, Sunnyvale, CA, USA
Plattenreader	Wallac Victor <sup>2</sup>	PerkinElmer, Bad Wildbad, Deutschland
Power panel		B&R / Bernecker + Rainer Industrie Elektronik GmbH, Eggelsberg, Deutschland
Probensteller (Schnelle Probenahme)	Probenahmesystem 8MSA4M.E0-00	B&R Industrie-Elektronik GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Programmer	S2000	Sykam, Fürstenfeldbruck, Deutschland
Pumpen	U101, U501, F101	Smith&Nephew Watson Marlow, Ilsfeld, Deutschland
Pumpen (HPLC)	S1000	Sykam, Fürstenfeldbruck, Deutschland
Säulen	Pump G1312A	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
	Pump G1312A	
	Aminex HPX 87H (300*7.8 mm)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Säulenofen	LiCrospher 100 RP EC (125*4 mm)	CS GmbH, Langerwehe, Deutschland
	Luna® 5u SCX 100A (150*2 mm)	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
	Synergi Hydro-RP C18 4µ 80Å (150x2.1 mm)	
	S4110	Sykam, Fürstenfeldbruck, Deutschland
	G1316A	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
	CO G1316A	

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Sauerstoffelektrode	InPro6800	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
Schlauchquetschventil		Bio-Chem, Omnifit Ltd., Cambridge, England
Schüttelinkubator	3033	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Schüttler	TitraMax 100	Molecular Devices Beckman, Sunnyvale, CA, USA
Sterile Kanülen	Sterican (0.9 x 70 mm; 0.9 x 40 mm)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Sterile Filter	Millex ® GP Syringe Driven Filter unit 0.22 µm	Millipore, Schwalbach, Germany
Sterile Filter	Acro ® 37 TF Vent device 0.2 µm	Pall GmbH, Dreieich, Deutschland
Sterile Spritzen	Injekt 2-20 mL Omnifix-F 1 mL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Stickstoffgenerator	NM20ZA Stickstoff Generator	Peak Scientific, Bedford, MA, USA
Stickstoffgenerator	Maxigas Modul N2MAX108	Domnick Hunter, Gateshead, England
Software	Softmax	Molecular Devices Beckman, Sunnyvale, CA, USA
	Chromeleon 6.4	Dionex, Idstein, Deutschland
	Analyst 1.4.1	Sciex, Concord, Canada
	Xcalibur 2.0	Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, USA
Spritzenpumpe	Syringe Pump 11 PLUS	Harvard Apparatus, Holliston, USA
Thermostat (HPLC)	ALS Therm G1330B Therm G1330B	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Thermostat (Ethanolbad)	Thermo-Haake C50P	Phoenix ContiTech AG, Hannover, Deutschland
Trockenschränke		Heraeus, Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Tips	epT.I.P.S.	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Überkopf-Mischer Verdünnungsgerät Vakuumpumpe	Reax 2 Microlab 1000 Divac 2.4 L	Heidolph, Kelheim, Deutschland Hamilton, Bonaduz, Schweiz Oerlikon Leybold, Köln, Deutschland
Ventil	VPAK-PS-ESD/USD/VSD-G	Aerre Inox, Fiesco Cremona, Italien
Ventil	Ventiltyp 0330	Bürkert GmbH & Co KG, Ingelfingen, Deutschland
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Waagen	L 2200 P BP 110 Research R160 P A 200 S I6800 TB 6KG	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wasseraufbereitungssystem		Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland Millipore, Schwalbach, Germany

## Anhang

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Zentrifugen	Biofuge <sup>®</sup> pico	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
	Allegra <sup>™</sup> Centrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Zentrifugenrotoren	Conical C0650 Conical C1015	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

