

# Stressantwort von Mikroorganismen

Friederike Schädel

**ibvt-Schriftenreihe**

Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik  
der Technischen Universität Braunschweig

Herausgegeben von Prof. Dr. Christoph Wittmann

**Band 55**

**Cuvillier-Verlag  
Göttingen, Deutschland**

Herausgeber  
Prof. Dr. Christoph Wittmann  
Institut für Bioverfahrenstechnik  
TU Braunschweig  
Gaußstraße 17, 38106 Braunschweig  
[www.ibvt.de](http://www.ibvt.de)

**Hinweis:** Obgleich alle Anstrengungen unternommen wurden, um richtige und aktuelle Angaben in diesem Werk zum Ausdruck zu bringen, übernehmen weder der Herausgeber, noch der Autor oder andere an der Arbeit beteiligten Personen eine Verantwortung für fehlerhafte Angaben oder deren Folgen. Eventuelle Berichtigungen können erst in der nächsten Auflage berücksichtigt werden.

#### **Bibliographische Informationen der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliographie; detaillierte bibliographische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. – Göttingen: Cuvillier, 2011

© Cuvillier-Verlag · Göttingen 2011  
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen  
Telefon: 0551-54724-0  
Telefax: 0551-54724-21  
[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte, auch das der Übersetzung, vorbehalten

Dieses Werk – oder Teile daraus – darf nicht vervielfältigt werden, in Datenbanken gespeichert oder in irgendeiner Form – elektronisch, fotomechanisch, auf Tonträger oder sonst wie – übertragen werden ohne die schriftliche Genehmigung des Verlages.

1. Auflage, 2011

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 978-3-86955-746-5

ISSN 1431-7230

# Stressantwort von Mikroorganismen

Von der Fakultät für Maschinenbau  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung der Würde  
einer Doktor-Ingenieurin (Dr.-Ing.)  
genehmigte Dissertation

von  
Dipl.-Ing. Friederike Schädel

aus  
Heldringen

---

Die folgende Arbeit wurde an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Fakultät für Maschinenbau als Dissertation angefertigt.

eingereicht am: 10.12.2010

mündliche Prüfung am: 10.02.2011

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Rainer Krull

1. Referent Juniorprof. Dr.-Ing. Ezequiel Franco-Lara

2. Referent Prof. Dr. Siegmund Lang

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Zielstellung und Hintergründe . . . . .	2
1.1.1	Stressverhalten und Organismen . . . . .	3
1.1.2	Abstoppen von Zellen mit kalten Lösungen . . . . .	8
1.1.3	Probenentnahmesysteme . . . . .	14
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1	Medien und Stämme . . . . .	22
2.1.1	Minimalmedium für <i>E. coli</i> . . . . .	22
2.1.2	CBS-Minimalmedium für <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	24
2.1.3	Stämme und deren Lagerung . . . . .	28
2.2	Kultivierung . . . . .	30
2.2.1	Bestimmung der optischen Dichte und Biotrockenmassekonzentration . . . . .	30
2.2.2	CFU Bestimmung . . . . .	30
2.2.3	Kultivierung von <i>E. coli</i> . . . . .	31
2.2.4	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	31
2.2.5	Kultivierung im Bioreaktor . . . . .	32
2.2.6	Automatisierte Probenentnahme und Pulsaufgabe . . . . .	32
2.3	Abstoppprozess . . . . .	33
2.3.1	Analyse der Zellintegrität beim Abstoppprozess . . . . .	34
2.3.2	Zellextraktion zur Analyse der Abstopplösungsauswirkung . . . . .	34
2.3.3	ATP Bestimmung . . . . .	35

2.3.4	Zellextraktion zur GC-MS Analyse von <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	36
2.3.5	Chemometrische Analyse . . . . .	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>40</b>
3.1	Auswirkung von kalten Abstopplösungen . . . . .	41
3.1.1	Validierung der Durchflusszytometrie . . . . .	41
3.1.2	Wirkung von kalten Abstopplösungen auf <i>E. coli</i> . . . . .	46
3.1.3	Wirkung von kalten Abstopplösungen auf <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	61
3.1.4	Zusammenfassung der Untersuchung der Abstopplösungs- wirkung . . . . .	65
3.2	<i>S. cerevisiae</i> unter Stressfaktoreinwirkung . . . . .	71
3.2.1	Wachstumsverhalten von <i>S. cerevisiae</i> unter Stressfak- toreinwirkung . . . . .	71
3.2.2	Metabolic Profiling von <i>S. cerevisiae</i> unter Stressinduk- tion . . . . .	75
3.3	Aufbau und Funktionsweise des konstruierten Probenentnah- megerätes . . . . .	90
3.3.1	Pulsexperiment und schnelle Probenentnahme . . . . .	98
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>101</b>
<b>5</b>	<b>Anhang</b>	<b>107</b>
5.1	Geräte . . . . .	107
5.2	Konstruktionszeichnung des Probentellers . . . . .	110
5.3	Chemikalien . . . . .	111
5.4	GC-MS Daten der Kultivierungen . . . . .	113
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>119</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>127</b>

# 1 Einleitung

Das Verhalten von Mikroorganismen auf Stressfaktoren aus der Umwelt ist für die Forschung von Interesse. Dies beruht auf den vielen konservierten DNA-Regionen in vielen Organismen. Dadurch bietet die Analyse der Reaktion des einen eine Möglichkeit, die Reaktion des anderen Organismus vorherzusagen und zu evaluieren. Dies bietet Vorteile, da nicht alle Organismen so intensiv und vergleichsweise einfach untersucht werden können wie Bakterien und Hefen. Auch auf Menschen treffen Stressfaktoren in vielen Formen, so wie Giftstoffe, die z. B. auf Grund der modernen großtechnischen Nahrungsmittelproduktion aufgenommen werden, oder Inhaltsstoffe der Nahrung selbst, auf deren Wirkung reagiert werden muss, UV-Licht durch Sonneneinstrahlung oder schlicht oxidativer Zellstress durch einfache Atmung.

Das Wissen über die Stressantwort der Zellen und die einzelnen Zellprozesse ermöglicht es, entsprechende Gegenmaßnahmen oder eine fortgeführte Aufnahme zu initiieren. So reagiert *Saccharomyces cerevisiae* z. B. auf die Zugabe von bestimmten Koffeinmengen mit einer verlängerten Lebenserwartung. Der Eingriff von Koffein ist dabei auf einen auch im Menschen und anderen Organismen vorhandenen konservierten Reaktionsweg konzentriert und bietet so eine mögliche lebensverlängernde Wirkung auch im Menschen [79].

In den letzten Jahren hat sich das Forschungsgebiet der Systembiologie entwickelt, auch um der Stressantwort von Mikroorganismen auf die Spur zu kommen. Dort werden unter anderem das Genom, das Transkriptom und das Metabolom betrachtet. Die Metabolomik untersucht dabei die genauen Reaktionswege, die Konzentrationen der einzelnen Metabolite und die Kinetik und Dynamik der enzymatischen Reaktionen [140]. Diese Informationen

sind auch ein wichtiger Grundbaustein für eine dynamische Modellierung und daher für das sog. *Metabolic Engineering* [99]. Diese Herangehensweise ermöglicht die gezielte genetische Änderung von Organismen, wobei rekombinante DNA zur Restrukturierung des metabolischen Netzwerkes der Mikroorganismen verwendet wird. Dabei werden verschiedene Ziele verfolgt, wie höhere Produktivität, verbesserte Ausbeute oder der Änderung der benötigten Kohlenstoffquelle, für die Nutzung von billigeren Rohmaterialien. Dazu ist es oft notwendig, verlässliche *in vivo* Daten über die metabolischen Flüsse und Konzentrationen zu besitzen, um einen effektiven Eingriff vornehmen zu können [39]. So kann z. B. die Produktion der Aminosäure Lysin deutlich gesteigert werden, indem eine Veränderung in einem auf den ersten Blick nicht offensichtlichen Reaktionsweg in *Corynebacterium glutamicum* induziert wird [5]. Eine Veränderung der verwendbaren Kohlenstoffquelle für *Zymomonas mobilis* kann z. B. durch den Einbau von *Escherichia coli* Genen für fünf verschiedene Enzyme erzielt werden. Dadurch sind die Bakterien in der Lage den Fünffachzucker Arabinose zu verstoffwechseln, der in Lignocellulosebiomasse und anderen Agrarreststoffen oft vorkommt, wodurch eine preiswertere Ethanolproduktion mit *Zymomonas mobilis* möglich wird. Die Produktion von Lysin oder Ethanol stellt dabei einen Produktionsstressfaktor dar.

### 1.1 Zielstellung und Hintergründe

Eine Untersuchung der metabolischen Stressantwort von Mikroorganismen bedarf einer guten Probenentnahme der zu untersuchenden Mikroorganismen, da *in vitro* Untersuchungen selten die Reaktion in der lebenden Zelle wiedergeben. Die eingesetzte Probenentnahme und Probenbehandlung darf dabei die Konzentrationen in der Zelle nicht verändern, da sonst eine genaue Abschätzung und Modellierung der Reaktionswege der Zelle kaum möglich ist.

Die Untersuchung der mikrobiellen Stressantwort wird an *Escherichia coli* (*E. coli*) MG1655 sowie an *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) BY4742 und deren ausgewählten Knockoutmutanten durchgeführt. Die Knockoutmu-

tanten stammen aus der Bibliothek von OpenBiosystems, die die Mutanten des *Saccharomyces Genome Deletion Projects* [143] für weltweite Untersuchungen zugänglich macht. Dabei wurden gezielt Mutanten mit Knockouts im zentralen Kohlenstoffwechsel ausgewählt.

Folgende Punkte werden zum Erreichen der Ziele verfolgt, die in den folgenden Unterkapiteln eingehender auf ihren theoretischen Hintergrund hin beleuchtet werden:

- Untersuchung der Reaktion von *E. coli* und *S. cerevisiae* auf verschiedene Stressfaktoren (Kap. 1.1.1)
- Untersuchung der Auswirkung der eingesetzten Abstopplösungen auf die Zellintegrität (Kap. 1.1.2)
- Konstruktion eines automatischen Probenentnahmegertes zur Analyse der dynamischen Stressreaktion in kurzen Zeitabschnitten (Kap. 1.1.3)

### 1.1.1 Stressverhalten und Organismen

Bei den Untersuchungen zum Stressverhalten wurden sowohl der Prokaryot *Escherichia coli* als auch der Eukaryot *Saccharomyces cerevisiae* herangezogen.

Kolibakterien sind 2 bis 6  $\mu\text{m}$  lang, stäbchenförmig und durchmessen 0,5 bis 1,0  $\mu\text{m}$ . Sie sind fakultativ anaerob und machen bei Mensch und Tier etwa 1 % der Bakterienflora des Darms aus. Flagellen können auf der gesamten Oberfläche verteilt ausgebildet werden und bis zu 20  $\mu\text{m}$  lang sein. Vor 125 Jahren entdeckte Theodor Escherich diese Familie der Enterobacteriaceae [119]. *E. coli* ist dabei das am besten bekannte Bakterium und generell eins der am besten untersuchten biologischen Systeme weltweit [119]. 1997 wurde das gesamte Genom sequenziert und die Funktionen von 76 % seiner 4288 Gene sind bekannt [9, 54].

Viel Forschung wurde und wird mit diesem Organismus durchgeführt, nicht zuletzt gelang mit *E. coli* die Entdeckung zur genetischen Kontrolle der Enzym- und Virussynthese durch Jacob, Lwoff und Monod, für den sie 1965 den Nobelpreis erhielten. Trotz dieser langen Forschungszeit überrascht *E. coli* noch

heute mit neuen Erkenntnissen und immer noch sind viele Aspekte der Biologie dieses „Arbeitstiers“ der molekularen Biologie zu entdecken [45].

Da es sich bei *E. coli* um ein Gram-negatives Bakterium handelt [119], wird eine deutlich stärkere Reaktion als bei *S. cerevisiae* auf verwendete Abstopplösungen und die damit verbundene Zellstressantwort erwartet. Dies wird als Indikator für eine gute Abstopplösung herangezogen (Kap. 1.1.2). Außerdem wird mit *E. coli* eine allgemeine Untersuchung der Stressantwort auf Abstopplösungen durchgeführt. Es wird zusätzlich für die Validierung der Anwendbarkeit des Probenentnahmeegerätes für Bakterien herangezogen (Kap. 1.1.3).

Bei *S. cerevisiae* handelt es sich um einen Organismus, der hohe Genhomologität zum humanen Genom aufweist und außerdem stark konservierte fundamentale biochemische Reaktionswege besitzt. Dies ermöglicht, grundlegende zelluläre Prozesse aufzudecken. Dies hat bereits zu mehreren Erkenntnissen und Entdeckungen im Bereich der Virologie und der Anwendung in der antiviralen Arzneimittelentwicklung geführt [35]. Bei der Anwendung von antiviralen Medikamenten darf allerdings kein toxischer Effekt auf die Zellen selbst auftreten, weshalb die Auswirkungen auf Genom-, Proteom- und Metabolomebene minimal sein müssen [112]. Die neuen Plattformtechnologien der Omics Forschung ermöglichen diese globale Herangehensweise auf allen Ebenen. Der wahrscheinlich sensitivste und umfassendste Indikator der Veränderungen durch antivirale Medikamente oder sonstige Stressoren ist das zelluläre Metabolom [59]. Die Analyse welches der Proteine das vielversprechenste Ziel für antivirale Medikamente ist, muss durch den Nachweis der Wirksamkeit der Inhibierung getestet werden. Da eine solche Studie nicht am Menschen durchgeführt werden kann, ist *S. cerevisiae* mit seinen Genhomologien ein geeigneter Modellorganismus. In einer Studie wurde unter anderem der Effekt von Deletionen mehrerer Gene auf den zentralen Stoffwechsel von *S. cerevisiae* untersucht, deren Genprodukte für die Virusproliferation wichtig sind. Dies dient der Abschätzung der nachteiligen Einflüsse der Inhibierung dieser Genprodukte auf die Wirtsorganismen und ihren Metabolismus. So können die vielversprechendsten Zielgene und deren Produkte mit dem geringsten Einfluss auf den Zellmetabolismus lokalisiert werden [112].

Das Stressverhalten von *S. cerevisiae* lässt also durch Homologie auf das Verhalten von humanen Zellen schließen und je genauer das Verhalten von *S. cerevisiae* bekannt ist, desto genauer lässt sich die Reaktion auf verschiedene Stressoren und Deletionen modellieren und vorhersagen. Daher werden in dieser Arbeit verschiedene *S. cerevisiae* Knockoutmutanten mit je einer Deletion im zentralen Kohlenstoffwechsel ausgewählt, wobei der Stamm BY4742 mit den genetischen Eigenschaften *his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0* der Elternstamm darstellt. Die in diesem Stamm vorhandenen Deletionen bewirken eine allgemeine Auxotrophie für Histidin, Leucin und Lysin und Uracil. Zu den ausgewählten Knockoutmutanten gehören zwei mit Deletionen in der Glycolyse (*pfk1Δ* - Phosphofruktokinase ( $\alpha$  Untereinheit); *pfk2Δ* - Phosphofruktokinase ( $\beta$  Untereinheit)), drei mit Deletionen im Pentosephosphatzyklus (*gnd1Δ* - 6-Phosphogluconatdehydrogenase; *gnd2Δ* - 6-Phosphogluconatdehydrogenase; *zwf1Δ* - Glukose-6-Phosphatdehydrogenase), sowie sechs mit Deletionen im Zitratzyklus (*aco1Δ* - Aconitase; *aco2Δ* - Aconitase, *fum1Δ* - Fumarase; *icl1Δ* - Isocitratlyase; *idp2Δ* - Isocitratdehydrogenase, *mae1Δ* - Malic-Enzym). *zwf1Δ* benötigt die Zugabe von Methionin und *aco1Δ* die von Glutamat.

Von den für die Festkulturen in dieser Arbeit ausgewählten Stressfaktoren NaCl (osmotischer Stress), CdCl (Schwermetallstress), pH-Wert (5, 6,8 und 8,5), Diamid (oxidativer Stress) und Koffein (Kap. 2.1.2) wird nur die Auswirkung von Koffein und Diamid weiter in Schüttelkolbenkulturen betrachtet.

*S. cerevisiae* hat sich in den letzten Jahren als leistungsfähiges Modellsystem zur Erforschung der genetischen und physiologischen Faktoren, die die Lebensspanne beeinflussen, entwickelt. Die Einschränkung der Nahrungsaufnahme, d.h. diätische Ernährung, zeigt in so gut wie allen untersuchten biologischen Systemen eine verlangsamende Wirkung auf den Alterungsprozess und eine Verlängerung der Lebenserwartung [79]. Studien belegen, dass eine genetische Schädigung von konservierten substrataktivierten Signalsteuerungspfaden die Phänokopie dieser Ernährungsart ausbildet und dabei sowohl die zeitliche Lebensspanne (*chronological lifespan*, CLS, Lebensfähigkeit

in der stationären Phase) als auch die replikative Lebensspanne (*replicative lifespan*, RLS, Anzahl an Tochterzellen/Knospen) verlängert.

Koffein ist ein natürliches Analog der Purinbase und physiologisch aktiv [68, 11]. Es wird mit einer breiten Spanne von zellulären Prozessen in Säugtieren, Pflanzen und Pilzen in Verbindung gebracht [68]. Niedrige Dosen an Koffein inhibieren die substratsensitive Kinase TORC1, ein Regulator im Wachstum von eukaryotischen Zellen [101], dessen nachfolgende Reaktionskaskaden Pkc1p-Mpk1p [68] und TORC1-Sch9-Rim15 [137] die CLS signifikant verlängern. Vornehmlich wird das durch die Inhibierung von TORC1-Sch9 freigesetzte Rim15 dafür verantwortlich gemacht. Rim15 beeinflusst wiederum weitere physiologische Prozesse, die sich von antioxidativen Verteidigungsmechanismen, der Akkumulation von Speicherkohlenhydraten wie Glykogen über die Hochregulierung von stressgekoppelter Genexpression erstreckt, welche alle positiv CLS-kritisch sind [137]. Die Auswirkung von Koffein wird dabei mit Transkriptionsexperimenten analysiert [68]. Hier kann neben diesen Beobachtungen auch eine inhibierende Wirkung des Ras/cAMP Reaktionsweges beobachtet werden. Der gesamte Reaktionsweg um TOR ist strukturell konserviert und wird daher als mögliche Erklärung für die Daten einer epidemiologischen Studie zu einer gesenkten Sterblichkeit von Menschen mit mäßigem Kaffeekonsum (d. h. Koffein) betrachtet [137].

Mutanten, die einen Defekt im Reaktionsweg der Zellwandintegrität besitzen, reagieren sensitiv auf Koffein [68]. Es induziert weiterhin die Änderung der Zellarchitektur. So wird die Zellwand durch einen gestiegenen  $\beta$ -Glucan-Gehalt deutlich verstärkt, was die Zellwand resistenter gegen abbauende Enzyme wie Zymolase macht. In hohen Konzentrationen von über 10 mM kann Koffein auf knospende und teilende Hefen mutagene Effekte haben [86].

Koffein ruft auch pleiotropische Effekte hervor, was letztendlich durch einen noch nicht charakterisierten Mechanismus zum Zelltod führt [68]. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass Koffein als Antikrebsmittel wirken könnte, da es die Transformation von Zellen unterdrückt [93]. Es inhibiert z. B. die Bildung von Tumoren und induziert Apoptose der bereits vorhandenen [77, 49]. Weiterhin induziert Koffein in *S. cerevisiae* die Makroautophagozytose, die

dazu dient, zelleigene Bestandteile abzubauen und in den Zellzyklus zurückzuführen. Dies ist z. B. essentiell bei stickstofflimitiertem Wachstum. Koffeinkonsum verursacht auch ein verringertes Auftreten von Parkinson. In dem Modell zur Parkinson Krankheit wird dabei ein möglicher Zusammenhang zwischen Autophagozytose und dem Abbau von  $\alpha$ -Synuclein vorgeschlagen [142].

Durch die Blockade der  $\text{Ca}^{+2}$ -Kanäle, wobei der Austritt aus den Zellen nicht vollständig eliminiert wird, minimiert Koffein die intrazelluläre Kalziumkonzentration. In diesem Zusammenhang wirkt sich Koffein positiv auf die stereoselektive Produktion von (1*R*,2*S*)-Diastereomeren von  $\beta$ -Ketoestern aus. In Kombination mit  $\beta$ -Ketoestern verursacht Koffein eine Apoptose eines kleinen Teils der Zellpopulation. Diese Teilpopulation ist vermutlich vor der Kultivierung durch Umweltbedingungen gestresst worden und produziert nun unerwünschte Stereoisomere. Durch diese Wirkung ermöglicht Koffein es, die Batch- zu Batch-Änderungen zu minimieren und die Ausbeuten und die Reinheit zu verbessern [11].

Mikroorganismen mit der Möglichkeit zur Nutzung von Koffein als Kohlenstoffquelle sind z. B. die Pilze *Aspergillus niger*, *Penicillium roquefortii* und die Bakterien *Pseudomonas putida* und *Serratia marcescens*. Von einem Abbauweg in *S. cerevisiae* und *E. coli* wurde bisher nichts berichtet [80].

Tetramethylazodicarboxamid  $(\text{CH}_3)_2\text{NCON}=\text{NCON}(\text{CH}_3)_2$ , mit dem Trivialnamen Diamid, ist ein Thiol-oxidierender Wirkstoff mit der chemischen Summenformel. Es ist ein gelbes, nicht hygroskopisches kristallines Pulver, das leicht löslich in Wasser und organischen Lösungsmitteln ist. Gegenüber Hydrolyse ist es sehr stabil [66]. Er tritt rasch in Zellen wie *E. coli* und *S. cerevisiae* ein und stört dort reversibel die Balance der redoxaktiven Thiole und ihrer Disulfidformen [56, 65]. Vorzugsweise werden niedrigmolekulare Thiole statt Proteinthiole durch Diamid oxidiert. Glutathion ist das am häufigsten vorkommende nichtproteinogene Thiol in den Zellen (1-10 mM) [94]. Es schützt viele zelluläre Komponenten und den Thiolstatus von Proteinen gegen oxidativen Stress in Pflanzen [38]. Die Zugabe von Diamid in stöchiometrischer Menge oxidiert Glutathion (GSH) in den Zellen zu Glutathion-

Disulfid (GSSG) [94]. Die theoretische Menge an Diamid für die Umwandlung von 1 mol GSH beträgt 0,5 mol. Die Reaktion ist dabei in den Zellen extrem schnell und nahe dem theoretischen Wert [66].

Der Ubiquitin-Proteasom Reaktionsweg reguliert kritische Zellprozesse, wie den Zellzyklus, die Zytokin induzierte Genexpression, die Differenzierung und den Zelltod. Dieser Reaktionsweg zeigt sich als anfällig gegenüber oxidativem Stress in tierischen Zellen, wobei die beiden entscheidenden Enzyme E1 und E2 durch das zelluläre Redoxpotential, namentlich das GSSG:GSH Verhältnis, reguliert werden. Ein erhöhtes Verhältnis verursacht eine Inhibition beider Enzyme, was durch die Zugabe von Diamid ausgelöst wird. Das Verhältnis von GSSG und GSH wird dabei dosisabhängig verändert [94].

In der vorgelegten Arbeit wird die Analyse der intrazellulären Metabolite mit dem sog. *Metabolic Profiling* durchgeführt. Mit dieser Methode ist es nicht notwendig die Konzentrationen zu bestimmen, es erfolgt eine Klassifizierung und eine Auswertung der Reaktion an Hand einer Kontrolle [48]. In der vorliegenden Arbeit dient der Elternstamm BY4742 unter Minimalmedienbedingungen als Kontrolle. Mit diesem werden alle anderen Versuche, inklusive der stressfaktorversetzten Kultivierung, verglichen und daraus die zelluläre Antwort abgeleitet.

### 1.1.2 Abstoppen von Zellen mit kalten Lösungen

Die Analyse und Bestimmung intrazellulärer Metabolite wird durch ihre kurzen Zeitkonstanten, die durch hohe Umsatzraten und kleine Poolgrößen verursacht werden, erschwert [144]. Die schnellen Umsatzraten erfordern das sofortige Abstoppen des intrazellulären Metabolitumsatzes zur Bestimmung von akkuraten *in vivo* Konzentrationen und Verhältnissen [47]. So wird z. B. in *E. coli* zytosolische Glukose mit ca.  $1,0 \text{ mMs}^{-1}$  und zytosolisches ATP mit ca.  $1,5 \text{ mMs}^{-1}$  umgesetzt [64]. Auch freie Aminosäuren besitzen eine Umsatzzeit im Bereich von Sekunden [89].

Die Verwendung von kalten Lösungen zum Abstoppen des Metabolismus (sog. kalte Abstopplösungen) zur Untersuchung des *in vivo* Metabolomzustandes wird bereits einige Jahre angewendet [144, 133]. Vorzugsweise wird

kaltes Methanol eingesetzt. Dies liegt darin begründet, dass es sich für das Abstoppen von Hefen als gut geeignet herausgestellt hat [64] und für Prokaryoten übernommen wurde. So wird ein Abstoppen von *S. cerevisiae* mit 60% Methanol (-40°C) mit der folgenden Zellernte durch Zentrifugation [64] oder Filtration [105] als effektive Methode zum Abstoppen des Metabolismus und zur Aufkonzentrierung der Zellen eingesetzt, vorausgesetzt, dass die Temperatur unter -20°C gehalten wird. Ein eventuell aktiver Metabolismus wird bei dieser Temperatur als unwahrscheinlich ausgeschlossen [64].

Der Erhalt der Zellintegrität von Mikroorganismen während des Abstoppprozesses wurde lange Zeit angenommen. Im Laufe der Zeit verbesserte sich jedoch die Sensitivität der Analytik und es stellte sich heraus, dass Prokaryoten bei der Anwendung von Abstopplösungen beschädigt oder gar zerstört werden. Dies zeigt sich im Vorkommen von intrazellulären Metaboliten in der Abstopplösung, wobei oft ATP als Modellmetabolit gewählt wird, da es sich dabei um ein energiereiches Nucleotid handelt, welches nicht in großem Umfang außerhalb der Zellen vorkommen sollte [12, 76, 132, 134, 139, 144].

Der sog. Kälteschockeffekt bei Zellen ist allerdings kein neues Phänomen, sondern bereits seit dem achtzehnten Jahrhundert bekannt und wurde dort zuerst bei Pflanzen beobachtet. So zeigten diese irreversible Schäden bei der Anwendung eines Abkühlungsprozesses durch Temperaturen wenig über dem Gefrierpunkt. Dieses als Kälteschaden in der Botanik bekannte Phänomen weist ebenfalls den Verlust an zellulärem Material in den extrazellulären Raum auf [75]. In der Tierwelt fanden sich parallele Effekte, die erstmals in den 1930er Jahren durch russische Arbeiter beim raschen Abkühlen von Spermien beobachtet wurden. Sie prägten den Begriff des Temperaturschocks. In den 90er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts wurde schließlich der Begriff des Kälteschocks (engl. *cold shock*) für beide Phänomene geprägt, da vermutet wurde, dass von einem mechanistischen Zusammenhang ausgegangen werden kann [30, 84, 85]. Zunächst wurde postuliert, dass nur spezifische Zellen für den Kälteschock anfällig sind, wie bestimmte Pflanzenzellen, Säugertiersperma und bestimmte Mikroorganismen. Jedoch wurde das Kälteschockphänomen schließlich in einem breiten Spektrum von Zellen beobachtet, was

bedeutet, dass eine Zellschädigung in diesem Zusammenhang ein allgemeines Phänomen darstellt [30, 84, 85].

Neuere Studien zum Verlust an intrazellulären Metaboliten beim Abstoppen von Zellen, dem sog. *leakage*, können belegen, dass es in verschiedenem Maß zum Verlust der Zellintegrität kommt und die Leakageverluste nicht vernachlässigt werden dürfen [13, 52, 139, 144]. Die Studien zeigen, dass der Kälteschockeffekt einen erheblichen Einfluss auf die Zellen haben muss. Dies wird z. B. auch in Studien ohne Abstoppprozedur nachgewiesen. So weist Tsuchido *et al.* [128] eine sinkende relative OD von 10-fach mit kaltem Medium verdünnten *Bacillus subtilis* Zellen nach, wobei der Effekt der Lyse stärker wird, je weiter die Kühltemperatur unter 10 °C gesenkt wird. Werden die Zellen dagegen langsamer abgekühlt (fünf- oder zweifache Verdünnung), kann eine geringere Zellyse beobachtet werden. Es wird vermutet, dass die Zellyse in diesem Fall wahrscheinlich wegen der Störung der Membranorganisation erfolgt, die durch den schnellen Temperaturwechsel hervorgerufen wird, wobei es zur Lipidphasenveränderung kommt. Auch bei der Untersuchung des Kälteschockverhaltens von Spermien zeigt sich, dass eine Temperaturabsenkung von mehreren Grad pro Minute den Verlust der Flagellenaktivität, die Beschädigung intrazellulärer Organellen und Leakage von gelösten Substanzen über die Zellmembran hinweg verursacht [30]. Da die Abstopplösungen einen sehr rapiden Temperaturwechsel für die Zellen verursachen liegt es nahe, dass auch in diesem Fall ein Kälteschockeffekt auftritt. Dies führt zu erheblichen Verlusten aus den Zellen [144] und vermutlich auch zur teilweisen Zellyse während des Prozesses.

Die Ergebnisse von Wittmann *et al.* [144] zeigen deutlich, dass eine Verwendung von kalter Abstopplösung und der darauffolgenden Zellabtrennung durch Zentrifugation für *Corynebacterium glutamicum* nicht angewendet werden kann, da es zu einem über 90%igen Verlust an intrazellulärem Glutamin und Glutamat kommt. Hier zeigt sich auch, dass die Expositionszeit der Zellen mit der Abstopplösung eine wichtige Rolle spielt. Eine Verlängerung der Zentrifugationszeit zur Trennung von Abstopplösung und Zellen um das doppelte führt zu einem erhöhten intrazellulären Metabolitverlust. Diese Zeitab-

hängigkeit zeigt sich auch bei den Versuchen von Tsuchido *et al.* [128], wo durch eine längere Inkubation bei tiefen Temperaturen die OD weiter sinkt und damit eine erhöhte Zelllyse beobachtet werden kann.

Für die Analyse von Aminosäuren kann eine schnelle Filtration eingesetzt werden [12], nicht aber bei Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels oder anderen Metaboliten mit hohem Umsetzungsrate. Dafür muss zum heutigen Stand der Forschung noch immer eine Abstopplösung eingesetzt werden, sollte man nicht das gesamte Kulturmedium direkt durch einen Extraktionsschritt abstoppen wollen (sog. *wohle broth quenching*) [78], was einen differenziellen Ansatz erfordert, um extra- und intrazelluläre Metabolite separieren zu können [12, 123]. Ein Aspekt des Abstoppprozesses ist neben dem Abstoppen des Metabolismus die Möglichkeit des Abtrennens des umgebenden Mediums bei gleichzeitig niedrigen Temperaturen. Dies ist notwendig, um die im Medium vorhandenen Salze und Metabolite von den intrazellulären zu trennen und eine Verdünnung der Probe zu minimieren. Das Zellvolumen im Vergleich zu dem Probenvolumen beträgt nur einen Bruchteil und die Konzentrationen vieler intrazellulärer Metabolite liegen unter 1 mM [17].

Trotz umfangreicher Untersuchungen zur Zusammensetzung von Abstopplösungen konnte bisher jedoch noch keine ideale Zusammensetzung gefunden werden, um eine Zellruptur zu vermeiden [134]. Da Methanol selbst zellschädigende Eigenschaften besitzt, wurden verschiedene Additive getestet, um zum einen dem Kälteschockeffekt und zum anderen diesen Eigenschaften entgegen zu wirken.

In dieser Arbeit wird die Zusammensetzung von Abstopplösungen und deren Auswirkung auf die Zellen untersucht. Dies diente der Identifikation einer geeigneten Lösung und Temperatur, bei deren Anwendung es nicht zur Beschädigung oder kompletten Zellruptur während der Probenentnahme von *E. coli* oder *S. cerevisiae* kommt. Außerdem soll die Auswirkung der Abstopplösungen auf Einzelzellebene untersucht werden, um ein besseres Verständnis der Vorgänge während des Abstoppprozesses zu erlangen. Dazu werden verschiedene Zusatzstoffe und Starttemperaturen eingesetzt, wobei vier Abstopplösungen aus anderen Arbeiten herangezogen werden, um eine Ver-

gleichsbasis zu erzielen, da die Probenentnahme selbst ebenfalls Auswirkungen auf die Ergebnisse hat und somit ein direkter Vergleich der hier gewonnenen Ergebnisse mit denen aus der Literatur nicht unbedingt möglich ist. Zu den zu untersuchenden Zusatzstoffen gehören Glycerin [76, 132], HEPES [52], Mannitol, Trehalose, Glutaraldehyd (GA) [128], sowie Ectoin und Hydroxyectoin. Zusätzlich wurde in Anlehnung an Canelas *et al.* [19] reines Methanol eingesetzt.

Der Puffer HEPES zeigte bei 70 mM mit einem pH-Wert von 7,5 bei der Untersuchung der Metabolitstabilität während der Ethanolextraktion erhebliche positive Effekte und reduziert den Verlust an  $\text{NAD}^+$ , NADH und Pyruvat auf unter 1% [39]. Glycerin, welches auch als Zusatzstoff beim Einfrieren von Zellkulturen als Frostschutzmittel verwendet wird, bewirkt ebenfalls deutlich verbesserte Eigenschaften der Abstopplösung [76]. Der Zuckerausstauschstoff Mannitol ist ein sog. kompatibles Solut, das Proteine und Zellen vor verschiedenen Stressfaktoren schützt [37]. Das Disaccharid Trehalose wirkt als Schutz gegen osmotischen Stress. Es wirkt nicht reduzierend und unterstützt den Erhalt der Membranfluidität unter trockenen Bedingungen [102]. Sowohl Mannitol als auch Trehalose werden traditionell als Schutz vor Kälteschäden eingesetzt [4, 103, 122, 127]. Glutaraldehyd wird in der Histologie als Gewebefixierungsmittel eingesetzt. Dabei bleibt die Struktur der Zelle erhalten, jedoch wird die Zellaktivität gestoppt, da GA u. a. die Autolyse ausschaltet [34] oder Lysinreste verknüpft und so aktive Zentren von Enzymen deaktiviert [67, 120, 141]. Die kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin werden einmal der Abstopplösung und einmal dem Wachstumsmedium zugesetzt. Diese beiden Stoffe werden von halophilen Mikroorganismen als Schutz gegen extreme Bedingungen, wie hohe Salzgehalte oder Temperaturen, gebildet. Ectoine haben sich als stabilisierend für Proteine, Nucleotide, Membranen und Zellen herausgestellt. Es sind keine Wechselwirkungen mit enzymatischen Reaktionen oder Bindungsreaktionen bekannt, wobei sie trotzdem hoch kompatibel mit dem Zellmetabolismus sind. Die Herstellerfirmen empfehlen eine Konzentration von 0,1-1 M als idealen Schutz von Proteinen und 0,1-1 % (w/v) für Membranen [114, 115].

Methanol bildete in fast allen Fällen die Basiskomponente (60 % v/v), da Methanolmischungen einen niedrigen Gefrierpunkt aufweisen und somit ohne Viskositätsprobleme als kalte Abstopplösung eingesetzt werden können.

Die Analyse der Zellintegrität, also der Auswirkung der einzelnen Abstopplösungen auf die Zellenphysiologie, erfolgt mit einem Durchflusszytometer. Die Durchflusszytometrie ist eine vergleichsweise schnelle und etablierte Zellanalysetechnologie, welche Informationen basierend auf Lichtstreuung und Fluoreszenzsignal auf Einzelzellebene, unter anderem auch über die Viabilität, liefert [113]. Traditionell wird die Lebensfähigkeit von Zellen durch Kultivierung auf Festmedium belegt, d. h. Zellen, die in der Lage sind eine Kolonie auszubilden, werden als lebensfähig klassifiziert, alle anderen als tot [26, 62]. Allerdings ist dies eine vereinfachte Methode und das Fehlen von Kolonien bedeutet nicht unbedingt, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Probenentnahme tot sind [60, 22]. Lebende aber nicht mehr kultivierbare Zellen (*viable but non-culturable*, VBNC) sind beschädigte oder ruhende Zellen, die nicht mehr in der Lage sind, auf dem angebotenen Medium zu wachsen. Damit sind sie für die traditionelle Methode der Viabilitätsbestimmung unsichtbar [60, 87, 22, 95]. Trotzdem können diese Zellen metabolische Aktivitäten in verschiedenem Ausmaß aufweisen [22, 95]. Die Reaktion auf verschiedene Stressfaktoren, wie Chemikalien, Hitzeschock, osmotischen Stress oder Dehydratation, sind als Faktor für den Eintritt in den VBNC Zustand bekannt [41, 42, 44, 98].

Die Markierung von beschädigten Zellen kann durch verschiedene Farbstoffe wie Propidiumbromid oder Propidiumiodid (PI) erfolgen. Diese Farbstoffe sind dafür bekannt, dass sie intakte Zellmembranen oder Zellwände nicht passieren können, weshalb sie lediglich beschädigte Zellen färben [113, 146]. Der Vorteil von PI ist dabei, dass kein weiterer Farbstoff zur Markierung der lebenden Zellen eingesetzt werden muss [146]. PI besitzt interkalative Eigenschaften, d. h. es wird zwischen die Basenpaare der DNA und RNA eingelagert, wobei es einen rot fluoreszierenden Komplex bildet [58]. Das Fluoreszenzsignal kann dann mit Hilfe des Durchflusszytometers detektiert werden, um die Verteilung des Färbers einer Zellpopulation zu bestimmen [29, 57].

### 1.1.3 Probenentnahmesysteme

Die Untersuchung der dynamischen Reaktion auf einen Puls, z. B. Glukose oder Schwermetalle, kann nur durch eine rasch aufeinander folgende Probenentnahme gewährleistet werden, da die Umsetzung der internen Metabolom-pools sehr schnell erfolgt, vor allem für Metabolite, die stark gekoppelt sind, wie Pyruvat, oder relativ niedrige Poolgrößen besitzen, wie FBP und Fumarat [19]. Grundvoraussetzung für eine rasche Probeninaktivierung und damit Abstoppen des zellulären Stoffwechsels ist eine kurze Verweilzeit der Probe von der Entnahmestelle bis zur Inaktivierung. Glasreaktoren können, wie Metallreaktoren, umgebaut werden, um an den Wänden oder dem Boden Ventile für eine rasche Probenentnahme anzubringen. Dies ist aber nicht in jedem Fall praktikabel, wie zum Beispiel im Fall von Doppelmänteln, und verhindert den globalen Einsatz eines Probenentnahmegertes. Zum variablen Einsatz soll daher im Verlauf der Arbeit ein Probenentnahmegert mit den bereits beschriebenen Eigenschaften mit einem möglichst hohen Automatisierungsgrad konstruiert werden.

Bis heute wurden diverse teilweise bis vollständig automatisierte Geräte für die Metabolomanalyse entwickelt. Dabei reicht die Konstruktion von am Reaktor anschließbaren Systemen, bis hin zu speziellen Konstruktionen, die den Reaktor selbst bei der Probenentnahme und einem zugegebenen Puls unbehelligt lassen.

Wesentliche Aspekte für die Konstruktion eines solchen Gerätes sind die Reproduzierbarkeit der Umgebungsbedingung für die Probe, die Reproduzierbarkeit der Probenentnahme selbst, eine einfache Handhabung, ein rasches Abstoppen des Metabolismus und ein geringer Einfluss der Probenentnahme auf den *in vivo* Zustand der Zellen. Diese Ziele wurden mit unterschiedlichem Erfolg erreicht, jedoch existiert bis zum heutigen Tag kein ideales System. Jedes zeigt Vor- und Nachteile, die berücksichtigt werden müssen, will man die Ergebnisse, die mit diesen Systemen erzielt worden sind, vergleichen.

Eines der ersten Geräte, die zum Zweck der Metabolomanalyse gebaut wurden, ist das System von Theobald *et al.* [125], welches später verändert wurde, um die Inaktivierungszeit der Zellen zu verkürzen (Abb. 1.1, a) [124].

Das System besteht aus einer Kapillaren, die durch eine Membran in der Reaktorwand geführt wird, und durch ein Ventil geöffnet werden kann. Die Probe gelangt durch diese Kapillare in ein evakuiertes Probengefäß, das mit auf  $-20\text{ °C}$  vorgekühlten Glaskugeln gefüllt ist. Aus dem Reaktor in das Probengefäß benötigt die Probe 150 ms und wird in 0,4 s komplett inaktiviert. Die Modifizierung des Systems 1997 brachte eine Verkürzung auf 0,2 s. Dies wird erreicht, indem in den Probenröhrchen 1 ml Extraktionslösung und 10 bis 15 Edelstahlkugeln zur Beschleunigung des Wärmeaustauschs vorgelegt werden.

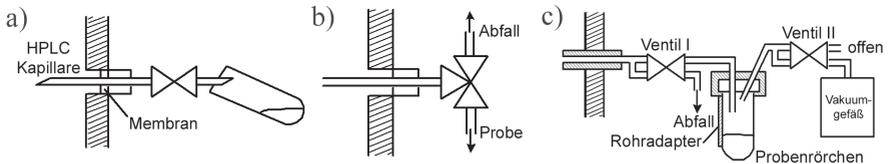


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Probenentnahmeräte von Theobald *et al.* [124] (a), Törnkvist und Larsson [71] (b) und Lange *et al.* [70] (c).

Ein ähnliches System wurde von Larsson und Törnkvist [71] entwickelt (Abb. 1.1, b). Dort wird statt eines einfachen Ventils ein Dreiwegeventil verwendet, um das Verbindungsstück Reaktor-Probenröhrchen vor der Probenentnahme von zurückgebliebenen Resten vorangegangener Probenentnahmen zu befreien. Zum Abstoppen des Metabolismus wird Perchlorsäure im Verhältnis 1:2 in den Probenröhrchen vorgelegt. Probenentnahme und Inaktivierung wird in unter einer Sekunde erreicht. Das Gerät wird genutzt, um extrazelluläre Metabolite, die in geringen Konzentrationen vorliegen, zu bestimmen.

Lange [70] nutzt die Entwicklung von Theobald *et al.* [124], um ein weiteres System zu konstruieren. Damit können kleine und vor allem konstante Probenvolumina erreicht werden (Abb. 1.1, c). Dies dient dazu, dass zum einen der Reaktor durch die Probenentnahme nicht in seinem stationären Zustand gestört wird und zum anderen dazu dass das Verhältnis Probe-Abstopplösung eingehalten werden kann. Die Probenröhrchen müssen nicht mehr manuell evakuiert werden, sondern können direkt in der Probenentnahmeposition vor

der eigentlichen Probenentnahme mit Hilfe eines Vakuumbehälters entlüftet werden. Ein Dreiwegeventil entfernt wie bei Larsson und Törnkvist [71] die stehende Flüssigkeit aus den Probenentnahmekapillaren. Das Totvolumen der Konstruktion liegt so bei 5 % des Probenvolumens. Die Probenentnahme- geschwindigkeit beträgt  $1,5 \text{ ml s}^{-1}$ . Das Probenvolumen von ca. 1 ml gelangt in 0,7 s in einem geraden Düsenstrahl in 5 ml vorgelegte wässrige Methanollösung ( $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Probenintervalle von weniger als 5 s sind erreichbar.

