

**Systembiologische Untersuchungen zur Optimierung mikrobieller
Produzenten schwefelhaltiger Aminosäuren**

DISSERTATION

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

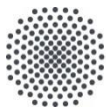
Attila Teleki

aus Stuttgart

Hauptberichter: Prof. Dr.-Ing. Ralf Takors

Mitberichter: Prof. Dr. Georg Sprenger

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2016



Universität Stuttgart

(University of Stuttgart, Germany)

Institut für Bioverfahrenstechnik

(Institute for Biochemical Engineering)

2016

Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel:

*„Systembiologische Untersuchungen zur Optimierung mikrobieller Produzenten
schwefelhaltiger Aminosäuren“*

selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe; aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Stuttgart, den 09.12.2016

(Attila Teleki)

„Und umzuschaffen das Geschaffene,
Damit sich´s nicht zum Starren waffne,
wirkt ewiges lebendiges Tun.
Und was nicht war, nun will es werden
Zu reinen Sonnen, farbigen Erden,
In keinem Falle darf es ruhn.

Es soll sich regen, schaffend handeln,
Erst sich gestalten, dann verwandeln;
Nur scheinbar steht´s Momente still.
Das Ewige regt sich fort in allen:
Denn alles muss ins Nichts zerfallen,
Wenn es im Sein beharren will.“

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

INHALTSVERZEICHNIS

1	Abbildungsverzeichnis	XIII
2	Tabellenverzeichnis	XVII
3	Abkürzungsverzeichnis	XIX
4	Zusammenfassung	1
5	Abstract	3
6	Motivation und Zielsetzung	5
7	Theoretische Grundlagen	7
7.1	Die Aminosäure Methionin	7
7.1.1	Methionin im zellulären Stoffwechsel	7
7.1.2	Verwendung und Produktion von Methionin	9
7.2	Grundlagen des Stoffwechsels in <i>Escherichia coli</i>.....	14
7.2.1	Zentralstoffwechsel	14
7.2.2	Reduktive Schwefelassimilation und L-Cystein-Synthese	17
7.2.3	C ₁ -Stoffwechsel.....	18
7.2.4	L-Methionin-Synthese	19
7.2.5	Regulation der Methionin-Synthese.....	22
7.2.5.1	Regulation auf allosterischer Ebene	22
7.2.5.2	Regulation auf transkriptioneller Ebene.....	24
7.3	Metabolomik	24
7.3.1	Intrazelluläre Metabolomanalysen	26
7.3.2	LC-Tandem-MS-basierte intrazelluläre Analytik.....	27
7.3.2.1	Elektrospray-Ionisierung.....	29
7.3.2.2	Triple Quadrupol-Tandem-Massenspektrometrie	31
7.4	Stimulus-Response-Experimente (SRE)	33
7.4.1	Metabolische Stimuli innerhalb intrazellulärer Stoffwechsel-Netzwerke	34
7.4.2	Intrazelluläre Probennahmestrategien	37
7.4.3	Datenauswertung im Rahmen der Metabolischer Kontrollanalyse (MCA).....	40

8	Material und Methoden	42
8.1	Produktionsstamm.....	42
8.2	Medien und Reinheit	44
8.3	Stammhaltung	47
8.4	Kultivierung im Schüttelkolben	47
8.4.1	Medienzubereitung	48
8.4.2	Supplementierungsexperimente	48
8.4.3	Stimulierungsexperimente	49
8.4.4	Stimulus-Response-Experimente.....	49
8.5	Kultivierung im Bioreaktor	50
8.5.1	Stimulus-Response-Experimente im 30-L-Rührkesselreaktor	51
8.5.2	Stimulus-Response-Experimente im 2,5-L-Rührkesselreaktor	53
8.6	Bestimmung der Biomassekonzentration	55
8.7	Materialien für analytische Methoden	56
8.8	Extrazelluläre Analytik	56
8.8.1	Extrazelluläre Probennahme	56
8.8.2	Quantifizierung mittels RPLC (RP-HPLC).....	56
8.8.3	Quantifizierung mittels Ionenaustauschchromatographie	59
8.8.4	Quantifizierung mittels Biosensorik	59
8.9	Intrazelluläre Analytik.....	60
8.9.1	Intrazelluläre Probennahme	60
8.9.1.1	Cold Methanol Quenching	60
8.9.1.2	Fast Centrifugation Treatment	61
8.9.2	Extraktion intrazelluläre Metabolite	61
8.9.2.1	Chloroformaufschluss	61
8.9.2.2	Heißwasser-Extraktion.....	62

8.9.3	Quantifizierung mittels LC-MS/MS.....	63
8.9.3.1	HILIC Chromatographie.....	63
8.9.3.2	Agilent 6410B Triple Quadrupol Massenspektrometer.....	65
8.9.4	Etablierung HILIC-ESI-MS/MS.....	66
8.9.4.1	Optimierung chromatographischer Bedingungen.....	66
8.9.4.2	Optimierung der Quellenparameter (ESI).....	67
8.9.4.3	Optimierung metabolit-spezifischer MS/MS Parameter.....	68
8.9.4.4	Methodenvalidierung HILIC-ESI-MS/MS.....	70
8.9.4.5	Quantifizierung in <i>E. coli</i> Metabolomextrakten.....	70
8.9.5	Quantifizierung intrazellulärer Metabolite der L-Met-Synthese.....	72
8.9.5.1	Alkalische HILIC-ESI-MS/MS.....	72
8.9.5.2	Derivatsierungsstrategien für L-Cystein und L-Homocystein.....	75
8.9.5.3	¹³ C Massenisotopomeranalysen.....	76
8.10	Analytische Quantifizierungsstrategien.....	78
8.10.1	Externe Kalibrierung.....	78
8.10.2	Methode des internen Standards.....	78
8.10.3	Isotopen-Verdünnungs-Massenspektrometrie.....	79
8.10.4	Standardaddition (Interne Kalibrierung).....	79
8.10.5	Methodische Fehlerbestimmung Standardaddition.....	80
8.11	Berechnung spezifischer Raten und Ausbeuten.....	81
8.11.1	Spezifische Wachstumsraten.....	81
8.11.2	Spezifische Ausbeuten.....	82
8.11.3	Spezifische Aufnahme- und Syntheseraten.....	82
8.12	Daten-Analyse (MCA).....	83
8.12.1	MCA Parameter.....	84
8.12.2	Kinetisches Modell basierend auf dem LinLog Ansatz.....	85
8.12.3	PEC Analyse (Pool Efflux Capacity).....	87
8.12.4	Umsatzzeiten Metabolitpools.....	88
8.12.5	Informationsreichhaltigkeit instationärer Datensätze.....	89

