



Friederike Schädel (Autor)
Stressantwort von Mikroorganismen



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/355>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

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 μm lang, stäbchenförmig und durchmessen 0,5 bis 1,0 μm . 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 μm 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 Virussyntese durch Jacob, Lwoff und Monod, für den sie 1965 den Nobelpreis erhielten. Trotz dieser langen Forschungszeit überrascht *E. coli* noch

1 Einleitung

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 vielversprechendste 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 (α Untereinheit); *pfk2Δ* - Phosphofruktokinase (β 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

1 Einleitung

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 Kaffeeconsum (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 β -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 α -Synuclein vorgeschlagen [142].

Durch die Blockade der 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 β -Ketoestern aus. In Kombination mit β -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 Inhibierung 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. $1,0 \text{ mM s}^{-1}$ und zytosolisches ATP mit ca. $1,5 \text{ mM s}^{-1}$ 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, Säugtiersperma und bestimmte Mikroorganismen. Jedoch wurde das Kälteschockphänomen schließlich in einem breiten Spektrum von Zellen beobachtet, was

1 Einleitung

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 %tigem 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 Zellyse 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 Umsatzrate. 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-

1 Einleitung

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 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 Methanollösungen 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].