### 8.3 Chemikalien

Chemikalie	Bezeichnung	Hersteller
AA Sigma Standard	Amino Acid Standard AAS18-5ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Steinheim, Deutschland
Aceton		Merck, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril	HPLC supra-gradient	Biosolve, Brüssel, Belgien
Agar-Agar	Für die Mikrobiologie	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aminosäuren Sigma-Kit LAA21	L-Alanin ≥ 98% L-Arginin ≥ 98% Hydrochlorid L-Asparagin ≥ 98% L-Aspartat ≥ 98% L-Cystein ≥ 98% L-Cystin L-Glutamat ≥ 99% L-Glutamin ≥ 99% Glycin ≥ 99% L-Histidin Hydrochlorid ≥ 98% L-Isoleucin ≥ 98% L-Leucin ≥ 98% L-Lysin Hydrochlorid ≥ 98% L-Methionin ≥ 98% L-Phenylalanin ≥ 98% L-Prolin ≥ 99% L-Serin ≥ 99% L-Threonin ≥ 98% L-Tryptophan ≥ 98% L-Tyrosin ≥ 98% L-Valin ≥ 98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Steinheim, Deutschland
Ammonium Acetat	puris p.a. (pro analysis) for MS	Fluka, Buchs, Schweiz
Ampicillin	Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Steinheim, Deutschland
U <sup>13</sup> C <sub>4</sub> -Aspartat	L-Aspartic acid (U-13C <sub>4</sub> , 98%) CLM-1801-0.25	Cambridge Isotope Laboratories Incorporation, Saarbrücken, Deutschland
U <sup>13</sup> C D-Glucose	(U-13C <sub>6</sub> , 99%) CLM-1396-0 10 g	Cambridge Isotope Laboratories Incorporation, Saarbrücken, Deutschland
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O		Merck, Darmstadt, Deutschland
CaCO <sub>3</sub>	precipitated p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	ROTIPURAN® 100 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Ethanol		Merck, Darmstadt, Deutschland
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glucose · H <sub>2</sub> O		Roquette Italia S.P.A., Cassano Spinola, Italien

## Anhang

Chemikalie	Bezeichnung	Hersteller
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Glycerin		Boehringer, Ingelheim, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	Für die Mikrobiologie	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hexokinase		Boehringer, Ingelheim, Deutschland
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	anhydrous extra pure	Merck Darmstadt, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	A.C.S. reagent	Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Steinheim, Deutschland
KOH		Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol		Merck, Darmstadt, Deutschland
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	spray-dried GR for analysis	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl		Merck, Darmstadt, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O		Merck, Darmstadt, Deutschland
NaOH		Merck, Darmstadt, Deutschland
NH <sub>3</sub>	25% p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
NH <sub>4</sub> CL	extra pure	Merck, Darmstadt, Deutschland
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pepton	Aus Casein pankreatisch verdaut, für die Mikrobiologie	Merck, Darmstadt, Deutschland
Perchlorsäure		Merck, Darmstadt, Deutschland
Phosphattest		Merck, Darmstadt, Deutschland
Pufferlösungen		Merck, Darmstadt, Deutschland
Pursept		Merz GmbH & Co. KGaA, Frankfurt, Deutschland
Structol		Zur Verfügung gestellt von der Degussa AG, Halle, Deutschland
Streptomycinsulfat Viabilitätstest	Live/Dead® BacLight™	Fluka, Buchs, Schweiz Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Zentralstoffwechsel Metabolite	Acetyl Coenzym A tri-Lithiumsalz	~ 95% AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
	Adenosin-5'-diphosphat Natriumsalz	≥ 97% Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Steinheim, Deutschland
	Adenosin-5'-monophosphat Natriumsalz	≥ 99%

Chemikalie	Bezeichnung	Hersteller
	Adenosin-5'-triphosphat Natriumsalz	≥ 99% Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
	cis-Aconitat	≥ 98% Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Steinheim, Deutschland
	D-Äpfelsäure	≥ 98%
	Bernsteinsäure	≥99,5% Merck, Darmstadt, Deutschland
	Brenztraubensäure	≥ 99%
	Dihydroxyacetonphosphat di-Lithiumsalz	≥ 95% Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Steinheim, Deutschland
	Erythrose-4-phosphat Natriumsalz	61%
	D-Fructose-1,6-bisphosphat tri-Natriumsalz	≥ 98%
	D-Fructose-6-phosphat di-Natriumsalz Dihydrat	99%
	Fumarsäure	≥99,5% Fluka, Buchs, Schweiz
	D-Glucose-6-phosphat Natriumsalz	100% Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Steinheim, Deutschland
	DL-Glyceraldehyd-3-phosphat Lösung	
	Glyoxylat Natriumsalz Monohydrat	≥ 97% Fluka, Buchs, Schweiz
	Guanosin-3',5'-cyclic monophosphat Natriumsalz	≥ 99%
	DL-Isozitroneinsäure tri-Natriumsalz	≥ 95% Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Steinheim, Deutschland
	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid Hydrat	97%
	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert, di-Natriumsalz Hydrat	~ 95%
	α-Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat Natriumsalz	~ 97%
	β-Nicotinamid-adenine-dinucleotid-2'-phosphat, reduziert, tetra-Natriumsalz	98%
	2-Oxoglutarinsäure	≥ 97% Merck, Darmstadt, Deutschland
	Phospho(enol)Pyruvat Mono-Natriumsalz Hydrat	99% Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Steinheim, Deutschland
	6-Phosphogluconsäure tri-Natriumsalz	100%
	D(+)-2-Phosphoglycerat Natriumsalz Hydrat	96%
	D(-)-3-Phosphoglycerat di-Natriumsalz	~ 95%