9	Resultate und Diskussion	91
9.1	Entwicklung und Validierung einer intrazellulären Metabolomanalytik.....	91
9.1.1	Chromatographische Trennleistung	92
9.1.2	Linearitätsbereiche, Bestimmungsgrenzen und Stabilität unters. Analyten....	95
9.1.3	ESI-MS-Responsivität unter alkalischen und sauren Bedingungen	99
9.1.4	Quantifizierung in bakteriellen Metabolomextrakten	104
9.1.5	Alkalische HILIC-ESI-MS/MS für intrazelluläre Metabolomanalysen	106
9.2	Entwicklung von alternativen SRE innerhalb des Met-SW von <i>E. coli</i> SPOT01 ...	108
9.2.1	Evaluierung intrazellulärer Probennahme-Strategien.....	108
9.2.2	Entwicklung adaptierter Perturbationsstrategien.....	111
9.2.3	Initiale Stimulus-Response-Studien.....	117
9.2.4	Perturbations- und Probennahmestrategien in SRE.	121
9.3	Stimulus-Response-Experimente in Fed-Batch Kultivierungen.....	123
9.3.1	Stimulus-Response-Experimente im 30-L-Rührkesselreaktor	124
9.3.2	LC-MS-basierte Messung intrazellulärer Konzentrationen	127
9.3.2.1	Langfristiger Verlauf intrazell. Gleichgewichtskonzentrationen	128
9.3.2.2	Stimulus-induzierte intrazelluläre Perturbationsprofile.....	134
9.4	Daten-Analyse von SRE unter Verwendung von [U¹²C]-L-Serin	137
9.4.1	Metabolische Kontrollanalyse (MCA) anhand des LinLog Ansatzes.....	137
9.4.2	Metabolische Kontrollanalyse (MCA) anhand des PEC Ansatzes.....	143
9.4.3	Metabolische Kontrollanalyse für die rationale Stammentwicklung	146
9.5	Alternative Stimulus-Response-Experimente in Batch Kultivierungen	150
9.5.1	Stimulus-Response-Experimente im 2,5-L-Rührkesselreaktor.....	150
9.5.2	LC-MS-basierte Messung intrazellulärer Konz. (Massenisotopomere).....	152
9.5.2.1	Verteilung des ¹³ C-Markierungssignals innerhalb des L-Met-SW	152
9.5.2.2	Stimulus-induzierte instationäre Positionsisotopomere.....	155
9.5.2.3	Bilanzierung der initialen Verteil. des vollmark. Stimulussubstrats... ..	158
9.6	Datenanalyse von SRE unter Verwendung [U¹³C]-L-Serin	162
9.7	Metabolische Situation in <i>E. coli</i> SPOT01	165

10	Literatur	168
11	Danksagung	185
12	Anhang	187
12.1	MRM-Chromatogramme des untersuchten Spektrums (HILIC-ESI-MS/MS)	187
12.2	Stabilitätsanalysen des untersuchten Metabolitspektrums (HILIC-ESI-MS/MS) ...	189

1 Abbildungsverzeichnis

7.1	<i>L-Met-Transmethylierungszyklus und reverse Transsulfurierung in Vertebraten</i>	9
7.2	<i>Chemische Synthese von DL-Methionin nach dem Evonik-Verfahren</i>	11
7.3	<i>Schematische Darstellung zur enzym. Razemattrennung von DL-Aminosäuren</i>	12
7.4	<i>Die Glykolyse (EMP-Weg) in E. coli</i>	14
7.5	<i>Der oxidative und nicht-oxidative Pentosephosphatweg (PPP) in E. coli</i>	15
7.6	<i>Der Citratzyklus (Tricarboxylic acid cycle, TCA) und C₃/C₄-Stoffwechsel (Anaplerose) in E. coli unter aeroben Bedingungen</i>	16
7.7	<i>Die reduktive Schwefelassimilation in E. coli anhand von Sulfat und Thiosulfat</i>	17
7.8	<i>Der C₁-Metabolismus und Regeneration des Tetrahydrofolats in E. coli anhand für die L-Methionin-Synthese relevanter Stoffwechselwege</i>	19
7.9	<i>De novo Synthese von L-Methionin in E. coli mit Glucose als C-Quelle und Sulfat bzw. Thiosulfat als S-Quelle unter aeroben Bedingungen</i>	20
7.10	<i>Wichtige allosterische und transkriptionelle Regulationswege der L-Met-Synthese unter Berücksichtigung des globalen Methionin-Repressors MetJ in E. coli</i>	23
7.11	<i>Schematischer Aufbau der eingesetzten LC-ESI-TripleQuad-MS/MS-Anlage</i>	29
7.12	<i>Schematischer Aufbau der eingesetzten Elektrospray-Ionisierungsquelle (ESI)</i>	30
7.13	<i>Schematischer Aufbau des eingesetzten Triple Quad MS/MS-Komplexes</i>	33
7.14	<i>Relaxationszeiten unterschiedlicher zellulärer Antwortmechanismen nach erfolgter metabolischer Perturbation</i>	35
7.15	<i>Konzentrationsanreicherungsprofile innerhalb metabolischer Perturbationsexp.</i>	37
8.1	<i>Genetische Modifikationen im Produktionsstamm E. coli SPOT01</i>	44
8.2	<i>Intra- und extrazell. Probennahmen innerhalb Perturbationsphasen von SRE I-III</i>	53
8.3	<i>Intra- und extrazell. Probennahmen innerhalb Perturbationsphase von SRE IV</i>	54
8.4	<i>RPLC-Chromatogramm (FLD) einer Aminosäure-Standard-Mischung (400 µM)</i>	58
8.5	<i>Retentionsmechanismen geladener bzw. polarer Analyten innerhalb von polymerbasierten zwitterionischen HILIC-Phasen (ZIC-pHILIC)</i>	64
8.6	<i>MRM-Ionenchromatogramm von Metabolitstandards der L-Met-Synthese</i>	73
8.7	<i>Absolute Quantifizierung von L-Methionin mittels Standardaddition</i>	74
8.8	<i>Carboxymethylierung von L-Cystein mit Iodessigsäure unter red. Bedingungen</i>	75