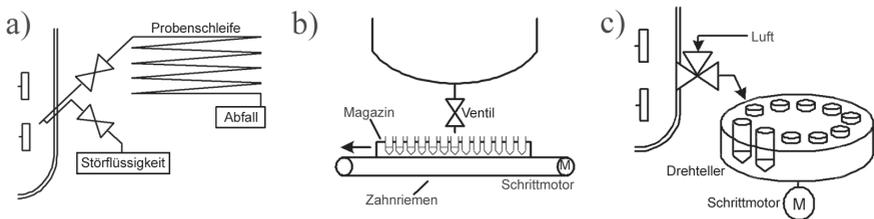


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Probenentnahmegерäte von Weuster-Botz [140] (a), Schäfer *et al.* [108] (b) und Grönke *et al.* [43] (c).

1997 wurde durch Weuster-Botz [140] ein System entwickelt, um ebenfalls schnelle dynamische Änderungen zu untersuchen (Abb. 1.2, a). Dazu wird an den Reaktor ein langes helikales Probenentnahmerohr angeschlossen. In der Nähe des Zulaufs befindet sich ein zusätzlicher Zulauf, der Perchlorsäure ( $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ ) in die den Reaktor durch Überdruck stetig verlassende Probe leitet und diese sowohl inaktiviert als auch aufschließt. Die Flussrate der Probe wird gravimetrisch überwacht und das gesamte Probenrohr nach der Probenentnahme bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren. Das Rohr wird anschließend so zersägt, dass die Teilstücke einer Probenentnahmezeit von 0,64 s entspricht. Das Gerät wird genutzt, um die Auswirkungen eines Glukosepulses auf den Metabolismus der Zellen zu untersuchen.

Schäfer *et al.* [108] konstruierte ein automatisiertes System mit einem Ventilzugang am Boden des Reaktors (Abb. 1.2, b). Alle 160 ms wird ein neues, mit 15 ml  $-50 \text{ }^\circ\text{C}$  Methanol gefülltes, Probenröhrchen unter dem Ventil platziert, aus dem die Probe kontinuierlich fließt. Die Probenröhrchen sind dafür auf einem Magazin hintereinander angeordnet. Durch mehrere aufeinander-

ander folgende Magazine auf dem Transportförderband erreicht das gesamte System eine rasch aufeinander folgende Probenentnahme über einen langen Zeitraum. Die eigentliche Probenentnahme von 5 ml dauert 60 ms und wird durch Überdruck im Reaktor angetrieben. Mit diesem System war es zum ersten Mal möglich, intrazellulär oszillierende Metabolomkonzentrationen zu messen.

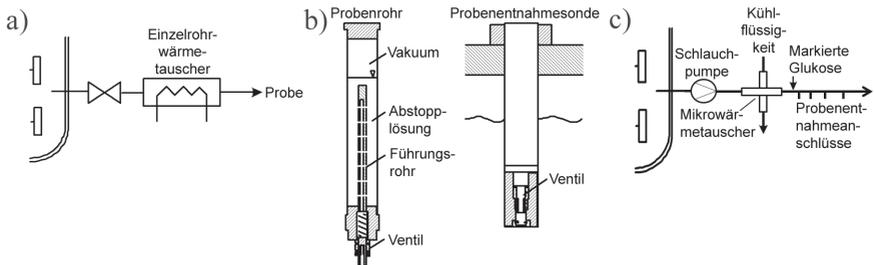


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Probenentnahmegeräte von Schaub *et al.* [109] (a), Hiller *et al.* [51] (b) und Wellerdiek *et al.* [139] (c).

Grönke *et al.* [43] verwendet eine ähnliche Herangehensweise wie Schäfer *et al.* [108]. Er nutzt statt des geraden Magazins einen Drehteller mit 20 Probenplätzen, der über einen Schrittmotor angetrieben wird (Abb. 1.2, c). Als Ventil dient ein spezielles Ventil der Firma Aerre Inox. Dieses Dreiwegventil wird direkt ohne das übliche Verbindungsstück an der Reaktorwand angeschlossen. Vor und nach der Probenentnahme kann das Ventil über den dritten Weg mit Heißluft entleert und sterilisiert werden. Dies ermöglicht eine totvolumenfreie Anwendung. Die geringe Ansprechzeit der pneumatisch betätigten Ventile und die Kombination mit einem gesteuerten Probensteller ermöglicht, im Gegensatz zu dem Gerät von Schäfer *et al.* [108], eine Probenentnahme gezielt in jedes einzelne Probenröhrchen. Lediglich durch den hohen Medienfluss aus dem Ventil erfolgt ein Rückstoß aus dem Probenröhrchen und somit eine Verteilung von Probe. Die Konstruktion ermöglicht eine Probenentnahme im Bruchteil einer Sekunde. Die Proben werden durch 15 ml vorgelegte wässrige Methanollösung abgestoppt.

Durch einen Wärmetauscher (95 °C) direkt nach dem Probenventil, welches an der Reaktorwand angeschlossen ist, erreicht Schaub *et al.* [109] die sofortige

Inaktivierung der Probe und ihren gleichzeitigen Aufschluss, ohne die Probe verdünnen zu müssen (Abb. 1.3, a). Radiale Durchmischung wird durch eine helikale Geometrie des Probenrohres gesichert. Antriebskraft der Probe ist auch hier Überdruck im Reaktor. Das Probenvolumen kann eingestellt werden und beträgt in den Untersuchungen 0,7 ml. Die maximale Verweilzeit im System beträgt 200 ms, ohne dass dabei eine Sauerstofflimitierung auftritt. Die Inaktivierung der Probe ist nach rund 0,5 s erreicht und eine komplette Extraktion nach 2,5 s. Die intrazelluläre Metabolitkonzentration wird danach durch Gegenrechnen zu Proben des Reaktorüberstandes ermittelt.

Die meisten der raschen Probenentnahmegeräte sind für Edelstahlreaktoren konzipiert. Hiller *et al.* [53] konstruierten 2003 ein manuelles Probenentnahmegerät für Glasreaktoren, welches durch den Zugang über den Deckel universell angewendet werden kann, ohne den Reaktor umbauen zu müssen (Abb. 1.3, b). Das System besteht aus zwei Teilen, einmal der Probenentnahmesonde und einmal dem Probenrohr. Die Sonde ist ein nach außen offenes Edelstahlrohr, welches in den Deckel eingeschraubt werden kann. An dessen unteren Ende ist unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche das Probenentnahmeventil angebracht. Dadurch wird der Zugang zum gut durchmischten Medium möglich. Das Probenrohr besteht aus Kunststoff und ist oben durch einen Deckel und am unteren Ende durch ein Ventil abgeschlossen. Dieses passt in das Ventil der Sonde. Werden beide Ventile manuell gekoppelt, fließt Probe aus dem Reaktor in das Probenrohr. Die Probe fließt dabei durch das Führungsrohr direkt in die wässrige Methanolabstopplösung, die zuvor auf  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt wird. Angetrieben wird dieser Fluss durch einen Unterdruck (100 mbar) über der Abstopplösung im Rohr. Das System ist nicht automatisierbar.

Für die Untersuchung der Temperatureinwirkung auf die Zellen konstruierte Wellerdiek *et al.* [139] ein System, welches einen Querstrom-Mikrostruktur-Wärmetauscher des Forschungszentrums Karlsruhe [15] verwendet (Abb. 1.3, c). Eine der Durchgangsrichtungen ist dabei für das Kulturmedium und eine für das Kühlmittel ( $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Jeder Durchgang besteht dabei aus 850 Kanälen

mit einer geometrischen Abmessung von  $100 \times 200 \mu\text{m}$  und einer Länge von 14 mm. Beide Flüssigkeiten werden durch eine Schlauchpumpe gefördert. Der Aufbau ermöglichte eine rasche Abkühlung der Proben um  $30^\circ\text{C}$  innerhalb von ca. 200 ms.

Die zuvor beschriebenen Systeme benutzen das Kultivierungsmedium direkt aus dem Bioreaktor, wobei der zumeist kontinuierlich laufende Prozess unterbrochen wird. Auch Pulsexperimente bewirken eine Störung der kontinuierlichen Prozessführung. Damit muss mit der nächsten Probenentnahme bis zum Einsetzen eines erneuten kontinuierlichen Zustandes gewartet werden. Als Alternative bieten sich dabei die Probenentnahmesysteme von Buziol *et al.* [18], Visser *et al.* [136] und Mashego *et al.* [78] an. Diese verwenden ein System, welches die Probe kontinuierlich aus dem Reaktor führt. Erst dort erfolgt eine Störung der kontinuierlichen Phase und die rasche Probenentnahme. So kann eine große Anzahl von verschiedenen Experimenten in wesentlich kürzerer Zeit und geringerem Materialaufwand durchgeführt werden.

Das System von Buziol *et al.* [18] besteht aus einem Ventil, das an die Reaktorwand angeschlossen ist (Abb. 1.4, a). Beim Öffnen des Ventils fließt wegen des Drucks im Reaktor Kulturmedium durch eine Kapillare aus dem Reaktor in die Mischkammer, wo es mit einer Glukoselösung, die durch eine zweite Kapillare zugeleitet wird, gemischt wird. Die gesamte Lösung fließt dann durch eine dritte Kapillare in Richtung der Probenentnahmekaskade. Dreiwegeventile, in bestimmten Abständen an der Kapillare angebracht, ermöglichen eine zeitgesteuerte Probenentnahme auf Basis der Kapillarlänge, die die Probe zurück gelegt hat, sowie der Flussrate, die durch das Probengewicht bestimmt wird. Die Probenröhrchen werden zur Probenabstopfung zuvor mit 10 ml flüssigem Strickstoff gefüllt. Insgesamt werden je Probe 2,6 ml bis 3,7 ml gesammelt. In der Kapillare herrscht Pfropfenströmung, weshalb für jeden einzelnen Zustand beliebig viel Probe gesammelt werden kann. Auch eine Änderung des Störungsfaktors ist möglich. Der gesamte Apparat ist computergesteuert und Versuche zu intrazellulären Kinetiken, wie Aufnahme- und Sekretionsraten, sind durch die verwendete sog. *stopped-flow* Methode möglich.

# 1 Einleitung

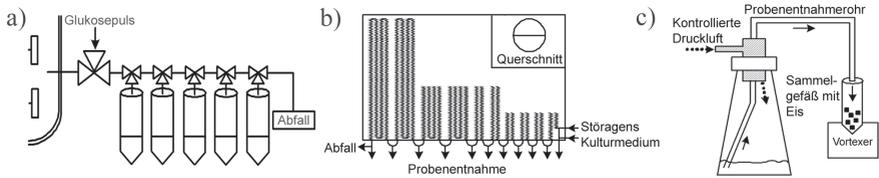


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Probenentnahmegeräte von Buziol *et al.* [18] (a), Mashego *et al.* [78] (b) und Aragon *et al.* [2] (c).

Visser *et al.* [136] konzipierten ein System basierend auf der kontinuierlichen Flussmethode. Das sog. BioScope besteht aus einer Helix einer sauerstoffdurchlässigen Silikonröhre. Die Geometrie soll das Wachstum als Biofilm verhindern und Dispersion sowie den Widerstand gegen Hitze und Massentransfer senken. 20 Helices werden hintereinander angeordnet und je ein Probenentnahmeanschluss dazwischen gesetzt. Diese 11 Anschlüsse ermöglichen eine Aufenthaltszeit im System von 4 s bis 69 s. Das BioScope wird an einen kontinuierlich betriebenen Bioreaktor angeschlossen, wobei eine Pumpe für eine konstante Flussrate sorgt. Das Gerät befindet sich in einer Temperiereinheit, um eine konstante Temperatur zu gewährleisten. Durch einen weiteren Zulauf nach dem ersten Probenentnahmeanschluss kann Störfüssigkeit, wie Glukose o. ä., zugegeben werden. Nach 140 mm Röhrenmaterial, äquivalent zu 1,5 s, ist eine komplette Durchmischung gegeben. Diese Mischzeit entspricht der des Reaktors. Während des Transportes tritt weder Sauerstoff- noch Glukoselimitation auf. Die Proben selbst tropfen aus den geöffneten Probenanschlüssen in mit 5 ml -40 °C Methanol befüllte Probenröhrchen. Dabei ist die Abstoppgeschwindigkeit eines Tropfens unter 0,5 s und eine gute Reproduzierbarkeit der Versuche ist gegeben.

Da das System u. a. auf Grund der flexiblen Silikonschläuche anfällig für mechanische Veränderungen ist und jede einzelne Helix auf ihre Eigenschaften hin einzeln untersucht werden muss, entstand durch die Überarbeitung von Mashego *et al.* [78] die zweite Generation des BioScopes (Abb. 1.4, b). Das Design basiert jetzt auf zwei hemispherischen Kanälen in einer zweidimensionalen Serpentinegeometrie, die die Pfropfenströmung gewährleistet. Die Kanäle werden in Acrylglas gefräst, übereinander gelegt und dabei durch

eine Silikonmembran voneinander getrennt. Diese Membran ermöglicht den Gasaustausch von  $O_2$  und  $CO_2$ . Diese Box wird ebenfalls in eine Temperatureinheit plaziert.

Für die Transkriptomenebene von Hefen konzipierte Aragon *et al.* [2] ein automatisiertes Probenentnahmegesät für Schüttelkolben (Abb. 1.4, c). Wie bei Glasreaktoren kann Probe nur über den Deckel entnommen werden, wenn man das System flexibel anwenden will und keine Baumaßnahmen vornehmen möchte oder kann. Ein Probenrohr führt durch den Deckel in ein auf einem Vortexgerät lagerndes Probenröhrchen, das mit 20 g Eis gefüllt ist. Eine Abkühlzeit auf  $4\text{ }^\circ\text{C}$  von  $<0,1\text{ s}$  kann damit erreicht werden. Das Kulturmedium wird aus dem Schüttelkolben durch Kopfdruck gefördert, der kurz vor der Probenentnahme zugeschaltet wird. Da der Druck im Gefäß über die Zeit durch den sinkenden Flüssigkeitsspiegel fällt, wird der Druck im Verlauf der Probenentnahme ständig erhöht. Dieses Druckverhalten wurde untersucht und in ein computergesteuertes System umgesetzt. Große Probenvolumina werden durch multiple Probenrohre und Probengefäße realisiert. Für 10 ml werden 10 s benötigt und Probenvolumen von 10 ml bis 30 ml bei variablem Probenintervall können gesammelt werden.

# 2 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die angewendeten Lösungen, Medien und Arbeitsmethoden vorgestellt. Einige Methoden, wie die automatisierte Probenentnahme, werden in den entsprechenden Kapiteln im Einleitungs-, sowie im Ergebnis- und Diskussionsteil genauer erläutert.

## 2.1 Medien und Stämme

Die Anzucht auf Agarplatten erfolgte auf Komplexmedium, die Kultivierung von *E. coli* und *S. cerevisiae* in Schüttelkolben und gegebenenfalls im Bioreaktor erfolgte mit Minimalmedium.

### 2.1.1 Minimalmedium für *E. coli*

Für *E. coli* wurde das Minimalmedium nach [51] mit 1/4 der angegebenen  $\text{MgSO}_4$  Konzentration eingesetzt. Die einzeln aufgeführten Lösungen in den Tab. 2.1, 2.2, 2.3, 2.4 wurden separat autoklaviert, um die Bildung von Maillard-Produkten zu vermeiden. Die Spurenelementlösung (Tab. 2.2) wurde zum Lösen der Bestandteile mit HCl auf pH 2 gebracht und anschließend sterilfiltriert. Das Medium wurde vor jeder Kultivierung frisch vereinigt (Tab. 2.5). Agarplatten wurden mit LB-Medium (Trypton substituiert mit Pepton) hergestellt (Tab. 2.6). Die Substanzen wurden jeweils in bidestilliertem Wasser gelöst.

Tabelle 2.1: Magnesiumsulfatlösung, 250fach konzentriert

Substanz	Chemische Formel	Konzentration [g l <sup>-1</sup> ]
Magnesiumsulfatheptahydrat	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	63,75

Tabelle 2.2: Spurenelementlösung, 500fach konzentriert

Substanz	Chemische Formel	Konzentration [g l <sup>-1</sup> ]
Aluminiumchloridhexahydrat	AlCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,25
Borsäure	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0625
Cobaltchlorid	CoCl <sub>2</sub>	0,475
Eisensulfatheptahydrat	FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	9,0
Kalziumchloriddihydrat	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	5,0
Kupferchlorid	CuCl <sub>3</sub>	0,1
Mangansulfatmonohydrat	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1,25
Natriummolybdatdihydrat	Na <sub>2</sub> MoO · 2 H <sub>2</sub> O	0,25
Zinksulfatheptahydrat	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,25

Tabelle 2.3: Glukoselösung, 10fach konzentriert

Substanz	Chemische Formel	Konzentration [g l <sup>-1</sup> ]
Glukosemonohydrat	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> · H <sub>2</sub> O	330,0

Tabelle 2.4: Salzlösung, 1,25fach konzentriert

Substanz	Chemische Formel	Konzentration [g l <sup>-1</sup> ]
Ammoniumchlorid	NH <sub>4</sub> Cl	0,2
Ammoniumsulfat	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
Kaliumdihydrogenphosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,25
Dikaliumhydrogenphosphat	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5
Natriumdihydrogenphosphat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3

## 2 Material und Methoden

---

Tabelle 2.5: Minimalmediumzusammensetzung (ad. 1 l MQ-Wasser)

Substanz	Volumen [ml]
Spurenelementlösung	2,4
Magnesiumsulfatlösung	4,8
Glukoselösung	100
Salzlösung	800

Tabelle 2.6: Agarplattenmedium

Substanz	Chemische Formel	Konzentration [g l <sup>-1</sup> ]
Agar	(C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub> ) <sub>n</sub>	20
Hefeextrakt		5
Natriumchlorid	NaCl	5
Pepton		10

### 2.1.2 CBS-Minimalmedium für *S. cerevisiae*

Für *S. cerevisiae* wurde das Minimalmedium nach Verduyn *et al.* [129] eingesetzt. Da die *S. cerevisiae* Knockoutmutanten Auxotrophien aufwiesen, wurde zusätzlich Uracil, Glutamin, Lysin, Leucin, Histidin und Methionin zugegeben (Tab. 2.14, 2.13). Nicht alle diese Substanzen sind für jede Knockoutmutante notwendig. Die Zugabe zu jeder Kultivierung erfolgte zur normierten Anwendung des Wachstumsmediums. Diese Lösungen, sowie die Vitamin- (Tab. 2.8) und Spurenelementlösung (Tab. 2.7), wurden sterilfiltriert. Der Puffer wurde auf pH 4,5 eingestellt (NaOH) (Tab. 2.9) und wie die anderen Lösungen (Tab. 2.10, 2.11, 2.12) autoklaviert. Die Lösung der Chemikalien erfolgte in bidestilliertem Wasser und die Zusammenstellung des Mediums erfolgte nach Tab. 2.15.

Tabelle 2.7: Spurenelementlösung, 1000fach konzentriert, Lagerung bei 4 °C, dunkel

Substanz	Chemische Formel	Konzentration [g l <sup>-1</sup> ]
Dinatriumethyldiamin-tetraacetat	Na <sub>2</sub> EDTA	15
Zinksulfatheptahydrat	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	4,5
Manganchloriddihydrat	MnCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1,0
Cobaltchloridhexahydrat	CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,16
Kalziumchloriddihydrat	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	3,39
Kupfersulfatpentahydrat	CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,3
Natriummolybdatdihydrat	Na <sub>2</sub> MoO · 2 H <sub>2</sub> O	0,25
Eisensulfatheptahydrat	FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	3,0
Borsäure	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,0
Kaliumiodid	KI	0,1

Na<sub>2</sub>EDTA und Zinksulfat der Spurenelementlösung wurden in 0,75 l bi-distilliertem Wasser gelöst (pH 6, 1 M NaOH). Alle weiteren Komponenten wurden bei pH 4 unter pH-Kontrolle einzeln zugegeben (1 M HCl). Die Lagerung erfolgte dunkel bei 4 °C (Tab. 2.7).

Tabelle 2.8: Vitaminlösung, 1000fach konzentriert, Lagerung bei 4 °C

Substanz	Chemische Formel	Konzentration [g l <sup>-1</sup> ]
D-Biotin	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	0,05
Ca-D-Pantothenat	HOCH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH(OH)CONHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> · 0,5 Ca	1,0
Nikotinsäure	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	1,0
myo-Inositol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	25,0
Pyridoxalhydrochlorid	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> · HCl	1,0
p-Aminobenzosäure	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	0,2
Thiaminhydrochlorid	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS · HCl	1,0

## 2 Material und Methoden

---

Tabelle 2.9: Bernsteinsäurepuffer, pH 4,5, 10fach konzentriert, 4°C Lagerung

Substanz	Chemische Formel	Konzentration [g l <sup>-1</sup> ]
Bernsteinsäure	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	100

---

Biotin (Tab. 2.8) wurde in 10 ml 0,1 M NaOH gelöst und anschließend mit 0,75 l bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Der pH wurde mit 1 M HCl auf 6,5 eingestellt und die restlichen Komponenten unter pH Kontrolle einzeln zugegeben. Zuletzt wurde die Lösung ebenfalls unter pH Kontrolle auf 1 l aufgefüllt (Tab. 2.8).

Tabelle 2.10: Glukoselösung, 5fach konzentriert

Substanz	Chemische Formel	Konzentration [g l <sup>-1</sup> ]
Glukosemonohydrat	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> · H <sub>2</sub> O	110

---

Tabelle 2.11: Kaliumlösung, 10fach konzentriert

Substanz	Chemische Formel	Konzentration [g l <sup>-1</sup> ]
Kaliumdihydrogenphosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30

---

Tabelle 2.12: Sulfatlösung, 10fach konzentriert

Substanz	Chemische Formel	Konzentration [g l <sup>-1</sup> ]
Ammoniumsulfat	(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	25
Magnesiumsulfatheptahydrat	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2,5

---

Tabelle 2.13: Aminosäure- und Pyrimidinbaselösungen, 12,5fach konzentriert

Substanz	Chemische Formel	Konzentration [g l <sup>-1</sup> ]
Uracil	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1
Glutamat	HO <sub>2</sub> CCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH (NH <sub>2</sub> )CO <sub>2</sub> H	1,5

---

Tabelle 2.14: Aminosäurelösungen, 100fach konzentriert

Substanz	Chemische Formel	Konzentration [g l <sup>-1</sup> ]
Lysin	H <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH(NH <sub>2</sub> )CO <sub>2</sub> H	12
Leucin	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> CH(NH <sub>2</sub> )CO <sub>2</sub> H	12
Histidin	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	8
Methionin	CH <sub>3</sub> SCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH(NH <sub>2</sub> )CO <sub>2</sub> H	12

Tabelle 2.15: Minimalmedium (ad 1 l MQ-Wasser)

Substanz	Volumen [ml]
AS-Lösung	10
ASPB-Lösung	80
Glukoselösung	200
Kaliumlösung	100
Spurenelementlösung	1
Succinatpuffer	100
Sulfatlösung	200
Vitaminlösung	1

Tabelle 2.16: Agar LB-Medium [74]

Substanz		Konzentration [g l <sup>-1</sup> ]
Agar	(C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub> ) <sub>n</sub>	20
Hefeextrakt		20
Pepton		10
Glukosemonohydrat	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> · H <sub>2</sub> O	11

Die Glukose für die Agarplattenherstellung wurde als 10fach Stammlösung nach dem Autoklavieren und nach Erreichen einer Temperatur von unter 60 °C in die Agarlösung gegeben (Tab. 2.16).

Zur Auswahl eines geeigneten Stressfaktors wurde zunächst die Anzucht auf verschiedenen Agarplatten, versetzt mit verschiedenen Stressfaktoren, durch-

geführt. Ausplattiert wurden Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase in Minimalmedium (Kap. 2.1.1, 2.1.2) angezogene Kulturen. Als Stressfaktoren wurde der pH-Wert (pH 5 - Essigsäure, pH 6,8 - Komplexagar selbst, pH 8,5 - 5 M NaOH), 100  $\mu$ M Diamid (oxidativ), 0,6 M NaCl (osmotisch), 55  $\mu$ M CdCl (Schwermetall), sowie 5,15 mM Koffein eingesetzt. NaCl wurde separat autoklaviert. Die sterilfiltrierten Diamid- und CdCl<sub>2</sub>-Lösungen wurde nach dem Autoklavieren der Agarlösung nach Erreichen einer Temperatur unter 60 °C zugegeben.

Die Anzucht auf Agarplatten erfolgte im Brutschrank bei 30 °C über Nacht für *E. coli* oder über zwei bis mehrere Tage für *S. cerevisiae*, je nach Anpassungsfähigkeit und Wachstumsgeschwindigkeit der Knockoutmutante.

### 2.1.3 Stämme und deren Lagerung

In Tab. 2.17 ist der in dieser Arbeit verwendete *S. cerevisiae* Elternstamm, die dazugehörigen Knockoutmutanten, sowie der *E. coli* Stamm mit den jeweiligen genetischen Eigenschaften und Lieferanten aufgeführt.

Tabelle 2.17: Stämme

<i>S. cerevisiae</i> MAT $\alpha$	Genotyp	Lieferant
BY4742 (ID BY4742) (Elternstamm)	<i>his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Open Biosystems YSC1049-645441
BY4742 (ID 15212) ( <i>aco1<math>\Delta</math></i> )	<i>his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 YLR174w::kanMX4</i>	Open Biosystems YSC1021-548376
BY4742 (ID 17022) ( <i>aco2<math>\Delta</math></i> )	<i>his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 YJL200c::kanMX4</i>	Open Biosystems YSC1021-550366
BY4742 (ID 11030) ( <i>fum1<math>\Delta</math></i> )	<i>his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 YPL262w::kanMX4</i>	Open Biosystems YSC1021-547047
BY4742 (ID 12877) ( <i>gnd1<math>\Delta</math></i> )	<i>his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 YHR183w::kanMX4</i>	Open Biosystems YSC1021-547682

Fortsetzung...

Tabelle 2.17: Fortsetzung Tabelle Stämme

<i>S. cerevisiae</i> MAT $\alpha$	Genotyp	Lieferant
BY4742 (ID 15908) ( <i>gnd2</i> $\Delta$ )	<i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 YGR256W::kanMX4	Open Biosystems YSC1021-549096
BY4742 (ID 10202) ( <i>icl1</i> $\Delta$ )	<i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 YER065c::kanMX4	Open Biosystems YSC1021-547474
BY4742 (ID 14123) ( <i>idp2</i> $\Delta$ )	<i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 YLR174w::kanMX4	Open Biosystems YSC1021-547784
BY4742 (ID 14878) ( <i>mae1</i> $\Delta$ )	<i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 YKL029c::kanMX4	Open Biosystems YSC1021-547837
BY4742 (ID 15893) ( <i>pfk1</i> $\Delta$ )	<i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 YGR240c::kanMX4	Open Biosystems YSC1021-548668
BY4742 (ID 10791) ( <i>pfk2</i> $\Delta$ )	<i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 YMR205c::kanMX4	Open Biosystems YSC1021-546690
BY4742 (ID 11971) ( <i>zwf1</i> $\Delta$ )	<i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 YNL241c::kanMX4	Open Biosystems YSC1021-548812
<i>E. coli</i>	Genotyp	Lieferant
K-12	Unterstamm MG1655	DSMZ

Die Kryoampullen von *E. coli* wurden bei -86 °C gelagert, und von diesen wurde auch angeimpft. *S. cerevisiae* wurde auf YPD-Platten (Kap. 2.16) als Lebendkultur angezogen und bei 4 °C im Kühlschrank maximal einen Monat gelagert und zum Animpfen genutzt. Die Petrischalen wurden mit Parafilm versiegelt, um das Austrocknen der Platten zu verzögern. Zusätzlich wurden Lagerkulturen in CBS-Medium (Kap. 2.1.2) hergestellt und bei -80 °C gelagert (25% v/v Glycerin). Die Agarplatten wurden, bis auf die Platte des Elternstamms BY4742, mit Geneticin (0,2 g l<sup>-1</sup>) als Selektionsantibiotikum versetzt. Geneticin wurde steril in Kryoampullen als 200 g l<sup>-1</sup> Stammlösung bei -20 °C gelagert.

### 2.2 Kultivierung

Im folgenden Kapitel werden die Kultivierungsbedingungen und die Methoden der Kultivierungsüberwachung beschrieben.

#### 2.2.1 Bestimmung der optischen Dichte und Biotrockenmassekonzentration

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) erfolgte über die Absorptionsmessung (UV/VIS Photometer, Helios  $\alpha$ , Unicam, GB) Für *E. coli* wurde eine Wellenlänge von 660 nm und für *S. cerevisiae* 600 nm verwendet. Der lineare Bereich des Gerätes erstreckt sich von 0,05 bis 0,3. Die dadurch notwendigen Verdünnungsschritte wurden mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  durchgeführt. Der Verdünnungsfaktor wurde durch auswiegen von Küvette (VWR), Probe und  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  bestimmt.

Die Korrelation der Biotrockenmasse und der OD wurde für beide Organismen in der SpeedVac (Vacufuge 5301, Eppendorf, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden 4 x 2 ml, (*E. coli*) und 1 x 50 ml des Kulturmediums (*S. cerevisiae*) verwendet. Nach Zentrifugation (5 min, 4 °C, 13000 g, bzw. 10000 g) wurde der Überstand verworfen und die Reaktionsgefäße in der Speedvac über Nacht getrocknet. Die Gefäße wurden entnommen und nach Erreichen der Raumtemperatur ausgewogen. Die Berechnung der Biotrockenmassekonzentration erfolgte über Formel 2.1, wobei es sich bei den Variablen um das leere, getrocknete Falkongefäß (Falkon, leer), das Falkon mit dem getrockneten Biomassepellet (Falkon, getrocknetes Pellet), sowie um das Falkon mit der flüssigen Probe (Falkon, Probe) handelt.

$$c_x = (m_{\text{Falkon,leer}} - m_{\text{Falkon,getrocknetesPellet}}) / (m_{\text{Falkon,Probe}} - m_{\text{Falkon,leer}}) \quad (2.1)$$

#### 2.2.2 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten

Die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (*Colony Forming Units*, CFU) erfolgte über ausplattieren von je zwei mal 20  $\mu\text{l}$  einer mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

verdünnten Kultur. Ca. 300 Kolonien pro Platte werden angezogen. Die Duplikate wurde am folgenden Tag (*E. coli*), bzw. nach zwei Tagen (*S. cerevisiae*) Inkubation im 30 °C Brutschrank (B. Braun, Deutschland) ausgezählt.

### 2.2.3 Kultivierung von *E. coli*

Die Vorkulturen wurden in 500 ml Schüttelkolben mit 50 ml Medium (geringer wenn weniger Hauptkultur benötigt wurde), die mit vier Schikanen ausgestattet waren, bei 30 °C und 120 rpm über Nacht angezogen. Die Vorkultur wurde in ein 50 ml Falkon überführt und zentrifugiert (3 min, 4 °C, 10000 g). Der Überstand wurde verworfen. Die Vorkultur wurde in 50 ml Falkons überführt und zentrifugiert (3 min, 4 °C, 10000 g). Der Überstand wurde verworfen und das Biopellet an Hand der OD der Vorkultur in frischem Medium so resuspendiert, dass 1 ml der Suspension zum Animpfen der Hauptkultur mit einer definierten OD verwendet werden konnten. Die Hauptkulturen wurde in 250 ml Schüttelkolben mit vier Schikanen bei 37 °C und 120 rpm angezogen. Die Bestimmung der OD-Biomassekorrelation erfolgte in 2l Kolben, die ebenfalls 4 Schikanen aufwiesen.

### 2.2.4 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Vorkultur von *S. cerevisiae* wurde in 100 ml Kolben mit vier Schikanen über Nacht bei 30 °C, 120 rpm und mit 50 ml Kultivierungsvolumen angezogen. Für die folgenden Hauptkulturen bei gleichen Kultivierungsbedingungen und Schikanenanzahl wurden zur OD-BTM Korrelation 2l Kolben mit 500 ml Kultivierungsvolumen verwendet. Für die Versuche zur Auswirkung der Apstopplösungen wurden 250 ml Kolben mit 50 ml Kultivierungsvolumen verwendet.

Die Vorkultur wurde in 50 ml Falkons überführt und zentrifugiert (3 min, 4 °C, 10000 g). Der Überstand wurde verworfen und das Biopellet an Hand der OD der Vorkultur in frischem Medium so resuspendiert, dass 1 ml der Suspension zum Animpfen der Hauptkultur mit einer definierten OD verwendet werden konnten.

### 2.2.5 Kultivierung im Bioreaktor

Die Kultivierungen wurden in einem 1 l Bioreaktor von Bioengineering mit einem Kultivierungsvolumen von 400 ml durchgeführt. Kultiviert wurde im Bioreaktor *S. cerevisiae*. Kultivierungsbedingungen betragen 30 °C mit einer Begasungsrate von  $1 \text{ l}_{\text{Zuluft}} \cdot \text{l}^{-1}_{\text{Reaktorvolumen}} \cdot \text{min}^{-1}$  und einer Rührerdrehzahl von  $600 \text{ min}^{-1}$ . Zur Einstellung des pH-Wertes wurde 5 M NaOH verwendet. Die Beimpfung erfolgte mit gewaschenen Zellen auf OD 2. Während der Kultivierung wurde die Gelöstsauerstoffkonzentration ( $\text{pO}_2$ ), der pH, die Temperatur (Temperierung über einen Doppelmantel) sowie die  $\text{CO}_2$  und  $\text{O}_2$  Konzentration im Abgas überwacht. Das Wachstum wurde über die OD und die Glukosekonzentration (YSI 2000 Select, YSI Incorporated, USA) durch wiederholte Probenentnahme über den Versuchszeitraum analysiert. Nach Erreichen einer OD von ca. 9 wurde die Kultivierung durch Zufuhr von frischem Medium und Abzug von Kultivierungsmedium (Schlauchpumpe REGLO Digital, Ismatec, Schweiz) als kontinuierliche Kultivierung geschaltet (Durchflussrate 0,17), da die Zellen auf Grund einer Limitation bei einer OD von ca. 10 in die stationäre Phase über gehen. Die Probenentnahme erfolgte durch ein Probenentnahmerohr (Bioengineering, Schweiz).

### 2.2.6 Automatisierte Probenentnahme und Pulsaufgabe

Die rasche Probenentnahme erfolgte durch das konstruierte Probenentnahmergerät, dessen Aufbau und Funktionsweise in Kapitel 3.3 beschrieben wird. Die Falkons wurden direkt aus der -86 °C Truhe in den Teller gebracht, der zuvor mit Eis gefüllt worden war. Die Aufgabe des Pulses erfolgte durch den Probenentnahmezugang des Bioengineering Bioreaktors direkt in das Medium über eine 50 ml Einwegspritze. In der Spritze befand sich 4 ml der Testsubstanz (z. B.  $400 \text{ g l}^{-1}$  Glukose,  $20 \text{ g l}^{-1}$  Koffein), sowie sterile Luft im restlichen Volumen der Spritze, um das gesamte Lösungsvolumen durch den Zugang in das Medium drücken zu können. Die rasche Probenahme erfolgte wie in Kapitel 3.3 beschrieben.

## 2.3 Abstoppprozess

Zur Bestimmung der intrazellulären Konzentration der Metabolite wurden die Zellen durch kalte Lösung rasch abgestoppt, ein Prozess, der auch als *quenching* bezeichnet wird [19]. Zur Minimierung der Metabolitverluste aus den Zellen, die während des Abstoppprozesses auftreten, wurden verschiedene Methanolkonzentrationen, unterschiedliche Starttemperaturen, sowie verschiedene Additive getestet.

Für die Untersuchungen wurde ein Verhältnis von Probe zu Abstopplösung von 1:5 eingesetzt [19]. Die Abstopplösung wurde in 50 ml Falkons vorgelegt und bei  $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Vor (bei Raumtemperatur) und nach Zugabe der Probe wurde jedes Reaktionsgefäß zur Bestimmung der exakten Probenmenge ausgewogen. Die Pelletierung der Probe erfolgte in einer Biofuge Stratos (HERAEUS, Deutschland) ( $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 3 min, 10000 g). Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen extrahiert. Für die GC-MS Analytik wurden die Proben vor der Extraktion zwei mal mit 100 % MeOH bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gewaschen um Medienbestandteile zu entfernen. Der Transport der Proben erfolgte jeweils auf Eis.

Die Untersuchung der Auswirkung der Abstopplösung erfolgte mit Schüttelkolbenkulturen (Kap. 2.2.3, 2.2.4). Vor der Probenahme wurden die Falkontubes in einem vortemperierten Kryostat fixiert. 4 ml Probe wurde mit einer Pipettierhilfe (Hirshmann Laborgeräte, Deutschland) und einer 10 ml Glaspipette (Brand), rasch in die Lösung pipettiert. Die Temperatur der Abstopplösung wurde mit Hilfe des Datenloggers 177-T4 von Testo überwacht. Von den jeweiligen Überständen wurden Proben zur Bestimmung der ATP Konzentration genommen (Kap. 2.3.3), deren Auftreten auf eine Zerstörung der Zellwände während der Probenentnahme hindeutet.

Für die rasche Probenentnahme wurde für *S. cerevisiae* 100 % MeOH eingesetzt. Die Falkontubes wurden dabei im Probenteller fixiert, der zuvor mit Eis gefüllt worden war. Zwölf Proben konnten parallel bearbeitet werden. Alle überzähligen Proben wurden im  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  Kryostat (RK20KS, Lauda, Deutschland) zwischengelagert bis die ersten zwölf Proben in die Extraktion gebracht worden waren.

### 2.3.1 Analyse der Zellintegrität beim Abstoppprozess

Die abgestoppten Zellen wurden zentrifugiert (5 min,  $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 10000 g) und im Volumen der eingesetzten Probenmenge in  $1\times$  PBS Puffer (Tab. 2.18) resuspendiert und auf Eis gelagert. Die OD wurde ermittelt und mit der der unbehandelten Zellen verglichen um den Anteil an lysierten Zellen zu bestimmen [128].

Die Ermittlung der Zellintegrität erfolgte durch die Markierung mit Propidiumiodid (Stammlösung  $5\text{ g l}^{-1}$ , Arbeitslösung  $200\text{ }\mu\text{g l}^{-1}$ , Endkonzentration  $10\text{ }\mu\text{g l}^{-1}$ ). Die Proben wurden mit PBS Puffer auf OD 0,1 verdünnt und mit PI versetzt. Vor der Messung wurden die Zellen mindestens 4 min mit PI inkubiert. Als Referenz dienten unbehandelte markierte und unmarkierte Zellen aus der Kultivierung, sowie unmarkierte Zellen aus dem Abstopppverfahren. Die Messung der Zellen erfolgte in einem Flowzytometer der Firma Beckman Coulter (Cell Lab Quanta<sup>TM</sup> Flow Cytometer). Dabei wurde die Fluoreszenz auf das sogenannte elektronische Zellvolumen normiert. Die ermittelten Peakflächen konnten intakten und beschädigten Zellen zugeordnet werden.

Tabelle 2.18: PBS, 20fach konzentriert

Substanz	Chemische Formel	Konzentration [ $\text{g l}^{-1}$ ]
Natriumchlorid	NaCl	8
Kaliumchlorid	KCl	0,2
Dinatriumhydrogenphosphat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1,44
Kaliumdihydrogenphosphat	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,24

### 2.3.2 Zellextraktion zur Analyse der Apoptopplösungsauswirkung

Für die Analyse der ATP Konzentration (Kap. 2.3.3) im Zellpellet wurde 1 ml kochendes  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  (30 mM TEA) [51] zur Resuspension der Zellen zugegeben und die Suspension in einem Wasserbad (Köttermann, Deutschland) ( $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) für 15 min inkubiert. Das extrahierte Zellpellet wurde 1 min auf Eis abgekühlt

und anschließend zentrifugiert (4 °C, 5 min, 10000 g). Der Überstand wurde ausgewogen und bei -86 °C bis zur Analyse gelagert. Der Transport der Proben erfolgte auf Eis.

### 2.3.3 ATP Bestimmung

Die Bestimmung des ATP Gehaltes in den Proben erfolgte enzymatisch mit den ATP Determination Kits von Invitrogen (USA) und Biaffin (Deutschland). Extraktionsproben wurden zur Einhaltung des linearen Messbereichs 1:20 mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> verdünnt und mit dem Kit von Invitrogen analysiert. Alle Abstopplösungsproben wurden mit dem Analysekit von Biaffin bestimmt, da der ATP Gehalt in der Probe durch die Verdünnung mit der Abstopplösung zu gering für die Bestimmung mit dem Kit von Invitrogen war. Der Abstopplösungsüberstand wurde auf Grund des Methanolgehaltes 1:10 mit bidestilliertem Wasser verdünnt.

Die Messung wurde in weißen 96 well Platten (NUNC, Deutschland) durchgeführt. Die Analyse des ATPs erfolgt in beiden Fällen über einen Lumineszenznachweis mit einem Tecan Genios, gesteuert durch die Software Magellan (Tecan, Schweiz). Es wurden im Falle des Biaffinkits 20 µl Probe mit 20 µl Analyselösung und bei dem Invitrogenkit 10 µl mit 90 µl versetzt und anschließend 10 min im Mikrotiterplattenreader bei maximaler Auslenkung bei 28 °C geschüttelt. Nach 3 s Setzzeit erfolgte die Messung der Proben. Die Bestimmung des ATP Gehaltes erfolgte über eine bei jeder Messung mitlaufender Kalibrierung mit der von Invitrogen mitgelieferten ATP Lösung, verdünnt mit MQ-Wasser. Jede Probe wurde dreifach bestimmt. Die berechnete Menge an ATP in der Lösung wurde anschließend auf die eingesetzte BTM normiert. Sowohl das Kit von Invitrogen, die fertige Reaktionslösung des Biaffin Kits als auch die ATP-Standards wurden bei -20 °C gelagert. Die Reaktionslösung des Invitrogenkits wurde jeweils frisch angesetzt.