## Anhang

<b>Chemikalie</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
	D-Ribose-5-phosphat di-Natriumsalz Hydrat	98-100% Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Steinheim, Deutschland
	D-Ribulose-5-phosphat di-Natriumsalz	≥ 96% Fluka, Buchs, Schweiz
	D-Sedoheptulose-7-phosphat	Glycoteam GmbH, Hamburg, Deutschland
	Shikimat	≥ 99% Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Steinheim, Deutschland
	D-Xylulose-5-phosphat Natriumsalz	~ 75% Fluka, Buchs, Schweiz
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	Zitronensäure Lithiumsalz	≥99,5% Merck, Darmstadt, Deutschland

## 8.4 MRM-Übergänge für die Messung markierter Aminosäuren

Aspartat:	133,1 - 74,1	Spur vor Aspartat
C <sub>4</sub>	134,1 - 74,1	Aspartat unmarkiert
	135,1 - 74,1	Aspartat +1
	135,1 - 75,1	Aspartat +1
	136,1 - 74,1	Aspartat +2
	136,1 - 75,1	Aspartat +2
	136,1 - 76,1	Aspartat +2
	137,1 - 75,1	Aspartat +3
	137,1 - 76,1	Aspartat +3
	138,1 - 76,1	Aspartat +4
	139,1 - 76,1	Spur nach Aspartat
Glutamat:	147,1 - 84,0	Spur vor Glutamat
C <sub>5</sub>	148,1 - 84,0	Glutamat unmarkiert
	149,1 - 84,0	Glutamat +1
	149,1 - 85,0	Glutamat +1
	150,1 - 85,0	Glutamat +2
	150,1 - 86,0	Glutamat +2
	151,1 - 86,0	Glutamat +3
	151,1 - 87,0	Glutamat +3
	152,1 - 87,0	Glutamat +4
	152,1 - 88,0	Glutamat +4
	153,1 - 88,0	Glutamat +5
	154,1 - 88,0	Spur nach Glutamat
Threonin/Homoserin:	119,2 - 74,1	Spur vor Threonin/Homoserin
C <sub>4</sub>	120,2 - 74,1	Threonin/Homoserin unmarkiert
	121,2 - 74,1	Threonin/Homoserin +1
	121,2 - 75,1	Threonin/Homoserin +1
	122,2 - 75,1	Threonin/Homoserin +2
	122,2 - 76,1	Threonin/Homoserin +2
	123,2 - 76,1	Threonin/Homoserin +3
	123,2 - 77,1	Threonin/Homoserin +3
	124,2 - 77,1	Threonin/Homoserin +4
	125,2 - 77,1	Spur nach Threonin/Homoserin
Aspartatsemialdehyd:	116,9 - 74,0	Spur vor Aspartat-semialdehyd
C <sub>4</sub>	117,9 - 74,0	Aspartat-semialdehyd unmarkiert
	118,9 - 74,0	Aspartat-semialdehyd +1
	118,9 - 75,0	Aspartat-semialdehyd +1
	119,9 - 75,0	Aspartat-semialdehyd +2
	119,9 - 76,0	Aspartat-semialdehyd +2
	120,9 - 76,0	Aspartat-semialdehyd +3
	120,9 - 77,0	Aspartat-semialdehyd +3
	121,9 - 77,0	Aspartat-semialdehyd +4
	122,9 - 77,0	Spur nach Aspartat-semialdehyd