9.1	<i>Einfluss des pH-Werts auf das Analyten-Peakverhalten (ZIC-pHILIC).</i>	94
9.2	<i>Chromatographische Trennung isobarer Analyten unter alkalischen und sauren Bedingungen (ZIC-pHILIC)</i>	95
9.3	<i>ESI-MS Responsivitätsverh. standard-basierter Kalibrierreihen (0,5-200 μM) exempl. Metabolite unter alkalischen Bed. (pH 9,2) der mobilen Phase (ZIC-pHILIC).</i>	97
9.4	<i>Einteilung untersuchter Metabolite anhand erzielbarer methodischer Detektionslimits (MDL) unter alkalischen und sauren Bed. der mobilen Phase (ZIC-pHILIC)</i>	98
9.5	<i>Einfluss des pH-Werts auf analyt-spezifische ESI-MS-Responsivitäten (ZIC-pHILIC)</i>	99
9.6	<i>Absolute intrazelluläre Konzentrationen ausgewählter Metabolite in E. coli K12 MG1655 Biomassen anhand drei verschiedener Quantifizierungsstrategien</i>	104
9.7	<i>Quantifizierung des kältebasierten metabolit-spez. Leakage-Effekts CMQ-basierter intrazell. Probennahmen innerhalb eines Fed-Batch-Prozess von E. coli SPOT01.</i>	109
9.8	<i>Schematische Darstellung des L-Methionin-Synthesenetzwerks in E. coli SPOT01 mit topologischer Lage potentieller netzwerk-inhärenter Stimulus-Substrate</i>	113
9.9	<i>Kultivierungsverläufe sowie biomassespezifische Aufnahmeraten von L-Ser, L-Asp und L-HSer innerhalb von Stimulierungsexperimenten von E. coli SPOT01</i>	114
9.10	<i>Initiale Stimulus-Response-Studien unter Verwendung des alternativen Stimulus-substrats L-Serin innerhalb unlim. Kultivierungsbedingungen von E. coli SPOT01</i>	118
9.11	<i>Intrazelluläre Konzentrationsdynamiken exempl. Metabolite des L-Met-Netzwerks innerhalb von L-Serin-basierten Stimulus-Response-Studien von E. coli SPOT01</i>	121
9.12	<i>Kultivierungsverläufe sowie extrazelluläre Substrat- und Produkttiter durchgeführter Stimulus- Response-Experimente (SRE I-III) innerhalb drei verschiedener Prozessphasen einer Fed-Batch-Fermentation von E. coli SPOT01</i>	125
9.13	<i>Verlauf intrazell. Gleichgewichtskonzentration von Metaboliten des L-Met-Synthesenetzwerks innerhalb einer Fed-Batch-Fermentation (14 h) von E. coli SPOT01.</i>	129
9.14	<i>MS/MS-Parameter zur relativen Quantifizierung des Thioethers LL-Homolanthionin unter Aufführung des analogen Fragmentierungsverhaltens von L-Homocystein</i>	131
9.15	<i>Metabolische Situation der L-Methionin-Synthese in E. coli SPOT01 unter Berücksichtigung des L-Homocystein/LL-Homolanthionin-Akkumulationszyklus</i>	133
9.16	<i>Stimulus-induzierte Perturbationsprofile von Metaboliten des L-Methionin-Synthesenetzwerks aus SRE I innerh. von Fed-Batch-Fermentationen von E. coli SPOT01</i>	134

9.17	<i>Stimulus-induzierte Perturbationsprofile von Metabolite des L-Methionin-Synthesenetzwerks aus SRE II innerh. von Fed-Batch-Fermentationen von E. coli SPOT01</i>	135
9.18	<i>Stimulus-induzierte Perturbationsprofile von Metaboliten des L-Methionin-Synthesenetzwerks aus SRE III innerh. von Fed-Batch-Fermentationen von E. coli SPOT01</i>	136
9.19	<i>Lineare Reaktionssequenz zur L-Methionin-Synthese aus L-Serin (EMP-Weg)</i>	138
9.20	<i>Interpolationsfunktionen gemessener instationärer Metabolitkonzentrationen und berechnete LinLog-Modellverläufe innerhalb der Stimulusphasen von SRE I-III</i>	141
9.21	<i>Standardisierte Poolgeschwindigk. innerh. der Perturbationsphasen von SRE I-III ...</i>	144
9.22	<i>Ermittelte PEC-Werte (maximale Netto-Ausflussraten) innerhalb von SRE I-III perturbierter intrazellulärer Metabolitpools</i>	145
9.23	<i>Kultivierungsverlauf sowie extrazell. Titer des durchgeführten Stimulus-Response-Experiments (SRE IV) innerh. einer Batch-Fermentation von E. coli SPOT01</i>	151
9.24	<i>Schematische Darstellung des L-Met-Synthesenetzwerks in E. coli SPOT01 unter Berücksichtigung der Signalverteilung des Stimulussubstrats [$U^{13}C$]-L-Serin</i>	153
9.25	<i>Perturbationsprofile nicht-markierter sowie markierter Metabolitpools des L-Met-Synthesenetzwerks aus SRE IV einer Batch-Fermentation von E. coli SPOT01.....</i>	157
9.26	<i>Biomassespezifische Aufnahmerate von [$U^{13}C$]-L-Ser und Bildungsrate von [$5-^{13}C_1$]-L-Met innerhalb der Perturbationsphase von SRE IV</i>	159
9.27	<i>Initiale Verteilung des vollmarkierten Stimulussubstrats [$U^{13}C$]-L-Serin innerhalb des L-Methionin-Reaktionsnetzwerks zum Perturbationszeitpunkt ($\Delta t=25$ s).....</i>	161
9.28	<i>Ermittelte PEC-Werte innerhalb SRE IV perturbierter und aufsummierter markierter und nicht-markierter Metabolitpools</i>	162
9.29	<i>Ermittelte PEC-Werte innerhalb SRE IV perturbierter ^{13}C-markierter Metabolitpools unter Normalisierung mit analogen nicht-markierten $U^{12}C$-Poolkonzentrationen....</i>	163
9.30	<i>Metabolisches Szenario innerhalb des L-Methionin-Synthesenetzwerks in E. coli SPOT01 unter produktionsnahen unlimitierten Kultivierungsbedingungen.....</i>	167
12.1	<i>MRM-Chromatogramme des untersuchten Metabolitspektrums anhand der entwickelten HILIC-ESI-MS/MS-Methode unter alkalischen Bedingungen (pH 9,2) ..</i>	187
12.2	<i>MRM-Chromatogramme des untersuchten Metabolitspektrums anhand der entwickelten HILIC-ESI-MS/MS-Methode unter sauren Bedingungen (pH 5,6)</i>	188