### 2.3.4 Zellextraktion zur GC-MS Analyse von *S. cerevisiae* und Hydrolyse der Proben

Die Schüttelkolbenkulturen wurden bis auf eine OD von 6 angezogen. Anschließend wurde eine manuelle Probenentnahme durchgeführt. Das Zellpellet aus dem Abstoppschritt wurde in 1,5 ml Extraktionslösung (1,5 ml 100% EtOH/ 0,2 g l<sup>-1</sup> Ribitolstammlösung) resuspendiert und 15 min bei 70 °C im Ultraschallbad (Bandelin electronic, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis ca. 5 min abgekühlt. 1,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> (4 °C) wurde zu jeder Probe gegeben und 1 min homogenisiert. Die Proben wurden erneut mit 1 ml Chloroform homogenisiert. Die Mischung wurde zentrifugiert (4 °C, 5 min, 10000 g) und die wässrige Phase abgenommen. 1 ml der wässrigen Phase wurde in 1 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Deutschland) überführt und in einer SpeedVac (Vacufuge 5301, Eppendorf, Deutschland) getrocknet (1 h Rotation, weitere Trocknungszeit ohne Rotation bis zur vollständigen Verdampfung der Lösung) [10]. Bis zur anschließenden Hydrolyse wurden die Proben bei -86 °C gelagert (angepasst nach [110]).

#### 2.3.4.1 GC-TOF-MS basierte Metabolitanalyse

Die GC-TOF-MS basierte Metabolitanalyse erfolgte nach dem angepassten Protokoll von Scherling [110] mit einem HP 6890 Gaschromatographen (Agilent, Deutschland) via Kaltaufgabe System mit deaktivierten Standard-ALEX-Linern (GERSTEL, Deutschland), gekoppelt an ein Pegasus IV TOF Massenspektrometer (LECO, USA). Durch die splittlose Injektion von 1 µl derivatisierter Probe in das Kaltaufgabe System (60 °C, 1 min isotherm, 30 °C min<sup>-1</sup>; 280 °C, 3 min isotherm) kann eine nahezu diskriminierungsfreie Übertragung der Analyten auf die Säule garantiert werden. Als chromatographische Trennsäule wurde eine VF-5ms Kapillarsäule verwendet, 30 m lang, 0.25 mm ID, 25 µm Film und eine 10 m EZ-Guard Vorsäule (Agilent, Deutschland), bei konstantem Fluss von 2 ml min<sup>-1</sup> Helium mit temperaturprogrammierter Verdampfung (80 °C, 2 min isotherm; 80-360 °C, 15 °C min<sup>-1</sup>; 360 °C, 5 min isotherm). Vor jeder Injektion wurde der Liner durch Injektion von 1 µl MST-

FA gespült; nach ca. 80 Injektionen erfolgte ein manueller Linerwechsel. Die Datenakquisition erfolgte softwaregesteuert mit Hilfe der LECO® ChromaTOFTM Software (LECO, USA) bei einer Scanrate von  $20 \text{ s}^{-1}$  in einem Massenbereich von  $m/z$  71-600 nach Elektronenstoss-Ionisation bei 70 eV. Als Referenzgas für das (Auto)Tuning diente Trisperflourbutylamin (FC43) (PerkinElmer Inc., USA). Zu Beginn und am Ende jedes Probensets wurde ein *Quality Control*-Standardmix injiziert. Alle zu einer Probencharge gehörenden Chromatogramme wurden zunächst mit Hilfe der LECO® ChromaTOFTM Software und der Golm-Metabolom-Datenbank (GMD@CSB.DB, Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Deutschland) Spektrenbibliothek abgeglichen. Um einen genauen Retentionsabgleich mit der Bibliothek zu gewährleisten, müssen die systembedingten Retentions Shifts mit Hilfe von n-Alkanen und der Berechnung des Retentions Index ausgeglichen werden. Die annotierten Peaks werden daraufhin in einem Referenz-Chromatogramm markiert, welches anschließend gegen alle Chromatogramme abgeglichen wird. Für die akkurate relative Quantifizierung wurde jede Fläche mittels isotoopenmarkierten Internen Standard und Frischgewicht normalisiert. Die von LECO® ChromaTOFTM erzeugten Daten konnten dann mit Hilfe der Software GC-GC-MS Data Matrix Creator [63] exportiert und als Matrix zur statistischen Auswertung abgelegt werden [110].

### 2.3.4.2 Derivatisierung für GC-TOF-MS

Die Derivatisierung der Proben erfolgte nach dem angepassten Protokoll von Scherling [110]. Eingeengte Metabolitfraktionen wurden unter starkem Schütteln zunächst mit  $20 \mu\text{l}$  einer frisch angesetzten Methoxyaminhydrochloridlösung ( $40 \text{ mg min}^{-1}$  Pyridin) für 90 min bei  $30^\circ\text{C}$  gelöst, und anschließend mit weiteren  $135 \mu\text{l}$  MSTFA (Machery-Nagel, Deutschland) für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Vor der Injektion wurden die derivatisierten Proben bei  $14000 \text{ g}$  für 5 min zentrifugiert und anschließend mit  $1 \mu\text{l}$  Retentionsindex-Markerlösungen (n-Alkane  $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{26}$ , je  $2 \mu\text{l ml}^{-1}$  in Pyridin sowie n-Fettsäuremethylester-Standardlösung  $\text{C}_8$ - $\text{C}_{30}$ , je  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$   $\text{CHCl}_3$ ) versetzt [110].

### 2.3.5 Chemometrische Analyse

Die chemometrischen Analysen wurden mit dem Programm Tigr Multiexperiment Viewer (TigrMeV) Version 4.5.1 [106] durchgeführt.

#### 2.3.5.1 Dimensionsreduktion – Hauptkomponentenanalyse (PCA)

Die Dimensionsreduktion der aus der Metabolitanalyse resultierenden hochdimensionalen Datensätzen zur zweidimensionalen Darstellung der Datenmengen mittels Hauptkomponentenanalyse erfolgte nach vorangegangener Normalisierung nach Formel 2.2 in TigrMeV, welche auf der Kovarianzmatrix gemäß des implementierten PCA Scriptes basiert. Bei den Variablen handelt es sich um den Messwert eines Metabolits einer einzelnen Probe ( $a_i$ ), den Daten zu einem Metabolit gemittelt über alle gemessenen Proben ( $\bar{a}$ ), sowie die dazugehörige Standardabweichung ( $\sigma_a$ ).

$$x = (a_i - \bar{a})/\sigma_a \quad (2.2)$$

Bei der PCA werden die Originaldaten durch eine geringere Anzahl von Variablen ersetzt, die trotzdem die relevanten Informationen beibehalten. Dabei werden redundante Variablen, d.h. Variablen die stark mit einer anderen korrelieren und damit keine oder kaum neue Informationen enthalten, entfernt. Dies erfolgt durch eine lineare Transformation des Originaldatensatzes. Korrelierte Variablen werden somit in neue Variablen zusammengefasst, wobei jede so entstehende Variable als Hauptkomponente bezeichnet wird, die untereinander unkorreliert sind und redundanzfrei den größten Teil der Gesamtvarianz erklären. Die Hauptkomponenten bilden dabei die Basisvektoren des neuen Koordinatensystems, welches durch die Linearkombination entsteht. Dadurch können die transformierten Daten durch wenige Hauptkomponenten, d.h. Dimensionen, passend abgebildet werden und eine Differenzierung der Proben wird sichtbar. Die Hauptkomponenten beinhalten dabei die größte Varianz innerhalb des Datensatzes [28, 110].

### 2.3.5.2 T-Test-Clustering

T-Test-Clustering und die farbcodierte Darstellung relativer Änderungen der Metabolitkonzentrationen erfolgte nach vorangegangener Normalisierung nach Formel 2.2 mit Hilfe des in TIGRMeV implementierten Algorithmus. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen durchgeführt. Die zur Verwerfung der Nullhypothese, dass die  $n$  untersuchten Stichproben sich nicht unterscheiden, angenommene Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  betrug 0,01. Die Clusteranalyse erfolgte mit den Distanzfunktionen K-mean-Algorithmus und der euklidische Distanz zur Bestimmung des Abstands oder der Ähnlichkeiten von Metabolitgruppen [110].

# 3 Ergebnisse und Diskussion

Die Stressantwort von Zellen ist vielfältig und die Analyse lässt Rückschlüsse auf Metabolische Reaktionswege und Möglichkeiten der Vorhersage über die Reaktion anderer Organismen zu. Das Stressverhalten und die Stressantwort von *E. coli* und *S. cerevisiae* wird in dieser Arbeit untersucht. Dafür kommen für die Versuche verschiedene Analysemethoden zum Einsatz. Da die Untersuchungen auf Metabolomebene stattfinden, muss eine geeignete Probenentnahmeverfahren verwendet werden, d. h. der Metabolismus muss sehr schnell abgestoppt werden. Um eine Abstopplösung zu identifizieren die für diese Belange eingesetzt werden kann, kommen verschiedene Starttemperaturen und Zusammensetzungen zum Einsatz. Durch die Verwendung von kalten Abstopplösungen kommt es oft zum Verlust von intrazellulären Metaboliten, was eine genaue Bestimmung der Konzentration in den Zellen zum Zeitpunkt der Probenentnahme sehr behindert oder gar unmöglich macht. Die für die Analyse der Zellschädigung bei diesem Prozess eingesetzte Methode der Durchflusszytometrie wird zunächst validiert und dann bei den Versuchen in Kombination mit einer PI Färbung eingesetzt. Zusätzlich werden weitere Parameter untersucht, um die Zellintegrität zu überprüfen. Dazu gehört die Bestimmung der ATP-Menge, die sich nach dem Abstoppen außerhalb der Zellen befinden, sowie die OD der resuspendierten Proben im Verhältnis zur Kultivierung für Rückschlüsse auf Zelllyse.

Die Untersuchung des eigentlichen Stressverhaltens erfolgt mit *S. cerevisiae* in einem ersten Vorversuch auf festem Komplexmedium. Dieses wird mit verschiedenen Stressfaktoren versetzt und dient der Feststellung der Wachstumsfähigkeit und des Wachstumsverhaltens im Vorfeld von Kultivierungsversuchen. In Schüttelkolbenkultivierungen werden anschließend die Wachs-

tumsraten in Minimalmedium mit den ausgewählten Stressfaktoren Diamid und Koffein bestimmt. Das Metabolic Profiling erfolgt mittels GC-MS. Das Abstoppen der Proben erfolgt daher mit der als geeignet identifizierten Abstopplösung. Zum einen erfolgt die Analyse der Stressantwort in Kombination mit einer manuellen Probenentnahme mit Schüttelkolbenkultivierungen, die unter Langzeitstressbedingungen wachsen. Und zum anderen in Kombination mit einer im Zuge dieser Arbeit konstruierten automatisierten Probenentnahmeeinheit, gekoppelt an einen kontinuierlich betriebenen Bioreaktor, zur Bestimmung der dynamischen Änderung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen auf einen Stressimpuls.

### 3.1 Auswirkung von kalten Abstopplösungen

Zunächst erfolgt die Validierung der Durchflusszytometrie. Im Anschluss daran werden die Abstopplösungen mit verschiedenen Starttemperaturen und Zusammensetzungen für *E. coli* getestet. Für *S. cerevisiae* erfolgt eine weitere Untersuchung der Auswirkung bei verschiedenen MeOH-Konzentrationen und Starttemperaturen.

#### 3.1.1 Validierung der Durchflusszytometrie

Die Untersuchung der möglichen Ursachen für den Metabolitverlust aus Zellen durch die Probenentnahme und das Abstoppen kann durch die Bestimmung der Zellmembranintegrität mittels Durchflusszytometrie erfolgen. Dazu wird in dieser Arbeit das Gerät von Beckman verwendet (Cell Lab Quanta<sup>TM</sup> Flow Cytometer). Diese Methode muss validiert werden, da sie für Untersuchungen wie in dieser Arbeit noch nicht verwendet wurde. In der Durchflusszytometriemethode sollen mit Hilfe von PI intakte von durch den Prozess beschädigte Zellen unterschieden werden. Nebe-von-Caron und Badley [21] beschreiben die Evaluation der Membranintegrität als sichersten Nachweis der Zellviabilität, da die Integrität ein Indikator für das Potential einer Zelle ist, Gradienten aufzubauen, d. h. das Membranpotential, und somit ein Indikator der metabolischen Aktivität. Zellen mit beschädigten oder beeinträch-

### 3 Ergebnisse und Diskussion

tigten Membranen werden als tot betrachtet, da große Membrandefekte den Zellen Substanzen entziehen, die sie normalerweise akkumulieren würden, sie Toxinen aussetzt, die die Zellmembran normalerweise nie überwinden würden und die Fähigkeit einen elektrochemischen Gradienten aufzubauen oder zu erhalten verloren geht [113, 29].

Die Validierung erfolgt durch die thermische Behandlung von jeweils 1 ml Kultur aus der exponentiellen Phase in einem Thermoblock (99 °C, 700 rpm, HeizThermoMixer MHL 20). Dabei wird 10 Minuten lang jede Minute eine Probe aus dem Thermoblock entnommen und auf Eis abgekühlt. Jeweils 20 µl einer behandelten Probe werden auf Agarplatten ausplattiert. Von den Proben wird außerdem die OD bestimmt. Für die Analyse im Durchflusszytometer werden die Proben mit Hilfe von sterilfiltriertem 1xPBS auf eine OD von 0,1 verdünnt. Die Vermessung der Proben erfolgt einmal ohne und einmal mit PI Zusatz (Kap. 2.3.1). Dies dient der Überprüfung der Reproduzierbarkeit und der Untersuchung der Auswirkung von PI auf die Messung, d. h. ob das Analyseverfahren in der Lage ist, aussagekräftige Daten zu liefern, die durch das Experiment, nicht aber durch die Messmethode bedingt werden.

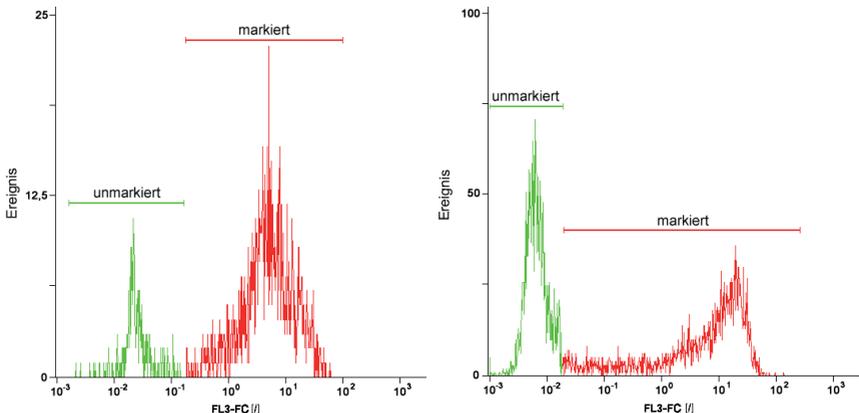


Abbildung 3.1: **FL3-FC von *E. coli*(links) und *S. cerevisiae*(rechts)**. Nach Behandlung der Zellen mit 60 % MeOH/Glycerin/NaCl (*E. coli*) und 60 % MeOH (*S. cerevisiae*) und Zugabe von PI kann im FL3-FC Diagramm statt einem einzelnen Peak von unmarkierten Zellen (grün), ein weiterer beobachtet werden (rot), wobei es sich um mit PI markierte Zellen handelt.

Die Auswertung der auf das Elektronische Volumen (EV) normierten Fluoreszenz (FL3), FL3-FC, ergibt zwei voneinander unterscheidbare Peakflächen nach der Zugabe von PI, davor lediglich eine einzelne, die in Abbildung 3.1 als unmarkiert bezeichnet wird. Im Verlauf der thermischen Behandlung sinkt in den mit PI versetzten Proben die Fläche des ersten Peaks stark ab. Bereits nach 2 Minuten ist fast ausschließlich Peakfläche 2 aufzufinden. Damit steigt bei *E. coli* (Abb. 3.2, links) der Flächenanteil des zweiten Peaks auf ca. 95 % und bei *S. cerevisiae* (Abb. 3.3, links) auf ca. 100 %. Die in diesen Abbildungen jeweils auf der rechten Seite dargestellten Ausstriche zeigen in Korrelation zur Annahme, dass es sich bei der zweiten Peakfläche um beschädigte Zellen handelt, für beide Organismen ebenfalls nach einer thermischen Behandlung ab 2 Minuten keine koloniebildenden Zellen mehr. Das Wachstumsverhalten deutet auf eine vollständig inaktivierte, d. h. beschädigte Zellpopulation hin.

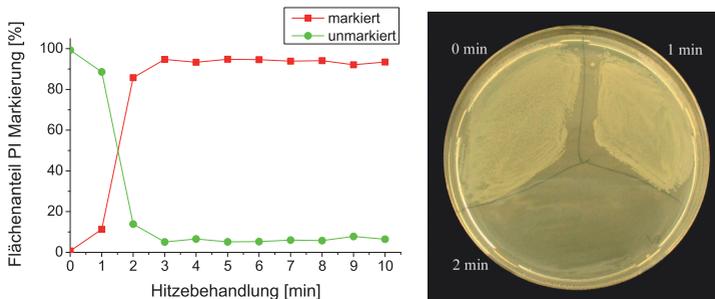


Abbildung 3.2: **Markierungsmuster mit PI (links) und Agarkultur (rechts) von *E. coli* nach Hitzebehandlung.** Nach 2 Minuten verschwindet die Fraktion der unmarkierten Zellen im FL3-FC Diagramm fast vollständig und die zweite Peakfläche steigt auf ca. 95 %. In Korrelation dazu können auf dem Agarnährboden nach 2 Minuten keine lebenden Zellen mehr in der Probe gefunden werden. Die nicht markierte Fraktion (ca. 5 %) im FL3-FC sind Partikel.

Die verbleibenden 5 % der Peakfläche 1 bei *E. coli* sind Partikel aus dem Medium. Dies zeigt sich an einem gleichbleibenden Markierungsmuster von ca. 95 %, dem Fehlen von CFUs nach 2 Minuten (Abb. 3.3, rechts) und dem veränderten Seitwärtsstreulicht (SSC) (Abb. 3.4, rechts), was Partikeleigenschaften mit deutlich anderer Granularität als bei den unbehandelten Zellen bedeutet.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

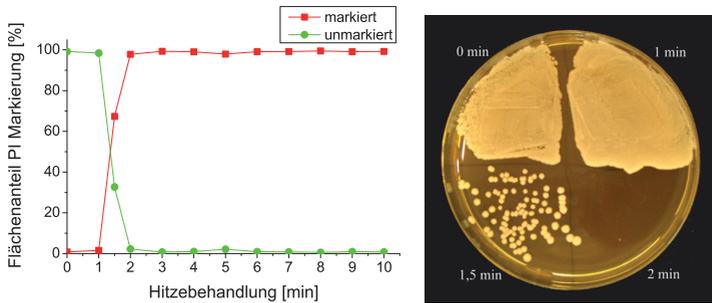


Abbildung 3.3: **Markierungsmuster mit PI (links) und Agarkultur (rechts) von *S. cerevisiae* nach Hitzebehandlung.** Nach 2 Minuten verschwindet die Fraktion der unmarkierten Zellen im FL3-FC Diagramm fast vollständig. Die zweite Peakfläche steigt auf fast 100 %. In Korrelation dazu können auf dem Agarnährboden nach 2 Minuten keine lebenden Zellen mehr in der Probe nachgewiesen werden.

Bei *E. coli* verändert die Zugabe von PI die Zelleigenschaften von unbehandelten Zellen im SSC, nicht aber im EV. Mit fortschreitender Hitzebehandlungszeit weichen die EV Mittelwerte von denen der unversetzten Probe ab, folgen aber einem ähnlichen Verlauf. Der Mittelwert von Peakfläche 2 weist noch einmal einen höheren EV Wert auf, was eine Unterscheidung der Proben im EV ermöglicht. Der Mittelwert FL3-FC der Proben verändert sich über den Behandlungszeitraum deutlich. Teilweise ist diese Veränderung durch die Änderung des EV bedingt. Jedoch gleichen die Werte des EV zum Ende der Behandlungszeit denen des Anfangs, demnach hat das EV dort kaum Einfluss, wobei trotzdem ein höherer FL3-FC Mittelwert auftritt. Demnach deutet die Verschiebung auch auf eine wachsende Zellschädigung über den Behandlungszeitraum hinweg hin (Abb. 3.4).

Die Granularität verändert sich durch PI Zugabe ebenfalls. Die Kurvenverläufe des SSC der PI versetzten und unversetzten Proben folgen einem ähnlichen, in den Werten verschobenen, Verlauf. Die Granularität der Zellen verändert sich also durch PI Zugabe.

Bei *S. cerevisiae* steigert sich der Mittelwert des FL3-FC Peaks nur bis zu 2 Minuten und bleibt dann annähernd gleich, womit bereits nach 2 Minuten eine maximale Zugänglichkeit der DNA und RNA für PI erreicht wird, was mit der CFU Bestimmung korreliert. Der Mittelwert des EV folgen dem gleichen Verlauf. Jedoch ändert sich dabei das EV von Peak1 einer einzelnen

### 3.1 Auswirkung von kalten Abstopplosungen

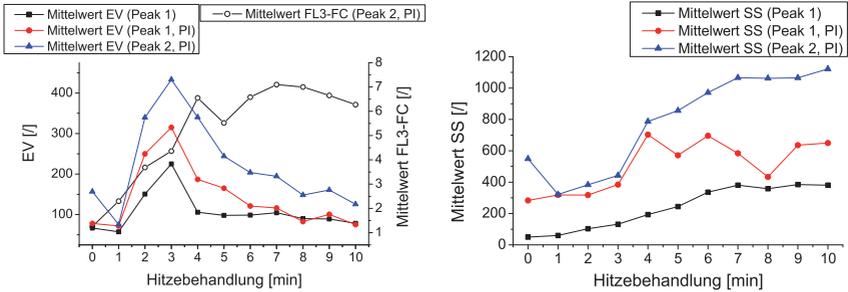


Abbildung 3.4: **Mittelwert EV, FL3-FC (links) und SSC (rechts) von *E. coli* nach Hitzebehandlung.** Die Zugabe von PI verändert die Eigenschaften der Zellen.

Probe durch die Zugabe von PI nicht, d. h. PI verändert die Granularität der Hefezellen nicht und kann eingesetzt werden. Das SSC der Hefezellen ist ebenfalls mit und ohne PI Zugabe identisch. Nach 1,5 Minuten sind in der ersten Peakfläche kaum noch Partikel enthalten, wobei es sich wie bei *E. coli* basierend auf der unsteten Granularität nicht um Zellen handelt (Abb. 3.5).

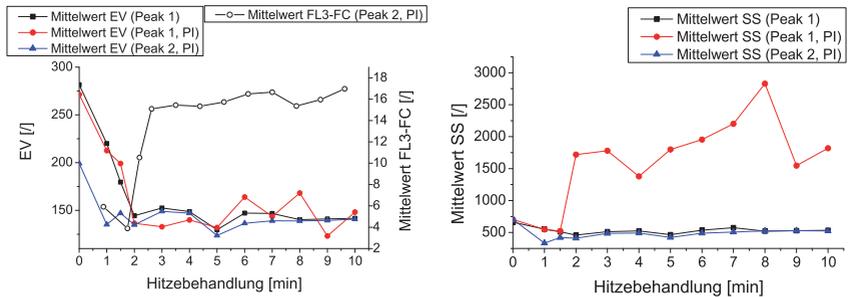


Abbildung 3.5: **Mittelwert EV, FL3-FC (links) und SSC (rechts) von *S. cerevisiae* nach Hitzebehandlung.** Versetzen der Probe mit PI ändert die Eigenschaften der Zellen nicht.

Da Zellen durch fortschreitende thermische Behandlung zunehmend geschädigt werden, kann mit diesem Versuch nachgewiesen werden, dass das Durchflusszytometer für die Identifikation von lebenden und beschädigten Zellen mit Hilfe von PI angewendet werden kann. Mit den Ergebnissen können den beiden auftretenden Peaks Zellfraktionen zugewiesen werden. Dem ersten Peak wird dabei die Fraktion lebender Zellen und dem zweiten die Fraktion der beschädigten und toten Zellen zugeordnet.

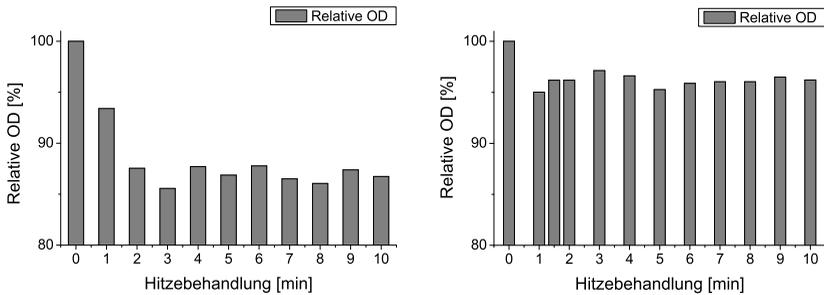


Abbildung 3.6: **Relative OD von *E. coli* (links) und *S. cerevisiae* (rechts) nach Hitzebehandlung.** *E. coli* erreicht nach 2 min seinen niedrigsten Wert, *S. cerevisiae* bereits nach 1 min Behandlungszeit.

Die OD der hitzebehandelten Zellen wurde zusätzlich ins Verhältnis zu der der Hauptkultur gesetzt. Ziel war es eine Veränderung der OD mit der CFU korrelieren zu können. Die OD beider Organismen sinkt durch Hitzebehandlung ab. *E. coli* erreicht mit der vollständigen Inaktivierung nach 2 Minuten Inkubation den niedrigsten relativen OD Wert von ca. 85 % (Abb. 3.6, links). Bei *S. cerevisiae* fällt der Wert nur auf 95 % ab und erreicht diesen bereits nach 1 Minute Inkubation, wobei CFU nachweisbar sind (Abb. 3.6, rechts). Somit kann zwar eine Änderung der OD durch die Behandlung festgestellt werden, jedoch keine Korrelation zwischen den vorhandenen inaktivierten Zellen, die mit PI angefärbt werden können, und der CFU. Auch der VBNC Zustand [60, 87, 22, 95], die ebenfalls durch ausplattieren nicht nachgewiesen werden können, jedoch mittels OD-Messung berücksichtigt werden, können auftreten. Ein weiterer Versuch mit Zellbehandlung durch mehrere Behandlungszyklen mit flüssigem Stickstoff zur Simulation des Kälteschocks zeigen ebenfalls keine Korrelation.

#### 3.1.2 Wirkung von kalten Abstopplösungen auf *E. coli*

Wie in der Einleitung beschrieben (Kap. 1.1.2) werden intrazelluläre Metabolite rasch umgesetzt. Nur ein gleichfalls rasches Abstoppen ermöglicht ein Abbild des intra- und extrazellulären Metabolitprofils zu bestimmten Zeit-

punkten. Die hauptsächlich eingesetzte Methode, um diese schnell umgesetzten Metabolite zu bestimmen, ist die Zellabstoppung mit kalter Abstopplösung. Diese Abstoppmethode wird in den meisten Probenentnahmegaräten für die Metabolitanalyse eingesetzt, da damit der Metabolitumsatz gestoppt und die Zellen vom Medium getrennt werden können [52, 71, 124]. Auch in dieser Arbeit werden verschiedene kalte Abstopplösungen eingesetzt.

Die am häufigsten eingesetzte Abstopplösung ist Methanol, zumeist mit verschiedenen Additiven versetzt. Die zum Verlust an intrazellulären Metaboliten durchgeführten Untersuchungen mit diesen Lösungen zeigen deutliche Verluste an intrazellulären Metaboliten [13, 19, 132]. Der Grund für diesen Verlust während des Zellabstoppprozesses wird im Verlust der Zellintegrität gesehen, der durch den sog. Kälteschockeffekt verursacht wird. Die Untermauerung dieser Annahme basiert auf dem Nachweis der Metabolite im Überstand der Abstopplösung [13, 76] und der Analyse der Zellintegrität über Färbung der Zellen in Mikrotiterplattenanalysen [52]. In der vorliegenden Arbeit wird zur Untersuchung der Wirkung der Abstopplösungen die Zusammensetzung und die Starttemperatur variiert, um eine Lösung zu identifizieren, die den Verlust an Metaboliten aus den Zellen minimiert oder unterbindet.

Als Modellmetabolit wird ATP im Zellextrakt und im Abstopplösungsüberstand mittels Luciferaseassay (Kap. 2.3.3) bestimmt. ATP dient auch in anderen Untersuchungen als Modellmetabolit [51, 76], da dieser nur in sehr geringen Konzentrationen im umgebenden Medium vorhanden sein sollte und einen guten Indikator für eventuell während des Abstoppvorgangs auftretende Zelldefekte darstellt. Zusätzlich wird die Zellintegrität untersucht, indem zum einen die OD des resuspendierten Pellets und die der unbehandelten Schüttelkolbenkultur verglichen wird [27, 128]. Diese Methode dient als Indikator für den Verlust an intakten Zellen, da eine Zellzahlverringern zu einer Reduzierung der OD führt. Zum anderen wird die Aufnahmefähigkeit von PI (Kap. 1), detektierbar mittels Durchflusszytometer, untersucht.

Zunächst wird getestet, ob einzelne Versuche in dieser Arbeit untereinander vergleichbar sind. Dazu wird eine Schüttelkolbenkultivierung vorgenom-

### 3 Ergebnisse und Diskussion

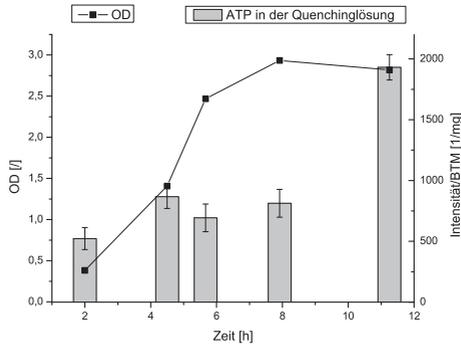


Abbildung 3.7: **Verlauf des ATP-Gehaltes in der Abstopplösung über die Wachstumskurve von *E. coli*.** Das Verhalten von *E. coli* im Verlauf des Wachstums auf die eingesetzte Abstopplösung von 60 % MeOH/70 mM HEPES zeigt bis zum Einsetzen der stationären Phase keine statistische Signifikanz. Erst bei der Probe im Bereich der stationären Phase ( $t > 11$  h) änderte sich die gemessene Intensität des ATP-Luciferaseassays bezogen auf die eingesetzte BTM deutlich. Demnach können Versuche aus der exponentiellen Phase bei *E. coli* miteinander verglichen werden.

men. Während des gesamten Wachstumsverlaufs werden Proben mittels 60 % MeOH/70 mM HEPES [51] abgestoppt und ATP über eine Intensitätsbestimmung in der Quenchinglösung bestimmt (Abb. 3.7), wobei bei diesem Experiment kein ATP Standard mitgemessen wird und somit keine Umrechnung in eine ATP-Konzentration erfolgt. Der Wert im frühen exponentiellen Wachstumsbereich ( $t = 2$  h) liegt etwas unter denen in der exponentiellen Phase, was auf die geringe eingesetzte Biotrockenmasse zurückgeführt werden kann und damit auf einen größeren Messfehler durch die starke Verdünnung mit der Abstopplösung. Im Bereich der exponentiellen Phase und der einsetzenden stationären Phase zeigt sich keine Signifikanz in den Werten ( $4 \text{ h} < t \leq 8 \text{ h}$ ). Nach erreichter stationärer Phase kann eine erhebliche Steigerung des ATP-Gehaltes festgestellt werden ( $t > 11$  h). Evt. sind die Zellen in dieser Phase auf Grund der Substratlimitierung bereits gestresst, bzw. haben ihren Metabolismus und damit die Zellmembranstruktur verändert. Damit kommt es zu einem höheren Anteil an beschädigten und lysierten Zellen durch den Abstoppprozess. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass Versuche im exponentiellen Wachstumsbereich gut vergleichbar sind, Proben aus der stationären

Phase hingegen einen zu hohen Verlust aufweisen und nicht in die Analyse einbezogen werden können.

### 3.1.2.1 Wirkung von Abstopplösungen mit verschiedenen Methanolkonzentrationen auf *E. coli*

Die Wirkung von Methanol wird mit Schüttelkolbenkultivierungen untersucht. Dazu wird die Methanolkonzentration variiert. Die Starttemperatur für alle Lösungen beträgt  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , um die Lösungen kalt aber flüssig zu halten. Ein Kryostat verhindert einen zusätzlichen Einfluss durch Temperaturschwankungen auf die Probenentnahme. Die Analyse des ATP-Gehaltes in den Proben, bezogen auf die eingesetzte Biotrockenmasse, ergibt bei einer Abstopplösung von 40 % MeOH einen deutlich höheren Wert im Überstand als bei höheren Methanolkonzentrationen. 80 und 100 % MeOH zeigen hier ähnliche Auswirkungen auf die Zellen. Demnach wirkt sich eine hohe MeOH-Konzentration positiv auf die Zellintegrität aus. Die Analyse des Zellextraktes ergibt in Korrelation mit den Ergebnissen der Abstopplösung geringe ATP-Konzentrationen bei niedriger MeOH-Konzentration abgestoppten Zellen und steigende Werte für steigende MeOH-Konzentrationen (Abb. 3.8). Jedoch kann der Gesamt-ATP-Gehalt in der Quenchinglösung und dem Zellextrakt bei höheren MeOH Konzentrationen nicht die von 40 % MeOH erreichen. Die Ursache dafür ist unklar. Zellproben werden in allen Fällen bis auf den Methanolgehalt der Quenchinglösung gleich behandelt und MeOH störte den Luciferaseassay nicht.

Ausgehend von der bestimmten ATP/BTM-Konzentration ist zu vermuten, dass bei der Verwendung von 100 % MeOH weniger Zellen beschädigt werden als bei 40 % MeOH. Diese Hypothese kann jedoch weder mit dem Vergleich der Resuspensions-OD noch mittels Durchflusszytometrie bestätigt werden. Der Vergleich der OD der Hauptkultur und der der resuspendierten Pellets zeigt, dass keine der MeOH-Konzentrationen eine vollständige Wiederherstellung der Ausgangs-OD zulässt. Die OD des in 1 xPBS Puffer resuspendierten Pellets bei 80 % MeOH-Konzentration erreichte annähernd 82,5 % der Ausgangs-OD, 60 % MeOH ca. 81,4 %, 40 % MeOH rund 79 % und

### 3 Ergebnisse und Diskussion

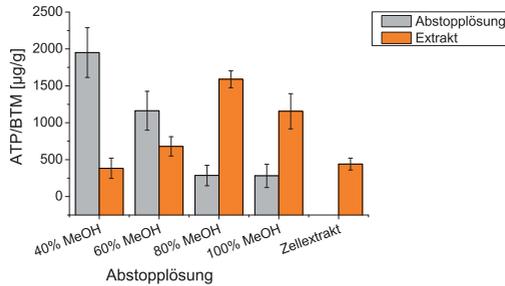


Abbildung 3.8: **Vergleich der gemessenen ATP/BTM-Konzentration mit verschiedenen Methanolkonzentrationen abgestoppter *E. coli* Zellen bei einer Starttemperatur von -20 °C.** Die ATP/BTM-Konzentrationen in der Abstopplösung liegen bei höheren Methanolkonzentrationen deutlich unter denen bei 40 und 60 % MeOH. Hohe Konzentrationen können im Überstand von 80 und 100 % MeOH nachgewiesen werden.

100 % MeOH rund 70% (Abb. 3.9, rechts). Dies impliziert, dass 15 bis 25 % der *E. coli* Zellen in der Probe einen Volumenverlust erleiden und/oder lysieren, was einen direkten Metabolitverlust in die umgebende Abstopplösung bedeutet.

Die Ergebnisse deuten auf während des Prozesses lysierte, geschrumpfte oder verklumpte Zellen hin, wobei beachtet werden muss, dass bei allen Versuchen ein Teil der Zellen auch durch das Abnehmen des Abstopplösungsüberstandes entfernt wird. Die Verwendung von PBS Puffer hat außerdem zwar keinen Einfluss auf unbehandelte Zellen, kann aber das weitere sehr langsame Absinken der OD abgestoppter Zellen nicht verhindern.

Die resuspendierten Zellen werden nun auf eine OD von 0,1 verdünnt und im Durchflusszytometer analysiert. Der Vergleich der Absolutwerte der Peakflächen für markierte und unmarkierte Zellen ergibt sowohl bei 80 als auch 100 % MeOH eine fast vollständig mit PI markierte Probe, wonach fast alle Zellen Beschädigungen aufweisen. Bei 40 und 60 % MeOH sind lediglich 58 bzw. 51 % der Probe markiert (Abb. 3.9, links). Diese Ergebnisse spiegeln nicht die Analysen von Hiller [52] wieder, wobei zu beachten ist, dass die Proben über ein anderes Probenentnahmegesetz gezogen werden. In den Untersuchungen kommt SYTO 9 und PI zum Einsatz, um den Anteil an beschädigten Zellen bei der Verwendung von 60 % MeOH zu identifizieren. Die Analyse erfolgt

### 3.1 Auswirkung von kalten Abstopplösungen

nicht über Einzelzellanalyse wie im Durchflusszytometer, sondern über eine Kalibrierung und Messung in Mikrotiterplatten. Dabei werden ca. 99,1 % der Zellen als lebend mit intakten Zellwänden identifiziert.

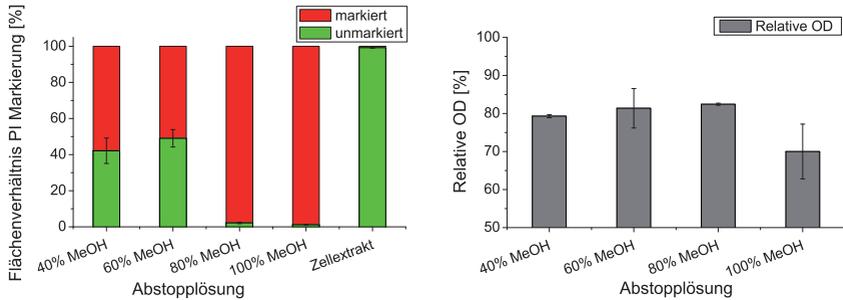


Abbildung 3.9: Durchflusszytometer- (links) und relative OD-Werte (rechts) mit verschiedenen Methanolkonzentrationen abgestoppter *E. coli* Zellen bei einer Starttemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$ . 80 und 100 % MeOH verursachen eine fast vollständig markierte Zellpopulation. Die OD der resuspendierten Zellen erreicht nicht den Wert der unbehandelten Kultur. Die relative OD bei einer Abstopplösung von 100 % MeOH bleibt dabei noch unter der der anderen Lösungen.

Zusätzlich werden die resuspendierten Zellen auf Agar ausplattiert. Es zeigt sich, dass in 80 und 100 % MeOH kaum lebensfähige Zellen vorliegen. In 40 und 60 % MeOH kann jedoch ein geschlossener Rasen beobachtet werden, d. h. viele der Zellen sind revitalisierbar (Abb. 3.10, links). Die OD der resuspendierten Pellets liegt bei diesen Abstopplösungen bei jeweils ca. 80 % der Ausgangs-OD.

Mit der hier angewendeten Probenentnahme lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen schlussfolgern, dass die Zellen unabhängig von der eingesetzten MeOH-Konzentration zu einem gewissen Grad durch das organische Lösungsmittel beschädigt werden, was bis zur vollständigen Lyse der Zellen führt. Die Ergebnisse aus ATP-Bestimmung, Durchflusszytometrie und OD-Analyse zeigen trotz des hohen Beschädigungsgrades der Zellpopulation von fast 100 % bei hohen MeOH Konzentrationen eine positive Wirkung auf den Verlustgrad an intrazellulären Metaboliten. Trotz geringerer Beschädigung durch 40 % MeOH wird damit deutlich mehr ATP in der Abstopplösung nachgewiesen, also ein höherer Verlust an intrazellulären Metaboliten. Demnach muss es neben dem Einfluss auf die Zellintegrität weitere Einflüsse geben, die

für den Verlust von intrazellulärem ATP herangezogen werden müssen. Da die Proben bei 40 und 60 % MeOH noch einen hohen lebensfähigen Anteil besitzen, befindet sie sich dieser Teil während des Abstoppprozesses in einem anderen Zustand als die gesamte Probe bei höheren MeOH-Konzentrationen.

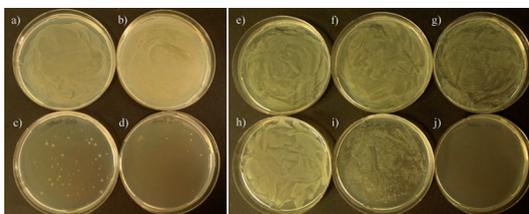


Abbildung 3.10: **Ausplattete Zellen aus dem Quenchingversuch mit unterschiedlichen MeOH Konzentrationen.** Kaum lebensfähige Zellen konnten in 60 und 100 % MeOH nachgewiesen werden. In 40 und 60 % hingegen konnte, wie bei den Zellen der Kultivierung, ein dichter Zellrasen beobachtet werden. (a - 40 % MeOH, b - 60 % MeOH, c - 80 % MeOH, d - 100 % MeOH, e - 60 % MeOH/Glycerin/NaCl, f - 60 % MeOH/Trehalose, g - 60 % MeOH/Mannitol, h - 0,0025 % Glutaraldehyd, i - 0,05 % Glutaraldehyd, j - 0,5 % Glutaraldehyd)

#### 3.1.2.2 Wirkung von 100 % MeOH als Abstopplösung für *E. coli* bei verschiedenen Starttemperaturen

Canelas *et al.* [19] weist bereits 2008 auf den Einfluss der Temperatur beim Verlust der Metabolite aus den Zellen hin. Eine Starttemperatur der Abstopplösung von unter  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  und einer maximalen Mischungstemperatur von  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ist dabei die ideale Bedingung für das Abstoppen von Hefen. Daher wird in dieser Arbeit reines Methanol bei verschiedenen Starttemperaturen mit *E. coli* getestet, da die Viskosität dieser Lösung bei tiefen Temperaturen gering bleibt.

Die ATP/BTM-Konzentration in der Abstopplösung liegt bei hohen Starttemperaturen bis um das zehnfache höher als bei niedrigen Temperaturen ( $-50$  und  $-76\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Abb. 3.11). Entsprechend kann im Zellextrakt bei niedrigen Starttemperaturen eine höhere ATP/BTM-Konzentration bestimmt werden. Diese Daten korrelieren mit den Daten der Resuspensions-OD. Mit sinkender Starttemperatur nähert sich die Resuspensions-OD immer mehr dem der Kultivierung an und erreicht bei einer Starttemperatur von  $-76\text{ }^{\circ}\text{C}$  und einer

Mischungstemperatur von unter  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  rund 86,9 % der Ausgangs-OD. Eine tiefere Temperatur war durch technische Gegebenheiten nicht einsetzbar. Bei höheren Temperaturen hingegen sinkt die OD der Resuspension und erreichte bei einer Starttemperatur von  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  und einer daraus resultierenden Mischungstemperatur von über  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  nur ca. 58,6 % der Ausgangs-OD.