## Anhang

Asparagin: C <sub>4</sub>	132,0 - 87,0	Spur vor Asparagin
	133,0 - 87,0	Asparagin unmarkiert
	134,0 - 87,0	Asparagin +1
	134,0 - 88,0	Asparagin +1
	135,0 - 88,0	Asparagin +2
	135,0 - 89,0	Asparagin +2
	136,0 - 89,0	Asparagin +3
	136,0 - 90,0	Asparagin +3
	137,0 - 90,0	Asparagin +4
	138,0 - 90,0	Spur nach Asparagin
Serin: C <sub>3</sub>	105,1 - 60,0	Spur vor Serin
	106,1 - 60,0	Serin unmarkiert
	107,1 - 60,0	Serin +1
	107,1 - 61,0	Serin +1
	108,1 - 61,0	Serin +2
	108,1 - 62,0	Serin +2
	109,1 - 62,0	Serin +3
	110,1 - 62,0	Spur nach Serin
Tyrosin: C <sub>9</sub>	181,1 - 136,1	Spur vor Tyrosin
	182,1 - 136,1	Tyrosin unmarkiert
	183,1 - 136,1	Tyrosin +1
	183,1 - 137,1	Tyrosin +1
	184,1 - 137,1	Tyrosin +2
	184,1 - 138,1	Tyrosin +2
	185,1 - 138,1	Tyrosin +3
	185,1 - 139,1	Tyrosin +3
	186,1 - 139,1	Tyrosin +4
	186,1 - 140,1	Tyrosin +4
	187,1 - 140,1	Tyrosin +5
	187,1 - 141,1	Tyrosin +5
	188,1 - 141,1	Tyrosin +6
	188,1 - 142,1	Tyrosin +6
	189,1 - 142,1	Tyrosin +7
	189,1 - 143,1	Tyrosin +7
	190,1 - 143,1	Tyrosin +8
190,1 - 144,1	Tyrosin +8	
191,1 - 144,1	Tyrosin +9	
192,1 - 144,1	Spur nach Tyrosin	
Glutamin: C <sub>5</sub>	146,2 - 84,1	Spur vor Glutamin
	147,2 - 84,1	Glutamin unmarkiert
	148,2 - 84,1	Glutamin +1
	148,2 - 85,1	Glutamin +1
	149,2 - 85,1	Glutamin +2
	149,2 - 86,1	Glutamin +2
	150,2 - 86,1	Glutamin +3
	150,2 - 87,1	Glutamin +3
	151,2 - 87,1	Glutamin +4
	151,2 - 88,1	Glutamin +4
152,2 - 88,1	Glutamin +5	
153,2 - 88,1	Spur nach Glutamin	

Alanin: C <sub>3</sub>	89,1 - 44,1	Spur vor Alanin
	90,1 - 44,1	Alanin unmarkiert
	91,1 - 44,1	Alanin +1
	91,1 - 45,1	Alanin +1
	92,1 - 45,1	Alanin +2
	92,1 - 46,1	Alanin +2
	93,1 - 46,1	Alanin +3
	94,1 - 46,1	Spur nach Alanin
Methionin: C <sub>5</sub>	149,1 - 104,0	Spur vor Methionin
	150,1 - 104,0	Methionin unmarkiert
	151,1 - 104,0	Methionin +1
	151,1 - 105,0	Methionin +1
	152,1 - 105,0	Methionin +2
	152,1 - 106,0	Methionin +2
	153,1 - 106,0	Methionin +3
	153,1 - 107,0	Methionin +3
	154,1 - 107,0	Methionin +4
	154,1 - 108,0	Methionin +4
	155,1 - 108,0	Methionin +5
	156,1 - 108,0	Spur nach Methionin
	Prolin: C <sub>5</sub>	115,0 - 70,1
116,0 - 70,1		Prolin unmarkiert
117,0 - 70,1		Prolin +1
117,0 - 71,1		Prolin +1
118,0 - 71,1		Prolin +2
118,0 - 72,1		Prolin +2
119,0 - 72,1		Prolin +3
119,0 - 73,1		Prolin +3
120,0 - 73,1		Prolin +4
120,0 - 74,1		Prolin +4
121,1 - 74,1		Prolin +5
122,1 - 74,1		Spur nach Prolin
Glycin: C <sub>2</sub>	75,0 - 48,1	Spur vor Glycin
	76,0 - 48,1	Glycin unmarkiert
	77,0 - 48,1	Glycin +1
	77,0 - 49,1	Glycin +1
	78,0 - 49,1	Glycin +2
	79,0 - 49,1	Spur nach Glycin
Valin: C <sub>5</sub>	117,1 - 72,0	Spur vor Valin
	118,1 - 72,0	Valin unmarkiert
	119,1 - 72,0	Valin +1
	119,1 - 73,0	Valin +1
	120,1 - 73,0	Valin +2
	120,1 - 74,0	Valin +2
	121,1 - 74,0	Valin +3
	121,1 - 75,0	Valin +3
	122,1 - 75,0	Valin +4
	122,1 - 76,0	Valin +4
	123,1 - 76,0	Valin +5
124,1 - 76,0	Spur nach Valin	