12.3	<i>Messtabilität (0,7,14,21 h) untersuchter Metabolite (neg. Ionisierungsmodus, ESI-) anhand der entwickelten HILIC-ESI-MS/MS-Methode unter alkalischen Bed.</i>	189
12.4	<i>Messtabilität (0,7,14,21 h) untersuchter Metabolite (pos. Ionisierungsmodus, ESI+) anhand der entwickelten HILIC-ESI-MS/MS-Methode unter alkalischen Bed.</i>	190

2 Tabellenverzeichnis

7.1	<i>Grundlegende Begriffe der Metabolomik</i>	25
8.1	<i>Übersicht des Genotyps des L-Methionin-Produzenten E. coli SPOT01</i>	42
8.2	<i>Reinheit und Hersteller eingesetzter Supplementierungs- und Stimulierungssubstr. ...</i>	45
8.3	<i>Minimalmedium (WHM) zur Kultivierung von E. coli K12 MG1655 (Wildtyp)</i>	45
8.4	<i>Minimalmedien (EcM) zur Kultivierung von E. coli SPOT01</i>	46
8.5	<i>Abweichende Komponenten in EcM4 Minimalmedien zur Stammhaltung</i>	47
8.6	<i>Zusammensetzung der Zulaufösungen im Fed-Batch-Prozess von E. coli SPOT01</i>	52
8.7	<i>HPLC-System und Chromatographie-Bedingungen der Aminosäure-RPLC</i>	57
8.8	<i>Retentionszeiten (t_R) RPLC-Auftrennung Aminosäuren (ZORBAX® Eclipse Plus C18) ...</i>	58
8.9	<i>LC-ESI-MS/MS-Plattform für die Intrazelluläre Analytik</i>	65
8.10	<i>Optimierte HILIC Chromatographie-Bedingungen (ZIC-pHILIC)</i>	67
8.11	<i>Optimierte globale Quellenparameter (ESI)</i>	67
8.12	<i>MS/MS-Parameter für 62 intrazelluläre Metabolite unter Aufführung zugehöriger MRM-Übergänge für unmarkierte [$U^{12}C$] und vollmarkierte [$U^{13}C$] Analyten</i>	69
8.13	<i>Exempl. Probenansatz für die alkalische HILIC-Chromatographie (ZIC-pHILIC)</i>	72
8.14	<i>Retentionszeiten (t_R) von Metaboliten der L-Met-Synthese (ZIC pHILIC®/ pH 9,2)</i>	74
8.15	<i>Exempl. Probenansatz (Derivatisierung) für die alkalische HILIC-Chromatographie ...</i>	76
9.1	<i>Übersicht Linearitätsbereiche ($\leq 5 \mu M$), Regressionskoeffizienten, methodische Detektionslimits und Retentionszeiten untersuchter Metabolite unter alkalischen (pH 9,2) und sauren Bedingungen (pH 5,6) (1. Teil)</i>	102
9.2	<i>Übersicht Linearitätsbereiche ($\leq 5 \mu M$), Regressionskoeffizienten, methodische Detektionslimits und Retentionszeiten untersuchter Metabolite unter alkalischen (pH 9,2) und sauren Bedingungen (pH 5,6) (2. Teil)</i>	103
9.3	<i>Retentionszeiten, Kalibrierfunktionen und Parameter quantifizierter Metabolite</i>	105
9.4	<i>Wachstumsparameter sowie spezifische Substratausbeuten und Aufnahmezeiten innerhalb von Stimulierungs-Experimenten von E. coli SPOT01</i>	115

9.5	<i>Wachstumsparameter sowie spezifische L-Serin-Substratausbeuten und Aufnahmeraten innerhalb SRE-Studien von E. coli SPOT01</i>	119
9.6	<i>Spezifische Produkt- und Nebenprodukt-Ausbeuten sowie analoge Bildungsraten innerhalb SRE-Studien von E. coli SPOT01</i>	119
9.7	<i>Wachstumsparameter und spezifische Produkt- und Nebenprodukt-Ausbeuten sowie analoge Bildungsraten innerhalb eines SRE-Fed-Batch von E. coli SPOT01</i>	126
9.8	<i>Spezifische L-Serin-Substratausbeuten und Aufnahmeraten von SRE I-III innerhalb eines Fed-Batch-Prozess von E. coli SPOT01</i>	127
9.9	<i>Berechnete Elastizitäten anhand eines LinLog-basierten Modells und SRE I-III inner- halb versch. Prozessphasen einer Fed-Batch-Fermentation von E. coli SPOT01</i>	139
9.10	<i>Berechnete Flusskontrollkoeffizienten (FCC) anhand SRE I-III innerhalb verschiedener Prozessphasen einer Fed-Batch-Fermentation von E. coli SPOT01</i>	142
9.11	<i>Wachstumsparameter und spezifische Produkt- und Nebenprodukt-Ausbeuten sowie analoge Bildungsraten innerhalb eines SRE-Batch (SRE IV) von E. coli SPOT01</i>	151
9.12	<i>Spezifische L-Serin-Substratausbeuten und Aufnahmeraten von SRE IV innerhalb eines Batch Prozesses von E. coli SPOT01</i>	152
9.13	<i>MRM-Übergänge unmarkierter sowie teil- bis vollmarkierter Metabolite des L-Methionin-Synthesenetzwerks unter Umsetzung von vollmark. [U¹³C]-L-Serin</i>	154

3 Abkürzungsverzeichnis

α KB	α -Ketobutyrat
α KG	α -Ketoglutarat
2PG	2-Phosphoglycerat
3PG	3-Phosphoglycerat
3P-HPyr	3-Phospho-Hydroxypyruvat
3PS	3-Phosphoserin
6PG	6-Phosphogluconat
Abb.	Abbildung
AC	Wechselstrom
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
AHCY	S-Adenosylhomocystein Hydrolase
AIBA	α -Aminoisobutyrat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BHMT	Betain-Homocystein-Methyltransferase
BTM	Biotrockenmasse
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
cAMP	cyklisches Adenosin-Monophosphat
CBS	Cystathionin- β -Synthase
CCC	Konzentrationskontrollkoeffizient
CDP	Cytosindiphosphat
CE	Kollisionsenergie
CE	Kapillarelektrophorese
CER	Carbon Dioxide Emitting Rate
CGL	Cystathionin- γ -Lyase
CID	Collision-Induced Dissociation
cis-Aco	cis-Aconitat
Cit	Citrat
CMP	Cytosinmonophosphat