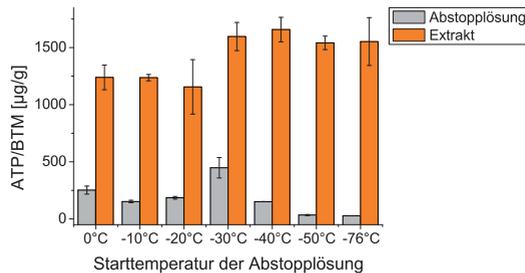


Abbildung 3.11: Vergleich der ATP/BTM-Konzentrationen mit 100 % MeOH abgestoppelter *E. coli* Zellen bei verschiedenen Starttemperaturen. Geringe ATP/BTM-Konzentrationen werden in der Abstopplösung bei allen Temperaturen detektiert, wobei die Konzentration mit sinkender Temperatur noch zurückgeht. Äquivalent dazu ist im Zellpellet bei tiefen Temperaturen eine höhere ATP/BTM-Konzentration, als in Zellen die bei einer höheren Temperatur abgestoppt werden, nachweisbar.

Im Extrakt wird bei niedrigen Temperaturen, wie aus den Werten zur Abstopplösung zu erwarten, mehr ATP/BTM detektiert als bei höheren. Die Untersuchung der Zellmembranintegrität ergibt bei allen eingestellten Temperaturen eine fast vollständige Markierung mit PI, was auf beschädigte Zellwände unabhängig von der Starttemperatur der Abstopplösung hindeutet. Dies bestätigt den negativen Einfluss von Methanol, der auch durch Temperaturvariation nicht neutralisiert werden kann.

Der Temperaturunterschied, d. h. der Temperaturshift, zwischen der Starttemperatur und der Mischungstemperatur nach Zugabe der Hauptkulturprobe steigt mit sinkender Starttemperatur:  $0\text{ }^{\circ}\text{C}/20,0 \pm 0,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}/23,3 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/27,2 \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}/31,1 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}/34,3 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}/39,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  und bei der tiefsten Temperatur von  $-76\text{ }^{\circ}\text{C}/50,7 \pm 0,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Mit dem angewendeten Verfahren und dem Mischungsverhältnis von 1:5 kann erst bei  $-76\text{ }^{\circ}\text{C}$  eine Mischungstemperatur unter  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  erreicht werden, wie sie als

### 3 Ergebnisse und Diskussion

ausreichend zum Abstoppen des Zellmetabolismus angesehen wird [51]. Die hohe Mischungstemperatur bei niedrigen Starttemperaturen kann für einen Teil der ATP/BTM-Menge in der Abstopplösung und der niedrigen Konzentration im Zellextrakt ursächlich sein, da ein großer Teil der Probe bei Temperaturen über 0 °C in das Methanol gebracht wird, wodurch der Zellstoffwechsel nicht abrupt durch den Temperaturshift abgestoppt wird und sich auch die Zellen in unterschiedlichen Zuständen befinden.

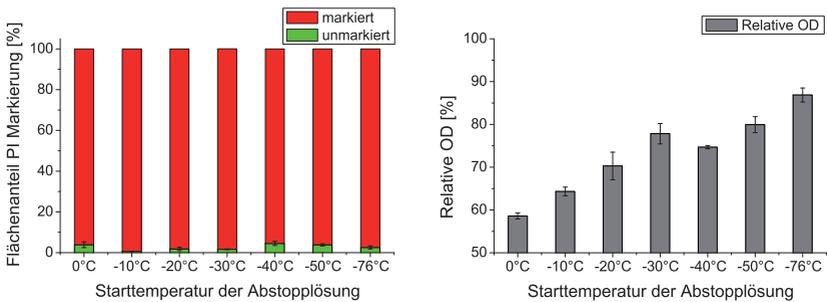


Abbildung 3.12: **Durchflusszytometer-** (links) **und relative OD-Werte** (rechts) **mit 100 % MeOH abgestopppter *E. coli* Zellen bei verschiedenen Starttemperaturen.** Alle Zellpopulationen zeigen die gleiche Reaktion auf die Abstopplösung und sind fast 100 % der Zellen mit PI angefärbt. Der Vergleich der relativen OD der in 1x PBS resuspendierten Pellets zeigt mit sinkender Starttemperatur eine Näherung an die OD der Hauptkultur an.

Trotzdem der Anteil an lysierten Zellen bei einer Starttemperatur von 0 °C mit einer relativen OD von ca. 58,6 % sehr tief liegt und die Zellen der Probe fast vollständig mit PI markiert werden (Abb. 3.12), ist die bestimmte ATP/BTM-Konzentration in der Quenchinglösung um 70 % niedriger als die bei 40 % MeOH und einer Starttemperatur von -20 °C. Der Grund dafür ist unbekannt und kann in den vorliegenden Untersuchungen nicht ermittelt werden. Evt. tritt bei diesen rascheren Temperaturveränderungen auch verstärkt der VBNC Zustand auf, was dazu führt, dass ein geringerer Teil der Zellen lysiert vorliegt und somit die OD höher ist. Die Hypothese, dass Zelleakage in dem Verlust der Zellintegrität und Lyse begründet liegt, lässt sich mit den vorliegenden Daten teilweise bestätigen, wobei weitere Ursachen vorliegen müssen. So ist trotz deutlich geringerer OD und gleichem Färbungsmuster mit PI z. B. zwischen -50 und -76 °C kein Unterschied zwischen der

ATP/BTM-Konzentration in der Abstopplösung oder dem Zellextrakt zu sehen. Eindeutig ist neben der Wirkung des organischen Lösungsmittels (Kap. 3.1.2.1), der als Grundbaustein der Abstopplösung dient, ein Kälteschockeffekt feststellbar. Neben diesen Gründen müssen allerdings noch andere Faktoren für den Verlust der Metabolite aus den Zellen ursächlich sein.

### 3.1.2.3 Wirkung von Additiven in Abstopplösungen auf *E. coli*

In vielen Untersuchungen wird der Zusatz von Additiven getestet, um die Wirkung von Methanol auf die Zellen abzuschwächen und den Verlust an intrazellulären Metaboliten zu minimieren oder gänzlich zu verhindern [13, 19, 51, 76]. Einige dieser Zusammensetzungen werden auch im Zuge dieser Arbeit untersucht, um die Effekte auf die Zellintegrität mittels ATP-Bestimmung und Durchflusszytometrie zu untersuchen und die Daten mit denen anderer Arbeiten in Relation setzen zu können. *E. coli* wurde für diese Untersuchungen verwendet, da es als Gram-negatives Bakterium das sensitivere der beiden Organismen sein sollte [118] und keine der anderen in dieser Arbeit eingesetzten Lösungen und Starttemperaturen bisher in den Tests die Zellintegrität erhält und der Organismus somit noch nicht für Metabolituntersuchungen eingesetzt werden kann. 60 % MeOH wird dabei versetzt mit 70 mM HEPES [52], 40 % Glycerin [76], mit 92,4 mM NaCl (Salzkonzentration der Lösung von Villas-Bôas und Bruheim [132]), 5 % (m/v) Trehalose, 0,5 % (m/v) Mannitol, sowie 0,0025, 0,05 und 0,5 % (v/v) GA, welches bei Tsuchido *et al.* [128] bereits als Zellmembranstabilisator bei Temperaturabsenkungen Anwendung findet. Zusätzlich wird auch die glycerinbasierte Lösung von Villas-Bôas und Bruheim [132] untersucht, da sie als besonders schonende Methode des Abstoppens des Zellmetabolismus gilt. Die Versuche werden für die Additive HEPES und Glycerin bei -50 °C, für Trehalose, Mannitol und Glutaraldehyd bei -40 °C und im Fall der Glycerinlösung auf Grund der hohen Viskosität bei -20 °C gestartet.

Die Bestimmung der ATP/BTM-Konzentration in der Abstopplösung und der Extraktionslösung liefert für die Lösungen basierend auf 60 % MeOH unabhängig von dem eingesetzten Additiv hohe Werte (Abb. 3.13). Die Ergeb-

nisse für die Additivlösungen mit Trehalose, Mannitol, 0,0025 % (v/v) Glutaraldehyd und HEPES liegen im Bereich der mit 40 % MeOH abgestoppten Proben (Abb. 3.8, 3.13) und höher als die von ungepuffertem 60 % MeOH. Hingegen entspricht die Konzentration im Extrakt in allen Fällen der von 60 % MeOH.

Die Kombination von Methanol und Glycerin senkt den ATP-Gehalt in der Abstopplösung deutlich und liefert im Zellextrakt eine Konzentration, die der von 100 % MeOH entspricht. Glycerin in Verbindung mit Methanol erlaubt die Nutzung bei niedrigen Temperaturen, wie bei Link *et al.* [76] beschrieben. Jedoch zeigen sich bei anderen Untersuchungen bei der Verwendung von Glycerin zusätzlich zur Viskosität einige Schwierigkeiten bei der nachfolgenden Analytik. Spura *et al.* [118] untersucht die Glycerin-Salzlösung von Villas-Bôas und Bruheim [132]. Dabei sind sie nicht in der Lage das Glycerin von den Zellen zu trennen. Auch ein Waschschriff kann nicht alles entfernen. Damit zeigen die ermittelten Chromatogramme bei allen Untersuchungen einen deutlichen Glycerinpeak, der den anderer Metabolite vollständig überlagert. Den Ergebnissen entsprechend sollte daher komplett von einer Verwendung von Glycerin abgesehen werden.

Eine Ausnahme zu den stets hohen ATP/BTM-Konzentration in der Abstopplösung, bildet die Abstopplösung mit dem Additiv Glutaraldehyd in den Konzentrationen 0,05 % und 0,5 % sowie das Zellextrakt der Lösung mit 0,5 % GA. Untersuchungen der Abstopplösungen, versetzt mit einer definierten Menge an ATP, liefern gleiche Ergebnisse. Dies beruht auf der fixierenden Wirkung von Glutaraldehyd. Es vernetzt Lysinreste, welche im Fall von Luciferase entscheidend für die Enzymaktivität sind [67, 120]. Dies hat demnach zur Folge, dass Luciferase nicht mehr in der Lage ist ATP umzusetzen, wodurch das freigesetzte ATP in der Abstopplösung nicht nachgewiesen werden kann. Die geringere ATP Konzentration im Zellextrakt der Quenchinglösung mit 0,5 % Glutaraldehyd wird durch an den Zellen haftendes Glutaraldehyd verursacht, da die Zellen nach dem Abstoppen nicht gewaschen werden, sondern direkt extrahiert werden.

### 3.1 Auswirkung von kalten Abstopplösungen

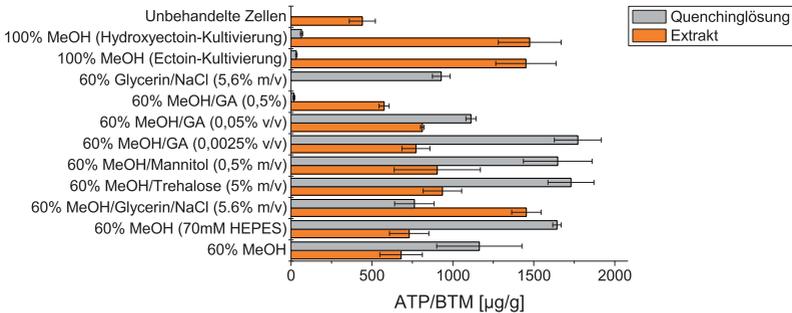


Abbildung 3.13: **ATP/BTM-Konzentration des Abstoppprozesses von *E. coli* mit Abstopplösungen mit verschiedenen Additiven und Kultivierungsbedingungen.** Keins der Additive kann den Verlust von Metaboliten während des Abstoppprozesses verhindern. Höhere Konzentrationen an Glutaraldehyd senken den ATP Gehalt in der Abstopplösung und der Extraktion, was auf der inhibierenden Wirkung von Glutaraldehyd auf den Luciferasesassay beruht. Die Zellen die mit der Abstopplösung basierend auf Glycerin behandelt werden können mit den vorhandenen Geräten nicht abgetrennt werden, können daher auch nicht extrahiert werden. Die Zugabe von Ectoin und Hydroxyectoin und das Abstoppen mit 100% MeOH zeigt eine gleiche Auswirkung wie auf Zellen, die ohne die kompatiblen Solute angezogen werden. Das Extrakt von vollständig unbehandelten Zellen aus der exponentiellen Kultivierungsphase zeigt eine geringere ATP/BTM-Konzentration als alle anderen Extrakte.

Bei der Untersuchung der relativen OD erreicht die Glycerin-Saline Lösung von Villas-Bôas und Bruheim [132] trotz der positiven Eigenschaften des Glycerins auf die Zellintegrität nur knapp 85 % der Ausgangs-OD, was allerdings über allen methanolbasierten Lösungen liegt. Die Zellen können aus dieser Lösung außerdem auf Grund der hohen Viskosität mit den vorhandenen Geräten nicht abgetrennt werden und werden nach der Bestimmung der OD in der Abstopplösung mit 1 x PBS Puffer verdünnt. Bei der Verwendung des Methanol-Glycerin Gemisches kann eine drastische Erhöhung des markierten Anteils festgestellt werden. Eine Beobachtung in diesem Zusammenhang ist die geringe Durchmischung der Probe mit der Abstopplösung auf Grund der hohen Viskosität, verursacht durch die niedrige Temperatur. Im Gegensatz zu allen anderen Lösungen, die kein Glycerin enthalten, liegt hier die Probe als deutliche Schlieren vor, wobei einige Bereiche der Lösung überhaupt nicht durchmischbar werden. Dies tritt wahrscheinlich in den Untersuchungen von Link *et al.* (2008) [76] nicht auf, da der Sampler von Hiller [52] verwendet wird, in dem die Probe automatisch gleichmäßig in der Abstopplösung verteilt wird. Trotzdem senkt die Kombination von Methanol und Glycerin den ATP-Gehalt in der Abstopplösung und liefert trotz des hohen Anteils an PI

### 3 Ergebnisse und Diskussion

markierten Zellen, der eher dem von 80 oder 100 % MeOH entspricht, eine ATP/BTM-Konzentration im Zellextrakt, die der von 100 % MeOH gleicht. Hier zeigt sich wiederum die fehlende Korrelation zwischen dem Verlust der Zellintegrität und den ermittelten ATP/BTM-Konzentrationen in der Abstopplösung und im Extrakt.

Die Additive 70 mM HEPES, 5 % (m/v) Trehalose, 0,5 % (m/v) Mannitol, sowie Glutaraldehyd in verschiedenen Konzentrationen (0,0025 %, 0,05 % und 0,5 % (v/v)) zeigen unterschiedliche Auswirkungen auf die Zellintegrität. HEPES verändert die Auswirkung von 60 % MeOH nicht, was auch auf geringe Konzentrationen von Glutaraldehyd zutrifft, das PI-Markierungsmuster ist gleich. Trehalose, Mannitol und 0,5 % Glutaraldehyd senken das Markierungsmuster deutlich, die Trehaloselösung liegt dabei etwas über dem Wert der „schonenden“, glycerinbasierten Lösung. Die Werte liegen im Mittel zwischen 24 und 41 %. Jedoch kann durch die Lösungen keine Veränderung im ATP/BTM-Gehalt erzielt werden. Die relative OD der resuspendierten Pellets zeigen kaum Unterschiede. Bei allen verwendeten Lösungen können lediglich rund 80 % der OD detektiert werden. Bei 60 % MeOH/HEPES sind es sogar nur 70 %.

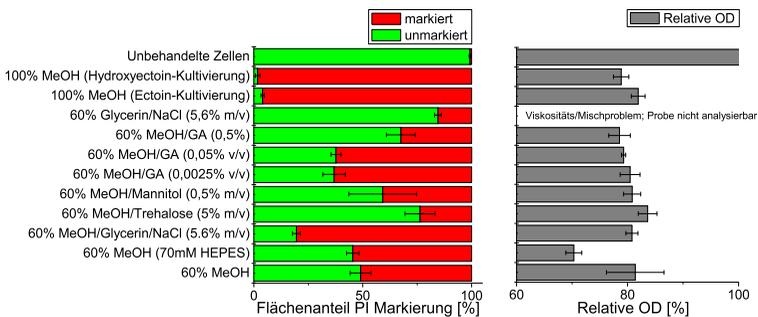


Abbildung 3.14: **Durchflusszytometer- (links) und relative OD-Werte (rechts) des Abstoppprozesses von *E. coli* mit Abstopplösungen mit verschiedenen Additiven und Kultivierungsbedingungen.** Die Lösung 60 % Glycerin liefert den geringsten Anteil an PI gefärbten Zellen, die OD wurde bedingt durch geringe Durchmischung nicht bestimmt. 60 % MeOH zeigt wie die Lösung ohne HEPES keine Änderung im Markierungsmuster. Die Zugabe von Glycerin zu MeOH führt zu einem höheren Anteil an markierten Zellen. Sowohl die Kultivierung mit Ectoin als auch Hydroxyectoin ändern die Auswirkungen von 100 % MeOH auf die Zellen nicht. Die relative OD der resuspendierten Zellen liegt zumeist bei 80 %, HEPES-Zusatz bewirkt eine Senkung auf ca. 70 %. (Starttemperatur der Abstopplösung von oben nach unten: /, -40 °C, -40 °C, -50 °C, -40 °C, -40 °C, -40 °C, -50 °C, -20 °C, -50 °C, -20 °C, -50 °C, -50 °C)

In den untersuchten 60 % MeOH Lösungen mit Additiven können unterschiedliche Inaktivierungsgrade der Zellen mittels Durchflusszytometrie festgestellt werden. 0,0025 und 0,05 % Glutaraldehyd liefert 40 % der Zellen mit PI-Markierung, Mannitol, HEPES und ungepuffertes MeOH rund 50 bis 60 %, 0,5 % Glutaraldehyd 70 % und Trehalose sowie Glycerin/NaCl rund 80 %. Trotz der geringen PI-Markierung mit 0,05 % Glutaraldehyd entsteht bei unverdünnter Probe ein nicht so dichter Rasen wie bei den anderen Additiven (Abb. 3.10, rechts). Mit 0,5 % Glutaraldehyd können keine Koloniebildenden Einheiten nachgewiesen werden, obwohl nur 70 % der Probe mit PI markiert sind. Die verändernde Wirkung von Glutaraldehyd kann auch in der Farbe des Zellpellets wiedergefunden werden. Hier wird im Zellpellet der AL-Pellets und der Extrakte eine leicht bräunliche Färbung der Zellen deutlich. Bei dem jeweiligen Zellpellet aus der Extraktion ließ sich eine farbliche Veränderung bei der Verwendung von 0,05 und 0,5 % Glutaraldehyd beobachten. Im Gegensatz zu einer fast weißlichen Farbe liegt hier ein hellbrauner (0,05 % GA), bzw. fast orange-roter Farbton (0,5 % GA) vor. Das Zellpellet der unbehandelten Zellen hat hingegen einen leicht beigen Ton, der nur kaum von dem etwas weißlichen, mit anderen Abstopplösungen behandelten Zellen, unterschieden werden kann (Abb. 3.15). Diese starken Färbungen sind ein Indiz für die starke Zellveränderung und damit für die fehlende Teilungsfähigkeit.

Als weitere Möglichkeit, die Zellintegrität während des Abstoppprozesses zu erhalten, werden Additive im Kultivierungsmedium getestet. Dazu wird sowohl eine Kultivierung mit 50 mM Ectoin als auch eine mit 50 mM Hydroxyectoin durchgeführt. Das Abstoppen erfolgt hier mit 100 % MeOH mit einer Starttemperatur von  $-40^{\circ}\text{C}$  (Abb. 3.13, 3.14). Zusätzlich werden beide Stoffe bei einer normalen Kultivierungen in Minimalmedium in der Abstopplösung selbst als Additive in 60 % MeOH eingesetzt. Für die Abstopplösung werden die Konzentrationen 100 und 280 mM für Ectoin und 100 und 300 mM für Hydroxyectoin eingesetzt. Beide Stoffe sollten nicht umgesetzt werden, sondern bei der Kultivierung in den Zellen akkumulieren. Ziel ist es, mit diesen Antistressagentien die Stressantwort auf den Abstoppschritt zu minimieren.

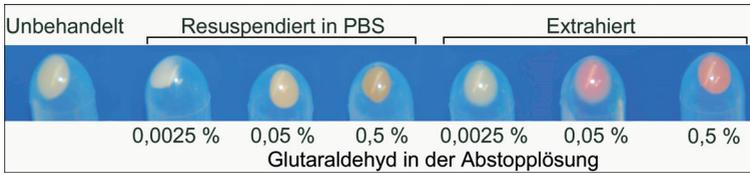


Abbildung 3.15: **Verfärbung des Zellpellets durch die Abstopplösung mit dem Additiv Glutaraldehyd.** Zentrifugierte Zellen weisen einen beige Farbton auf, extrahiert einen ins weißlich gehenden. Zellen, die mit Glutaraldehyd abgestoppt werden, haben eine bräunlich-rote Färbung, was auf deutliche Zelländerungen hinweist.

Weder die Verwendung in der Abstopplösung (Daten nicht gezeigt, da die Untersuchung zwar mit Referenz, jedoch ohne Bestimmung der ATP-Konzentration erfolgte) noch als Wachstumsadditiv bringt eine Änderung der Verlustauswirkungen (Abb. 3.13, Vergleich 100 % MeOH Abb. 3.11). Bei einer höheren Konzentration an Ectoin und Hydroxyectoin in der Abstopplösung kann eine leichte Verbesserung für das erstere und eine stärkere Verbesserung um ca. ein Drittel für das letztere festgestellt werden. Eine höhere Konzentration ist allerdings für Hydroxyectoin nicht möglich, da die Löslichkeitsgrenze in MeOH erreicht ist. Beide Stoffe sind also für den Einsatz zum Erhalt der Zellintegrität im Abstopfverfahren nicht geeignet.

Da die Zellen während der Kultivierung nicht unter Stress stehen, wird Ectoin oder Hydroxyectoin nur in geringen Mengen aufgenommen, so wie dies bei halophilen Zellen ebenfalls erst im Stressfall passiert. Da das Abstoppen mit kalter Lösung innerhalb von einem Sekundenbruchteil erfolgt, haben die Zellen keine Möglichkeit, die Protektanzen aufzunehmen.

Keine der ausgewählten Kombinationen ist in der Lage die Verluste an intrazellulären Metaboliten in *E. coli* zu verhindern. Trotzdem muss eine Abstopplösung eingesetzt werden. Die allgemeine Notwendigkeit und Effektivität des Abstoppens wird durch die Untersuchung von unbehandelten Zellen gezeigt. Dafür wird Probe aus der Kultur direkt mit der Extraktionsmethode aufgeschlossen, ohne zuvor mit Abstopplösung in Kontakt gekommen zu sein. Die Ergebnisse liefern eine deutlich geringere ATP/BTM-Konzentration als in allen Versuchen mit Abstopplösung (Abb. 3.13). Demnach wird durch den nicht abgestoppten Zellstoffwechsel das ATP in den Zellen umgesetzt und auch alle anderen *in vivo* Konzentrationen von Metaboliten mit hohem Tur-

nover sind somit ohne das Abstoppen nicht bestimmbar. Dieses Phänomen kann auch auf die Abstoppvversuche zutreffen, die bei geringer Starttemperatur durchgeführt werden (Kap. 3.1.2.2, Abb. 3.11). Auch hier kann es sein, dass der Metabolismus von *E. coli* durch zu hohe Umgebungstemperaturen nicht abgestoppt wird und dadurch ATP in den Zellen umgesetzt wird und es außerdem zu erhöhter Spannung in den Zellwänden und damit zur erhöhten Lyse kommt (Abb. 3.12, rechts).

### 3.1.3 Wirkung von kalten Abstopplösungen auf *S. cerevisiae*

Die Untersuchung der Reaktion von *S. cerevisiae* auf kalte Abstopplösungen erfolgt mit 100 % Methanol bei verschiedenen Starttemperaturen und mit unterschiedlichen Methanolkonzentrationen bei -20 °C.

#### 3.1.3.1 Auswirkung von kalter Abstopplösung mit unterschiedlichen MeOH-Konzentrationen auf *S. cerevisiae*

Ein hoher Methanolgehalt liefert wie bei *E. coli* (Abb. 3.8) einen erhöhten ATP/BTM-Gehalt trotz eines hohen Anteils an beschädigten Zellen (Abb. 3.16, 3.17, rechts). Die Ergebnisse der Abstopplösungsuntersuchung liegen alle in der gleichen Größenordnung. Bei der Analyse des Zellextraktes treten größere Schwankungen auf. Ein Versuch wird mit einer Kultur und den Abstopplösungen 40, 60 und 80 % MeOH durchgeführt. 100 % MeOH wird, wie die Temperaturversuche aus technischen Gründen, dreifach mit einer separaten Schüttelkolbenkultur durchgeführt. Die bestimmte ATP/BTM-Konzentration liegt um das 10 (40 % MeOH) bis 1000 (100 % MeOH) fache höher als das in der AL. Die Wiederholung der Versuche bringt unterschiedliche Ergebnisse zum absoluten ATP/BTM-Gehalt des Zellextraktes. Jedoch zeigt die Tendenz für 40 bis 80 % MeOH, dass mit steigender Methanolkonzentration eine höhere *in vivo* ATP-Menge in den Zellen nachgewiesen werden kann. Durch den variierenden ATP-Gehalt der Versuche kann dieser Versuch bezüglich des absoluten *in vivo* ATP/BTM-Gehaltes der Zellen nicht direkt mit denen bei 40 bis 80 % verglichen werden.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Der Temperaturunterschied der gemischten Lösungen liegt bei  $14,3 \pm 0,5$  °C für 40 % MeOH,  $16,5 \pm 0,7$  °C für 60 % MeOH, 19,9 °C für 80 % MeOH und  $25,5 \pm 0,5$  °C für 100 % MeOH was deutlich über den vorgeschlagenen maximalen Temperaturen für das Abstoppen einer Zellpopulation liegt [19, 52].

Die beobachteten Schwankungen lassen den Schluss auf eine Änderung der internen Metabolitpools während der exponentiellen Phase zu. So beobachtet Hans *et al.* [47] signifikante und komplexe Dynamiken der intrazellulären Aminosäurepools während der Batchkultivierung von *S. cerevisiae*. Es liegt daher nahe, das auch die Metabolite des zentralen Kohlenstoffwechsels und die Energieträgermoleküle wie ATP diesen Schwankungen unterliegen.

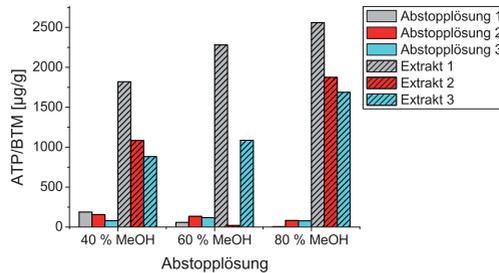


Abbildung 3.16: **ATP/BTM-Konzentration des Abstoppprozesses von *S. cerevisiae* mit unterschiedlichen Methanolkonzentrationen.** Geringe Methanolkonzentrationen verursachen, eine hohe ATP Konzentration in der Abstopplösung. (Starttemperatur von -20 °C, 1 bis 3 Versuchsnummer)

Die Behandlung der Zellen mit PI bringt wie bei *E. coli* im FL3-FC (Kap. 3.1.1) einen zweiten Peak, der beschädigte Zellen repräsentiert. Bereits unter Kultivierungsbedingungen ist ein Teil der Zellpopulation mit PI gefärbt (ca. 22,2 %), d. h. bereits stark geschädigt aber noch nicht lysiert.

Bei der Verwendung von unterschiedlichen Methanolkonzentrationen wird ein deutlicher Unterschied im Peakflächenanteil und somit an beschädigten Zellen, zwischen niedrigen (40 und 60 %) und höheren Methanolkonzentrationen (80 und 100 %), sichtbar, der umgekehrt zum ATP/BTM-Gehalt ist. Bei der Verwendung von 40 % MeOH steigt der Flächenanteil des zweiten Peaks um 8,6 %, mit 60 % MeOH um 28,7 %, mit 80 % um 74,2 %, wodurch

der Anteil an beschädigten Zellen auf ca. 97 % der gesamten Zellpopulation steigt, und mit 100 % um 57,6 % (Abb. 3.17).

Die Untersuchung der Verringerung der OD nach der Resuspension in 1xPBS Puffer zeigt bei 40 und 60 % MeOH ähnliche Verluste von ca. 10 % der Ausgangs-OD. Bei 80 % MeOH tritt ein Verlust von ca. 19 % auf. Die Ergebnisse für 100 % MeOH liegen wiederum niedriger (ca. 8 %).

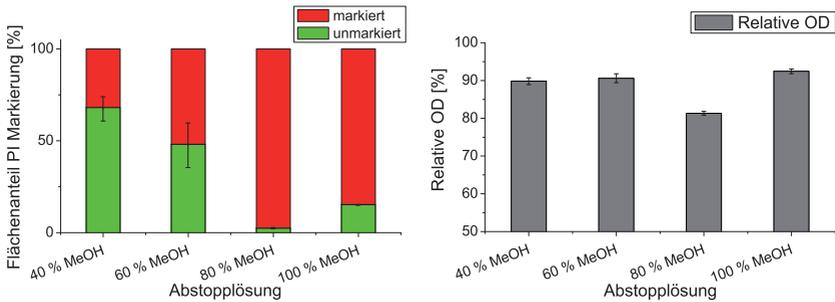


Abbildung 3.17: **Durchflusszytometer-** (links) **und relative OD-Werte** (rechts) **mit verschiedenen MeOH-Konzentrationen abgestoppter *S. cerevisiae* Zellen.** Geringe Methanolkonzentrationen verursachen eine geringe Markierung mit PI, hohe eine fast vollständige Einfärbung. Der Vergleich der relativen OD bringt eine geringere OD bei Zellen mit 80 % MeOH Behandlung. Bei allen anderen Konzentrationen wird eine ähnlich hohe OD ermittelt, die ca. 10 % unter der Ausgangs-OD liegt.

Von den in 1xPBS resuspendierten Zellen werden 20 µl unverdünnt auf YPD-Agar ausplattiert. Dabei zeigt sich ein dicht bewachsener Rasen bei 40 und 60 % MeOH, was die Ergebnisse der Durchflusszytometrieuntersuchung unterstützt. Trotz der fast vollständig mit PI gefärbten Zellpopulation können bei 80 % MeOH einige wenige kolonieformende Zellen nachgewiesen werden. 100 % MeOH führt im Durchflusszytometer zu keiner vollständig inaktivierten Zellpopulation, jedoch können auf dem Agar keine Zellen nachgewiesen werden. Es handelt sich also bei den Zellen, die mit 80 und 100 % MeOH abgestoppt werden, um zumeist nicht mehr lebensfähige, jedoch intakte Zellen. Dies ist ein Indiz dafür, dass der Zellstoffwechsel der Zellen sehr wahrscheinlich nicht mehr funktionsfähig ist, und die *in vivo* Metabolitkonzentrationen dadurch nicht mehr verändert werden, wohingegen bei 40 und 60 % MeOH ein großer Anteil der Zellen noch lebensfähig ist und ein Zellstoffwechsel, wenn auch eingeschränkt, nicht ausgeschlossen werden kann. Dies wird zusätzlich

durch die Ergebnisse der ATP Untersuchung mit den Abstopplösungen von 40 und 60 % unterstrichen.

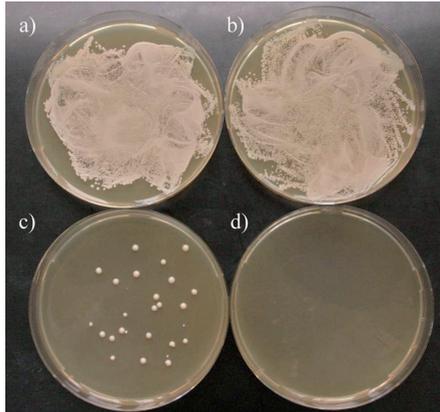


Abbildung 3.18: **Ausplattierte, mit verschiedenen MeOH-Konzentrationen abgestoppte, in PBS resuspendierte Zellen von *S. cerevisiae* BY4742 auf YPD-Agar.** Zellen, die mit geringen Methanolkonzentrationen behandelt werden (40 % MeOH (a) und 60 % MeOH (b)) sind teils unfähig, wohingegen 80 % MeOH (c) fast alle Zellen inaktiviert und bei 100 % MeOH (d) keine lebensfähigen Zellen mehr nachgewiesen werden können.

#### 3.1.3.2 Wirkung von 100 % MeOH als Abstopplösung für *S. cerevisiae* bei unterschiedlichen Starttemperaturen

Unabhängig von der eingesetzten Temperatur kann nur eine sehr geringe ATP/BTM-Konzentration in der Abstopplösung nachgewiesen werden. Die Werte der Zellextraktion zeigen keine Abhängigkeit wie bei *E. coli*, wo mit sinkender Starttemperatur eine höhere ATP/BTM-Konzentration nachgewiesen werden kann. Statt dessen liegen die Werte für 0 °C deutlich über denen von -20 und -40 °C und leicht unter denen bei -60 °C (Abb. 3.19). Da diese Versuche im Gegensatz zu denen mit unterschiedlichen MeOH-Konzentrationen aus technischen Gründen aufgrund der Temperierung der Abstopplösungen nicht mit der gleichen Kultur durchgeführt werden kann, lässt sich aus den Daten der ATP/BTM-Bestimmung lediglich schlussfolgern, dass sich der ATP Gehalt der Kultur bezogen auf die BTM, im Gegensatz zu *E. coli* (Kap. 3.1.2), im Verlauf der Kultivierung ändert. Demnach müssen die Kulturen mit gleicher OD abgestoppt werden.

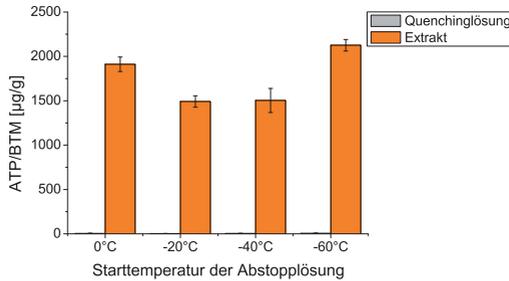


Abbildung 3.19: **ATP/BTM-Konzentration des Abstoppprozesses von *S. cerevisiae* mit 100 % MeOH bei unterschiedlichen Starttemperaturen.** Bei niedriger Temperatur ist eine höhere Konzentration vorhanden. Allerdings konnte keine genaue Tendenz aus den Daten ermittelt werden.

Die Behandlung der Zellen mit 100 % MeOH bei unterschiedlichen Starttemperaturen zeigt im Durchflusszytometer für Temperaturen unter 0 °C geringe Schwankungen in den Peakflächen (Abb. 3.20, links). Bei dem Versuch bei 0 °C beträgt die unmarkierte Fraktion 1,7 % des Flächenanteils, bei -20 °C 15,3 %, bei -40 °C 10,6 % und bei -60 °C 10,9 %. Damit zeigt sich kein direkter Zusammenhang zwischen der Starttemperatur und dem Beschädigungsgrad der Zellen, bis auf die stärkere Auswirkungen der Starttemperatur von 0 °C. Auch die relativen OD-Werte zeigen keine Unterschiede zwischen den einzelnen Temperaturversuchen und betragen ca. 92 % (Abb. 3.20, rechts).

Der Temperatursprung zwischen Start- und Mischungszeitpunkt liegt für 0 °C bei  $17,3 \pm 0,2$  °C, für -20 °C bei  $25,5 \pm 0,5$  °C, für -40 °C bei  $28,8 \pm 3,6$  °C und für -60 °C bei  $43,6 \pm 1,4$  °C. Dies liegt über -40 °C [19], bzw. -20 °C [51] als maximale Mischungstemperatur.

#### 3.1.4 Zusammenfassung der Untersuchung der Abstopplösungswirkung

Viele der auf die Zellmembran der Mikroorganismen wirkenden Stressarten während des raschen Kälteschocks und der Verwendung von Abstopplösungen lassen sich analog an Hand von Untersuchungen der Zellmembran bei

### 3 Ergebnisse und Diskussion

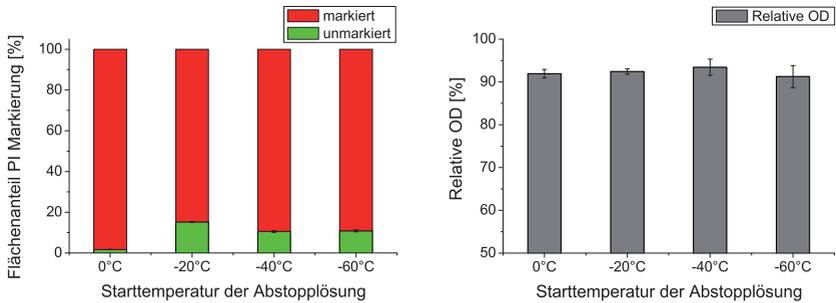


Abbildung 3.20: Durchflusszytometer- (links) und relative OD-Werte (rechts) abgestoppter *S. cerevisiae* Zellen mit 100 % MeOH bei verschiedenen Starttemperaturen. Die Verringerung der Starttemperatur unter 0 °C senkt die PI-Markierung auf 85 bis 90 %. Die relative OD zeigt dabei keine Veränderung.

Verwendung von Kryopreservativen [107] und Kälte vermittelte Bakterientötung, z. B. zur Nahrungsmittelkonservierung, [6, 20, 31, 61] zusammenfassen:

- Verändertes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen durch Volumenänderungen und damit verbundene Membrangrößenänderungen durch kalte hyperosmotische Abstopplungen
- Toxizitätseffekt der Abstopplung
- Thermotropische Phasenänderung der Membranphospholipide durch gesenkte Temperatur
- Dehydration durch Gefrieren und Osmose
- Verlust des Zellurgors und Plasmolyse
- Mechanischer Stress durch extrazelluläre Eisbildung sowie Zelle-Zelle und Zelle-Probenentnahmegeschäft Wechselwirkungen
- Ionische und elektrische Effekte durch Einbau von Ionen in die Eiskristalle
- Intrazelluläre Eisbildung (Kühlungsrateabhängig)
- Kälteinduzierte Lipidperoxidation und Verlust der Superoxidismutaseaktivität

- Verringerte Zellmembranfluidität und erhöhte Zellmembranviskosität durch mechanische Kompression und gesenkter Temperatur
- Nichtspezifische Lipidextraktion aus der Membran durch organische Lösungsmittel in der Abstopplösung
- Hydromechanischer Scherstress im Probenentnahmegesäß durch rasche Probenentnahme

In den Untersuchungen zu den Verlusten an Metaboliten aus den Zellen werden einige dieser Stressarten bereits als Ursache für die Verluste in Betracht gezogen. Britten und McClure [16] ermittelten ein osmotisches Äquilibrium zwischen intra- und extrazellulären Metaboliten in wachsenden *E. coli* Zellen. Änderungen der Osmolarität des umgebenden Mediums entfernen alle freien intrazellulären Aminosäuren aus den Zellen [134]. Basierend auf diesem Äquilibriumsprinzip sollte eine Abstopplösung, die die Zellphysiologie nicht beeinträchtigt, die Verluste auf Grund von Osmose reduzieren [132].

Das klassische Flüssig-Mosaik-Modell der Zellmembran von Singer und Nicolson [116] beschreibt eine Doppelschicht von Phospholipiden mit erheblichem Bewegungsfreiraum, in dem Proteine und anderen Moleküle seitlich treiben, können, der Übergang von einer zur anderen Schicht aber eingeschränkt ist. In diesem Sinne präsentiert die Membranfluidität, die auf Grund der nicht kovalenten Wechselwirkungen der Elemente besteht, die dynamische Eigenschaft in der Doppelschicht [90].

Die Lipidzusammensetzung der Zelle wird reguliert, um bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen eine konstante Membranfluidität zu erreichen, da die Struktur und Biegsamkeit der Doppelschicht von den vorhandenen Lipiden abhängt. So werden in Bakterien und Hefen vermehrt ungesättigte Fettsäuren bei niedrigen Wachstumstemperaturen eingebaut [3, 90]. Dem entsprechend senkt sich auch die Phasenübergangstemperatur. Die charakteristisch kurze Probenentnahme- und Abstopppzeit ist deutlich unter der Reaktionszeit von Bakterien, die dadurch die Zusammensetzung der Lipide der Membran nicht regulieren können und es kommt zum Phasenübergang von der flüssigen in die nicht flüssige Phase [82, 126, 145]. Die nun in der Gelphase vorliegenden Komponenten arbeiten nicht mehr in den normalen Para-

metern, weshalb bakteriellen Membranen nicht mehr voll funktionsfähig sind und Komponenten aus dem Zellinneren unkontrolliert austreten können [3]. Abhängig von der Fettsäurezusammensetzung der Lipiddoppelschicht wird die Membran von *E. coli* Zellen unter bestimmten Temperaturen sogar so fragil, dass sie leicht zerreißen kann [46]. *E. coli* Zellen die bei niedrigeren Temperaturen angezogen werden und damit angepasst sind, weisen wesentlich mehr ungesättigte Fettsäuren auf, weshalb sie deutlich weniger sensitiv in Hinblick auf den Phasenübergang der Membran sind, der Übergang erfolgt erst bei deutlich tieferen Temperaturen als bei Kulturen, die bei 37 °C angezogen werden [61, 96, 145]. Ähnliche Ergebnisse werden bei dem Grampositiven Organismus *Bacillus subtilis* beobachtet [27, 121, 128, 7].

In Bakterien können Phospholipide verschiedene fluide und feste Phasen einnehmen, charakterisiert durch verschiedene räumliche Anordnungen, wobei die lamellare Phase für die Funktion von Biomembranen die relevante ist [81]. Biophysikalische Herangehensweisen zur Emulation der Zellmembranen als einfache Doppelschichtmischungen zeigen ein umfangreiches Phasenverhalten inklusive der Koexistenz von zwei flüssigen Phase, d. h. flüssiggeordnete und -ungeordnete Domänen mit unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften innerhalb einer einzelnen Membranfläche [1, 32, 33, 81].

Der rasche Phasenübergang bei der Nutzung von kalten Abstopplösungen kann daher eine Ursache für viele Metabolitverluste aus den Zellen Grampositiver und Gram-negativer Bakterien sein. Für *Corynebacterium glutamicum* können bei einem starken Temperaturshift, der innerhalb einer Sekunde statt findet, intrazelluläre Metabolitverluste beobachtet werden [139]. Studien zur Permeabilität der *E. coli* Membran in Hinblick auf permeaseakkumulierende Substrate durch Leder [73] zeigen eine starke Sensitivität auf isoosmotischen Kälteschock. Die Substrate verschwinden bei dem angewendeten Probenentnahmeprozess dabei fast vollständig aus den Zellen, bei einem Temperaturshift von 25 auf 0 °C. Leder vermutet dabei, dass der isoosmotische Kälteschock eine Kristallisation der sich in der Flüssigphase befindenden Lipide der Membran verursacht. Die sich bei diesem Prozess bildenden hydrophilen Kanäle beschleunigen den Verlust des Substrats aus den Zellen.

Bei eukaryotischen Zellen wird beim Phasenübergang ein ca. 50 %tiger Verlust der Lipidfläche beobachtet, die auch die gebundenen Proteine beeinflusst und somit Protein-Protein Kontakte und Interaktionen verändert [32].