## Anhang

Isoleucin/Leucin: C <sub>6</sub>	131,1 - 86,0	Spur vor Isoleucin/Leucin
	132,1 - 86,0	Isoleucin/Leucin unmarkiert
	133,1 - 86,0	Isoleucin/Leucin +1
	133,1 - 87,0	Isoleucin/Leucin +1
	134,1 - 87,0	Isoleucin/Leucin +2
	134,1 - 88,0	Isoleucin/Leucin +2
	135,1 - 88,0	Isoleucin/Leucin +3
	135,1 - 89,0	Isoleucin/Leucin +3
	136,1 - 89,0	Isoleucin/Leucin +4
	136,1 - 90,0	Isoleucin/Leucin +4
	137,1 - 90,0	Isoleucin/Leucin +5
	138,1 - 90,0	Spur nach Isoleucin/Leucin
	Phenylalanin: C <sub>9</sub>	165,1 - 120,0
166,1 - 120,0		Phenylalanin unmarkiert
167,1 - 120,0		Phenylalanin +1
167,1 - 121,0		Phenylalanin +1
168,1 - 121,0		Phenylalanin +2
168,1 - 122,0		Phenylalanin +2
169,1 - 122,0		Phenylalanin +3
169,1 - 123,0		Phenylalanin +3
170,1 - 123,0		Phenylalanin +4
170,1 - 124,0		Phenylalanin +4
171,1 - 124,0		Phenylalanin +5
171,1 - 125,0		Phenylalanin +5
172,1 - 125,0		Phenylalanin +6
172,1 - 126,0		Phenylalanin +6
173,1 - 126,0		Phenylalanin +7
173,1 - 127,0		Phenylalanin +7
174,1 - 127,0		Phenylalanin +8
174,1 - 128,0		Phenylalanin +8
175,1 - 128,0	Phenylalanin +9	
176,1 - 128,0	Spur nach Phenylalanin	
Tryptophan: C <sub>11</sub>	204,1 - 187,9	Spur vor Tryptophan
	205,1 - 187,9	Tryptophan unmarkiert
	206,1 - 188,9	Tryptophan +1
	207,1 - 189,9	Tryptophan +2
	208,1 - 190,9	Tryptophan +3
	209,1 - 191,9	Tryptophan +4
	210,1 - 192,9	Tryptophan +5
	211,1 - 193,9	Tryptophan +6
	212,1 - 194,9	Tryptophan +7
	213,1 - 195,9	Tryptophan +8
	214,1 - 196,9	Tryptophan +9
215,1 - 197,9	Tryptophan +10	
216,1 - 198,9	Tryptophan + 11	
217,1 - 198,9	Spur nach Tryptophan	

Lysin: C <sub>6</sub>	146,1 - 130,0	Spur vor Lysin
	147,1 - 130,0	Lysin unmarkiert
	148,1 - 131,0	Lysin +1
	149,1 - 132,0	Lysin +2
	150,1 - 133,0	Lysin +3
	151,1 - 134,0	Lysin +4
	152,1 - 135,0	Lysin +5
	153,1 - 136,0	Lysin +6
	154,1 - 136,0	Spur nach Lysin
Histidin: C <sub>6</sub>	155,1 - 110,0	Spur vor Histidin
	156,1 - 110,0	Histidin unmarkiert
	157,1 - 110,0	Histidin +1
	157,1 - 111,0	Histidin +1
	158,1 - 111,0	Histidin +2
	158,1 - 112,0	Histidin +2
	159,1 - 112,0	Histidin +3
	159,1 - 113,0	Histidin +3
	160,1 - 113,0	Histidin +4
	160,1 - 114,0	Histidin +4
	161,1 - 114,0	Histidin +5
	161,1 - 115,0	Histidin +5
	162,1 - 115,0	Histidin +6
	163,1 - 115,0	Spur nach Histidin
Arginin: C <sub>6</sub>	174,1 - 70,1	Spur vor Arginin
	175,1 - 70,1	Arginin unmarkiert
	176,1 - 70,1	Arginin +1
	176,1 - 71,1	Arginin +1
	177,1 - 70,1	Arginin +2
	177,1 - 71,1	Arginin +2
	177,1 - 72,1	Arginin +2
	178,1 - 71,1	Arginin +3
	178,1 - 72,1	Arginin +3
	178,1 - 73,1	Arginin +3
	179,1 - 72,1	Arginin +4
	179,1 - 73,1	Arginin +4
	179,1 - 74,1	Arginin +4
	180,1 - 73,1	Arginin +5
	180,1 - 74,1	Arginin +5
181,1 - 74,1	Arginin +6	
182,1 - 74,1	Spur vor Arginin	
Cystein: C <sub>3</sub>	119,0 - 76,1	Spur vor Cystein
	120,0 - 76,1	Cystein unmarkiert
	121,0 - 76,1	Cystein +1
	121,0 - 77,1	Cystein +1
	122,0 - 77,1	Cystein +2
	122,0 - 78,1	Cystein +2
	123,0 - 78,1	Cystein +3
124,0 - 78,1	Spur nach Cystein	