CO ₂	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
CTP	Cytosintriphosphat
c _x	Biotrockenmasse-Konzentration
D	Dextro
D	Deutschland
Da	Dalton
DAD	Diodenarraydetektor
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
DC	Gleichstrom
DHAP	Dihydroxyaceton-Phosphat
DO	Dissolved Oxygen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E4P	Erythrose-4-Phosphat
EC	Energy Charge
EcM	<i>Escherichia coli</i> Minimalmedien
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIC	Extracted Ion Current
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas-Weg
EPN	Extrazelluläre Probennahmen
ESI	Elektrospray-Ionisierung
ESI-	Elektrospray-Ionisierung (negativer Modus)
ESI+	Elektrospray-Ionisierung (positiver Modus)
F	Fragmentorspannung
F6P	Fructose-6-Phosphat
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid (oxidiert)
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
FbP	Fructose-1,6-bis-Phosphat
FCC	Flusskontrollkoeffizient
FCT	Fast Centrifugation Treatment
FHWM	full width at half-maximum height
FLD	Fluoreszenzdetektor

XX

Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonylchlorid
Fum	Fumarat
G6P	Glucose-6-Phosphat
GABA	γ -Aminobutyrat
GAP	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat
GC	Gaschromatographie
GCV	Glycine Cleavage System
GDP	Guanosindiphosphat
Gl.	Gleichung
Gly	Glycin
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HCl	Salzsäure
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
Hlan	Homolanthionin
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HWE	Hot Water Extraction
i.R.	in der Regel
IDMS	Isotopen-Verdünnungs-Massenspektrometrie
IPN	Intrazelluläre Probennahmen
IsoCit	Isocitrat
IST	Interner Standard
Kap.	Kapitel
KOH	Kalilauge
L	Levo
L-Ala	L-Alanin
L-Arg	L-Arginin
L-Asn	L-Asparagin
L-Asp	L-Aspartat

LB	Lysogeny Broth Medium
LC	Flüssigchromatographie
L-Cys	L-Cystein
L-Cysth	L-Cystathionin
L-Gln	L-Glutamin
L-Glu	L-Glutamat
L-HCys	L-Homocystein
L-His	L-Histidine
L-HSer	L-Homoserin
L-Ile	L-Isoleucin
LinLog	Linear-Logarithmisch
L-Leu	L-Leucin
L-Lys	L-Lysin
L-Met	L-Methionin
L-Nva	L-Norvalin
L-Phe	L-Phenylalanin
L-Pro	L-Prolin
L-Ser	L-Serin
L-Thr	L-Threonin
L-Trp	L-Tryptophan
L-Val	L-Valin
M	Molar
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
Mal	Malat
MAT	Methionin-Adenosyltransferase
max.	maximal
MCA	Metabolic Control Analysis
MDL	Methodische Detektionslimits
MPA	Mercaptopropionat
min	Minute
min.	minimal
mM	milimolar

MPA	Mercaptopropionat
MRM	Multiple-Reaction-Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MS	Methionin-Synthase
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (reduziert)
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduziert)
NH ₃	Ammoniak
NH ₄ ⁺	Ammonium-Ion
nM	nanomolar
NP	Normalphase
NPLC	Normalphasen-Flüssigchromatographie
O ₂	Sauerstoff
O-Ac-Ser	O-Acetylserin
OD600	Optische Dichte (600 nm)
OPA	ortho-Phtahldialdehyd
OSHS	O-Succinyl-L-Homoserin
OUR	Oxygen Uptake Rate
PEC	Pool Efflux Capacity
PEP	Phosphoenolpyruvat
pM	picomolar
PPP	Pentose-Phosphat-Weg
psi	per square inch
PTS	Phosphotransferasesystem
Quad	Quadrupol
R5P	Ribose-5-Phosphat
RI	Refraktionsindex
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase

RPLC	Umkehrphasen-Flüssigchromatographie
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
Ru5P	Ribulose-5-Phosphat
s	Sekunde
S ²⁻	Sulfid-Anion
SAH	S-Adenosyl-L-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SI	Soft-Ionisierung
SRE	Stimulus-Response-Experimente
Suc	Succinat
Std	Standard
SW	Stoffwechsel
SO ₄ ²⁻	Sulfat-Anion
SO ₃ ²⁻	Sulfit-Anion
T	Temperatur
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TBA	Tributylamin
TCA	Citratcyklus
THF	Tetrahydrofolat
S ₂ O ₃ ²⁻	Thiosulfat-Anion
TLC	Dünnschichtchromatographie
TripleQuad	Dreifach-Quadrupol
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	uniform
ü. N.	über Nacht
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
UTP	Uridintriphosphat
V	Volt
var.	variabel

VE	vollentsalzt
Vitamin B ₁₂	Cobalumin
vgl.	vergleich
vv ⁻¹	volume per volume
wv ⁻¹	weight per volume
ww ⁻¹	weight per weight
WWR	Wrong-Way-Round-Ionization
Xu5P	Xylulose-5-Phosphat
z.B.	zum Beispiel
ZIC-pHILIC	zwitterionic polymerbased Hydrophilic Interaction Liquid Chrom.
μ	Wachstumsrate
μM	mikromolar