Die Kühlungsrate selbst ist ebenfalls ein wesentlicher Faktor für die Zellschädigung von *E. coli* und *Bacillus subtilis* [20, 121]. So zeigt das Antibiotikum Nisin bei einer Kühlungsrate von  $2\text{ }^{\circ}\text{C Minuten}^{-1}$  keine Wirkung, wohingegen  $2000\text{ }^{\circ}\text{C Minuten}^{-1}$  eine Dosisabhängige Populationsdezimierung hervorruft. Dies lässt eine starke Schädigung der Zellmembran durch Störung der äußeren Membranbarriere vermuten, die *E. coli* sensitiv auf Nisin macht [20]. Auf der anderen Seite zeigt sich bei den Untersuchungen von Canelas *et al.* [19] für *S. cerevisiae* eine stärkere Kühlungsrate als positiv gegen intrazelluläre Metabolitverluste. Und auch bei der Herstellung von Kryokulturen wird allgemein ein rasches Abstoppen der Proben mit flüssigem Stickstoff verwendet, was einen positiven Effekt auf den Anteil an lebensfähigen Zellen hat. Auch in der vorliegenden Arbeit liegen umgekehrte Ergebnisse vor. Die Auswirkungen der organischen Lösungsmittel werden durch den Einsatz von tiefen Temperaturen bei *E. coli* deutlich gesenkt, ersichtlich an der relativen OD und der spezifischen ATP-Konzentration im Überstand der Abstopplösung. Mit sinkender Starttemperatur und damit stärkerem Temperaturshift verbessern sich beide Werte.

Der Verwendung von kaltem Methanol für die schnelle Probenentnahme wurde von de Koning und van Dam entwickelt [64]. Durch die Verwendung von kalten Lösungen kann der Zellmetabolismus rasch abgestoppt werden und nur so kann die Biomasse vom umgebenden Medium abgetrennt werden, so dass Medienkomponenten wie Salze nicht die Analysetechnik stören [19]. Die Verwendung von Methanol als Basiskomponente für Abstopplösungen hat den Vorteil, dass es bei sehr tiefen Probenentnahmetemperaturen zum Abstoppen des Metabolismus eingesetzt werden kann. Auf der anderen Seite lösen die organischen Lösungsmittel fast alle der intrazellulären Metabolite aus Bakterienzellen [134]. Laut Bolten *et al.* [12] kommt es bei der Verwendung solcher Lösungen zu unspezifischen Verluste einer Vielzahl von Metaboliten, was keine detaillierte Analyse der *in vivo* Metabolitkonzentra-

tionen und -verteilungen möglich macht. Der Hauptgrund wird dabei in der Schädigung von Zellwänden und Membranen gesehen [118, 132, 134].

Selten werden Daten zur Hypothese der Schädigung der Zellen durch den Abstoppprozess auf Grundlage der Einzelzellanalyse durchgeführt. Zumeist werden der Überstand der Abstopplösung und die darin enthaltenen Metabolite betrachtet [12, 19, 76, 132]. Hiller *et al.* [52] kann so gut wie keine Zellschädigung bei der Verwendung von 60 % MeOH/HEPES bei *E. coli* beobachten. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen eine starke Schädigung bereits durch das organische Lösungsmittel MeOH, selbst bei einer Pufferung mit HEPES. Es kommt teilweise zu starken Einflüssen auf die Zellen, bis hin zur Lyse der Zellen. Das PI-Markierungsmuster weist mit steigenden Konzentrationen organischer Lösungsmittel eine stärker werdende Einzelzellschädigung auf. Auch die relative OD weicht von der der Kultur bei jeder Starttemperatur und jeder MeOH-Konzentration ab.

Die Verwendung von Additiven wie Trehalose, Mannitol, GA, Glycerin und NaCl senken die Schädigende Wirkung von 60 % MeOH zwar teilweise deutlich, jedoch zeigt die Bestimmung der spezifischen ATP-Konzentration aus der Abstopplösung und dem Zellextrakt kaum Unterschiede (Abb. 3.14). Trotzdem verhindert keine der Kombinationen komplett den intrazellulären Metabolitverlust. Untersuchungen von Canelas *et al.* [19] zeigen z. B. ebenfalls keinen signifikanten Vorteil bei der Verwendung von Puffern und einer angepassten ionischen Stärke der MeOH-Lösung beim Abstoppen von *S. cerevisiae*, wie sie in anderen Arbeiten berichtet werden. Im Gegenteil, Canelas *et al.* ermittelt sogar leicht schlechtere Ergebnisse für intrazelluläre Konzentrationen, stärker ausgeprägt für kleine Komponenten als für große.

Keine der untersuchten Abstopplösungen und keine der gewählten Starttemperaturen ermöglicht es *E. coli* Zellen unbeschädigt aus der Kultivierung in die Extraktion zu bringen. Gleichzeitig zeigt sich eine Notwendigkeit den Metabolismus abzustoppen an der Extraktion unbehandelter Zellen (Abb. 3.13). Ein ca. dreifach geringerer spezifischer ATP-Gehalt als in 100 % MeOH abgestoppter Zellen kann so nur nachgewiesen werden, was auf eine Umsetzung der Metabolite während der Probenentnahme hindeutet. Daher wurde die Untersuchung von *E. coli* nicht fortgesetzt.

Auch bei *S. cerevisiae* konnte kein vollständiger Erhalt der Zellintegrität erreicht werden. Da eine tiefe Temperatur zu geringen ATP/BTM-Konzentration in der Abstopplösung führt und auch das PI-Markierungsmuster 10 % besser ist als das bei 0 °C, wird für die Analyse der intrazellulären Metabolite der folgenden Experimente zu den Stresskultivierungen und den Pulsexperimenten eine tiefe Starttemperatur verwendet, wie sie auch bei Canelas *et al.* [19] vorgeschlagen wird.

### 3.2 *S. cerevisiae* unter Stressfaktoreinwirkung

In diesem Unterkapitel wird das allgemeine Wachstumsverhalten der verwendeten Hefen *S. cerevisiae* auf Agarplatten, versetzt mit Stressfaktoren dargestellt. Außerdem erfolgt der Vergleich der Wachstumskurven von Minimalmedienkulturen und gestressten Kulturen, d. h. dort wurde das Minimalmedium wie das Agar mit den Stressfaktoren versetzt. Im Anschluss daran folgt die Analyse der intrazellulären Metabolite mittels GC-MS.

#### 3.2.1 Wachstumsverhalten von *S. cerevisiae* unter Stressfaktoreinwirkung

Zur Evaluierung des Wachstumsverhaltens der Knockoutmutanten werden Agarplatten versetzt mit verschiedenen Stressfaktoren verwendet. Die Kultivierung erfolgt in Verduynmedium. In der exponentiellen Phase werden Zellen entnommen, auf ca. 15000 Zellen ml<sup>-1</sup> verdünnt und davon 20 µl ausplattiert. Nach einem definierten Inkubationszeitraum bei 30 °C wurden die Kolonien verglichen.

Je nach Stressfaktor und Knockoutmutante wachsen die Zellkolonien unterschiedlich schnell an. Die Morphologie der einzelnen Knockoutmutanten variiert je nach eingesetztem Stressfaktor und auch untereinander zeigen sich unterschiedliche Morphologien. Cadmiumchlorid verhindert jegliches Zellwachstum. Alle Stämme wachsen auf YPD (pH 6,8) und Diamidplatten innerhalb von zwei Tagen zu sichtbaren Kolonien heran. Außer für *zwf1*Δ trifft dies

### 3 Ergebnisse und Diskussion

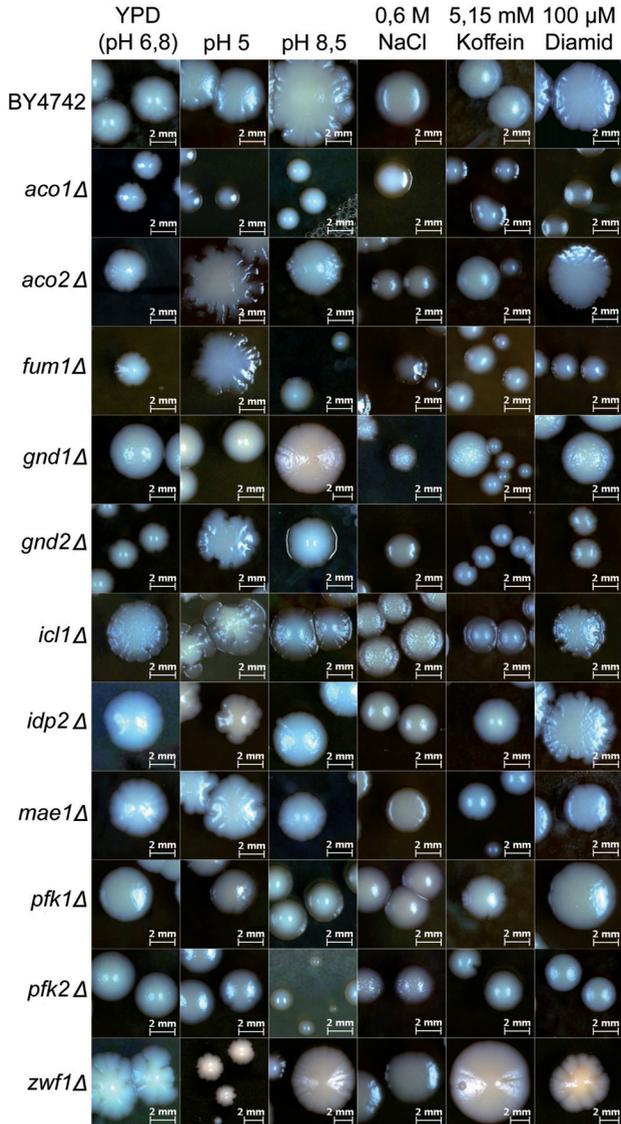


Abbildung 3.21: Agarplattenkultivierung auf YPD Medium versetzt mit unterschiedlichen Stressfaktoren nach Inkubation von ca. 8 Tagen (bzw. ca. 10 Tage für pH 8,5 *gnd1* $\Delta$  und *zwf1* $\Delta$  , sowie pH 5, 5,15 mM Koffein, 100  $\mu$ M Diamid *zwf1* $\Delta$  ). Von links nach rechts: YPD (pH 6,8), pH 5, pH 8,5, 0,6 M NaCl, 5,15 mM Koffein, 100  $\mu$ M Diamid.

auch für pH 5 zu. *zwf1*Δ braucht dort ca. 8 Tage, um sichtbare Kolonien auszubilden. Im basischen Bereich kann nur *mae1*Δ innerhalb von 2 Tagen Kolonien ausbilden, *fum1*Δ benötigte 4 Tage, und *pfk1*Δ 5 Tage. Alle anderen Mutanten sowie der Elternstamm benötigen einen längeren Zeitraum. Unter osmotischem Stress, durch 0,6 M NaCl verursacht, wuchsen auf den Platten bei mehreren Mutanten und dem Elternstamm nicht alle ausplattierten Zellen zu Kolonien heran (*aco1*Δ, *pfk1*Δ, *pfk2*Δ, *fum1*Δ, *gnd1*Δ, *gnd2*Δ), nur wenige Zellhaufen sind nach mehrtägiger Inkubation sichtbar. *aco1*Δ, *zwf1*Δ, *pfk1*Δ und *pfk2*Δ brauchen 5 Tage, alle anderen nur 4 Tage, um Kolonien auszubilden. 5,15 mM Koffein wirkt ebenfalls wachstumshemmend. *gnd1*Δ benötigt weniger als 4 Tage, *pfk2*Δ 5 Tage und *aco1*Δ und *zwf1*Δ deutlich mehr als 5 Tage, alle andern Mutanten und der Elternstamm benötigen 4 Tage.

Die Morphologie reicht von flachen über runde, glatte halbkugelförmige Zellhaufen bis hin zu rauen unförmigen Kolonien (Abb. 3.21). Farblich treten alle Stämme in beige-weißer Farbe auf, einige, vor allem die flach wachsenden, sind durchscheinend.

*aco1*Δ zeigt in jedem Fall glatte Kolonieoberflächen. Auf NaCl und Diamid bilden sich nur flache Kolonien aus. *aco2*Δ und der Elternstamm bilden große, beige Kolonien aus. Auf Koffein- und NaCl-Medium sind diese glatt und halbkugelförmig. Auf pH 8,5, YPD und Diamid zeigen die Kolonien ausladende Ränder, die auf pH 5 Medium noch deutlich zunehmen und dort im Falle von *aco2*Δ auch keinen kreisförmigen Querschnitt mehr aufweisen.

*fum1*Δ zeigt bei Koffein halbkugelförmige glatte Kolonien. NaCl, Diamid und YPD verursachen raue Oberflächen und pH 5 wiederum die ausladendsten Ränder. *gnd1*Δ zeigt nach längerem Wachstum auf YPD pH 5, NaCl, und Koffein zwar halbkugelförmige Kolonien, die Oberfläche zeigt sich jedoch unterschiedlich rau, wobei Koffein die stärkste Rauigkeit verursacht. Auf pH 8,5 entstand eine glatte, kugelige Oberfläche.

*gnd2*Δ, *idp2*Δ, *pfk1*Δ sowie *pfk2*Δ zeigen fast ausschließlich glatte, halbkugelförmige Zellhaufen. Δicl1 weist zumeist eine raue Oberfläche auf und zeigt teilweise ausladende Kolonieränder. *zwf1*Δ wächst wie *aco2*Δ in einer Mischung aus allen Formen.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

In einigen Fällen zeigen die Mutanten und der Elternstamm ein verändertes morphologisches Verhalten. Die Kolonien reichen von ca. 0,1 mm bis hin zu 1 mm durchmessenden Kolonien, die bis zu 1 cm Länge erreichen und senkrecht, der Gravitation folgend, vom Agarboden her wachsen, da die Agarplatten mit dem Deckel nach unten im Brutschrank gelagert werden, was eine Kondenswassertropfenbildung in den Petrischalen verhindert. Nach einem erneuten Ausplattieren dieser Kolonien entstehen einfache Zellhaufen. Außerdem treten bei vielen Platten und Mutanten sog. *small colony variants* (SCV) auf. Dabei handelt es sich um langsam wachsende Zellhaufen, die genetisch identisch zu den Zellen morphologisch anders gewachsener Zellhaufen auf der Platte sind [50]. SCV werden sowohl bei Gram-positiven und -negativen Bakterien [50] als auch bei Pilzen [8] beobachtet. Der Grund für das phänotypische Umschalten ist bis heute ein Gebiet der Forschung. Mittlerweile werden bei akuten Infektionen vor allem diese SCV als wesentlich für Persistenz und Rezidivität vieler pathogener Mikroorganismen angesehen. So werden SCV von *Staphylococcus aureus* als Ursache für Herzinnenhaut-, Lungen- und Knochenmarksentzündung betrachtet [50].

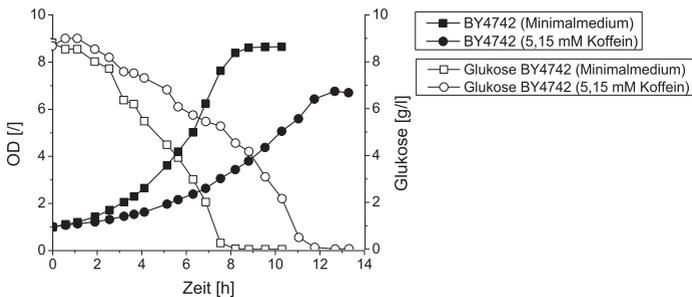


Abbildung 3.22: **Wachstumsverlauf des *S. cerevisiae* Elternstamms BY4742 in Minimalmedium und koffeinversetztem Medium.** Mit einer verringerten Glukosevorlage von ca.  $10 \text{ g l}^{-1}$  statt  $20 \text{ g l}^{-1}$  erreichen die Kulturen eine OD von unter 10. Der Zusatz von 5,15 mM Koffein verringert sowohl die maximale Wachstumsrate als auch die maximal erreichbare OD.

Die Kultivierung in Schüttelkolben wird mit Verduyn-Minimalmedium sowie mit den Zusätzen Diamid und Koffein durchgeführt (Kap. 2.1.2). BY4742 und *mae1*Δ zeigen dabei ein ähnliches Wachstumsverhalten auf Verduynme-

dium (ca.  $0,22 \text{ h}^{-1}$ ). *zwf1* $\Delta$  weist eine halbierte maximale Wachstumsgeschwindigkeit auf (ca.  $0,10 \text{ h}^{-1}$ ). Diamid zeigt keine Auswirkungen auf die Kulturen, sie wachsen wie im normalen Verdünnmedium. Die Konzentration an Koffein wird variiert. Die Wachstumsrate von BY4742 senkt sich deutlich mit steigendem Koffeingehalt bis hin zu einer Dezimierung auf  $0,014 \text{ h}^{-1}$  mit  $5,15 \text{ mM}$  Koffein. *zwf1* $\Delta$  zeigt die gleiche Reaktion auf steigende Koffeinkonzentrationen wie BY4742. Die Wachstumsrate sinkt um das Zehnfache beim Einsatz von  $5,15 \text{ mM}$  Koffein. Die Wachstumsrate von *mae1* $\Delta$  sinkt hingegen mit steigender Koffeinkonzentration nicht so stark ab. Es wird eine maximale Wachstumsrate von  $0,16 \text{ h}^{-1}$  bei  $5,15 \text{ mM}$  Koffein erreicht. Das Wachstum mit einem verringerten Glukosegehalt von  $10 \text{ g l}^{-1}$  statt  $20 \text{ g l}^{-1}$  bewirkt eine geringere End-OD der Kultur von unter 9. Durch diese Kultivierung wird auch deutlich, dass der Zusatz von  $5,15 \text{ mM}$  Koffein einen höheren Energiebedarf für die Zellen bedeutet, weshalb mit der vorgelegten Glukose nicht die gleiche OD wie im Minimalmedium erreicht wird (Abb. 3.22). Für die Kultivierungen der GC-MS Untersuchung wird daher eine doppelte Glukosekonzentration im Medium eingesetzt, wodurch alle Kulturen ohne Glukoselimitation über eine OD von 8 wachsen, was ausreicht, da die Kulturen bei einer OD von 6 abgestoppt werden.

### 3.2.2 Metabolic Profiling von *S. cerevisiae* unter Stressinduktion

Die Untersuchung der Langzeitstressantwort erfolgt in Minimalmedium, dem der entsprechende Stressfaktor zugesetzt wird, in Schüttelkolbenexperimenten. Als Stressfaktoren werden  $100 \mu\text{M}$  Diamid und  $5,15 \text{ mM}$  Koffein eingesetzt. Untersucht werden der Elternstamm und die Knockoutmutanten *mae1* $\Delta$  und *zwf1* $\Delta$ . Dazu werden wie bei der Untersuchung der Auswirkungen der Abstopplösung  $500 \text{ ml}$  Kolben mit  $50 \text{ ml}$  Kultivierungsmedium verwendet. Die Behandlung der Zellen und die Extraktion für die GC-MS Analyse erfolgt nach dem Protokoll von Börner *et al.* [10] und die Vorbereitung und Messung der Proben angepasst nach dem Protokoll von Scherling [110] (Kap. 2.3.4).

Die Wirkung von Stressfaktoren auf den Zellmetabolismus kann nicht vorhergesagt werden. Zu komplex sind die Reaktionen auf allen miteinander verflochtenen Reaktionsebenen. Die Untersuchung des Metaboloms bildet daher in dieser Arbeit einen Schritt in der Erstellung einer Hypothese über die Reaktion der ausgewählten Mikroorganismen. Dazu wird ein Kontrollorganismus bzw. eine Kontrollbedingung gewählt und die Kultivierungen unter Stressbedingungen damit verglichen. Als Kontrolle dient in diesem Fall die Kultivierung von *S. cerevisiae* BY4742 (Elternstamm) auf Minimalmedium ohne Stressfaktorzugabe, wobei zu bemerken ist, das dem Minimalmedium auf Grund von Auxotrophien Glutamin, Histidin, Leucin, Lysin und Uracil zugegeben wird. Die zu erwartenden Unterschiede zwischen Elternstamm (Kontrolle) und den Zellen unter Stressbedingungen sind dabei zumeist auf Grund der Komplexität nicht ersichtlich und um die entscheidenden Aussagen aus den hochdimensionalen Datensätzen durch Visualisierung und dadurch erst ermöglichte Mustererkennung zu extrahieren, ist eine Reduzierung der Datensatzdimension nötig [83].

Die Dimensionsreduktion zielt auf die Darstellung der n-dimensionalen Daten auf zwei- oder dreidimensionaler Ebene ab. Eine der am häufigsten angewendeten Verfahren ist dabei die Hauptkomponentenanalyse (*Principal Components Analysis*, PCA) (Kap. 2.3.5.1).

Die Identifizierung der relevanten Metabolite erfolgt mit Hilfe eines T-Tests der normalisierten Werte in TigrMev und zusätzlich mit dem Verhältnis der Mittelwerte der Proben zur Kontrolle. Metabolite mit einem Verhältnis von mindestens Faktor 2 über oder unter den Vergleichswerten werden dabei berücksichtigt. In den Tabellen im Anhang (Tab. 5.6, 5.7, 5.8, 5.9) sind die Mittelwerte, Standardabweichungen, p-Werte und die Verhältnisse der Metabolite mit Signifikanz aufgeführt. Die Werte sind für jede Kombination erstellt, d. h. der Elternstamm in Minimalmedium als Kontrolle mit jeweils einer anderen Wachstumsbedingung und/oder Knockoutmutante.

#### **3.2.2.1 Metabolic Profiling des Elternstamms unter Stressbedingungen**

Mittels PCA werden die Proben des Elternstamms unter ungestressten Bedingungen (Kontrolle) mit denen der gestressten Schüttelkultivierungen ver-

gleichen (Abb. 3.23). Es wird deutlich, dass die Versetzung der Kultur mit Diamid keine Unterschiede der beiden Kulturen verursacht. Sowohl die Kontrolle als auch die Stresskultur gehören zu einem einzelnen Cluster.

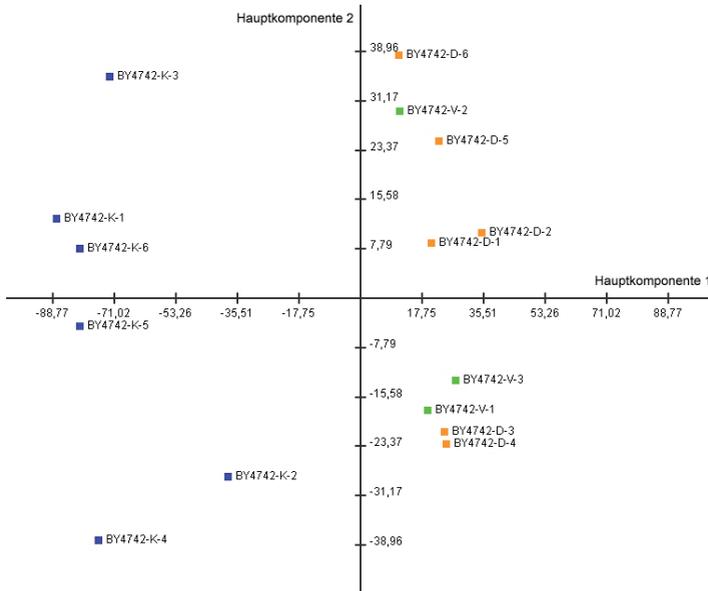


Abbildung 3.23: **PCA der Kultivierung des Elternstamms BY4742 unter ungestressten (Kontrolle, Verduyn-Minimalmedium) und gestressten Bedingungen (Diamid- und Koffeinmedium).** Diamid verursacht keine signifikante Veränderung des Metabolitprofils, eine Koffeinzugabe hingegen zeigt deutliche Unterschiede. PCA mit normalisierten und BTM normierten Metabolitdaten von insgesamt 72 relativ quantifizierten Metaboliten, wobei beide Komponenten 57,6 % der Gesamtvarianz wiedergeben. (BY4742 - Elternstamm, V - Verduyn-Minimalmedium, D - Diamidmedium (100  $\mu$ M), K - Koffeinmedium (5,15 mM), 1 bis 6 - Versuchsnummer der unabhängigen Versuche)

Hingegen bewirkt Koffein gegenüber der Kontrollbedingung eine signifikante Veränderung bei 25 Metaboliten, von 72 gemessenen (Abb. 3.24). 16 davon weisen ein Verhältnis größer 2 oder kleiner 0,5 auf (Kap. 5.4). Zur Verdeutlichung ist in Abbildung 3.25 ein Teil des Metabolomnetzwerks von *S. cerevisiae* dargestellt. Hervorgehoben sind die Metabolite die der eben beschriebenen Verhältnisbedingung entsprechen. Der Fettsäurestoffwechsel ist durch Koffein gestört, Palmitinsäure liegt 2,27 fach geringer vor. Die zweite der gemessenen Fettsäuren, Stearinsäure, wird ebenfalls durch das Programm

### 3 Ergebnisse und Diskussion

TigrMeV (Kap. 2.3.5.1 als signifikant verändert erkannt, jedoch besitzt sie lediglich eine 1,70fach geringere Konzentration. Zusätzlich liegt das an der Lipidbiosynthese beteiligte Glycerinphosphat in verringerter Konzentration vor (3,33fach).

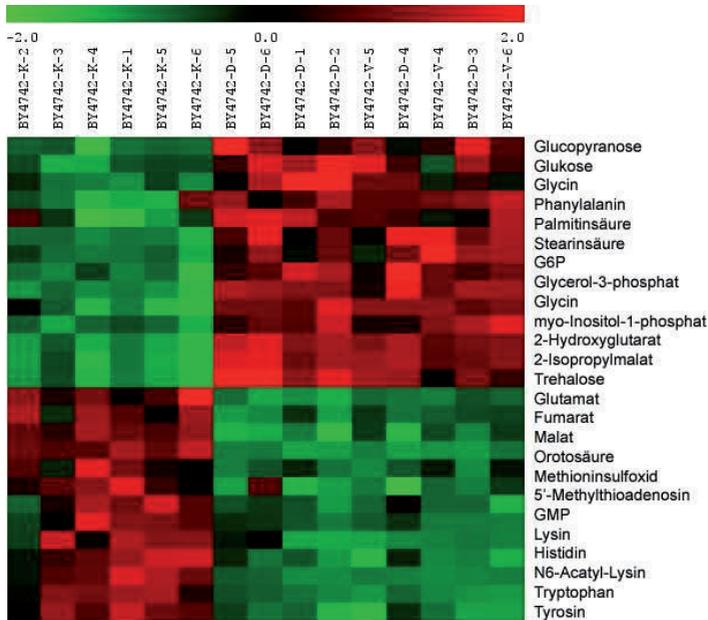


Abbildung 3.24: **T-Test Clustering der Kultivierung des Elternstamms BY4742 unter ungestressten (Kontrolle, Verduyn- und Diamid-Minimalmedium) und gestressten Bedingungen (Koffeinmedium).** Farbcoodierte Darstellung signifikanter Änderungen der Metabolitkonzentrationen, wobei die rote Farbcoodierung erhöhte und die grüne Farbcoodierung verminderte Konzentrationen darstellt. Diamid wird, da es keine signifikanten Unterschiede zu den Daten der Minimalmediumkultivierung gibt, als Kontrolle herangezogen. (BY4742 - Elternstamm, V - Verduyn-Minimalmedium, D - Diamidmedium (100  $\mu$ M), K - Koffeinmedium (5,15 mM), 1 bis 6 - Versuchsnummer der unabhängigen Versuche)

Die Aminosäuren zeigen einen deutlichen Unterschied zur Kontrolle. Im Methion-Threonin und Lysin Bildungsreaktionsweg aus Oxalacetat ist Threonin 2,25fach vorhanden, wobei es im T-Test nicht als signifikant erkannt wurde. Lysin, welches dem Medium auf Grund von *leu2 $\Delta$ 0* vorgelegt werden muss, liegt 3,84fach vor. Gleichzeitig ist das aus Threonin oder 3-Phosphoglycerat gebildete Glycin gesenkt (4,76fach). Histidin, welches durch den Knockout

von *his3* nicht gebildet werden kann und ebenfalls vorgelegt wird, liegt in den Zellen 2,83fach erhöht vor. Die aus Chorismate gebildeten Aminosäuren Tryptophan (3,61fach) und Tyrosin liegen erhöht vor, wobei Tyrosin das Verhältniskriterium mit 1,78 nicht erreicht wird. Das aus Pyruvat abstammende Leucin wird dem Medium auf Grund von *leu2* $\Delta$ 0 zugegeben. Eins der Zwischenprodukte auf diesem Reaktionsweg, das 2-Isopropylmalat ist um den Faktor 7,69 gesenkt.

Orotosäure wird im Reaktionsweg der Umwandlung von Glutamin in CTP als Zwischenprodukt gebildet. Es liegt in 8,93fach höherer Konzentration vor, obwohl der Reaktionsweg im Stamm durch *ura3* $\Delta$ 0 im weiteren Reaktionsweg unterbrochen ist. Orotosäure wird unabhängig vom Reaktionswegen auch aus 4,5-Dihydro-Oroat unter Bildung von  $H_2O_2$  gebildet.

Das aus der Reaktion von Putrecin und S-Adenosylmethioninamin gebildete 5'-Methylthioadenosin liegt 2,60fach vor. Es wird durch mehrere Zwischenreaktionen in Methionin umgewandelt, welches dem Medium zugegeben wird, da das Medium für alle Kultivierungen gleich sein soll. Es wird zugegeben, da *zwf1* $\Delta$  eine Methioninauxotrophie aufweist. Im gleichen Bildungsschritt von 5'-Methylthioadenosin wird auch Spermidin und aus Spermidin wiederum 5'-Methylthioadenosin und Spermin gebildet, was eine Vorstufe für CoA ist, welches bei vielen biologischen Prozessen als Cofaktor dient und als Acetyl-CoA u. a. stark am Fettstoffwechsel beteiligt ist. Evt. wird durch die Bereitstellung von Methionin der Pool von 5'-Methylthioadenosin nicht in dem Maße verbraucht wie in der Kontrolle.

Das von Lysin abstammende N6-Acetyl-Lysin liegt trotz hoher Lysinkonzentration 15,84fach vor. Es handelt sich hierbei um ein kompatibles Solut, d. h. ein Osmolyt [69, 117]. Offensichtlich bewirkt Koffein eine starke Stressantwort und löst eine ähnliche Reaktion aus wie ein osmotischer Stressfaktor. Zusätzlich dazu könnte eine Störung des Energiestoffwechsels vorliegen, d. h. eine Störung des Redoxpotentials, ersichtlich zum einen am gestörten Fettsäurestoffwechsel und u. a. z. B. an der vermindert vorliegenden 2-Hydroxyglutarsäure (3,13fach), welches aus 2-Oxoglutarat gebildet wird. Die Synthese erfordert den Einsatz von NADH.

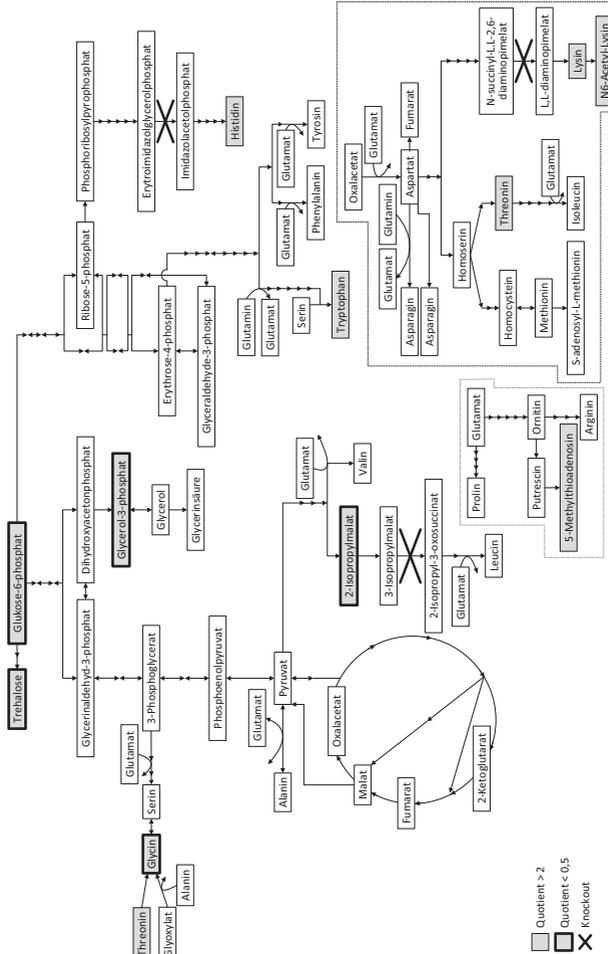


Abbildung 3.25: **Metabolomnetzwerk des Elternstamms unter Koffeineinwirkung.** Dargestellt ist das Netzwerk basierend auf den Daten des *Saccharomyces Genome Database* [25, 24]. Hervorgehoben sind Metabolite, die der Verhältnisbedingung (Q) entsprechen, d. h. der entsprechende Metabolitpool liegt mindestens doppelt höher oder niedriger vor als in der Referenz.

### 3.2.2.2 Metabolic Profiling der Knockoutmutanten unter Stressbedingungen

BY4742*mae1* $\Delta$  wurde nur mit Minimalmedium getestet, da nur geringe Änderungen im Vergleich zum Elternstamm vorliegen und für eine Kultivierung in Koffein nur ein geringer Unterschied zu erwarten ist. Es weist im Vergleich zur Kontrolle die ca. dreifachen Konzentrationen an Fumarat (2,74 fach) und Malat (3,30 fach) auf, was auf das Fehlen der Malat-Decarboxylase, die durch das Gen *mae1* codiert wird, zurückzuführen ist. Zusätzlich liegt der Speicherstoff Trehalose in doppelter Konzentration vor. Die 2-Isopropylmalatkonzentration im Leucinbiosyntheseweg ist halbiert. Neun weitere der 80 gemessenen Metabolite zeigen Signifikanz (Abb. 3.26), jedoch keine mindestens doppelte Erhöhung oder Senkung der *in vivo* Konzentrationen (Kap. 5.4).

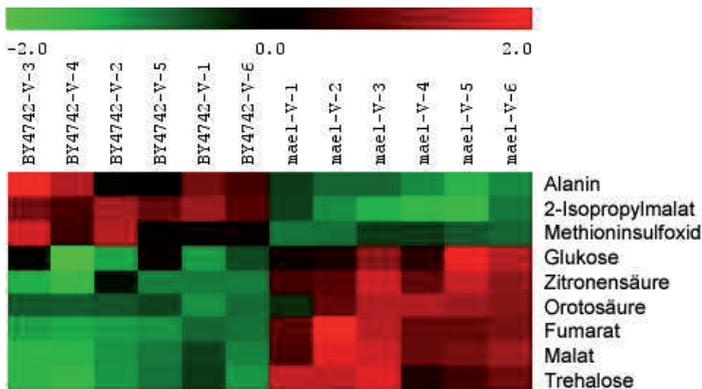


Abbildung 3.26: **T-Test Clustering der Kultivierung des Elternstamms BY4742 und *mae1* $\Delta$  unter ungestressten Bedingungen (Verduyn-Minimalmedium).** Farbcodierte Darstellung signifikanter Änderungen der Metabolitkonzentrationen, wobei die rote Farbcodierung erhöhte und die grüne Farbcodierung verminderte Konzentrationen darstellt. (BY4742 - Elternstamm, *mae1* $\Delta$  - Knockoutmutante, V - Verduyn-Minimalmedium, 1 bis 6 - Versuchsnummer der unabhängigen Versuche)

Die Hauptkomponentenanalyse der Daten von *zwf1* $\Delta$  in Minimalmedium und 5,15 mM Koffein liefert wie für *mae1* $\Delta$  eine Unterscheidbarkeit der Kontrolle und der Mutante, sowie in ungestresstem und gestresstem Zustand.

Bei BY4742*zwf1* $\Delta$  in Minimalmedium zeigen sich deutlichere Unterschiede zur Kontrolle. Von den 72 gemessenen Metaboliten sind 28 als Signifikant

im T-Test identifiziert (Abb. 3.28). Davon zeigen 17 ein dem Kriterium entsprechendes Vielfache der intrazellulären Konzentration von zwei oder darüber (Kap. 5.4). In Abbildung 3.27 sind entsprechend dieser Daten die Metabolite in einem Teil des Metabolomnetzwerks hervorgehoben. Die meisten der Aminosäuren liegen in *BY4742Δzwf1* in geringeren Konzentrationen vor. Dies liegt vor allem an der Auxotrophie für organischen Schwefel unter aeroben Wachstumsbedingungen, die durch Zugabe von Methionin teilweise behoben werden kann. Die Hypothese warum eine fehlende Glukose-6-phosphat-dehydrogenase eine Methioninauxotrophie auslöst geht dahin, dass die Zelle durch das Fehlen des NADPH Bildenden Reaktionsschrittes von G6P in den Pentosephosphatweg ein verändertes Redoxpotential haben. So ermittelten Hudak Slekar *et al.* [55] in einer *zwf1Δ Saccharomyces*-Knockoutmutante nur 67% des NADPH Levels des isogenen Wildtyps. Oxidativer Stress bewirkt, dass NADPH verstärkt zum Schutz vor diesem Stressfaktor verwendet werden muss, womit viele andere essentielle Reduktionsprozesse vernachlässigt werden, d. h. die Zugabe von Methionin verhindert die schlechte Energiebilanz nicht. Damit auch die Bildung von schwefelhaltigen Aminosäuren.

Nicotinamid ist ein wesentlicher Bestandteil von NAD und NADP und liegt in 2,18facher Konzentration vor. Durch die Vorlage im Medium kann diese erhöhte Konzentration in den Zellen auftreten. Eine Umwandlung von Nicotinamid in NAD erfolgt durch Umwandlung von Phosphoribosylpyrophosphat, was wiederum aus Ribose-5-phosphat gebildet wird, welches durch das Fehlende Gen *zwf1* und den damit gestörten Pentosephosphatweg in geringeren Mengen vorliegen sollte als in der Kontrolle.

Orotosäure liegt wie im mit Koffein angezogenen Elternstamm 2,56fach höher konzentriert vor. Ein Grund für das Erhöhte Aufkommen kann wie bei der Umwandlung von Nicotinamid im gestörten Pentosephosphatweg liegen. Auch hier wird PRPP genutzt, hier um Orotosäure in Orotidin-5'-phosphat umzuwandeln. Fehlt PRPP kann es auch zu einer erhöhten Poolgröße bei Orotosäure kommen.

Thymin, ein Derivat der RNA-Base Uracil, liegt sehr wahrscheinlich auf Grund des Uracilüberschusses erhöht vor (2,24fach). Außerdem wird es un-



### 3 Ergebnisse und Diskussion

ter Verwendung von NADPH in Alanin abgebaut, welche in 2,22 fach niedrigerer Konzentration vorliegt. Da NADPH nicht in ausreichendem Maß vorhanden ist, kann auch der Umsatz von Thymin reduziert sein. Guanosin-5-monophosphat liegt wiederum in erhöhter Konzentration vor (2,68 fach). Da es als Grundbaustein der RNA dient, liegt evt. eine verminderte Translation vor.

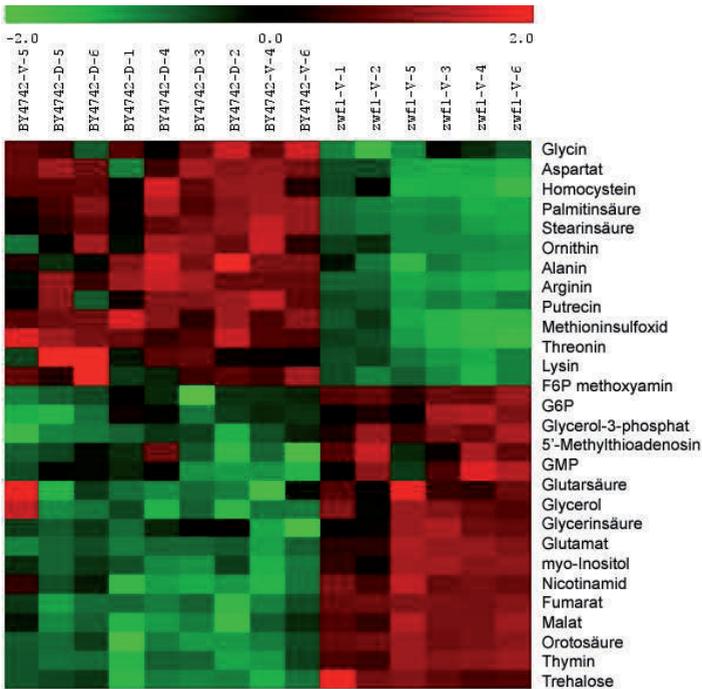


Abbildung 3.28: **T-Test Clustering der Kultivierung des Elternstamms BY4742 und *zwf1Δ* unter ungestressten Bedingungen (Verduyn-Minimalmedium).** Farbcodierte Darstellung signifikanter Änderungen der Metabolitkonzentrationen, wobei die rote Farbcodierung erhöhte und die grüne Farbcodierung verminderte Konzentrationen darstellt. Diamid wird, da es keine signifikanten Unterschiede zu den Daten der Minimalmediumkultivierung gibt, als Kontrolle herangezogen. (BY4742 - Elternstamm, *zwf1Δ* - Knockoutmutante, V - Verduyn-Minimalmedium, D - Diamidmedium (100  $\mu$ M), 1 bis 6 - Versuchsnummer der unabhängigen Versuche)

Trotz Zugabe von Methionin sind die Level der Aminosäuren in dieses Stoffwechselbereich deutlich gesenkt. Homocysteine, was direkt aus Methionin ge-

bildet wird, besitzt nur einen 5,56fach niedrigeren Level. Obwohl die Vorstufe Homoserin keine Signifikanz aufweist, ist die ebenfalls davon abgeleitete Aminosäure Threonin ebenfalls geringer vorhanden (2,04fach). Geht man in der Reaktion weiter zurück kommt man zu der Aminosäure Aspartat. Dieses liegt 2,86fach geringer vor. Ein weiterer Abkömmling der Reaktionsschritte aus Aspartat, das Lysin, liegt in 2,43fach geringerer Konzentration vor, obwohl es durch die Zugabe im Medium im Überschuss vorhanden ist. Gebildet wird Lysin auf Grund der parentalen Auxotrophie durch *lys2* $\Delta$ 0 nicht. Glutamat, was u. a. bei der Bildung von Aspartat verbraucht wird, liegt hingegen in 2,23facher Konzentration vor. Unter Glutamatumwandlung wird auch Ornithin, Putrecin und Arginin gebildet. Diese drei Metabolite liegen wie Aspartat, Homocystein, Threonin und Lysin in geringerem Maße in den Zellen vor (gemessenen Derivate von Ornithin 6,67 und 4,55fach, Putrecin 5,56fach, Arginin 3,13fach). Putrecin wird im Verlauf der weiteren Reaktion wie beim Elternstamm beschrieben in Spermidin und schließlich in CoA umgewandelt. Bei der Kontrolle liegt das Zwischenprodukt 5'-Methylthioadenosin in erhöhtem Maße vor. Da die Vorstufen zu 5'-Methylthioadenosin aus Methionin abstammen und mit Putrecin reagieren, liegt evt. eine Verminderung des Reaktionsweges vor, womit zwar die Vorstufen zu CoA Synthese gebildet werden, jedoch nur in verringertem Maß weiter umgesetzt werden.