4 Zusammenfassung

Die schwefelhaltige und essentielle Aminosäure L-Methionin besitzt vor allem aufgrund ihres Einsatzes zur Supplementierung von pflanzlichem Tierfutter eine enorme wirtschaftliche Bedeutung. Der globale Jahresbedarf wird auf ca. 1.000.000 Tonnen geschätzt und weist angesichts eines ansteigenden Fleischbedarfs, insbesondere in Schwellenländern, stabile jährliche Wachstumsraten von ca. 5-6% auf. Methionin wird derzeit nahezu ausschließlich durch chemische Synthese (Evonik-Verfahren) als DL-Razemat hergestellt. Ein moderner biotechnologischer Prozess würde eine nachhaltige Alternative zu bisher petrochemisch-basierten Verfahren darstellen und bietet das Potential einer erheblichen Kostensenkung, höherer Substratflexibilität sowie der Herstellung von enantiomer-reinem L-Methionin. Eine Überproduktion von L-Methionin stellt allerdings aufgrund der Komplexität zugrundeliegender Stoffwechselwege, einer strikten zellulären Regulation und eines vergleichsweise hohen energetischen Syntheseaufwands innerhalb gängiger mikrobieller Plattformen eine große Herausforderung dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels systembiologischer Ansätze ein durch die Evonik Industries AG bereitgestellter Modellproduzent (*E. coli* SPOT01) auf Potentiale zu einer gezielten Methionin-Überproduktion untersucht. Rationale Stammoptimierungen basieren auf systematische genetische Modifikationen und setzen ein dynamisch-quantitatives Verständnis zugrundeliegender intrazellulärer Stoffwechselnetzwerke voraus (*Systems Metabolic Engineering*). Innerhalb zielgerichteter metabolischer Perturbationsanalysen können Kontrolleinflüsse beteiligter Enzyme auf die zu optimierenden Zielflüsse auf systemischer Ebene quantifiziert werden (*Metabolic Control Analysis*). Derartige Ansätze erfordern eine abgestimmte Anwendung intrazellulärer Metabolomanalysen, adäquater Perturbations- und Probennahmestrategien sowie mathematischer Modellierung. Hierzu wurde eine universelle LC-ESI-MS/MS-Methode entwickelt, die eine sensitive und selektive Quantifizierung eines breiten Spektrums niedermolekularer Metabolite des zellulären Stoffwechsels ermöglicht (*Metabolic Profiling*). In umfangreichen Transportkinetik-Studien konnte anschließend mit L-Serin ein alternatives und netzwerk-inhärentes Stimulussubstrat identifiziert werden, das eine direkte und zielgerichtete Perturbation des L-Methionin-Synthesenetzwerks ermöglicht. Unter Anwendung adaptierter Stimulusszenarien sowie semi-automatisierter Beprobungsstrategien konnten innerhalb produktionsrelevanter

Kultivierungsbedingungen von *E. coli* SPOT01 aussagekräftige Konzentrationsdynamiken fokussierter Metabolitpools erzielt werden. Für die quantitative Auswertung resultierender Perturbationsprofile wurde ein modellbasierter Ansatz unter Verwendung einer nicht-mechanistischen LinLog-Kinetik sowie ein rein datengetriebener Ansatz unter Verwendung des PEC-Kriteriums (*Pool Efflux Capacity*) verfolgt. Insbesondere die PEC-Analyse stellte sich hierbei als zielführender Ansatz heraus, der aufgrund seiner hohen Robustheit auch bei messtechnischen Unsicherheiten valide Aussagen im Rahmen der Kontrollanalyse erlaubt.

Innerhalb unterschiedlicher Perturbationsstudien konnten hierbei übereinstimmend die Cystathionin- β -Lyase (MetC), die Methioninsynthase (MetH/E) und das Methionin-Exportsystem (YjeH) als Enzyme mit hoher Flusskontrolle identifiziert werden. Ermittelte enzymatische Targets zeigten eine hohe Konsistenz mit der abgeleiteten metabolischen Situation innerhalb des Synthesenetzwerks. Aufgrund einer ausgeprägten Akkumulation des Vorläufermetabolits L-Homocystein und eines zunehmenden Übergewichts gegenüber L-Cystein, erfolgt die unspezifische Umsetzung des cytotoxischen Intermediats zum Akkumulationsprodukt LL-Homolanthionin. Der unspezifische Abbau von LL-Homolanthionin führt zur erneuten Bildung von L-Homocystein und stellt den Ausgangspunkt für eine alternative Syntheseroute des Haupt-Nebenprodukts L-Isoleucin dar.

Dieses für die L-Methionin-Synthese höchst unvorteilhafte Akkumulationsszenario (Kohlenstoff- und Energieverlust) konnte letztlich auf ein Ungleichgewicht in der Bereitstellung von L-Aspartat (TCA-Syntheseweg) und L-Serin (EMP-Syntheseweg) zurückgeführt werden. Unter Einsatz des vollmarkierten Stimulussubstrats [$U^{13}C$]-L-Serin konnte der Informationsgehalt resultierender instationärer Datensätze weiter gesteigert werden. Die hohe Flusskontrolle durch die Methioninsynthase (MetH/E) konnte hierbei eindeutig auf eine limitierte Transmethylierungskapazität durch den C_1 -Stoffwechsel zurückgeführt werden. Ein Schlüsselenzym in diesem Zusammenhang stellt die Hydroxymethyltransferase (GlyA) dar, welche unter Umsetzung von L-Serin Methylgruppen für die finale Transmethylierung bereitstellt. Durch eine gezielte Erhöhung der enzymatischen Affinität von GlyA zu seinem Substrat L-Serin kann eine Kompensation des TCA/EMP-Ungleichgewicht unter einer gleichzeitigen Aufhebung des Akkumulationszyklus erfolgen. Der stimulus-induzierte Anstieg der L-Methionin-Bildungsrate verweist hierbei auf eine potentielle Ausbeutesteigerung von ca. 20-30%.

5 Abstract

The sulfurous and essential amino acid L-methionine is of enormous industrial importance, mainly due to its addition to plant-based animal feed products. The annual global demand is estimated at about 1,000,000 tons and the annual growth rates are stable at 5-6%, caused by an increasing need for meat, particularly in developing countries. Currently, methionine is produced exclusively by chemical synthesis as DL-racemate (Evonik procedure). Modern biotechnological processes represent a sustainable alternative to the hitherto existing petrochemical based syntheses and offer the potential of significant cost reduction, higher substrate flexibility and production of enantiopure L-methionine. However, an overproduction of L-methionine in common microbial producers is challenging due to the complexity of underlying metabolic pathways, a strict cellular regulation and comparably high energetic efforts for the synthesis.