BY4742*zwf1* $\Delta$  hat eine erhöhte Konzentration des Energiespeicherstoffes und kompatiblen Soluts Trehalose (3,04fach). Evt. wird hier der Überschuss an G6P, da er nicht in den Pentosephosphatweg gelangen kann, in Trehalose umgesetzt. Der Fettsäurestoffwechsel ist ebenfalls verändert. Es liegt eine erhöhte Konzentration an Glycerin (2,57fach) vor und kann in der Gluconeogenese wieder zu G6P umgesetzt werden. Jedoch liegt eine deutlich geringere Konzentration an Palmitinsäure (2,63fach) und Stearinsäure (2fach) vor, die einzigen gemessenen Fettsäuren.

Die geringe Palmitinsäurekonzentration kann an dem hohen NADPH Bedarf für die Bildung dieser Säure liegen (14 NADPH). Da Stearinsäure, die aus Palmitinsäure gebildet wird, ebenfalls in geringer Konzentration vorliegt, liegt die Vermutung nahe, dass sämtliche Fettsäuren geringer vorliegen, da

### 3 Ergebnisse und Diskussion

diese beiden Vorstufen für länger-kettige Fettsäuren sind [90]. Eine geringere Bildung von Fettsäuren kann auch eine erhöhte Konzentration an Glycerin erklären, da es als Rückgrat vieler Speicher- und Membranlipide dient. Lipide sind wiederum u. a. aus einzelnen Fettsäuren zusammengesetzt. Mit einem geringeren Fettsäurestoffwechsel kann auch die beobachtete geringere Wachstumsrate (Kap. 3.2.1) einher gehen, da die Bildung von neuen Zellmembranbestandteilen damit deutlich verlangsamt ablaufen sollte.

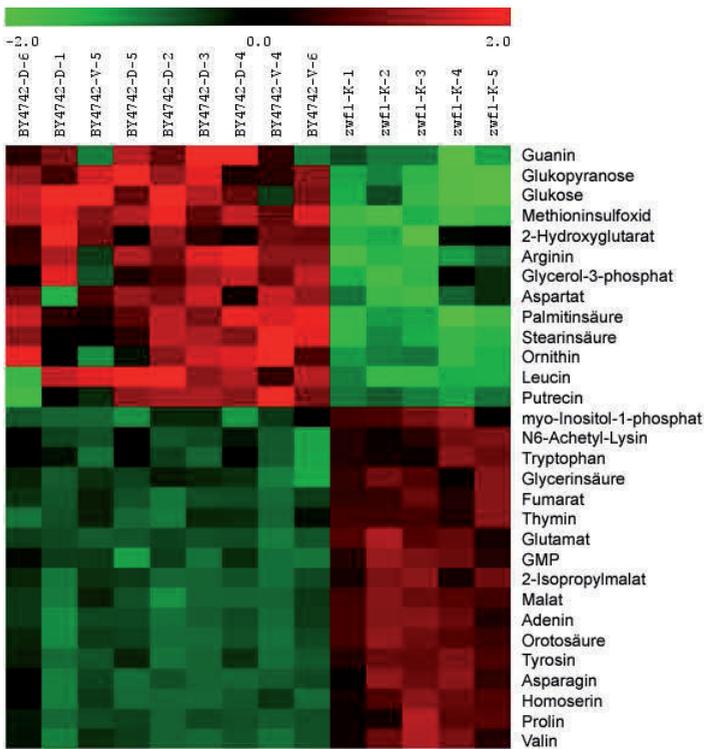


Abbildung 3.29: **T-Test Clustering der Kultivierung des Elternstamms BY4742 (Veruyn- und Diamid-Minimalmedium) unter ungestressten und *zwf1*  $\Delta$  unter gestressten Bedingungen (Koffeinmedium).** Farbcodierte Darstellung signifikanter Änderungen der Metabolitkonzentrationen, wobei die rote Farbcodierung erhöhte und die grüne Farbcodierung verminderte Konzentrationen darstellt. Diamid wird, da es keine signifikanten Unterschiede zu den Daten der Minimalmediumkultivierung gibt, als Kontrolle herangezogen. (BY4742 - Elternstamm, *zwf1*  $\Delta$  - Knockoutmutante, V - Verduyn-Minimalmedium, D - Diamidmedium (100  $\mu$ M), K - Koffeinmedium (5,15 mM), 1 bis 6 - Versuchsnummer der unabhängigen Versuche)

Die Zugabe von 5,15 mM Koffein beeinflusst den Metabolismus von *zwf1*  $\Delta$  stark. Im Vergleich zur Kontrolle sind 30 Metabolite signifikant (Abb. 3.29) und 21 besitzen ein positives Verhältniskriterium (Kap. 5.4). In Abbildung 3.30 sind entsprechend dieser Daten einige der Metabolite in einem Teil des Metabolomnetzwerks hervorgehoben. Der Aminosäurestoffwechsel ist gestört. Asparagin statt Asparaginsäure und Glutamat statt Glutaminsäure liegen hier in erhöhtem Level vor (6,33fach und 3,87fach). Fumarat, welches u. a. aus Glutamat über Aspartat und aus Succinat gebildet werden kann, liegt 2,45fach erhöht vor, so wie das Reaktionsprodukt aus Fumarat, das Malat (2,45fach). Da durch Malatreaktionen NADH gebildet werden kann, verliert der Metabolismus durch die Zugabe an Koffein zusätzlich Redoxpotential. Außerdem liegt Ornithin deutlich geringer (3,03fach) und Prolin deutlich erhöht (4,38fach) vor, welche ebenfalls aus Glutamat gebildet wird. Prolin ist, wie Ectoin, Hydroxyectoin und N6-Acetyl-Lysin, ein Osmoprotektanz [40]. Auch N6-Acetyl-Lysin kommt erhöht vor (4,11fach). Wie bei der ungestressten Mutante liegt eine hohe Konzentration an Orotosäure (7,38fach) vor, die wie beschrieben aus Glutamin gebildet wird und ein Zwischenprodukt der CTP Synthese ist. Im Reaktionsweg der Threonin- und Methioninbiosynthese liegen keine der Aminosäuren in geringerem Maß vor. Homoserin zeigt sogar eine doppelt so hohe Konzentration (2,12fach). Gleichzeitig liegt ein Abbauprodukt von Methionin, das Methioninsulfoxid geringer vor (2,78fach).

In anderen Reaktionswegen zeigen sich deutlichere Änderungen, so im von Pyruvat ausgehenden Leucin und Valin Bildungsweg. Sowohl Valin als auch das Zwischenprodukt der Leucinbildungsreaktion 2-Isopropylmalat (4,34fach) liegen erhöht vor. Eine hohe 2-Isopropylmalat kann am Knockout des Gens für den Reaktionsschritt von 3-Isopropylmalat zu 2-Ketoisocaproat liegen, jedoch tritt dieser Zustand nicht bei dem ungestressten Organismus auf. Leucin, welches im Medium zugesetzt ist, ist dagegen deutlich gesenkt (2,86fach). Evt. wird es verstärkt für die Proteinsynthese eingesetzt [90].

Weiterhin liegt mehr Tryptophan (2,23fach) und Tyrosin (3,90fach) in den Zellen vor, die beiden aus einem Hauptreaktionsweg abstammen, die aus dem Pentosephosphatweg herrührt. Die Fettsäuresynthese ist ebenso gestört wie

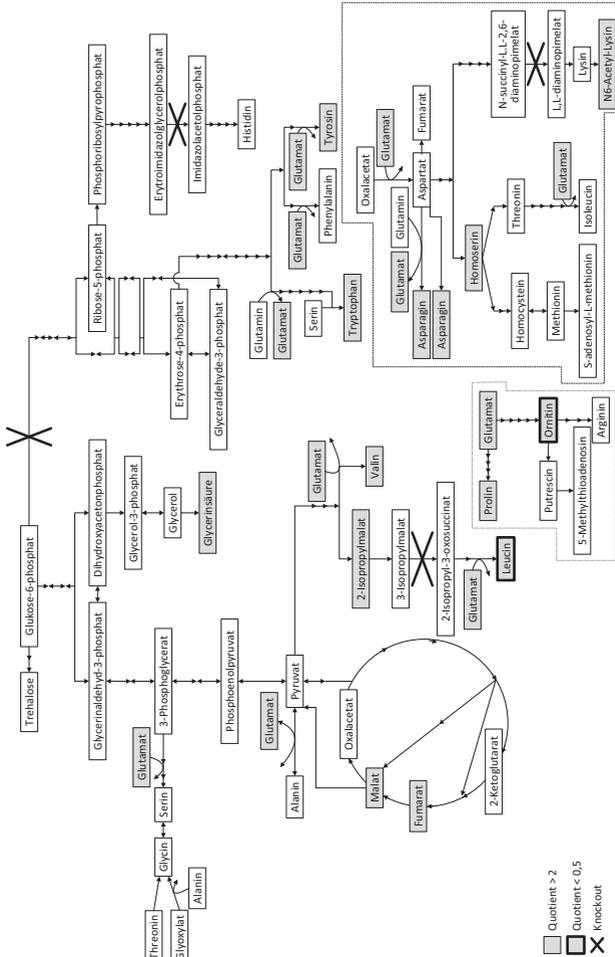


Abbildung 3.30: **Metabolomnetzwerk der Knockoutmutante *zwf1Δ* unter Koffeininwirkung.**

Dargestellt ist das Netzwerk basierend auf den Daten des *Saccharomyces Genome Database* [25, 24]. Hervorgehoben sind Metabolite, die der Verhältnisbedingung (Q) entsprechen, d.h. der entsprechende Metabolitpool liegt mindestens doppelt höher oder niedriger vor als in der Referenz.

die der ungestressten Knockoutmutante. Palmitinsäure liegt wie bei der ungestressten Kultivierung deutlich geringer vor (2,33fach). Stearinsäure zeigt keine Signifikanz, liegt aber ebenfalls 2fach geringer vor. Statt Glycerin ist Glycerinsäure erhöht (2,13fach). Statt Thymin kann die Purinbase Adenin 5,98fach nachgewiesen werden und Guanin nur 3,85fach vermindert.

Durch die Ergebnisse wird deutlich, dass sich die ungestresste Knockoutmutante auf metabolischer Ebene sowohl vom Elternstamm als auch von der gestressten Kultivierung unterscheidet

### 3.2.2.3 Zusammenfassung des Metabolic Profiling

Die Ergebnisse der Metabolituntersuchung zeigen keine Unterschiede zwischen einer Kultivierung mit und ohne Diamid, weshalb die Kultivierungen mit Diamid ebenfalls als Vergleichsbasis verwendet werden. Mit diesen Daten werden sowohl der Elternstamm, kultiviert in Koffeinmedium, als auch *mae1*Δ in Minimalmedium und *zwf1*Δ in Minimal- und koffeinversetztem Medium verglichen. Da *mae1*Δ in Minimalmedium kaum Unterschiede zum Elternstamm aufweist, wird es nicht in Koffeinmedium untersucht.

Koffein bewirkt eine deutliche Veränderung des Metabolitprofils im Elternstamm. Dieses gleicht stark dem der Knockoutmutante *zwf1*Δ in Minimalmedium in Bezug auf den Fettsäurestoffwechsel. Der verringerte Fettsäurestoffwechsel in *zwf1*Δ liegt auf Grund der fehlenden G6PD vor. Das fehlende Enzym macht die Knockoutmutante außerdem sensitiv auf oxidativen Stress, da ein großer Teil des Redoxpotentials durch den Pentosephosphatstoffwechsel nicht aufgebaut werden kann [91, 92]. Der verringerte Fettsäurestoffwechsel deutet also auf einen hohen Energieverbrauch in Zusammenhang mit Koffein hin, d. h. die Zelle benötigt einen erheblichen Teil seiner Energie um die Wirkung von Koffein zu verringern. Dies zeigt sich auch in der erheblich verringerten Wachstumsrate des Elternstamms (Kap. 3.2.1). Unterschiede liegen bei anderen Stoffen vor. So liegt unter Koffeininwirkung der Speicherstoff Trehalose geringer und alle Aminosäuren mit veränderter Konzentration erhöht im Elternstamm vor. Die Zugabe von Koffein zum Kultivierungsmedium von *zwf1*Δ verändert die Konzentrationen einiger Metabolite.

Alle mit veränderten Konzentrationen vorliegenden Aminosäuren liegen nun, wie im Elternstamm unter Koffeineinfluss, erhöht vor. Daraus ergibt sich eine mögliche Veränderung des Proteinbildungsprofils. Die Wachstumsrate verringert sich ebenfalls deutlich wie beim Elternstamm.

Die Ergebnisse unterstützen die Erkenntnis der Beeinflussung von Rim15 durch Koffein, welches in der Proteinkinase A Reaktionskaskade nach PKA folgt, von diesem negativ reguliert wird, und stark für die Expression von Stressreaktionsgenen verantwortlich ist [97, 100]. Auch die Bildung von kompatiblen Soluten wie N6-Acetyl-Lysin im Elternstamm und *zwf1Δ*, in dem zusätzlich noch Prolin erhöht vorliegt, weist auf eine erheblich verstärkte Expression von Stressreaktionsgenen hin.

### 3.3 Aufbau und Funktionsweise des konstruierten Probenentnahmegertes

Nach der Untersuchung der Langzeitstressantwort sollte nun die kurzfristige Änderung und damit die zeitliche Änderung in den Zellen untersucht werden. Die Konstruktion eines Probenentnahmegertes hat das Ziel eine rasch aufeinanderfolgende automatisierte Probenentnahme zu ermöglichen, um eine Pulsantwort überwachen zu können und so die kinetischen Parameter des Metabolismus von *S. cerevisiae* zu bestimmen. Dabei orientiert sich die Probenentnahmegeschwindigkeit an den Umsatzraten der intrazellulären Metabolite und muss daher sehr schnell sein. Diese Aufgabe kann durch die manuelle Probenentnahme zumeist nicht erfüllt werden, da diese zu langsam ist. Auch die Kultivierung im Schüttelkolben wie sie in den vorangegangenen Versuchen eingesetzt wurde ist für diese Untersuchungen ungeeignet, da keine kontinuierliche Fahrweise möglich ist.

Das Probenentnahmegert soll variabel bei Glasreaktoren einsetzbar sein, d. h. der Zugang erfolgt über den Deckel. Dafür wird zunächst eine Möglichkeit gesucht, viele Proben hintereinander weg aus dem Reaktor zu entnehmen. Unterdruck zur Probenförderung aus dem Reaktor wie im System von Lange *et al.* [70] ist in Hinblick auf eine Automatisierung nicht anwendbar.

Jede Probe muss dort einzeln an das Probenentnahmesystem angeschlossen werden. Daher wird zunächst ein fünf Wege Probenentnahmesystem gekoppelt mit einer Schlauchpumpe und/oder Überdruck im Reaktor getestet. Vier Ausgänge, die von der Hauptleitung im 45° Winkel abgehen dienen der Probenahme und werden mit einem Magnetventil versehen. Der fünfte Weg dient dem Ablauf des Totvolumens. Der geförderte maximale Volumenstrom ist mit dieser Konstruktion jedoch zu gering ( $6 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ) [104]. Die Verwendung der in dieser Arbeit vorhandenen Schlauchpumpe (Mehrkanalpumpe PD5201, Heidolph Instruments) erzielt im , d.h. zu einem einfachen Überdruck im Reaktor nur geringere Volumenströme. Die Verwendung einer Pumpe verlängert außerdem die Förderstrecke erheblich und damit die Zeit, die die Zellen im Probenentnahmesystem verweilen. Jedoch kann das Probenvolumen deutlich besser eingestellt werden als bei Druckförderung. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass Pumpen in vielen Fällen Zellschädigungen hervorrufen, die durch Strömungsverhältnisse in der Pumpe und die damit gekoppelten Scherraten, bzw. den Scherstress, und Dehnbelastungen verursacht werden. Schlauchpumpen gelten allgemein als schonende Förderungsmethode für Zellen. Neuere Untersuchungen von Brandmayer [14] widerlegen diese, denn auch Schlauchpumpen haben einen nicht unerheblichen Effekt auf Zellen. Die Versuche zeigen bei der Untersuchung des Flagellaten *Euglena gracilis*, dass schon bei niedrigen Drehzahlen durch die Schlauchpumpe Zellen geschädigt werden, und bei gleichem Volumenstrom eine stärkere Inhibierung der Zellen als bei der Verwendung einer Zahnradpumpe auftritt. Durch steigende Drehzahlen wird die Zellschädigung in allen getesteten Pumpen deutlich verstärkt. Die Belastungen ändern die Zellform, verursachen den Verlust der Geißel und induzieren eine Schleimhüllenbildung. Im Hinblick auf die Zielstellung der Untersuchung des *in vivo* Zustandes der Zellen im Bioreaktor zum Zeitpunkt der Probenentnahme und die damit verbundene rasche Förderung der Zellsuspension bei hohen Drehzahlen ist daher von einer Pumpe zur Förderung des Kultivierungsansatzes abzusehen. Diese Methode zur Probenentnahme wird daher nicht weiter verfolgt.

Statt dessen werden in diesen Versuchen die Proben mittels Überdruck über dem Medium aus dem Reaktor befördert. Die Verwendung eines Kopfdruckes zur Förderung der Probe wie bei Weibel *et al.* [138] verhindert die Nutzung der Abgasanalytik für die Kohlenstoffbilanzierung [125] und auch der Gelöstsauerstoffgehalt des Mediums steigt in der vorliegenden Arbeit mit Einsetzen des Kopfdruckes trotz geöffnetem Abgaswegs auf 100 % an. Jedoch kann so die Probe in möglichst kurzer Zeit automatisiert über den Deckel aus dem Reaktor befördert und zur Inaktivierung gebracht werden.

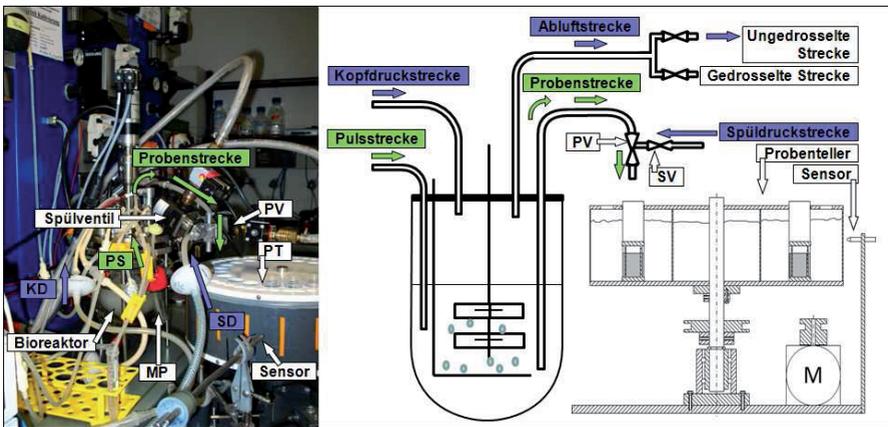


Abbildung 3.31: **Aufbau des Probenentnahmesystems angeschlossen an den kontinuierlich betriebenen Bioreaktor.** Links Laboraufbau, rechts Schema. Die Probenentnahme beginnt mit dem Öffnen der Kopfdruckstrecke bei geöffnetem Abluftventil. Danach erfolgt der Start der automatischen Probenentnahme durch Betätigung des Startschalters, wobei die Abluftstrecke gedrosselt wird. Nach Einstellen des Kopfdruckes erfolgt die Öffnung des Probenentnahmeventils und mit der ersten Probe die manuelle Aufgabe des Stresspulses über die Pulsstrecke. Mit der Öffnung des Probenentnahmeventils wurde der Motor angeschaltet und Probe fließt angetrieben durch den Kopfdruck durch die Probenstrecke. Nach Abschluss der Probenentnahme wird automatisch auf die ungedrosselte Abluftstrecke umgeschaltet, das Probenentnahmeventil geschlossen und das Spülventil kurz geöffnet. Durch einen kurzen Druckluftpuls wird über diese Strecke das gesamte Probenrohr in den Reaktor entleert. (Flüsse farbige unterlegt; KD = Kopfdruckstrecke; MP = Manuelle Probenentnahme; PS = Pulsstrecke; PT = Probenenteller; PV = Probenentnahmeventil; SD = Spüldruckstrecke; SV = Spülventil)

Das automatische Probenentnahmegesetz (Abb. 3.31) besteht aus einem ca. 500 mm langen Metallrohr mit einem Durchmesser von 5 mm, durch den die Probenentnahme erfolgt. Über einen kurzen Silikonschlauch von ca. 100 mm Länge wird das Metallrohr an ein pneumatisches Ventil (W600 Ventilkörper) der Firma Gemü angeschlossen, das über dem Probenentnahmegefäß, welches

auf einem Drehteller platziert ist, mündete. Die Probenplätze auf dem Teller sind markiert und werden über einen optischen Sensor gezählt. Der Medienfluss wird durch einen induzierten Kopfdruck im Reaktor betrieben. Die Steuerung erfolgt durch einen zentralen Schaltkasten, der Antrieb des Tellers über eine separate Steuereinheit (Abb. 3.32).

Vor Beginn der Probenentnahme wird manuell die Anzahl der zu nehmenden Proben, die Zeit zum Einstellen des Kopfdrucks sowie die Zeit zur Druckaufgabe für die Reinigung des Probenrohres (Spülstrecke) an der Steuereinheit eingestellt (Abb. 3.32). Als erstes wird die Druckluftstrecke zur Initiierung des Kopfdrucks (1,38 bar) manuell geöffnet (Abb. 3.31).

Bei Betätigung des Startknopfes wird zunächst der Kopfdruck im Reaktor eingestellt. Dies erfolgt durch das Umschalten der Magnetventile in der Abluftstrecke, was zu einer Drosselung der Abluft und einer Drucksteigerung im Reaktor um 0,22 bar führt. Nach Ablauf der eingestellten Zeit wird das Probenentnahmeventil pneumatisch geöffnet und Probe aus dem Reaktor gedrückt. Für die Strecke vom Reaktor bis zum Ausgang des Probenentnahmeventils benötigt die Probe mit den beschriebenen Einstellungen ca. 0,15 s.

Gleichzeitig mit dem Öffnen des Probenentnahmeventils wird die Zählfunktion des fotoelektrischen Näherungsschalters und der Motor aktiviert. Sobald die eingestellte Probenzahl erreicht ist, wird das Ventil automatisch geschlossen. Zeitgleich erfolgt ein Umschalten der Abluftstreckenventile und somit der Wegfall des Kopfdruckes. Durch ein weiteres Ventil (Spülventil), welches in den oberen Bereich des Probenentnahmeventils mündet, wird direkt nach der Probenentnahme für den eingestellten Zeitraum sterile Druckluft (1,1 bar) durch das Probenrohr auf das System gegeben. Dies ermöglicht die Entleerung des Probenentnahmerohres hinter dem Probenentnahmeventil (Abb. 3.31). Durch einen Intervallschalter kann die gesamte Probenentnahmeprozedur innerhalb weniger Sekunden oder Minuten wiederholt werden. Für Zeiträume über einer Minute Zykluszeit wird die Steuereinheit ausgeschaltet und erst zum Zeitpunkt der nächsten Probenentnahme wieder eingeschaltet. Durch die Verwendung eines größeren Widerstandes ( $>1\text{ k}\Omega$ ) zur Einstellung der Taktungszeit können auch diese Zeitintervalle automatisiert

### 3 Ergebnisse und Diskussion

werden. Die Kopfdruckleitung wird für diese Unterbrechung nicht geschlossen.

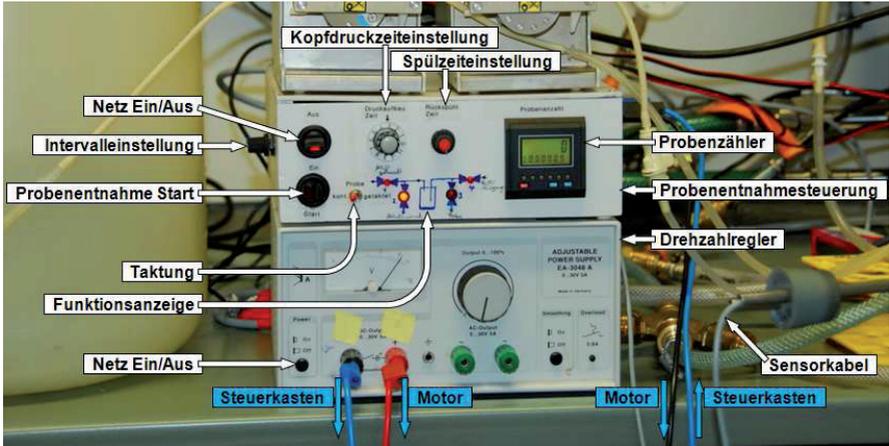


Abbildung 3.32: **Probenentnahmesteuerung und Drehzahlregler für die automatische Probenentnahme.** Mit dem Steuerkasten können fast alle der Parameter für die Probenentnahme eingestellt werden. Dazu gehören die Zeit für die Einstellung des Kopfdruckes, die Spülzeit, die Probenanzahl, das Intervall zwischen einem kompletten Probenentnahmezyklus sowie die Taktung zwischen den einzelnen Proben. Der Probenzähler wird mit dem fotoelektrischen Näherungsschalter (Sensor) gekoppelt. Dieser detektiert die markierten Probenplätze. Die Probenentnahme wird durch die Betätigung des unteren Schalters gestartet. Über den Drehzahlregler wird die Tellerdrehgeschwindigkeit und damit das Probenvolumen und die Probenentnahmezeit eingestellt. (Farbig unterlegt ist die Kabelführung des Drehzahlreglers)

Die zeitliche Aufschlüsselung des Pulsexperiments wird durch die Tellerdrehzahl erreicht, die wiederum durch die Einstellung der Spannung gesteuert wird (Abb. 3.32). Dadurch kann die höchste Aufschlüsselung durch die maximal einstellbare Spannung von 30 V mit 143 ms pro 50 ml Falkon-Probe erzielt werden (Abb. 3.33).

Bei dem Ventilkörper, der aus den Probenentnahme- und Spülventilen besteht, handelte es sich um die W600 Ventilkonfiguration 1 der Firma Gemü. Ventil 1 besitzt einen Durchmesser von 8 mm und gewährleistet, durch den im Vergleich zu dem des Probenentnahmerohres größeren Durchmesser, einen raschen Probendurchfluss. Der Ventilkörper besteht aus zwei pneumatisch betriebenen Ventilen, die miteinander so verschweißt sind, dass eine im Vergleich zu anderen Konstruktionen tottraumarme Verbindung entsteht. Das zweite

### 3.3 Aufbau und Funktionsweise des konstruierten Probenentnahmerätes

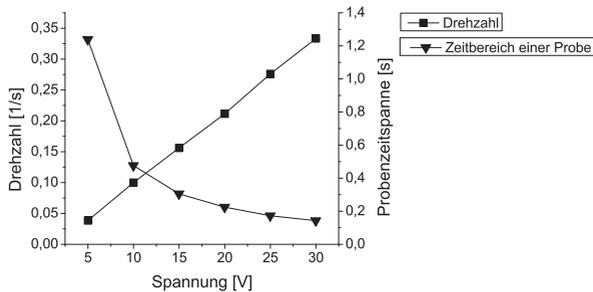


Abbildung 3.33: **Drehzahl des Probentellermotors und damit der einstellbaren Probenzeitspannen für 50 ml Probengefäße.** Die Probenzeitspanne stellt dabei die Zeitspanne, die eine Probe während der Probenentnahme abdeckt, dar.

Ventil ist dabei so angeordnet, dass der Stutzen direkt hinter der Membran des ersten Ventils ansetzt. Dies ermöglicht in diesem Fall die Verwendung als Druckluftzugang und damit Spülstrecke, um das erste Ventil von Probe zu befreien und die im Probenentnahmerohr stehende Flüssigkeit in den Reaktor zurück zu drücken. Nach erfolgter Rückspülung ist im Bereich des Silikonschlauches, der zum Zeitpunkt der Probenentnahme komplett gefüllt ist, kein Medium zu erkennen. Das Ventil des Probenentnahmeweges ist vertikal zum Probenteller angebracht. Dadurch entleert sich der Ventilstutzen auf der Ausgangsseite nicht selbstständig nach erfolgter Probenentnahme, was eine manuelle Reinigung mit 70% EtOH notwendig macht, oder ein Totvolumen von ca. 2-2,5 ml hervorruft, weshalb bei Versuchen mit mehreren Probezeitpunkten jeweils die erste Probe eines Probenzyklus verworfen werden sollte.

Die Verwendung des Sicherheitsventils ermöglicht einen stabileren Kopfdruck und verhindert den Aufbau eines hohen Drucks, was aus Sicherheitsgründen bei Glasreaktoren nicht auftreten darf, wodurch eine sichere Handhabung gewährleistet wird (Abb. 3.34). Durch Schwankungen in der Systemluft kann der Volumenstrom bei Wiederholung der Versuche unter gleichen Versuchsbedingungen jedoch nicht konstant gehalten werden (Abb. 3.35). Auch ohne aktive Änderung der Versuchsbedingungen ändert sich der Volumenstrom, wodurch die Reproduzierbarkeit des Volumens nicht gegeben ist. Auch über den Verlauf der einzelnen Probenentnahmen selbst ändert sich der Vo-

### 3 Ergebnisse und Diskussion

lumenstrom, wodurch die Probenvolumina variieren, was eine Bestimmung des Gewichts jeder Probe erforderlich macht (Abb. 3.36).

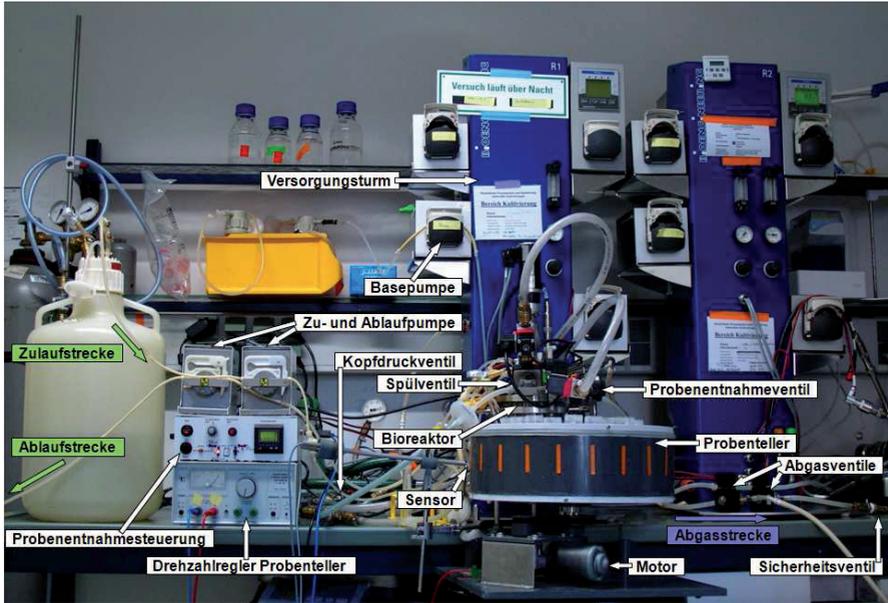


Abbildung 3.34: Versuchsstand der kontinuierlichen Kultivierung mit automatischem Probenentnahmesystem. (Farbig unterlegt sind Medien- und Gasflüsse)

Der Probenentnahmeteller (Abb. 3.31), in dem die Probenfalkons fixiert werden, besteht aus einem auf einer Welle gelagerten hohlen PVC Teller, der über die Welle mit einem Elektromotor angetrieben wird, der wiederum durch eine Steuereinheit versorgt und gesteuert wird. Die Falkons werden im Teller durch eine Presspassung verankert, damit sie z. B. durch umgebendes Kühlmittel nicht aus dem Teller gehoben werden. Es stehen Plätze sowohl für 15 als auch 50 ml Falkons zur Verfügung, wobei die 15 ml Falkons durch einen geringeren Abstand zwischen den einzelnen Röhrcchen eine schnellere Probenentnahmezeit aber auch kleinere Probenvolumina ermöglichen. Der Antrieb durch einen kontinuierlich laufenden Motor (Doga) bewirkt, dass Kulturmedium nicht nur in die Falkons fließt. Dies kann durch einen höheren Automatisierungsgrad und einen anderen Motor behoben werden, z. B.

durch die Verwendung eines Schrittmotors, gekoppelt mit dem Öffnungs- und Schließmechanismus von Ventil 1, wie es bei Grönke *et al.* [43] angewendet wird.

Das konstruierte System kann auch in einen getakteten Modus geschaltet werden, wobei die Ventilöffnung und -schließung mit den am Sensor vorbei laufenden Falkongefäßmarkierungen ausgelöst wird. Diese Herangehensweise war jedoch durch die Taktfrequenz des Ventils limitiert, d. h. das Ventil kann nicht schnell und lange genug öffnen, und ermöglicht die Anwendung nur bei einem sehr langsam drehenden Teller und somit hohen Proben volumina und Probenzeitspannen, d. h. die Zeit die eine Probe während der Probenentnahme abdeckt.

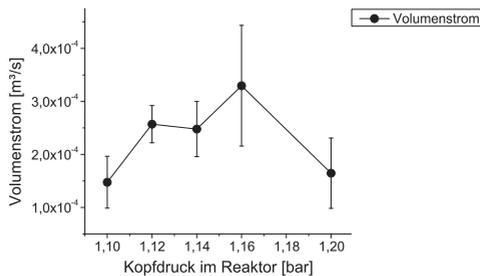


Abbildung 3.35: **Volumenstrom in Abhängigkeit des Kopfdruckes, bei einem Vordruck von 1,38 bar.** Durch die Schwankungen in der Systemdruckluft können keine verlässlichen Volumenströme für eine jeweilige Kopfdruckeinstellung bestimmt werden. Auch eine direkte Versuchswiederholung ohne Veränderung der Versuchsbedingungen zeigt andere Volumenströme als zuvor. Dies lässt keine Vorabschätzung des tatsächlich zu erwartenden Proben volumens zu.

Die Durchmischungsrate der Lösung (Pulsaufgabe) mit dem Medium im Reaktor wird mittels Zugabe einer NaCl Lösung in Leitungswasser untersucht. Nach 157 ms erfolgt ein Anstieg in der Leitfähigkeit des Mediums. Nach 450 ms wird ein annähernd gleich bleibender Wert angezeigt. Dadurch ist bei maximaler Tellerdrehzahl und Start der Probenentnahme und Pulsaufgabe zur gleichen Zeit mindestens die erste Probe aus dem Reaktor aus der stationären Chemostatphase, die darauf folgenden sind damit dem Stressfaktor ausgesetzt.

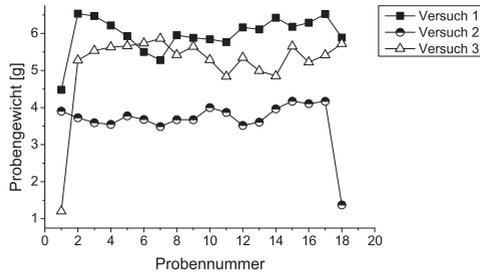


Abbildung 3.36: Variation der Probenvolumina über den Verlauf eine Probenentnahme bei eingestellten 1,38 bar Vordruck und 1,22 bar Kopfdruck, hervorgerufen durch schwankende Systemluft und dadurch schwankenden Kopfdruck im Reaktor. Daher müssen alle Proben nach der Probenentnahme ausgewogen werden.

#### 3.3.1 Pulsexperiment und schnelle Probenentnahme

Der Autosampler ermöglicht die Überwachung der *in vivo* Metabolitkonzentrationen in einem sehr kurzen Zeitbereich. Bedingt durch die zu untersuchenden Metabolite, werden im gewählten Zeitbereich von ca. 2,5 s nur wenige Änderungen beobachtbar sein, da hier nur starke Änderungen im zentralen Kohlenstoffwechsel, nicht aber in darauf folgenden Stoffwechselschritten, wie der Aminosäuresynthese, erfolgt sein können. Für die Überprüfung der Anwendbarkeit wird eine Analyse der Proben über das Metabolic Profiling durchgeführt.

Für den Versuch wird ein im Batch betriebener Reaktor mit einer OD von 2 angeimpft. Ab einer OD von 9 wird die kontinuierliche Zufütterung gestartet und der Reaktor in kontinuierliche Betriebsweise gebracht (Kap. 2.2.5).

Bei Anwendung eines Glukosepulses werden mehrere Proben rasch hintereinander gezogen, um den direkten Effekt des Pulses auf die Zellen zu untersuchen und die Funktionsfähigkeit des angewendeten Systems zu validieren. Jede Probe entspricht in diesem Versuch dabei einem Zeitintervall von 143 ms, was der maximalen Tellerdrehzahl entspricht.

Nach der Ventilöffnung des Probenentnahmeventils und damit der ersten Probe, wird die Zugabe von 4 ml  $400 \text{ g l}^{-1}$  Glukoselösung mit Hilfe einer 50 ml Einwegspritze gestartet. Die Spritze ist voll aufgezogen und die sterile Luft über der Glukoselösung dient dazu die gesamte Lösung in den Reaktor zu

befördern (Kap. 2.2.6). Die geringe Zahl der Zugangsöffnungen am Reaktor ermöglicht die Zugabe nur über einen Bypass durch das normalerweise zur manuellen Probenentnahme genutzte System direkt in das Medium.

In Abbildung 3.37 kann 1144 ms nach dem Versuchsstart (Probe8) eine Änderung des Glukosegehaltes in den Proben beobachtet werden, wobei es sich um intra- und/oder extrazelluläre Glukose handeln kann. Nach 1716 ms (Probe12) ändert sich dieser Wert nicht mehr. Es kann sich bei den gemessenen Glukosewerten durchaus um intrazelluläre Glukose handeln. Betrachtet man die Werte der anderen gemessenen Metabolite, wozu auch G6P und F6P gehören, die ebenfalls eine rasche Änderung durchlaufen sollten, muss diese Annahme kritisch betrachtet werden, da hier keine Änderungen auftreten. Es ist auch möglich, dass es sich hierbei um Glukose aus dem Medium handelt, die durch die zwei erfolgten Waschschrirte mit MeOH nicht vollständig von den Zellen entfernt wurden. Da es bei diesen Untersuchungen um die Unterschiede zwischen den Proben selbst geht, bei denen sich die Umgebungsbedingungen durch den Glukosepuls rasch ändern, und es sich nicht um einen Vergleich zwischen zwei Experimenten mit konstanten Medienbedingungen handelt, fällt der Unterschied, der durch an den Zellen verbleibendes Medium entsteht, stark ins Gewicht. Für die Beobachtung einer Änderung im Metabolismus muss daher ein größeres Zeitintervall verwendet werden und ein weiterer Waschrirte angewendet werden.

Auch die Anwendung eines Koffeinpulses bringt für die Untersuchung im 2,5 s Bereich keine Veränderung des Metabolitprofils. Ohne Pulsaufgabe lassen sich in diesem Zeitbereich keine Pooländerungen der gemessenen Metabolite feststellen, d. h. die Probenentnahme selbst beeinflusst die Zellen alle gleich, bzw. nicht.

Der Einsatz für zukünftige Untersuchungen im größeren Zeitintervall von einigen wenigen Sekunden ist durch den erfolgten Einbau einer Intervallschaltung möglich. In Kombination mit einem Schrittmotor könnte das benötigte Volumen pro Zyklus reduziert werden. Ein Einsatz für noch längere Zeitintervalle von über einer Minute ist, wie bereits bei der Funktionsweise des Gerätes beschrieben, durch die Verwendung eines Widerstandes größer als

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

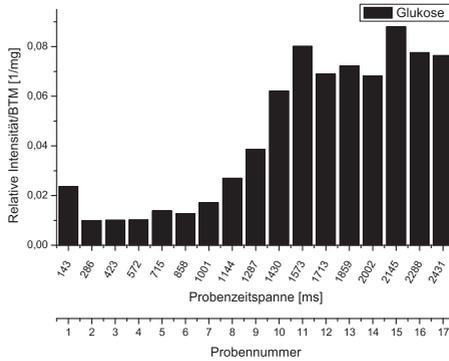


Abbildung 3.37: **Glukosegehalt der Proben bei dem Glukosepulsexperiment.** Zum Zeitpunkt 0 (Probe 1) wird die Probenentnahme gestartet und 4 ml Glukose ( $400 \text{ g l}^{-1}$ ) zugegeben. Eine Probe deckt im Verlauf des Experiments eine Probenentnahmezeitspanne von 143 ms ab. Die Daten sind BTM normiert.

1 k $\Omega$  möglich. Versuche über längere Zeiträume bedürfen vor allem bei der Verwendung eines kleinen Reaktorvolumens, wie in diesem Fall, einen erhöhten Automatisierungsgrad. Die Proben volumina müssen zur Minimierung des Kultivierungsvolumenverlustes kleiner gehalten werden als es in der vorliegenden Arbeit der Fall ist. Mehrere Proben zu einem Probenentnahmezeitpunkt sind durch die Notwendigkeit mehrerer technischer Replikate für die Messung mittels GC-MS zum Metabolic Profiling zu ziehen. Damit müssen zu jedem Zeitpunkt 5 bis 6 Proben gezogen werden, die in den vorliegenden Versuchen zwischen 20 und 36 ml ausmachen. Zusätzlich kommen weiter Verluste durch Probenverwerfung und Bestimmung der BTM und der Metabolite im Medienüberstand hinzu. Die Schwankung des Proben volumens von Versuch zu Versuch und von Probe zu Probe wird durch die schwankende Systemluft hervorgerufen und eine genaue Abschätzung vor der Probenentnahme ist nicht möglich, da auch der Reaktor nicht ausgewogen werden kann. Das Auswiegen der Proben braucht einige Minuten und aus diesen Werten kann, verursacht durch einen kontinuierlichen Medienaustritt aus dem Probenentnahmeventil, nicht exakt auf den Volumenverlust geschlossen werden. Dadurch kann auch die kontinuierliche Kultivierung nach der Probenentnahme nicht durch einfaches anpassen des Zulaufstroms fortgeführt werden.