In the present study a promising L-methionine producer provided by the Evonik Industries AG (*E. coli* SPOT01) was investigated by systems biology tools triggering product synthesis. Rational strain developments are based on targeted genetic modifications and require an extensive quantitative understanding of corresponding intracellular metabolic networks (*Systems Metabolic Engineering*). In this context, metabolic pulse experiments enable the quantification of control properties of involved enzymes on intracellular target fluxes at a systemic level (*Metabolic Control Analysis*). Such experimental concepts require a concerted application of intracellular metabolome analysis, appropriate pulse and sampling strategies, as well as mathematical modeling. For this purpose, a comprehensive LC-ESI-MS/MS method has been developed for a quantitative analysis of a broad range of common metabolites of the cellular metabolism with high selectivity and sensitivity (*Metabolic Profiling*). Through extensive transport kinetic studies, L-serine has subsequently been identified as an alternative and network-inherent stimulus substrate, allowing a direct and targeted perturbation of the L-methionine synthesis network. Adapted stimulus scenarios and rapid semi-automatized sampling strategies were applied to monitor metabolic dynamics as a function of external stimuli in connection to production-related cultivation conditions of *E. coli* SPOT01. Transient metabolic data were analyzed quantitatively by a non-mechanistic linlog kinetic model and purely data-driven approach using the PEC criterion (*Pool Efflux Capacity*). Especially the PEC

analysis emerges as a straight-forward approach, which enables valid results even in case of metrological uncertainties due to its inherent robustness.

As the result of various perturbation studies, the cystathionine- β -lyase (MetC), the methionine synthase (MetH/E) and the methionine exporter system (YjeH) were identified concurrently as enzymes with high flux control. The determined enzymatic targets show a high consistency with the derived metabolic situation of the investigated reaction network. In this regard, a distinct accumulation of the precursor L-homocysteine and an increasing overweight towards to L-cysteine, results in an unspecific metabolization of the cytotoxic intermediate to the accumulation product LL-homolanthionine. The unspecific degradation of LL-homolanthionine leads to a renewed formation of L-homocysteine and represents the entry point for an alternative synthesis route of the main byproduct L-isoleucine.

This highly unfavorable accumulation scenario concerning the methionine synthesis (loss of carbon and energy) is ultimately based on an imbalance in the supply of L-aspartate (TCA synthesis route) and L-serine (EMP synthesis route). In order to enhance the information content of resulting transient metabolic data, the experimental design was additional adapted by utilization of full labeled [U¹³C]-L-serine as stimulus substrate. The high flux control by the methionine synthase (MetH/E) is certain to being attributed to a limited transmethylation capacity by the C₁ metabolism. In this connection the hydroxymethyltransferase (GlyA) represents a key enzyme which provides the final transmethylation of L-homocysteine with methyl groups by degradation of L-serine. A targeted enhancement of the enzymatic affinity of GlyA to its substrate L-serine could lead to a compensation of the TCA/EMP imbalance and a simultaneous elimination of the accumulation cycle. The stimulus-induced short-term increase of the L-methionine synthesis rate refers to a potential yield improvement of 20-30%.

6 Motivation und Zielsetzung

Aminosäuren besitzen als Bausteine von Proteinen und aufgrund ihrer zahlreichen Funktionen im zellulären Metabolismus aller Lebewesen einen herausragenden Stellenwert. Hinsichtlich ihres Einsatzes in Nahrungsmitteln, für pharmazeutische Anwendungen und vor allem in der Supplementierung von Tierfutter besitzen sie zusätzlich eine enorme wirtschaftliche Bedeutung. Die aktuelle Weltjahresproduktion beläuft sich auf über 6 Millionen Tonnen mit jährlichen Steigerungsraten von 5-10% (Grandviewresearch Report 2015). Ein Grund hierfür ist ihr zunehmender Einsatz in der Futtermittelindustrie. Durch den weltweit ansteigenden Fleischkonsum, speziell in Entwicklungsländern, ist eine effizientere Versorgung der Nutztiere durch abgestimmte Supplementierungsstrategien erforderlich geworden. Insbesondere die essentiellen Aminosäuren Lysin, Tryptophan, Threonin und Methionin (*Feed Amino Acids*) kommen innerhalb der pflanzlichen Futtermittel in vergleichsweise niedrigen Anteilen vor (Leuchtenberger et al. 2005). Vorhandene essentielle Aminosäuren können aber nur entsprechend dem Gehalt der limitierenden Aminosäure verwertet werden (Farkhoy et al. 2012). Während der Großteil der Aminosäuren, darunter auch L-Lysin, L-Threonin und L-Tryptophan inzwischen fermentativ bzw. biokatalytisch synthetisiert werden, sind immer noch chemische Verfahren zur Gewinnung von Glycin und DL-Methionin im Einsatz (Mitsubishi 2014).

In diesem Zusammenhang hat sich die **Evonik Industries AG** zum Ziel gesetzt einen industriellen Zugang zur **mikrobiellen L-Methionin-Synthese** im etablierten **Plattform-Organismus *E. coli*** als nachhaltige Alternative zur bisher petrochemisch-basierten Synthese zu erlangen. Ein wirtschaftlich tragfähiger Zugang zur mikrobiellen Herstellung von L-Methionin mittels eines konventionell entwickelten Produktionsstamms existiert allerdings bisher noch nicht (Willke et al. 2014). Die Überproduktion von L-Methionin stellt hierbei aufgrund der komplexen sowie hierarchisch streng kontrollierten Stoffwechselsituation eine vergleichsweise große Herausforderung dar und erfordert eine systematische Stammentwicklung (Krömer et al. 2006). Derartige Ansätze basieren auf zielgerichtete genetische Modifikationen und setzen ein dynamisch-quantitatives Verständnis zugrundeliegender intrazellulärer Stoffwechselnetzwerke voraus (*Systems Metabolic Engineering*). Metabolische Perturbationsexperimente ermöglichen in diesem Zusammenhang einen direkten Zugang zu *in vivo* Kinetiken beteiligter Enzyme und unterliegenden zellulären Regulationsmechanismen

innerhalb definierter physiologischer Zustände und Zeitpunkte (Buchholz et al. 2002). Im Rahmen **metabolischer Kontrollanalysen** (MCA) können anhand resultierender Konzentrationsdynamiken Kontrolleigenschaften beteiligter Enzyme auf Stoffflüsse und Poolkonzentrationen innerhalb derartiger Reaktionsnetzwerke abgeleitet werden (Stephanopoulos 1999).