# 4 Zusammenfassung und Ausblick

Zur Untersuchung der zellulären Stressantwort wird oft die Genom- [36, 130] und Proteomebene [72, 88] herangezogen. Die Metabolomebene bietet weitere Erkenntnisse, da sie die physiologischen Vorgänge in der Zelle widerspiegelt, die oft nicht unbedingt den Genom- und Proteomprofilen entsprechen und weitere unbekanntes sog. *Bottlenecks* in den Zellen aufdecken können. So konnte eine Flussanalyse durch Becker *et al.* [5] Defizite im Fluss durch den Pentosephosphatweg aufzeigen, woraufhin eine genetische Veränderung für diesen Bereich eine deutliche Verbesserung der Lysinproduktion in *Corynebacterium glutamicum* brachte. In der vorliegenden Arbeit sollte daher als Teil der Stressantwortanalyse die Metabolite in den Zellen untersucht werden. Dieses Ziel hat mehrerer Aspekte, die in Abb. 4.1 aufgeführt sind. Die Zellen müssen im zu untersuchenden Zustand festgehalten werden, was ein rasches Abstoppen des Metabolismus erfordert. Dazu sollte für *E. coli* und *S. cerevisiae* auch die Wirkung des Prozesses untersucht werden, wozu die Durchflusszytometrie, der Verlust an intrazellulären Zellbestandteilen (ATP als Modellmetabolit) und auch die relative OD der behandelten Zellsuspension im Verhältnis zur Kultur-OD herangezogen wurde. Anschließend wurde der Metabolismus von *S. cerevisiae* in Hinblick auf eine Stressantwort auf einen ständig präsenten Stressfaktor (Koffein) untersucht. Die dynamische Zellantwort auf einen Stresspuls, d. h. die kurzfristige Änderung des Zellmetabolismus nach dem Auftreten eines Stressfaktors, kann nur mit einem Probenentnahmegesetz untersucht werden, welches in kurzer Zeit viele Proben hintereinander weg aus der Kultur ziehen kann. Die intrazellulären Stoffkon-

zentrationen werden so verfolgt. Eine Modellierung des Stoffwechsels ermöglicht dann die Ermittlung der kinetischen *in vivo* Parameter der beteiligten Enzyme [23, 111].

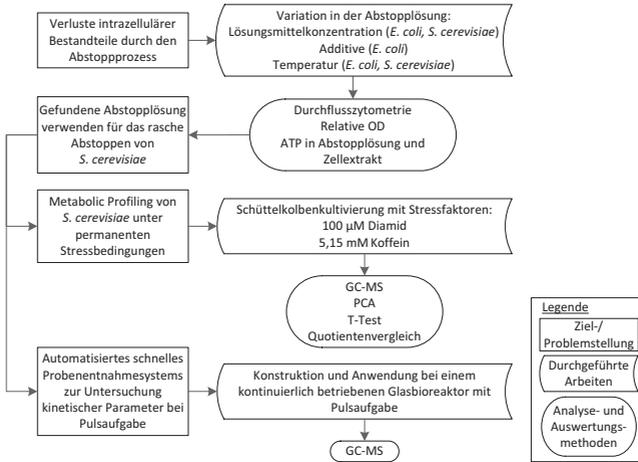


Abbildung 4.1: Übersicht der durchgeführten Untersuchungen.

Im ersten Kapitel wurde bereits beschrieben, dass für die Untersuchung des Metaboloms ein Abstoppen des intrazellulären Stoffwechsels notwendig ist. Das Abstoppen erfolgt üblicherweise mit kalten Abstopplösungen und da bei diesem Prozess Metabolite aus den Zellen austreten, sollten die Auswirkungen untersucht, Ursachen analysiert und nach einer geeigneten Abstopplösung gesucht werden. Dabei wurden sowohl die Starttemperatur, die Methanolkonzentration, als auch die Verwendung von Additiven als Einflussfaktoren herangezogen. Mit dieser Abstopplösung sollten anschließend die Zellen aus Stresskultivierungen behandelt werden und mittels GC-MS (Metabolic Profiling) analysiert werden. Zusätzlich sollte ein Gerät entwickelt werden, welches dem Anwender ermöglicht, dynamische Änderungen in den Zellen zu beobachten, d. h. ein System welches in kurzer Zeit viele Proben aus dem Kulturmedium ziehen kann.

In den durchgeführten Untersuchungen werden einige der negativen Eigenschaften der Abstopplösungen, wozu der Kälteschockeffekt und die Wirkung

---

der enthaltenen organischen Lösungsmittel zählen, auf die Zellen offen gelegt. Mit Hilfe der hier für dieses Problem erfolgreich etablierten Durchflusszytometrie können die Proben auf Einzelzellebene analysiert und der Effekt der Abstopplösungen evaluiert werden. Hinzu kommt der in Bezug auf die Verwendung von kalten Abstopplösungen erstmals eingesetzte Vergleich der OD-Werte, die einen Hinweis auf eine komplette Lyse der Zellen liefert.

Zieht man die Daten der Durchflusszytometeranalyse (Kap. 3.1) heran, bestätigt sich die Vermutung der Zellwandschädigung nicht nur durch die Verwendung von organischen Lösungsmitteln, sondern auch durch die Verwendung von tiefen Temperaturen [12, 118, 134] und der damit einher gehenden hohen Abkühlungsraten. Jedoch sollte, auch in Anbetracht der Ergebnisse von Canelas *et al.* [19], das Phänomen der Zellwandschädigung als alleinige Ursache für den Metabolomverlust überdacht werden, da bei 100 % MeOH sowohl fast alle *E. coli* als auch *S. cerevisiae* Zellen in der Probe unabhängig von der Starttemperatur der Abstopplösung für PI durchlässig gemacht werden und somit eine beschädigte Zellmembran besitzen. Gleichzeitig ergeben die Daten von Canelas *et al.*, dass 100 % MeOH bei tiefen Temperaturen die besten Ergebnisse der getesteten Lösungen für *S. cerevisiae*. Durch geringere Verluste bei tieferen Temperaturen kann auf einen positiven Effekt auf die Metabolomverluste und damit der Zellintegrität in Zusammenhang mit organischen Lösungsmitteln geschlossen werden (Kap. 3.1.2.2). Generell zeigt sich bei der Verwendung von geringeren Lösungsmittelkonzentrationen (Kap. 3.1.2.1, 3.1.3.1) eine geringere Zellschädigung und bei der Versetzung der Methanollösung mit Additiven wie Trehalose kann der Beschädigungsgrad verändert, jedoch nicht vollständig verhindert werden (Kap. 3.1.2.3).

Der hier angewendete Vergleich der OD-Werte der Kultur im Medium und nach Behandlung mit einer Abstopplösung ist trotz fehlender Korrelation zur CFU ein guter Indikator für den Effekt der verwendeten Lösungen auf die Zellen. Niedrige OD-Werte von *E. coli* bei Verwendung unterschiedlicher Starttemperaturen zeigen eine umgekehrte Korrelation zwischen vollständiger Zellschädigung, also Lyse, und sinkender Starttemperatur, d. h. je kälter

die Abstopplösung und damit je größer die Kühlungsrate, desto weniger Unterschied liegt zwischen der OD der Kultur und der behandelten Probe vor (Kap. 3.1.2.2). Die Untersuchungen der OD als auch des PI Markierungsmusters bestätigen die Annahme von Wittmann *et al.* [144], dass hohe Verluste an intrazellulären Metaboliten bei der Verwendung von methanolbasierten Abstopplösungen durch Permeabilisierung und Lyse von Zellen erfolgt.

Eine Möglichkeit für zukünftige Versuche, die Verluste während des beschriebenen Prozesses zu verringern oder gar zu verhindern, besteht in der von Spura *et al.* [118] eingesetzten Lösung, basierend auf EtOH statt MeOH. EtOH, welches in vielen Untersuchungen als Extraktionsmedium verwendet wird [39, 70, 131, 135], wird hier zusätzlich mit 0,8 % (m/v) NaCl zur osmotischen Stabilisierung versetzt. Als Starttemperatur wird -20 °C eingesetzt. Die Analyse mittels GC-MS durch Spura *et al.* [118] zeigt sehr gute und reproduzierbare Werte, wobei deutlich geringere Verluste aus den Zellen während des Prozesses auftreten als bei der Verwendung von Me OH. Erste, im Zuge dieser Arbeit nachträglich durchgeführte Untersuchungen für *E. coli* dazu, zeigen im Vergleich zu allen untersuchten Lösungen und Bedingungen verbesserte Werte, d. h. den geringsten Anteil an Zellwandschäden. Die PI Markierung liegt nur bei ca. 3% und die OD weicht nur ca. 9% von der der Kultur ab. Auch bei *S. cerevisiae* zeigten sich positive Effekte. So ist das Markierungsmuster identisch dem der unbehandelten Zellen und auch die Resuspensions-OD liegt im Bereich der der Kultur. Der Salzgehalt der EtOH-Abstopplösung könnte dabei, wie bei Bolten *et al.* [12] beschrieben, für jedes Wachstumsmedium angepasst werden und damit die Wirkung der kalten Abstopplösung noch weiter verringern.

Die Untersuchung der mikrobiellen Stressantwort konzentriert sich zumeist auf die Genom- und Proteomebene

Die Untersuchung des Stressverhaltens von *S. cerevisiae* auf den Stressfaktor Diamid auf Metabolomebene zeigte unter den gewählten Bedingungen keine Unterschiede zwischen den GC-MS Daten der ungestressten und gestressten Kultur. Bei der Anwendung von 5,15 mM Koffein konnten jedoch deutliche Unterschiede beobachtet werden, die von der verminderten

---

Wachstumsrate bis hin zu veränderten Aminosäurepools und der Störung des Fettsäurestoffwechsels reichen. Die Ergebnisse der Metabolomanalyse sind im Einklang mit den Resultaten auf Genomebene von Wanke *et al.* [137]. Dort zeigt sich unter Koffeineinwirkung die vermehrte Bildung von RIM15. Dieses ist stark in die Expression von Stressreaktionsgenen involviert. Eine starke Stressantwort lässt sich in den GC-MS Daten an Hand der erhöhten Metabolitpools an kompatiblen Soluten sehen. So liegt N6-Acetyl-Lysin im Elternstamm fast 16fach höher vor und selbst in *zwf1Δ*, welches durch das Fehlen der G6PD bereits sehr anfällig für Stress ist und weniger Energieträger für die Stressantwort auf einen weiteren Stressfaktor zur Verfügung hat, kann eine erhöhte Konzentration um das vierfache festgestellt werden. *zwf1Δ* behilft sich dafür mit der erhöhten Bildung von Prolin, ebenfalls einem kompatiblen Solut. Prolin liegt über vierfach erhöht vor. Zusätzlich unterstreichen die Ergebnisse zum gestörten Fettsäuresyntheseweg, d. h. verringerte Poolgrößen, die Umlenkung der Energie, die normalerweise für die Zellwandsynthese verwendet wird, in die Stressantwort der Zelle.

Im Zuge dieser Arbeit ist es weiterhin erfolgreich gelungen, ein automatisches Probennahmegerät zu etablieren, welches variabel an Glasreaktoren angeschlossen werden kann, ohne den Glasreaktor zuvor umbauen zu müssen, um ein Zugangsventil anzubringen. Es ermöglicht eine minimal mögliche Zeitraumabdeckung von 143 ms pro Probe für 50 ml Falkongefäße, mit 5 bis 6 ml pro Probe, und kann in einem Durchlauf bei maximaler Drehgeschwindigkeit des Tellers insgesamt einen Zeitbereich von bis zu 2,8 s abdecken (Kap. 3.3). Rasche Metabolitänderungen konnten in ersten Versuchen mit dem Gerät in Verbindung mit einem Glukosepuls gemessen werden, was ohne die Verwendung eines solchen Gerätes nicht möglich ist.

Durch eine Abkopplung des Geräts von der Systemluft des Gebäudes und einen erhöhten Automatisierungsgrad könnte sowohl die Handhabung als auch die Reproduzierbarkeit des Probenvolumens noch verbessert werden. Z. B. könnte ein Druckluftsystem wie bei Aragon *et al.* [2], welches den Kopfdruck auf den Reaktor kontinuierlich anpasst, die Volumenschwankungen unterbinden. Zusätzlich könnte die Öffnung der Kopfdruckstrecke und die

Zugabe der Stressfaktorlösung automatisiert werden. Beides erhöht die einfache Handhabung des Systems und eine bessere zeitliche Abschätzung der einzelnen Prozessschritte und deren einsetzende Wirkung auf das System. Außerdem kann durch die Steuerung der Kopfdruckstrecke eine minimale Expositionszeit des Überdrucks im Reaktor gewährleistet werden.

Das System kann in nachfolgenden Arbeiten genutzt werden, um die dynamischen Änderungen von Hefen und anderen Organismen auf Metabolomebene zu untersuchen und damit die kinetischen Eigenschaften der Enzyme in ihrer komplexen Umgebung mit Effektoren und Substraten in der lebenden Zelle zu bestimmen.

# 5 Anhang

## 5.1 Geräte

Tabelle 5.1: Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav Systec V-150	Systec
Biofuge stratos	HERAEUS Instruments, Deutschland
Bioreaktor	Bioengineering, Schweiz
Certomat S-1 Brutschrank	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Cell Lab Quanta™ Durchflusszytometer	Beckman Coulter, Deutschland
Clean Bench HERAsafe	HEAREUS Instruments, Deutschland
Dampfbügelstation GV 5120 (CIP-Einheit)	Tefal, Deutschland
Datenlogger 177-T4	Testo AG, Deutschland
Elektronische Bauteile	Diverse Hersteller, Conrad, Deutschland
EZ-Guard Vorsäule	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Deutschland
Fermenter RALF Plus	Bioengineering, Schweiz
Glaspipette	BRAND GmbH & Co. KG, Deutschland

Fortsetzung...

## 5 Anhang

Tabelle 5.1: Fortsetzung Tabelle Geräte

Gerät	Hersteller/Lieferant
HeizThermoMixer MHL 20	HLC Biotech, Deutschland
Helios $\alpha$ OD-Messgerät	Unicam, GB
Hera freeze Tiefkühltruhe	Thermo Electron Corporation, USA
HP 6890 Gaschromatograph	Agilent Technologies Deutsch- land GmbH, Deutschland
Inkubations Schüttelschrank BS4	B. Braun Biotech International, Deutschland
Kaltaufgabe System	GERSTEL, Deutschland
Pegasus IV TOF Massenspektrometer	LECO Corporation, USA
pH-MeterCG840	Schott-Geräte, Deutschland
Photoelektrischer Näherungsschalter (LTK-1040-303-506)	Contrinex, Schweiz
Pipettierhilfe pipetus-AKKU	Hirshmann Laborgeräte, Deutschland
Plate reader Tecan Ultra	Tecan Group Ltd., Schweiz
RK20KS Kryostat	Lauda, Deutschland
Schlauchpumpe REGLO Digital	Ismatec Laboratoriumstechnik, Schweiz
Tecan GENios	Tecan Group Ltd., Schweiz
Ultraschallbad	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Deutschland
Vacufuge 5301	Eppendorf, Deutschland
VF-5ms Kapillarsäule	Agilent Technologies Deutsch- land GmbH, Deutschland
Vortexer REAX top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland
W600 Ventilkörper	Gemü, Deutschland

Fortsetzung...

Tabelle 5.1: Fortsetzung Tabelle Geräte

Gerät	Hersteller/Lieferant
Wasserbad	Köttermann, Deutschland
YSI 2000 Select™ Biochemistry Analyser	YSI Incorporated, USA
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Deutschland
Motor	Doga, Spanien

Tabelle 5.2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Lieferant
96 well Mikrotiterplatten, weiß	Nunc GmbH Co. KG, Deutschland
CryoTubes™	Nunc GmbH & Co. KG, Deutschland
Einmalspritzen, steril	Terumo, USA
Midisart 2000 (0,2 µm)	Sartorius, Deutschland
Nanosep MF Centrifugal Devices 0,2 µm	Pall, USA
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Eppendorf, Deutschland
Schnellkupplungen	Diverse Anbieter, VWR

Tabelle 5.3: Kits

Kit	Hersteller/Lieferant
ATP Determination Kit	Biaffin, Deutschland
ATP Determination Kit	Invitrogen, USA



## 5.3 Chemikalien

Tabelle 5.5: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agar	Sigma-Aldrich
Aluminiumchloridhexahydrat	Sigma-Aldrich
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich
Ammoniiumsulfat	Sigma-Aldrich
Bernsteinsäure	Sigma-Aldrich
Borsäure	Bayer
Ca-D-Pantothemat	Merck
Cadmiumchlorid	Sigma-Aldrich
Chlorwasserstoff	Sigma-Aldrich
Chloroform	Sigma-Aldrich
Cobaltchlorid	Sigma-Aldrich
Cobaltchloridhexahydrat	Sigma-Aldrich
D-Biotin	Sigma-Aldrich
Diamid	Sigma-Aldrich
Dikaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich
Dinatriumethylendiamintetraacetat	Sigma-Aldrich
Eisensulfatheptahydrat	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Merck
Ethanol puris	Sigma-Aldrich
Geneticin	Sigma-Aldrich
Glukosemonohydrat	Carl Roth
Glycerin	Carl Roth
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich
Kaliumchloriddihydrat	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Kaliumiodid	Merck
Koffein	Sigma-Aldrich

Fortsetzung...

## 5 Anhang

---

Tabelle 5.5: Fortsetzung Tabelle Chemikalien

Abbreviation	Description
Kupferchlorid	Sigma-Aldrich
Kupfersulfatpentahydrat	Sigma-Aldrich
Manganchloriddihydrat	Sigma-Aldrich
Mangansulfatmonohydrat	Sigma-Aldrich
Mannitol	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfatheptahydrat	Sigma-Aldrich
Methanol	Fisher Scientific
Methoxyaminhydrochloridlösung	Sigma-Aldrich
MSTFA, N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamid	Machery-Nagel
myo-Inositol	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich
Natriummolybdatdihydrat	Sigma-Aldrich
Nikotinsäure	Sigma-Aldrich
p-Aminobenzosäure	Sigma-Aldrich
Pepton	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure	Sigma-Aldrich
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
Pyridin	Sigma-Aldrich
Pyridoxalhydrochlorid	Merck
Ribitol	Sigma-Aldrich
Rotisol	Sigma-Aldrich
Thiaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich
Trehalose	Carl Roth
Triethylamin	Sigma-Aldrich
Trisperflourbutylamin	PerkinElmer

Fortsetzung...

Tabelle 5.5: Fortsetzung Tabelle Chemikalien

Abbreviation	Description
Zinksulfatheptahydrat	Sigma-Aldrich

## 5.4 GC-MS Daten der Kultivierungen

Die BTM normierten Mittelwerte der durch die PCA (Kap. 2.3.5.1) als relevant ermittelten Metabolite sind in den folgenden Tabellen aufgeführt. Dazu kommt die entsprechende Standardabweichung  $\sigma$ , sowie der Quotient aus Referenz (Elternstamm, Minimalmedium) und dem untersuchten Organismus in Minimal- (MM) oder Koffeinmedium (Koffein). Die Quotienten von Metaboliten die mindestens doppelt erhöht ( $>2$ ) oder verringert ( $<0,5$ ) vorliegen und damit einen relevanten Unterschied zwischen den Metaboliten der Organismen bedeuten, sind hervorgehoben

Tabelle 5.6: T-Test und Quotienten von BY4742 in Minimalmedium und koffeinversetztem Minimalmedium. Quotienten (Q) relevanter Metabolite hervorgehoben.

Substanz	MW	$\sigma$	MW	$\sigma$	p-Wert	Q
Organismus	BY4742		BY4742		( $10^{-3}$ )	
Medium	MM		Koffein			
2-Hydroxyglutarat	1,21	0,29	-1,11	0,30	0,00004	<b>0,32</b>
2-Isopropylmalat	1,23	0,36	-1,12	0,36	0,00020	<b>0,13</b>
5'- Methylthioadenosin	-0,69	0,42	0,70	0,85	9,67522	<b>2,59</b>
Fumarat	-0,75	0,30	0,74	0,72	3,05301	1,46
Glucopyranose	1,08	1,32	-0,91	0,38	2,11416	<b>0,46</b>
Glucose	0,99	0,83	-0,79	0,36	0,14114	0,63
G6P	1,00	0,52	-0,94	0,35	0,01693	<b>0,49</b>
Glutamat	-0,92	0,22	0,96	0,87	3,45909	0,93
Glycerol-3-P	1,16	0,43	-1,06	0,25	0,00000	<b>0,32</b>

Fortsetzung...

## 5 Anhang

Tabelle 5.6: Fortsetzung Tabelle T-Test und Quotienten von BY4742 in Minimalmedium und koffeinversetztem Minimalmedium

Substanz	MW	$\sigma$	MW	$\sigma$	p-Wert	Q
Organismus	BY4742		BY4742		$(10^{-3})$	
Medium	MM		Koffein			
Glycin	0,93	0,45	-0,75	0,88	5,01201	<b>0,21</b>
GMP	-0,68	0,25	0,70	0,81	9,97214	<b>4,96</b>
Histidin	-0,88	0,40	0,93	0,71	0,75953	<b>2,83</b>
Isomaltose	0,89	1,02	-0,78	0,31	1,01216	0,65
Lysin	-0,86	0,44	0,82	0,79	2,19301	<b>3,84</b>
Malat	-0,99	0,43	0,89	0,33	0,00062	1,58
Methioninsulfoxide	-0,65	0,33	0,57	0,74	9,09845	1,34
myo-Inositol-1-P	0,93	0,55	-0,88	0,29	0,00259	0,58
N6-Acetyl-Lysin	-0,92	0,13	0,88	0,66	1,21016	<b>15,84</b>
Orotosäure	-1,04	0,13	1,00	0,34	8,00040	<b>8,93</b>
Palmitinsäure	1,02	0,74	-0,95	0,21	0,03615	<b>0,45</b>
Phenylalanin	0,90	0,70	-0,78	0,89	4,58917	0,62
Stearinsäure	0,84	0,78	-0,83	0,27	0,15376	0,59
Threonin	-0,86	0,69	0,74	0,64	0,73267	<b>2,25</b>
Trehalose	1,26	0,67	-1,11	0,32	0,00097	<b>0,32</b>
Tryptophan	-0,91	0,19	0,82	0,58	0,86789	<b>3,61</b>
Tyrosin	-0,94	0,39	0,86	0,50	0,04022	1,78

Tabelle 5.7: T-Test und Quotienten von BY4742 und BY4742*mae1*Δ in Minimalmedium. Quotienten (Q) relevanter Metabolite hervorgehoben.

Substanz	MW	$\sigma$	MW	$\sigma$	p-Wert	Q
Organismus	BY4742		<i>mae1</i> Δ		$(10^{-3})$	
Medium	MM		MM			
2-Isopropylmalat	0,96	0,29	-1,14	0,42	0,0077	0,51
Alanin	0,87	0,92	-0,91	0,31	4,2244	0,62

Fortsetzung...

## 5.4 GC-MS Daten der Kultivierungen

Tabelle 5.7: Fortsetzung Tabelle T-Test und Quotienten von BY4742 und BY4742*mae1*Δ in Minimalmedium

Substanz	MW	$\sigma$	MW	$\sigma$	p-Wert	Q
Organismus	BY4742		<i>mae1</i> Δ		(10 <sup>-3</sup> )	
Medium	MM		MM			
Fumarat	-1,03	0,19	1,17	0,51	0,0584	<b>2,74</b>
Glukose	-0,81	0,76	0,79	0,85	7,3302	1,23
Malat	-1,05	0,35	1,19	0,42	0,0036	<b>3,30</b>
Methioninsulfoxid	0,65	0,73	-0,67	0,18	7,5724	0,73
Orotosäure	-0,73	0,18	0,95	0,68	2,0457	1,46
Trehalose	-1,07	0,39	1,11	0,56	0,0511	1,95
Zitronensäure	-0,97	0,46	1,08	0,43	0,0214	1,36

Tabelle 5.8: T-Test und Quotienten von BY4742 und BY4742*zwf1*Δ in Minimalmedium. Quotienten (Q) relevanter Metabolite hervorgehoben.

Substanz	MW	$\sigma$	MW	$\sigma$	p-Wert	Q
Organismus	BY4742		<i>zwf1</i> Δ		(10 <sup>-3</sup> )	
Medium	MM		MM			
5'-	-0,62	0,78	0,73	0,71	5,09198	1,74
Methylthioadenosin						
Alanin	0,85	0,77	-0,94	0,42	0,09230	<b>0,45</b>
Arginine	0,93	0,53	-1,06	0,27	0,00058	<b>0,32</b>
Aspartat	0,81	0,71	-1,03	0,35	0,02325	<b>0,35</b>
F6P methoxyamin	-0,69	0,78	0,83	0,28	0,31038	1,77
Fumarat	-0,88	0,33	1,00	0,08	0,00048	1,51
G6P	-0,60	0,54	0,70	0,64	2,62598	1,35
Glutamat	-0,81	0,18	0,95	0,43	0,07343	<b>2,23</b>
Glutarsäure	-0,60	1,05	0,76	0,60	7,85578	0,78
Glycerinsäure	-0,62	0,61	0,78	0,55	0,74030	1,36
Glycerol	-0,68	0,88	0,80	0,49	1,28561	<b>2,57</b>
Glycerol-3-P	-0,81	0,43	0,90	0,40	0,00741	1,44

Fortsetzung...

## 5 Anhang

Tabelle 5.8: Fortsetzung Tabelle T-Test und Quotienten von BY4742 und BY4742*zwf1*Δ in Minimalmedium

Substanz	MW	$\sigma$	MW	$\sigma$	p-Wert	Q
Organismus	BY4742		<i>zwf1</i> Δ		(10 <sup>-3</sup> )	
Medium	MM		MM			
Glycin	0,72	0,71	-0,81	0,55	0,50932	0,69
GMP	-0,63	0,54	0,77	0,83	8,54973	<b>2,48</b>
Homocystein	0,85	0,49	-1,02	0,60	0,12928	<b>0,18</b>
Lysin	0,72	1,16	-0,88	0,29	3,39362	<b>0,41</b>
Malat	-0,90	0,46	0,99	0,35	0,00112	1,55
Methioninesulfoxid	1,00	0,38	-1,11	0,47	0,00685	0,53
myo-Inositol	-0,76	0,32	0,93	0,49	0,15057	1,68
Nicotinamid	-0,85	0,63	0,99	0,30	0,00701	<b>2,18</b>
Ornithin	0,63	0,84	-0,83	0,31	0,79531	<b>0,15</b>
Orotosäure	-0,93	0,40	1,03	0,15	0,00009	<b>2,56</b>
Palmitinsäure	0,86	0,45	-1,05	0,17	0,00332	<b>0,38</b>
Putrescin	0,74	0,72	-0,87	0,24	0,10178	<b>0,18</b>
Stearinsäure	0,78	0,53	-0,98	0,17	0,00040	<b>0,49</b>
Threonine	0,71	0,94	-0,92	0,27	0,00676	<b>0,48</b>
Thymin	-0,88	0,29	1,00	0,31	0,00032	<b>2,24</b>
Trehalose	-0,89	0,34	1,02	0,46	0,02377	<b>3,04</b>

Tabelle 5.9: T-Test und Quotienten von BY4742 und BY4742*zwf1*Δ in koffeinversetztem Minimalmedium. Quotienten (Q) relevanter Metabolite hervorgehoben.

Substanz	MW	$\sigma$	MW	$\sigma$	p-Wert	Q
Organismus	BY4742		<i>zwf1</i> Δ		(10 <sup>-3</sup> )	
Medium	MM		Koffein			
2-Hydroxyglutarat	0,81	0,64	-0,97	0,84	6,3546	0,90
2-Isopropylmalat	-0,62	0,21	0,75	0,41	0,8848	<b>4,34</b>
Adenin	-0,66	0,21	0,81	0,32	0,2393	<b>5,98</b>
Arginin	1,09	0,71	-1,30	0,40	0,0057	0,52

Fortsetzung...

## 5.4 GC-MS Daten der Kultivierungen

Tabelle 5.9: Fortsetzung Tabelle T-Test und Quotienten von BY4742 und BY4742*zwf1*  $\Delta$  in koffeinversetztem Minimalmedium

Substanz	MW	$\sigma$	MW	$\sigma$	p-Wert	Q
Organismus	BY4742		<i>zwf1</i> $\Delta$		(10 <sup>-3</sup> )	
Medium	MM		Koffein			
Asparagin	-0,62	0,30	0,77	0,45	0,7630	<b>6,33</b>
Aspartat	0,79	0,90	-1,05	0,58	0,7137	0,70
Fumarat	-0,58	0,19	0,68	0,31	0,4287	<b>2,45</b>
Glucopyranose	1,34	1,04	-1,52	0,47	0,0214	<b>0,30</b>
Glukose	1,41	1,01	-1,49	0,64	0,0394	0,55
Glutamat	-0,63	0,13	0,80	0,40	1,4305	<b>3,87</b>
Glycerinsäure	-0,56	0,33	0,69	0,36	0,3889	<b>2,13</b>
Glycerol-3-P	0,82	0,80	-0,98	0,73	2,0585	1,16
Guanin	0,96	1,48	-1,12	0,59	3,3902	<b>0,26</b>
GMP	-0,63	0,32	0,79	0,37	0,1848	<b>3,27</b>
Homoserin	-0,63	0,28	0,74	0,31	0,0846	<b>2,12</b>
Leucin	1,18	1,16	-1,30	0,24	0,1622	<b>0,35</b>
Malat	-0,66	0,24	0,79	0,23	0,0036	<b>2,75</b>
Methioninsulfoxide	1,39	0,39	-1,60	0,22	0,0000	<b>0,36</b>
myo-Inositol-1-P	-0,59	0,39	0,73	0,44	0,8013	1,77
N6-Acetyl-Lysin	-0,50	0,37	0,61	0,35	0,5671	<b>4,11</b>
Ornithin	0,87	1,08	-1,15	0,27	0,4891	<b>0,33</b>
Orotosäure	-0,66	0,23	0,80	0,27	0,0175	<b>7,38</b>
Palmitinsäure	1,22	0,60	-1,49	0,35	0,0004	<b>0,43</b>
Prolin	-0,59	0,16	0,71	0,48	4,2732	<b>4,38</b>
Putrescin	0,69	1,15	-0,91	0,17	3,5837	0,65
Stearinsäure	1,05	0,71	-1,33	0,22	0,0031	0,59
Thymin	-0,57	0,28	0,65	0,28	0,0544	1,91
Tryptophan	-0,46	0,44	0,59	0,40	1,3084	<b>2,23</b>
Tyrosin	-0,61	0,23	0,76	0,24	0,0580	<b>3,90</b>

Fortsetzung...

## 5 Anhang

---

Tabelle 5.9: Fortsetzung Tabelle T-Test und Quotienten von BY4742 und BY4742*zwf1*Δ in koffeinversetztem Minimalmedium

Substanz	MW	$\sigma$	MW	$\sigma$	p-Wert	Q
Organismus	BY4742		<i>zwf1</i> Δ		(10 <sup>-3</sup> )	
Medium	MM		Koffein			
Valin	-0,63	0,24	0,79	0,48	1,5295	<b>5,42</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 5.10: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
AL	Abstopplösung
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
ASPB	Aminosäure Pyrimidinbase
bidest.	bidestilliert
BTM	Biotrockenmasse
c	Konzentration
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CFU	<i>Colony Forming Units</i> , Koloniebildende Einheit
CLS	<i>chronological lifespan</i> , zeitliche Lebensspanne
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
dest	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
etc.	<i>et cetera</i> , und so weiter
EtOH	Ethanol
EV	<i>electronic volume</i> , Elektronisches Volumen
FL3-FC	EV normierte Fluoreszenz des Durchfluszytometers
G6P	Glukose-6-Phosphat
G6PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GA	Glutaraldehyd
GC-MS	Gaschromatograph-Massenspektrometer-Kopplung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
KD	Kopfdruckstrecke
L	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i> , Komplexmedium

Fortsetzung...

## 5 Anhang

---

Tabelle 5.10: Fortsetzung Tabelle Chemikalien

---

Abkürzung	Bezeichnung
M	Molar
MeOH	Methanol
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamid
MM	Minimalmedium
MP	Manuelle Probennahme
ms	Millisekunde
min	Minute
MW	Mittelwert
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert
NADP	Nicotinsäureamidadenindinukleotidphosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinsäureamidadenindinukleotidphosphat, reduziert
o. ä.	oder ähnliches
OD	Optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung, PBS Puffer
pH	pH-Wert
PI	Propidiumiodit
PKA	Proteinkinase A
PPP	Pentosephosphatweg
PRPP	5-Phosphoribosyl-diphosphat
PS	Pulsstrecke
PT	Probenteller
PV	Probennahmeventil
PVC	Polyvinylchlorid
Q	Quotient
RLS	<i>replicative lifespan</i> , replikative Lebensspanne
RT	Raumtemperatur

---

Fortsetzung...

Tabelle 5.10: Fortsetzung Tabelle Chemikalien

Abkürzung	Bezeichnung
s	Sekunde
SD	Spüldruckstrecke
SSC	<i>sidewards scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
ST	Starttemperatur
SV	Spülventil
SW	Standardabweichung
SYTO 9	<i>green fluorescent nucleic acid stain</i> , Grün fluoreszierendes Färbemittel für Nukleinsäuren
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TEA	Triethylamin
TOR	<i>target of rapamycin</i>
TORC1	<i>target of rapamycin complex 1</i>
v	<i>volume</i> , Volumen
VBNC	<i>viable but non-culturable</i> , Lebensfähig aber nicht kultivierbar
vvm	Volumen Luft pro Volumen Fermentationslösung pro Minute
w	<i>weight</i>
YPD	<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i> , Hefeextrakt Pepton Dextrose
°C	Grad Celsius

# Tabellenverzeichnis

2.1	Magnesiumlösung für <i>E. coli</i> . . . . .	23
2.2	Spurenelementlösung für <i>E. coli</i> . . . . .	23
2.3	Glukoselösung für <i>E. coli</i> . . . . .	23
2.4	Salzlösung für <i>E. coli</i> . . . . .	23
2.5	Minimalmediumzusammensetzung für <i>E. coli</i> . . . . .	24
2.6	Agarplattenmedium für <i>E. coli</i> . . . . .	24
2.7	Spurenelementlösung für <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	25
2.8	Vitaminlösung für <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	25
2.9	Bernsteinsäurepuffer für <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	26
2.10	Glukoselösung für <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	26
2.11	Kaliumlösung für <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	26
2.12	Sulfatlösung für <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	26
2.13	Aminosäure- und Pyrimidinbaselösungen für <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	26
2.14	Aminosäurelösungen für <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	27
2.15	Minimalmedium für <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	27
2.16	Agar LB-Medium für <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	27
2.17	Stämme . . . . .	28
2.17	Fortsetzung Tabelle Stämme . . . . .	29
2.18	PBS . . . . .	34
5.1	Geräte . . . . .	107
5.1	Fortsetzung Tabelle Geräte . . . . .	108
5.1	Fortsetzung Tabelle Geräte . . . . .	109
5.2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	109

5.3	Kits . . . . .	109
5.4	Software . . . . .	110
5.5	Chemikalien . . . . .	111
5.5	Fortsetzung Tabelle Chemikalien . . . . .	112
5.5	Fortsetzung Tabelle Chemikalien . . . . .	113
5.6	T-Test und Quotienten von BY4742 in Minimalmedium und koffeinversetztem Minimalmedium. Quotienten (Q) relevanter Metabolite hervorgehoben. . . . .	113
5.6	Fortsetzung Tabelle T-Test und Quotienten von BY4742 in Minimalmedium und koffeinversetztem Minimalmedium . . .	114
5.7	T-Test und Quotienten von BY4742 und BY4742 <i>mae1</i> $\Delta$ in Minimalmedium. Quotienten (Q) relevanter Metabolite hervorgehoben. . . . .	114
5.7	Fortsetzung Tabelle T-Test und Quotienten von BY4742 und BY4742 <i>mae1</i> $\Delta$ in Minimalmedium . . . . .	115
5.8	T-Test und Quotienten von BY4742 und BY4742 <i>zwf1</i> $\Delta$ in Minimalmedium. Quotienten (Q) relevanter Metabolite hervorgehoben. . . . .	115
5.8	Fortsetzung Tabelle T-Test und Quotienten von BY4742 und BY4742 <i>zwf1</i> $\Delta$ in Minimalmedium . . . . .	116
5.9	T-Test und Quotienten von BY4742 und BY4742 <i>zwf1</i> $\Delta$ in koffeinversetztem Minimalmedium. Quotienten (Q) relevanter Metabolite hervorgehoben. . . . .	116
5.9	Fortsetzung Tabelle T-Test und Quotienten von BY4742 und BY4742 <i>zwf1</i> $\Delta$ in koffeinversetztem Minimalmedium . . . . .	117
5.9	Fortsetzung Tabelle T-Test und Quotienten von BY4742 und BY4742 <i>zwf1</i> $\Delta$ in koffeinversetztem Minimalmedium . . . . .	118
5.10	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	119
5.10	Fortsetzung Tabelle Chemikalien . . . . .	120
5.10	Fortsetzung Tabelle Chemikalien . . . . .	121

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der Probenentnahmegерäte von Theobald <i>et al.</i> [124], Törnkvist und Larsson [71] und Lange <i>et al.</i> [70] . . . . .	15
1.2	Schematische Darstellung der Probenentnahmegерäte von Weuster-Botz [140], Schäfer <i>et al.</i> [108] und Grönke <i>et al.</i> [43] . . . . .	16
1.3	Schematische Darstellung der Probenentnahmegерäte von Schaub <i>et al.</i> [109], Hiller <i>et al.</i> [51] und Wellerdiek <i>et al.</i> [139] . . . . .	17
1.4	Schematische Darstellung der Probenentnahmegерäte von Buziol <i>et al.</i> [18], Mashego <i>et al.</i> [78] und Aragon <i>et al.</i> [2] . . . . .	20
3.1	FL3-FC von <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	42
3.2	Markierungsmuster mit PI und Agarkultur von <i>E. coli</i> nach Hitzebehandlung . . . . .	43
3.3	Markierungsmuster mit PI und die Agarkultur von <i>S. cerevisiae</i> nach Hitzebehandlung . . . . .	44
3.4	Mittelwert EV, FL3-FC und SSC von <i>E. coli</i> nach Hitzebehandlung . . . . .	45
3.5	Mittelwert EV, FL3-FC und SSC von <i>S. cerevisiae</i> nach Hitzebehandlung . . . . .	45
3.6	Relative OD von <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i> nach Hitzebehandlung . . . . .	46
3.7	Verlauf des ATP-Gehaltes in der Abstopplösung über die Wachstumskurve von <i>E. coli</i> . . . . .	48

---

3.8	ATP/BTM-Konzentrationen mit verschiedenen Methanolkonzentrationen abgestoppter <i>E. coli</i> Zellen bei einer Starttemperatur von -20 °C . . . . .	50
3.9	Durchflusszytometer- und relative OD-Werte mit verschiedenen Methanolkonzentrationen abgestoppter <i>E. coli</i> Zellen bei einer Starttemperatur von -20 °C . . . . .	51
3.10	Ausplattierte, mit verschiedenen MeOH Konzentrationen abgestoppte, <i>E. coli</i> Zellen . . . . .	52
3.11	ATP/BTM-Konzentrationen mit 100 % MeOH abgestoppter <i>E. coli</i> Zellen bei verschiedenen Starttemperaturen . . . . .	53
3.12	Durchflusszytometer- und relative OD-Werte mit 100 % MeOH abgestoppter <i>E. coli</i> Zellen bei verschiedenen Starttemperaturen . . . . .	54
3.13	ATP/BTM-Konzentration des Abstoppprozesses von <i>E. coli</i> mit Abstopplösungen mit verschiedenen Additiven . . . . .	57
3.14	Durchflusszytometer- und relative OD-Werte des Quenchingprozesses von <i>E. coli</i> mit verschiedenen Quenchinglösungen und Kultivierungsbedingungen . . . . .	58
3.15	Verfärbung des Zellpellets durch die Abstopplösung mit dem Additiv Glutaraldehyd . . . . .	60
3.16	ATP/BTM-Konzentration des Abstoppprozesses von <i>S. cerevisiae</i> mit unterschiedlichen Methanolkonzentrationen . . . . .	62
3.17	Durchflusszytometer- und relative OD-Werte mit verschiedenen MeOH-Konzentrationen abgestoppter <i>S. cerevisiae</i> Zellen . . . . .	63
3.18	Ausplattierte, mit verschiedenen MeOH-Konzentrationen abgestoppte, <i>S. cerevisiae</i> Zellen . . . . .	64
3.19	ATP/BTM-Konzentration des Abstoppprozesses von <i>S. cerevisiae</i> mit 100 % MeOH bei unterschiedlichen Starttemperaturen . . . . .	65
3.20	Durchflusszytometer und relative OD-Werte abgestoppter <i>S. cerevisiae</i> Zellen mit 100 % MeOH bei verschiedenen Starttemperaturen . . . . .	66
3.21	Agarplattenkultivierung . . . . .	72

3.22	Wachstumsverlauf des <i>S. cerevisiae</i> Elternstamms BY4742 in Minimalmedium und koffeinvertetztem Medium . . . . .	74
3.23	PCA der Kultivierung des Elternstamms BY4742 unter ungestressten und gestressten Bedingungen . . . . .	77
3.24	T-Test Clustering der Kultivierung des Elternstamms BY4742 unter ungestressten und gestressten Bedingungen . . . . .	78
3.25	Metabolomnetzwerk des Elternstamms unter Koffeininwirkung	80
3.26	T-Test Clustering der Kultivierung des Elternstamms BY4742 und <i>mae1</i> $\Delta$ unter ungestressten Bedingungen . . . . .	81
3.27	Metabolomnetzwerk der Knockoutmutante <i>zwf1</i> $\Delta$ . . . . .	83
3.28	T-Test Clustering der Kultivierung des Elternstamms BY4742 und <i>zwf1</i> $\Delta$ unter ungestressten Bedingungen . . . . .	84
3.29	T-Test Clustering der Kultivierung des Elternstamms BY4742 unter ungestressten und <i>zwf1</i> $\Delta$ unter gestressten Bedingungen	86
3.30	Metabolomnetzwerk der Knockoutmutante <i>zwf1</i> $\Delta$ unter Koffeininwirkung . . . . .	88
3.31	Automatisiertes Probenentnahmesystem . . . . .	92
3.32	Steuerung des Probenentnahmesystems . . . . .	94
3.33	Drehzahl und Probenzeitspanne . . . . .	95
3.34	Labora Aufbau der Kultivierung . . . . .	96
3.35	Volumenstrom in Abhängigkeit des Kopfdrucks . . . . .	97
3.36	Variation der Probenvolumina über den Verlauf einer Probenentnahme . . . . .	98
3.37	Glukosegehalt der Proben bei dem Glukosepulsexperiment . .	100
4.1	Übersicht der durchgeführten Untersuchungen . . . . .	102
5.1	Konstruktionszeichnung des Probentellers . . . . .	110

# Literaturverzeichnis

- [1] ALBON, N. und J. M. STURTEVANT: *Nature of the gel to liquid crystal transition of synthetic phosphatidylcholines*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 75(5):2258–2260, 1978.
- [2] ARAGON, A. D., G. A. QUINONES, C. J. ALLEN, S. ROY, G. S. DAVIDSON, P. D. WENTZELL, B. MILLIER, J. E. JAETAO, A. L. RODRIGUEZ und M. WERNER-WASHBURNE: *An automated, pressure-driven sampling device for harvesting from liquid cultures for genomic and biochemical analyses*. Journal of Microbiological Methods, 65(2):357–360, 2006.
- [3] BEALES, N.: *Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 3(1):1–20, 2004.
- [4] BEATTIE, G. M., J. H. CROWE, A. D. LOPEZ, V. CIRULLI, C. RICORDI und A. HAYEK: *Trehalose: a cryoprotectant that enhances recovery and preserves function of human pancreatic islets after long-term storage*. Diabetes, 46(3):519–523, 1997.
- [5] BECKER, J., C. KLOPPROGGE, O. ZELDER, E. HEINZLE und C. WITTMANN: *Amplified Expression of Fructose 1,6-Bisphosphatase in Corynebacterium glutamicum Increases In Vivo Flux through the Pentose Phosphate Pathway and Lysine Production on Different Carbon Sources*. Applied and Environmental Microbiology, 71(12):8587–8596, 2005.

- [6] BENEY, L. und P. GERVAIS: *Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stress*. Applied Microbiology and Biotechnology, 57:34–42, 2001.
- [7] BERANOVA, J., M. JEMIOLA-RZEMINSKA, D. ELHOTTOVA, K. STRZALKA und I. KONOPASEK: *Metabolic control of the membrane fluidity in Bacillus subtilis during cold adaptation*. Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes, 1778(2):445–453, 2008.
- [8] BIANCHI, D. E.: *Small colony variant in Candida albicans*. Journal of Bacteriology, 82:101–105, 1961.
- [9] BLATTNER, F. R., G. PLUNKETT, C. A. BLOCH, N. T. PERNA, V. BURLAND, M. RILEY, J. COLLADO-VIDES, J. D. GLASNER, C. K. RODE, G. F. MAYHEW, J. GREGOR, N. W. DAVIS, H. A. KIRKPATRICK, M. A. GOEDEN, D. J. ROSE, B. MAU und Y. SHAO: *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12*. Science, 277:1453–1462, 1997.
- [10] BOERNER, J., S. BUCHINGERA und D. SCHOMBURG: *A high-throughput method for microbial metabolome analysis using gas chromatography/mass spectrometry*. Analytical Biochemistry, 267(2):143–151, 2007.
- [11] BOHN, M., K. LEPPCHEN, M. KATZBERG, A. LANG, J. STEINGROEWER, J. WEBER, T. BLEY und M. BERTAU: *Effects of caffeine on stereoselectivities of high cell density biotransformations of cyclic beta-keto esters with Saccharomyces cerevisiae*. Organic and Biomolecular Chemistry, 5(21):3456–3463, 2007.
- [12] BOLTEN, C. J., P. KIEFER, F. LETISSE, J.-C. PORTAIS und C. WITTMANN: *Sampling for Metabolome Analysis of Microorganisms*. Analytical Chemistry, 79(10):3843–3849, 2007.

- [13] BOLTEN, C. J. und C. WITTMANN: *Appropriate sampling for intracellular amino acid analysis in five phylogenetically different yeasts*. Biotechnology Letters, 30(11):1993–2000, 2008.
- [14] BRANDMAYER, J., N. EBEL und E. SCHLUECKER: *Experimentelle und numerische Untersuchungen zur Schädigung von Zellen in Pumpen*. In: *Bioprozessorientiertes Anlagendesign*, S. 7–8, Nuernberg, 2010. DE-HEMA.
- [15] BRANDNER, J. J., E. ANURJEW, L. BOHN, E. HANSJOSTEN, T. HENNING, U. SCHYGULLA, A. WENKA und K. SCHUBERT: *Concepts and realization of microstructure heat exchangers for enhanced heat transfer*. Experimental Thermal and Fluid Science, 30:801–809, 2006.
- [16] BRITTEN, R. J. und F. T. MCCLURE: *The amino acid pool in Escherichia coli*. Bacteriological Reviews, 26:292–335, 1962.
- [17] BUCHHOLZ, A., R. TAKORS und C. WANDREY: *Quantification of Intracellular Metabolites in Escherichia coli K12 Using Liquid Chromatographic-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric Techniques*. Analytical Biochemistry, 295(2):129–137, 2001.
- [18] BUZIOL, S., I. BASHIR, A. BAUMEISTER, W. CLAASSEN, N. NOISOMMIT-RIZZI, W. MAILINGER und M. REUSS: *New bioreactor-coupled rapid stopped-flow sampling technique for measurements of metabolite dynamics on a subsecond time scale*. Biotechnology and Bioengineering, 80(6):632–636, 2002.
- [19] CANELAS, A. B., C. RAS, A. TEN PIERICK, J. C. VAN DAM, J. J. HEIJNEN und W. M. VAN GULIK: *Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics*. Metabolomics, 4(3):226–239, 2008.
- [20] CAO-HOANG, L., P. A. MARECHAL, M. LE-THANH und P. GERVAIS: *Synergistic action of rapid chilling and nisin on the inactivation of Escherichia coli*. Applied Microbial and Cell Physiology, 79(1):105–109, 2008.

- [21] CARON, G. NEBE-VON und R. A. BADLEY: *Viability assessment of bacteria in mixed populations using flow cytometry*. Journal of Microscopy, 179:55–66, 1995.
- [22] CARON, G. NEBE-VON, P. J. STEPHENS, C. J. HEWITT, J. R. POWELL und R. A. BADLEY: *Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting*. Journal of Microbiological Methods, 42:97–114, 2000.
- [23] CHASSAGNOLE, C., N. NOISOMMIT-RIZZI, J. W. SCHMID, K. MAUCH und M. REUSS: *Dynamic modeling of the central carbon metabolism of Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering, 79(1):53–73, 2002.
- [24] CHERRY, J. M., C. ADLER, C. BALL, S. A. CHERVITZ, S. S. DWIGHT, E. T. HESTER, Y. JIA, G. JUVIK, T. ROE, M. SCHROEDER, S. WENG und D. BOTSTEIN: *SGD: Saccharomyces Genome Database*. Nucleic Acids Research, 26(1):73–79, 1998.
- [25] DATABASE, S. G. <http://www.yeastgenome.org/>, Zugriffsdatum: 28.07.2010.
- [26] DAVEY, H. M. und D. B. KELL: *Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single cell analysis*. Microbiological Reviews, 60:641–696, 1996.
- [27] DELOBBE, A., R. HAGUENAUER und G. RAPOPORT: *Studies on the transport of  $\alpha$ -methyl-D-glucoside in Bacillus subtilis 168*. Biochimie, 53(9):1015–1021, 1971.
- [28] DIAMANTARAS, K. I. und S. Y. KUNG: *Principal Component Neural Networks*. Wiley-Interscience, New York, 1996.
- [29] DIAZ, M., M. HERRERO, L. A. GARCIA und C. QUIROS: *Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses*. Biochemical Engineering Journal, 48(3):385–407, 2010.

- [30] DROBNIS, E. Z., L. M. CROWE, C. T. BERGER, T. J. ANCHORDOGUY, J. W. OVERSTREET und J. H. CROWE: *Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model*. Journal of Experimental Zoology, 265:432–437, 1993.
- [31] FAY, J. P. und R. FARIAS: *Chilling cells enhances the bactericidal action of fatty acids on Escherichia coli*. Environmental Microbiology, 31(2):153–157, 1976.
- [32] FEIGENSON, G. W.: *Phase behavior of lipid mixtures*. Nature Chemical Biology, 2(11):560–563, 2006.
- [33] FEIGENSON, G. W.: *Phase boundaries and biological membranes*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 36:63–77, 2007.
- [34] FLORES, M. V., R. J. J. ERTOLA und C. E. VOGET: *Characterization of a glutaraldehyde stabilized yeast cell biocatalyst with beta-galactosidase activity*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 81(6):524–529, 1996.
- [35] GALAO, R. P., N. SCHELLER, I. ALVES-RODRIGUES, T. BREINIG, A. MEYERHANS und J. DIEZ: *Saccharomyces cerevisiae: a versatile eukaryotic system in virology*. Microbial Cell Factories, 6(32), 2007.
- [36] GARRE, E., F. RAGINEL, A. PALACIOS, A. JULIEN und E. MATALLANA: *Oxidative stress responses and lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts*. International Journal of Food Microbiology, 136(3):295–303, 2010.
- [37] GASPAR, P., A. R. NEVES, A. RAMOS, M. J. GASSON, C. A. SHEARMAN und H. SANTOS: *Engineering Lactococcus lactis for production of mannitol: high yields from food-grade strains deficient in lactate dehydrogenase and the mannitol transport system*. Applied and Environmental Microbiology, 70(3):1466–1474, 2004.

- [38] GILBERT, H. F., V. MCLEAN und M. MCLEAN: *Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange*. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 63:69–172, 1990.
- [39] GONZALEZ, B., J. FRANCOIS und M. RENAUD: *A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol*. Yeast, 13(14):1347–1356, 1997.
- [40] GOUESBET, G., M. JEBBAR, S. BONNASSIE, N. HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, S. HIMDI-KABBA und C. BLANCO: *Erwinia chrysanthemi at high osmolarity: influence of osmoprotectants on growth and pectate lyase production*. Microbiology, 141:1407–1412, 1995.
- [41] GREGORI, G., S. CITTERIO, A. GHIANI, M. LABRA, S. SGORBATI, S. BROWN und M. DENIS: *Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining*. Applied and Environmental Microbiology, 67:4662–4670, 2001.
- [42] GREY, B. und T. R. STECK: *Concentrations of copper thought to be toxic to Escherichia coli can induce the viable but nonculturable condition*. Applied and Environmental Microbiology, 67:5325–5327, 2001.
- [43] GROENKE, K., B. LUO, K. NOEH, W. WIECHERT, R. TAKORST und M. OLDIGES: *Measurement of  $^{13}\text{C}$ -labelling dynamics of intracellular metabolites as basis for kinetic and thermodynamic evaluation*. In: *1st International Symposium on Biothermodynamics*, Proceedings of the 1st International Symposium on Biothermodynamics, Frankfurt, Germany, 2006.
- [44] GUNASEKERA, T., P. V. ATTFIELD und D. VEAL: *A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk*. Applied and Environmental Microbiology, 66:1228–1232, 2000.
- [45] HACKER, J. und G. BLUM-OEHLER: *In appreciation of Theodor Escherich*. Nature, 5:902, 2007.

- [46] HAEST, C. W. M., J. DE GIER, G. A. VAN ES, A. J. VERKLEIJ und L. L. M. VAN DEENEN: *Fragility of the permeability barrier of Escherichia coli*. Biochimica et Biophysica Acta, 288:43–53, 1972.
- [47] HANS, M. A., E. HEINZLE und C. WITTMANN: *Quantification of intracellular amino acids in batch cultures of Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology, 56:776–779, 2001.
- [48] HARRIGAN, G. G., D. J. BRACKETT und L. G. BOROS: *Medicinal Chemistry, Metabolic Profiling and Drug Target Discovery: A Role for Metabolic Profiling in Reverse Pharmacology and Chemical Genetics*. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 5:13–20, 2005.
- [49] HASHIMOTO, T., T. SANO, W. ITO, K. KANAZAWA, G. DANNO und H. ASHIDA: *3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3]indole induces apoptosis and necrosis with activation of different caspases in rat splenocytes*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 68:964–967, 2004.
- [50] HAUSSLER, S., I. ZIEGLER, A. LOTTEL, F. VON GOTZ, M. ROHDE, D. WEHMHÖHNER, S. SARAVANAMUTHU, B. TUMMLER und I. STEINMETZ: *Highly adherent small-colony variants of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis lung infection*. Journal of Medical Microbiology, 52(Pt 4):295–301, 2003.
- [51] HILLER, J.: *Metabolische Analyse des Zentralstoffwechsels von Escherichia coli*. Dissertation, Technische Universität München, 2006.
- [52] HILLER, J., E. FRANCO-LARA und D. WEUSTER-BOTZ: *Metabolic profiling of Escherichia coli cultivations: Evaluation of extraction and metabolite analysis procedures*. Biotechnology Letters, 29(8):1169–1178, 2007.
- [53] HILLER, J., B. SCHWAIGER und D. WEUSTER-BOTZ: *Probenahme fuer fluide Proben.*, 2003.

- [54] HU, J. C., P. D. KARO, I. M. KESELER, M. KRUMMENACKER und D. A. SIEGELE: *What we learn about Escherichia coli through application of gene ontology*. Trends in Microbiology, 17:269–278, 2009.
- [55] HUDAK SLEKAR, K., D. J. KOSMAN und V. CIZEWSKI CULOTTA: *The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection*. The Journal of Biological Chemistry, 271(46):28831–28836, 1996.
- [56] JAHNGEN-HODGE, J., M. OBIN, X. GONG, F. SHANG, T. NOWELL, J. GONG, H. ABASI, J. BLUMBERG und A. TAYLOR: *Regulation of ubiquitin conjugating enzymes by glutathione following oxidative stress*. Journal of Biological Chemistry, 272:28218–28226, 1997.
- [57] JEPRAS, R. I., J. CARTER, S. C. PEARSON, F. E. PAUL und M. J. WILKINSON: *Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria*. Applied and Environmental Microbiology, 61(7):2696–2701, 1995.
- [58] JONES, K. H. und J. A. SENFT: *An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide*. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 33(1):77–79, 1985.
- [59] KADDURAH-DAOUK, R., B. S. KRISTAL und R. M. WEINSHILBOUM: *Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 48:653–683, 2008.
- [60] KAPREYLANTS, A. S. und D. B. KELL: *The use of CTC and flow cytometry for the visualization of respiratory activity in individual cells of Micrococcus luteus*. Journal of Microbiological Methods, 17:115–122, 1993.

- [61] KATO, K. und Y. BITO: *Relationship between bactericidal action of complement and fluidity of cellular membranes*. Infection and Immunity, 19(1):12–17, 1978.
- [62] KELL, D. B., A. S. KAPREYLANTS, D. H. WEICHART, C. R. HARWOOD und M. R. BARER: *Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues*. Antonie van Leeuwenhoek, 73:169–187, 1998.
- [63] KEMPA, S., J. HUMMEL, T. SCHWEMMER, M. PIETZKE, N. STREHMEL, S. WIENKOOP, J. KOPKA und W. WECKWERTH: *An automated GC $\tilde{A}$ —GC-TOF-MS protocol for batch-wise extraction and alignment of mass isotopomer matrixes from differential (13)C-labelling experiments: A case study for photoautotrophic-mixotrophic grown Chlamydomonas reinhardtii cells*. Journal of Basic Microbiology, 49:82–91, 2009.
- [64] KONING, W. DE und K. VAN DAM: *A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH*. Analytical Biochemistry, 204(1):118–123, 1992.
- [65] KOSOWER, N. S. und E. M. KOSOWER: *Diamide: an oxidant probe for thiols*. Methods in Enzymology, 251:123–133, 1995.
- [66] KOSOWER, N. S., E. M. KOSOWER, B. WERTHEIM und W. S. CORREA: *Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 37(4):593–596, 1969.
- [67] KUMITA, J. R., L. JAIN, E. SAFRONEEVA und G. A. WOOLLEY: *A Cysteine-Free Firefly Luciferase Retains Luminescence Activity*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 267(1):394–397, 2000.

- [68] KURANDA, K., V. LEBERRE, S. SOKOL, G. PALAMARCZYK und J. FRANCOIS: *Investigating the caffeine effects in the yeast Saccharomyces cerevisiae brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways*. Molecular Microbiology, 61(5):1147–1166, 2006.
- [69] LAI, M.-C. und R. P. GUNSALUS: *Glycine Betaine and Potassium Ion Are the Major Compatible Solutes in the Extremely Halophilic Methanogen Methanohalophilus Strain Z7302*. Journal of Bacteriology, S. 7474–7477, 1992.
- [70] LANGE, H. C., M. EMAN, G. VAN ZUIJLEN, D. VISSER, J. C. VAN DAM, J. FRANK, M. J. TEIXEIRA DE MATTOS und J. J. HEIJNEN: *Improved rapid sampling for in vivo kinetics of intracellular metabolites in Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, 75(4):406–415, 2001.
- [71] LARSSON, G. und M. TOERNKVIST: *Rapid sampling, cell inactivation and evaluation of low extracellular glucose concentrations during fed-batch cultivation*. Journal of Biotechnology, 49(1-3):69–82, 1996.
- [72] LÄRDERS, S., C. FALLET und E. FRANCO-LARA: *Proteome analysis of the Escherichia coli heat shock response under steady-state conditions*. Proteome Science, 7(36):doi:10.1186/1477-5956-7-36, 2009.
- [73] LEDER, I. G.: *Interrelated effects of cold shock and osmotic pressure on the permeability of the Escherichia coli membrane to permease accumulated substrates*. Journal of Bacteriology, 111(1):211–219, 1972.
- [74] LENNOX, E. S.: *Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1*. Virology, 1:190–206, 1955.
- [75] LEVITT, J.: *Chilling injury and resistance*. In: *Responses of Plants to Environmental Stresses*, Bd. 1. Academic Press, New York, 2. Aufl., 1980.

- 
- [76] LINK, H., B. ANSELMANT und D. WEUSTER-BOTZ: *Leakage of adenylates during cold methanol/glycerol quenching of Escherichia coli*. *Metabolomics*, 4(3):240–247, 2008.
- [77] LU, Y. P., Y. R. LOU, X. H. LI, J. G. XIE, Y. LIN, W. J. SHIH und A. H. CONNEY: *Stimulatory effect of topical application of caffeine on UVB-induced apoptosis in mouse skin*. *Oncology Research*, 13:61–70, 2002.
- [78] MASHEGO, M. R., K. RUMBOLD, M. MEY, E. VANDAMME, W. SOETAERT und J. J. HEIJNEN: *Microbial metabolomics: Past, present and future methodologies*. *Biotechnology Letters*, 29(1):1–16, 2007.
- [79] MASORO, E. J.: *Overview of caloric restriction and aging*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126:913–922, 2005.
- [80] MAZZAFERA, P.: *Catabolism of caffeine in plants and microorganisms*. *Frontiers in Bioscience*, 9(2):1348–1359, 2004.
- [81] MEER, G. v., D. R. VOELKER und G. W. FEIGENSON: *Membrane lipids: where they are and how they behave*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9:112–124.
- [82] MOREIN, S., A.-S. ANDERSSON, L. RILFORS und G. LINDBLOM: *Wild-type Escherichia coli cells regulate the membrane lipid composition in a window between gel and non-lamellar Structures*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(12):6801–6809, 1996.
- [83] MORGENTHAU, K.: *Protein Profiling und Metabolite Profiling in Arabidopsis thaliana im systembiologischen Kontext*. Dissertation, Technische Universitaet Berlin, 2007.
- [84] MORRIS, G. J.: *Direct chilling injury*. In: *The Effects of Low Temperatures on Biological Systems*. Edward Arnold, London, 1987.
- [85] MORRIS, G. J. und P. F. WATSON: *Cold shock injury - a comprehensive bibliography*. *Cryoletters*, 5:352–372, 1984.

- [86] MOSER, B. A., J. M. BRONDELLO, B. BABER-FURNAREI und P. RUSSELL: *Mechanism of Caffeine-Induced Checkpoint Override in Fission Yeast*. *Molecular and Cellular Biology*, 20:4288–4294, 2000.
- [87] NA, S. H., K. MIYANAGA, H. UNNO und Y. TANJI: *The survival response of Escherichia coli K12 in a natural environment*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2):386–392, 2006.
- [88] NANJO, Y., M. Z. NOURI und S. KOMATSU: *Quantitative proteomic analyses of crop seedlings subjected to stress conditions; a commentary*. *Phytochemistry*, In Druck, 2010.
- [89] NEIDHARDT, F. C., J. L. INGRAHAM und S. M.: *Physiology of the bacterial cell: a molecular approach*. Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts, 1990.
- [90] NELSON, L. und M. COX: *Lehninger Biochemie*. Springer, Berlin, 4 Aufl., 2009.
- [91] NG, C. H., S. X. TAN, G. G. PERRONE, G. W. THORPE, V. J. HIGGINS und I. W. DAWES: *Adaptation to hydrogen peroxide in Saccharomyces cerevisiae: The role of NADPH-generating systems and the SKN7 transcription factor*. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(6):1131–1145, 2008.
- [92] NOGAE, I. und M. JOHNSTON: *Isolation and characterization of the ZWF1 gene of Saccharomyces cerevisiae, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase*. *Gene*, 96(2):161–169, 1990.
- [93] NOMURA, O., D. ICHIMATSU, S. MORIANTI, I. KOYAMA, Z. DONG, K. YOKOGAWA und K. MIYAMOTO: *Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation and Akt activation by caffeine*. *Molecular Carcinogenesis*, 44:305–310, 2005.
- [94] OBIN, M., F. SHANG, X. GONG, G. HANDELMAN, J. BLUMBERG und A. TAYLOR: *Redox regulation of ubiquitin-conjugating enzymes: mecha-*

- nistic insights using the thiol-specific oxidant diamide*. FASEB Journal, 12:561–569, 1998.
- [95] OLIVER, J. D.: *Formation of viable but nonculturable cells*. In: Starvation in Bacteria. Plenum Press, New York, 1993.
- [96] PAROLA, A. H., M. LBDAAH, D. GILL und A. ZARITSKY: *Deviation from homeoviscous adaptation in Escherichia coli membranes*. Biophysical Journal, 57:621–626, 1990.
- [97] PEDRUZZI, I., F. DUBOULOZ, E. CAMERONI, V. WANKE, J. ROOSEN, J. WINDERICKX und C. DE VIRGILIO: *TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0*. Molecular Cell, 12:1607–1613, 2003.
- [98] PENEAU, S., D. CHASSAING und B. CARPENTIER: *First evidence of division and accumulation of viable but nonculturable Pseudomonas fluorescens cells on surfaces subjected to conditions encountered at meat processing premises*. Applied and Environmental Microbiology, 73:2839–2846, 2007.
- [99] RAMOS, A., A. R. NEVES und H. SANTOS: *Metabolism of lactic acid bacteria studied by nuclear magnetic resonance*. Antonie van Leeuwenhoek, 82(1-4):249–261, 2002.
- [100] REINDERS, A., N. BUERCKERT, T. BOLLER, A. WIEMKEN und C. DE VIRGILIO: *Saccharomyces cerevisiae cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase*. Genes and Development, 12:2943–2955, 1998.
- [101] REINKE, A., J. C. Y. CHEN, S. ARONOVA und T. POWERS: *Caffeine Targets TOR Complex I and Provides Evidence for a Regulatory Link between the FRB and Kinase Domains of Tor1p*. Journal of Biological Chemistry, 281(42):31616–31626, 2006.
- [102] RIMMELE, M. und W. BOOS: *Trehalose-6-phosphate hydrolase of Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 176(18):5654–5664, 1994.

- [103] RUDOLPH, A. S., J. H. CROWE und L. M. CROWE: *Effects of three stabilizing agents proline, betaine, and trehalose on membrane phospholipids*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 15:134–143, 1986.
- [104] RUDOLPH, E.: *Etablierung und Charakterisierung einer schnellen Probenahme zur metabolischen Prozessanalyse*. Diplomarbeit, Institut fuer Bioverfahrenstechnik, 2008.
- [105] RUIJTER, G. J. G. und J. VISSER: *Determination of intermediary metabolites in Aspergillus niger*. Journal of Microbiological Methods, 25:295–302, 1996.
- [106] SAEED, A., V. SHAROV, J. WHITE, J. LI, W. LIANG, N. BHAGABATI, J. BRAISTED, M. KLAPA, T. CURRIER, M. THIAGARAJAN, A. STURN, M. SNUFFIN, A. REZANTSEV, D. POPOV, A. RYLTSOV, E. KOSTUKOVICH, I. BORISOVSKY, Z. LIU, A. VINSAVICH, V. TRUSH und J. QUACKENBUSH: *TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis*. Biotechniques, 34(2):374–378, 2003.
- [107] SARAGUSTY, J., H. GACITUA, I. ROZENBOIM und A. ARAV: *Do physical forces contribute to cryodamage?*. Biotechnology and Bioengineering, 104(4):719–728, 2009.
- [108] SCHAEFER, U., W. BOOS, R. TAKORS und D. WEUSTER-BOTZ: *Automated Sampling Device for Monitoring Intracellular Metabolite Dynamics*. Analytical Biochemistry, 270(1):88–96, 1999.
- [109] SCHAUB, J., C. SCHIESLING, M. REUSS und M. DAUNER: *Integrated Sampling Procedure for Metabolome Analysis*. Biotechnology Progress, 22(5):1434–1442, 2006.
- [110] SCHERLING, C., C. ROSCHER, P. GIAVALISCO, E. D. SCHULZE und W. WECKWERTH: *Metabolomics unravel contrasting effects of biodiversity on the performance of individual plant species*. PLoS One, 5(9):e12569, 2010.

- [111] SCHMITZ, M., E. HIRSCH, J. BONGAERTS und R. TAKORS: *Pulse experiments as a prerequisite for the quantification of in vivo enzyme kinetics in aromatic amino acid pathway of Escherichia coli*. Biotechnology Progress, 18(5):935–941, 2002.
- [112] SCHNEIDER, K., J. O. KROEMER, W. WITTMANN, I. ALVES-RODRIGUES, A. MEYERHANS, J. DIEZ und E. HEINZLE: *Metabolite profiling studies in Saccharomyces cerevisiae: an assisting tool to prioritize host targets for antiviral drug screening*. Microbial Cell Factories, 8(12):Open Access, 2009.
- [113] SHAPIRO, H. M.: *Practical flow cytometry*. John Wiley and Sons, 4. Aufl., 2003.
- [114] SIGMA-ALDRICH: *44788/81619 Ectoin*. <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Fluka/Datasheet/81619dat.Par.0001.File.tmp/81619dat.pdf>, Zugriffsdatum 2.12.2010.
- [115] SIGMA-ALDRICH: *55243/70709 Hydroxyectoin*. <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Fluka/Datasheet/70709dat.Par.0001.File.tmp/70709dat.pdf>, Zugriffsdatum 2.12.2010.
- [116] SINGER, S. J. und G. L. NICOLSON: *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, 175(23):720–731, 1972.
- [117] SOWERS, K. R., D. E. ROBERTSON, D. NOLL, R. P. GUNSALUS und M. F. ROBERTS: *N6-Acetyl-,8-lysine: An osmolyte synthesized by methanogenic archaeobacteria*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87:9083–9087, 1990.
- [118] SPURA, J., L. C. REIMER, P. WIELOCH, K. SCHREIBER, S. BUCHINGER und D. SCHOMBURG: *A method for enzyme quenching in microbial metabolome analysis successfully applied to gram-positive and gram-negative bacteria and yeast*. Analytical Biochemistry, 394(2):192–201, 2009.

- [119] STEVERDING, D.: *Die Geschichte der Kolibakterien*. Biologie in unserer Zeit, 40(3):194–201, 2010.
- [120] SUNG, D. und H. KANG: *The N-Terminal Amino Acid Sequences of the Firefly Luciferase Are Important for the Stability of the Enzyme*. Photochemistry and Photobiology, 68(5):749–753, 1998.
- [121] SVARACHORN, A., T. TSUCHIDO, A. SHINMYO und M. TAKANO: *Autolysis of Bacillus subtilis induced by low temperature*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 71(4):281–283, 1991.
- [122] SZTEIN, J. M., K. NOBLE, J. S. FARLEY und L. E. MOBRAATEN: *Comparison of Permeating and Nonpermeating Cryoprotectants for Mouse Sperm Cryopreservation*. Cryobiology, 42(1):28–39, 2001.
- [123] TAYMAZ-NIKEREL, H., M. DE MEY, C. RAS, A. TEN PIERICK, R. M. SEIFAR, J. C. VAN DAM, J. J. HEIJNEN und W. M. VAN GULIK: *Development and application of a differential method for reliable metabolome analysis in Escherichia coli*. Analytical Biochemistry, 386(1):9–19, 2009.
- [124] THEOBALD, U., W. MAILINGER, M. BALTES, M. RIZZI und M. REUSS: *In vivo analysis of metabolic dynamics in Saccharomyces cerevisiae: I. Experimental observations*. Biotechnology and Bioengineering, 55(2):305–316, 1997.
- [125] THEOBALD, U., W. MAILINGER, M. REUSS und M. RIZZI: *In vivo analysis of glucose-induced fast changes in yeast adenine nucleotide pool applying a rapid sampling technique*. Analytical Biochemistry, 214(1):31–37, 1993.
- [126] THIERINGER, H. A., P. G. JONES und M. INOUE: *Cold shock and adaptation*. BioEssays : News and reviews in molecular, cellular and developmental biology, 20(1):49–57, 1998.

- [127] TIBBETT, M., F. SANDERS und J. CAIRNEY: *Low-temperature-induced changes in trehalose, mannitol and arabitol associated with enhanced tolerance to freezing in ectomycorrhizal basidiomycetes (Hebeloma spp.)*. Mycorrhiza, 12(5):249–255, 2002.
- [128] TSUCHIDO, T., T. NISHINO, Y. KATO und M. TAKANO: *Involvement of membrane lipids in cold shock-induced autolysis of Bacillus subtilis cells*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 59(9):1636–1640, 1995.
- [129] VERDUYN, C., E. POSTMA, W. A. SCHEFFERS und J. P. VANDIJKEN: *Effect of benzoic-acid on metabolic fluxes in yeasts - A continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation*. Yeast, 8:501–517, 1992.
- [130] VILLA-GARCIA, M. J., M. S. CHOI, F. I. HINZ, M. L. GASPAR, S. A. JESCH und S. A. HENRY: *Genome-wide screen for inositol auxotrophy in Saccharomyces cerevisiae implicates lipid metabolism in stress response signaling*. Molecular Genetics and Genomics, in Druck, 2010.
- [131] VILLAS-BOAS, S. G., M. AKESSON und J. NIELSEN: *Biosynthesis of glyoxylate from glycine in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast Research, 5(8):703–709, 2005.
- [132] VILLAS-BOAS, S. G. und P. BRUHEIM: *Cold glycerol-saline: The promising quenching solution for accurate intracellular metabolite analysis of microbial cells*. Analytical Biochemistry, 370(1):87–97, 2007.
- [133] VILLAS-BOAS, S. G., J. HOJER-PEDERSEN, M. AKESSON, J. SMEDSGAARD und J. NIELSEN: *Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods*. Yeast, 22(14):1155–1169, 2005.
- [134] VILLAS-BOAS, S. G., J. NIELSEN, J. SMEDSGAARD, M. A. E. HANSEN und U. ROESSNER-TUNALI: *Metabolome Analysis: An Introduction*. John Wiley and Sons, New York, 2007.

- [135] VISSER, D. und J. J. HEIJNEN: *The mathematics of metabolic control analysis revisited*. Metabolic Engineering, 4(2):114–123, 2002.
- [136] VISSER, D., G. A. VAN ZUYLEN, J. C. VAN DAM, A. OUDSHOORN, M. R. EMAN, C. RAS, W. M. VAN GULIK, J. FRANK, G. W. K. VAN DEDEM und J. J. HEIJNEN: *Rapid sampling for analysis of in vivo kinetics using the bioscope: A system for continuous-pulse experiments*. Biotechnology and Bioengineering, 79(6):674–681, 2002.
- [137] WANKE, V., E. CAMERONI, A. UOTILA, M. PICCOLIS, J. URBAN, R. LOEWITH und C. DE VIRGILIO: *Caffeine extends yeast lifespan by targeting TORC1*. Molecular Microbiology, 69(1):277–285, 2008.
- [138] WEIBEL, K. E., J. R. MOR und A. FIECHTER: *Rapid sampling of yeast cells and automated assays of adenylate, citrate, pyruvate, and glucose 6-phosphate pools*. Analytical Biochemistry, 58(1):208–216, 1974.
- [139] WELLERDIEK, M., D. WINTERHOFF, W. REULE, J. BRANDNER und M. OLDIGES: *Metabolic quenching of Corynebacterium glutamicum: efficiency of methods and impact of cold shock*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 32(5):581–592, 2009.
- [140] WEUSTER-BOTZ, D. und A. A. DE GRAAF: *Reaction engineering methods to study intracellular metabolite concentrations*. Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology, 54(Metabolic Engineering):75–108, 1996.
- [141] WINE, Y., N. COHEN-HADAR, A. FREEMAN und F. FROLOW: *Elucidation of the mechanism and end products of glutaraldehyde crosslinking reaction by X-ray structure analysis*. Biotechnology and Bioengineering, 98(3):711–718, 2007.
- [142] WINTER, G., R. HAZAN, A. T. BAKALINSKY und H. ABELIOVICH: *Caffeine induces macroautophagy and confers a cytotoxic effect on food spoilage yeast in combination with benzoic acid*. Autophagy, 4(1):28–36, 2008.

- [143] WINZELER, E. A., D. D. SHOEMAKER, A. ASTROMOFF, H. LIANG, K. ANDERSON, B. ANDRE, R. BANGHAM, R. BENITO, J. D. BOEKE, H. BUSSEY, A. M. CHU, C. CONNELLY, K. DAVIS, F. DIETRICH, S. W. DOW, M. EL BAKKOURY, F. FOURY, S. H. FRIEND, E. GENTALLEN, G. GIAEVER, J. H. HEGEMANN, T. JONES, M. LAUB, H. LIAO, N. LIEBUNDGUTH, D. J. LOCKHART, A. LUCAU-DANILA, M. LUSSIER, N. M'RABET, P. MENARD, M. MITTMANN, C. PAI, C. REBISCHUNG, J. L. REVUELTA, L. RILES, C. J. ROBERTS, P. ROSS-MACDONALD, B. SCHERENS, M. SNYDER, S. SOOKHAI-MAHADEO, R. K. STORMS, S. VERONNEAU, M. VOET, G. VOLCKAERT, T. R. WARD, R. WYSOCKI, G. S. YEN, K. YU, K. ZIMMERMANN, P. PHILIPPSEN, M. JOHNSTON und R. W. DAVIS: *Functional characterization of the Saccharomyces cerevisiae genome by gene deletion and parallel analysis*. Science, 285:901–906, 1999.
- [144] WITTMANN, C., J. O. KROMER, P. KIEFER, T. BINZ und E. HEINZLE: *Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria*. Analytical Biochemistry, 327(1):135–139, 2004.
- [145] YAMANAKA, K.: *Cold shock response in Escherichia coli*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 1(2):193–202, 1999.
- [146] ZAMAI, L., E. FALCIERI, G. MARHEFKA und M. VITALE: *Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptotic cells in the absence of nucleosomal DNA fragmentation*. Cytometry, 23(4):303–311, 1996.



- Band 1** **Sunder, Matthias:** Oxidation grundwasserrelevanter Spurenverunreinigungen mit Ozon und Wasserstoffperoxid im Rohrreaktor. 1996. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-00-4
- Band 2** **Pack, Hubertus:** Schwermetalle in Abwasserströmen: Biosorption und Auswirkung auf eine schadstoffabbauende Bakterienkultur. 1996. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-01-2
- Band 3** **Brüggenhies, Antje:** Biologische Reinigung EDTA-haltiger Abwässer. 1996. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-02-0
- Band 4** **Liebelt, Uwe:** Anaerobe Teilstrombehandlung von Restflotten der Reaktivfärberei. 1997. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-03-9
- Band 5** **Mann, Volker G.:** Optimierung und Scale up eines Suspensionsreaktorverfahrens zur biologischen Reinigung feinkörniger, kontaminierter Böden. 1997. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-04-7
- Band 6** **Boll Marco:** Einsatz von Fuzzy-Control zur Regelung verfahrenstechnischer Prozesse. 1997. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-06-3
- Band 7** **Büscher, Klaus:** Bestimmung von mechanischen Beanspruchungen in Zweiphasenreaktoren. 1997. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-07-1
- Band 8** **Burghardt, Rudolf:** Alkalische Hydrolyse – Charakterisierung und Anwendung einer Aufschlußmethode für industrielle Belebtschlämme. 1998. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-13-6
- Band 9** **Hemmi, Martin:** Biologisch-chemische Behandlung von Färbereiabwässern in einem Sequencing Batch Process. 1999. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-14-4
- Band 10** **Dziallas, Holger:** Lokale Phasengehalte in zwei- und dreiphasig betriebenen Blasensäulenreaktoren. 2000. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-15-2
- Band 11** **Scheminski, Anke:** Teiloxidation von Faulschlamm mit Ozon. 2001. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-16-0
- Band 12** **Mahnke, Eike Ulf:** Fluidodynamisch induzierte Partikelbeanspruchung in pneumatisch gerührten Mehrphasenreaktoren. 2002. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-17-9

- Band 13** **Michele, Volker:** CDF modeling and measurement of liquid flow structure and phase holdup in two- and three-phase bubble columns. 2002. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-18-7
- Band 14** **Wäsche, Stefan:** Einfluss der Wachstumsbedingungen auf Stoffübergang und Struktur von Biofilmsystemen. 2003. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-19-5
- Band 15** **Krull Rainer:** Produktionsintegrierte Behandlung industrieller Abwässer zur Schließung von Stoffkreisläuren. 2003. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-20-9
- Band 16** **Otto, Peter:** Entwicklung eines chemisch-biologischen Verfahrens zur Reinigung EDTA enthaltender Abwässer. 2003. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-21-7
- Band 17** **Horn, Harald:** Modellierung von Stoffumsatz und Stofftransport in Biofilmsystemen. 2003. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-22-5
- Band 18** **Mora Naranjo, Nelson:** Analyse und Modellierung anaerober Abbauprozesse in Deponien. 2004. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-23-3
- Band 19** **Döpfkens, Eckart:** Abwasserbehandlung und Prozesswasserrecycling in der Textilindustrie. 2004. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-24-1
- Band 20** **Haarstrick, Andreas:** Modellierung millieugesteuerter biologischer Abbauprozesse in heterogenen problembelasteten Systemen. 2005. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-27-6
- Band 21** **Baaß, Anne-Christina:** Mikrobieller Abbau der Polyaminopolycarbonsäuren Propylendiamintetraacetat (PDTA) und Diethylentriaminpentaacetat (DTPA). 2004. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-26-8
- Band 22** **Staudt, Christian:** Entwicklung der Struktur von Biofilmen. 2006. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-28-4
- Band 23** **Pilz, Roman Daniel:** Partikelbeanspruchung in mehrphasig betriebenen Airlift-Reaktoren. 2006. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-29-2
- Band 24** **Schallenberg, Jörg:** Modellierung von zwei- und dreiphasigen Strömungen in Blasensäulenreaktoren. 2006. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-30-6
- Band 25** **Enß, Jan Hendrik:** Einfluss der Viskosität auf Blasensäulenströmungen. 2006. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-31-4

- Band 26 Kelly, Sven:** Fluidodynamischer Einfluss auf die Morphogenese von Biopellets filamentöser Pilze. 2006. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-32-2
- Band 27 Grimm, Luis Hermann:** Sporenaggregationsmodell für die submerse Kultivierung koagulativer Myzelbildner. 2006. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-33-0
- Band 28 León Ohl, Andrés:** Wechselwirkungen von Stofftransport und Wachstum in Biofilmsystemen. 2007. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-34-9
- Band 29 Emmler, Markus:** Freisetzung von Glucoamylase in Kultivierungen mit *Aspergillus niger*. 2007. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-35-7
- Band 30 Leonhäuser, Johannes:** Biotechnologische Verfahren zur Reinigung von quecksilberhaltigem Abwasser. 2007. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-36-5
- Band 31 Jungebloud, Anke:** Untersuchung der Genexpression in *Aspergillus niger* mittels Echtzeit-PCR. 1996. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-37-2
- Band 32 Hille, Andrea:** Stofftransport und Stoffumsatz in filamentösen Pilzpellets. 2008. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-38-9
- Band 33 Fürch, Tobias:** Metabolic characterization of recombinant protein production in *Bacillus megaterium*. 2008. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-39-6
- Band 34 Grote, Andreas Georg:** Datenbanksysteme und bioinformatische Werkzeuge zur Optimierung biotechnologischer Prozesse mit Pilzen. 2008. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-40-120
- Band 35 Möhle, Roland Bernhard:** An Analytic-Synthetic Approach Combining Mathematical Modeling and Experiments – Towards an Understanding of Biofilm Systems. 2008. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-41-9
- Band 36 Reichel, Thomas:** Modelle für die Beschreibung des Emissionsverhaltens von Siedlungsabfällen. 2008. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-42-6
- Band 37 Schultheiss, Ellen:** Charakterisierung des Exopolysaccharids PS-EDIV von *Sphingomonas pituitosa*. 2008. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-43-3
- Band 38 Dreger, Michael Andreas:** Produktion und Aufarbeitung des Exopolysaccharids PS-EDIV aus *Sphingomonas pituitosa*. 1996. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-44-0

- Band 39** **Wiebels, Cornelia:** A Novel Bubble Size Measuring Technique for High Bubble Density Flows. 2009. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-45-7
- Band 40** **Bohle, Kathrin:** Morphologie- und produktionsrelevante Gen- und Proteinexpression in submersen Kultivierungen von *Aspergillus niger*. 2009. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-46-2
- Band 41** **Fallet, Claas:** Reaktionstechnische Untersuchungen der mikrobiellen Stressantwort und ihrer biotechnologischen Anwendungen. 2009. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-47-1
- Band 42** **Vetter, Andreas:** Sequential Co-simulation as Method to Couple CFD and Biological Growth in a Yeast. 2009. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-48-8
- Band 43** **Jung, Thomas:** Einsatz chemischer Oxidationsverfahren zur Behandlung industrieller Abwässer. 2010. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-49-5
- Band 45** **Herrmann, Tim:** Transport von Proteinen in Partikeln der Hydrophoben Interaktions Chromatographie. 2010. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-51-8
- Band 46** **Becker, Judith:** Systems Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* towards improved Lysine Production. 2010. Cuvillier Verlag · Göttingen, ISBN 978-3-86955-426-6
- Band 47** **Melzer, Guido:** Metabolic Network Analysis of the Cell Factory *Aspergillus niger*. 2010. Cuvillier Verlag · Göttingen, ISBN 978-3-86955-456-3
- Band 48** **Bolten J., Christoph:** Bio-based Production of L-Methionine in *Corynebacterium glutamicum*. 2010. Cuvillier Verlag · Göttingen, ISBN 978-3-86955-486-0
- Band 49** **Lüders, Svenja:** Prozess- und Proteomanalyse gestresster Mikroorganismen. 2010. Cuvillier Verlag · Göttingen, ISBN 978-3-86955-435-8
- Band 50** **Wittmann, Christoph:** Entwicklung und Einsatz neuer Tools zur metabolischen Netzwerkanalyse des industriellen Aminosäure-Produzenten *Corynebacterium glutamicum*. 2010. Cuvillier Verlag · Göttingen, ISBN 978-3-86955-445-7

- Band 51 Edlich, Astrid:** Entwicklung eines Mikroreaktors als Screening-Instrument für biologische Prozesse. 2010. Cuvillier Verlag · Göttingen, ISBN 978-3-86955-470-9
- Band 52 Hage, Kerstin:** Bioprozessoptimierung und Metabolomanalyse zur Proteinproduktion in *Bacillus licheniformis*. 2010. Cuvillier Verlag · Göttingen, ISBN 978-3-86955-578-2
- Band 53 Kiep, Katina Andrea:** Einfluss von Kultivierungsparametern auf die Morphologie und Produktbildung von *Aspergillus niger*. 2010. Cuvillier Verlag · Göttingen, ISBN 978-3-86955-632-1
- Band 54 Fischer, Nicole:** Experimental investigations on the influence of physico-chemical parameters on anaerobic degradation in MBT residual waste. 2011. Cuvillier Verlag · Göttingen, ISBN 978-3-86955-679-6