In der vorliegenden Arbeit soll ein durch die Evonik Industries AG bereitgestellter rekombinanter *E. coli* Stamm zur Überproduktion von L-Methionin (*E. coli* SPOT01) dynamisch-quantitativ untersucht werden. Im Vordergrund steht zunächst die Entwicklung einer möglichst universellen LC-MS-basierten intrazellulären Metabolomanalytik, die eine sensitive und selektive Quantifizierung niedermolekularer Metabolite des L-Methionin-Synthesenetzwerks sowie benachbarter Stoffwechselwege ermöglicht (*Metabolic Profiling*). Im Anschluss erfolgt die Entwicklung und Optimierung adaptierter metabolischer Stimulus-Response-Experimente innerhalb des anabolen L-Methionin-Stoffwechsels des mikrobiellen Produzenten unter produktionsrelevanten Kultivierungsbedingungen (Batch- und Fed-Batch-Fermentationen). Resultierende dynamische Konzentrationsprofile bilden die Ausgangsbasis für eine umfassende Datenanalyse im Rahmen der Metabolischen Kontrollanalyse. Hierzu wird ein modellbasierter Ansatz unter Verwendung einer nicht-mechanistischen LinLog-Kinetik sowie ein rein datengetriebener Ansatz unter Verwendung des PEC-Kriteriums (*Pool Efflux Capacity*) verwendet. Ziel ist die Ermittlung von *in vivo* Kinetiken und Regulationsmechanismen innerhalb des betrachteten Stoffwechselnetzwerks. Unter zusätzlicher Durchführung von Supplementierungs-, Stimulierungs- sowie Markierungsexperimenten kann somit ein umfassendes Bild der metabolischen Gesamtsituation innerhalb des Produzenten *E. coli* SPOT01 abgeleitet werden. Ermittelte Kontrollkoeffizienten ermöglichen die Bestimmung enzymatischer Targets bzw. Stoffwechselreaktionen die hinsichtlich der L-Methionin-Synthese limitierend sind und bilden somit die Basis für eine rationale Stammentwicklung.

7 Theoretische Grundlagen

7.1 Die Aminosäure Methionin

7.1.1 Methionin im zellulären Stoffwechsel

Die Aminosäure L-Methionin besitzt aufgrund ihrer zahlreichen Funktionen im zellulären Stoffwechsel aller Lebewesen eine große Bedeutung. Neben L-Cystein ist sie die einzige schwefelhaltige proteinogene Aminosäure, wobei das Schwefelatom in Form einer weniger reaktiven Thioethergruppe vorliegt. Trotz ihres vergleichsweise geringen Gesamtanteils (z.B. 2,5% *E. coli* Proteom) stellt sie einen wichtigen Baustein für den Aufbau von Proteinen dar (Neidhardt et al. 1996).

In löslichen, globulären Proteinen befindet sich die hydrophobe Aminosäure hauptsächlich innerhalb der wasserabgewandten Kernstruktur. Exponierte Methioninreste stellen hingegen aufgrund der oxidierbaren Thioether wichtige endogene Antioxidantien dar, wobei die resultierenden Sulfoxide die katalytische Aktivität entsprechender Enzyme kaum beeinflussen und durch Methionin-Sulfoxid-Reduktasen gezielt reduziert werden können (Moskovitz et al. 2005). Auch in Membranproteinen finden sich Methioninreste innerhalb entsprechender Transmembrandomänen in exponierter Stellung und ermöglichen somit eine Wechselwirkung mit der Lipid-Doppelschicht (Brosnan et al. 2006). L-Methionin bzw. sein Derivat N-Formyl-L-Methionin nehmen zusätzlich eine zentrale Rolle als Initiator-Aminosäuren innerhalb der eukaryontischen bzw. prokaryontischen Protein-translation ein (Sherman et al. 1985).

Das metabolische Folgeprodukt S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) stellt einen globalen zellulären Methylgruppendonor dar und ermöglicht anhand spezifischer Methyltransferasen eine regulatorische Methylierung unterschiedlichster Akzeptoren. Hierzu zählen DNA, RNA, Histone, niedermolekulare Metabolite, Metallionen sowie Aminosäurereste innerhalb von Proteinen (Clarke et al. 2001, Wood et al. 2004). In diesem Zusammenhang fungiert SAM auch als Quelle von Methylengruppen (Fettsäuresynthese), Aminoisopropylgruppen (Polyaminsynthese) sowie Amino- und Thiogruppen (Synthese von Biotin und Liponsäuren) und stellt ein wichtiges Vorläufermetabolit in der Synthese von Steroidhormonen wie Adrenalin dar (Fontecave et al. 2004).

Trotz zahlreicher regulatorischer Schlüsselfunktionen kann L-Methionin ebenso wie sein Analogon L-Selenomethionin (Hauptquelle für das Spurenelement Selen bei Menschen und Nutztieren) in vielen höheren Organismen nicht eigenständig synthetisiert werden, sondern muss mit der Nahrung aufgenommen werden und zählt somit zu den essentiellen Aminosäuren (Brosnan et al. 2006, Kitajima et al. 2013).

Hierbei besteht zwischen L-Cystein und L-Methionin innerhalb des Metabolismus eine enge Verbindung (s. Abb. 7.1). Zwar wird das Kohlenstoffgerüst von L-Cystein durch L-Serin bereitgestellt, allerdings wird die Thiolgruppe ausschließlich unter Abbau von L-Methionin beigesteuert (Brosnan et al. 2006). Aufgenommenes L-Methionin wird hierzu initial zu SAM adenyliert, welches durch spezifische Methyltransferasen unter Transmethylierung entsprechender Akzeptoren zu S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) umgesetzt wird. SAH wird anschließend zu Adenosin und L-Homocystein hydrolysiert. L-Homocystein kann durch Methioninsynthasen erneut zu L-Methionin umgesetzt werden, woraus der sogenannte Methioninzyklus resultiert (Sauter et al. 2013). L-Homocystein kann aber auch über eine Transsulfurierung irreversibel zu L-Cystein umgesetzt werden. Hierzu wird L-Homocystein unter Aufwendung von L-Serin zum Thioether LL-Cystathionin kondensiert, welcher nach Abspaltung von α -Ketobutyrat zu L-Cystein (semi-essentiell) umgesetzt wird (Brosnan et al. 2006). Der Stoffwechselweg wurde in Abbildung 7.1 zusammengefasst.

In dieser Richtung wird der Stoffwechselweg als reverse Transsulfurierung definiert und stellt einen wichtigen Unterschied zu Prokaryonten wie *E. coli* dar (Aitken et al. 2011). Ausgehend von anorganischen Schwefelquellen (z.B. Sulfat) erfolgt stattdessen anhand einer reduktiven Schwefelassimilation die *de novo* Synthese von L-Cystein, welches anhand einer Transsulfurierung zu L-Homocystein bzw. L-Methionin umgesetzt wird (s. Kap. 7.2.4).

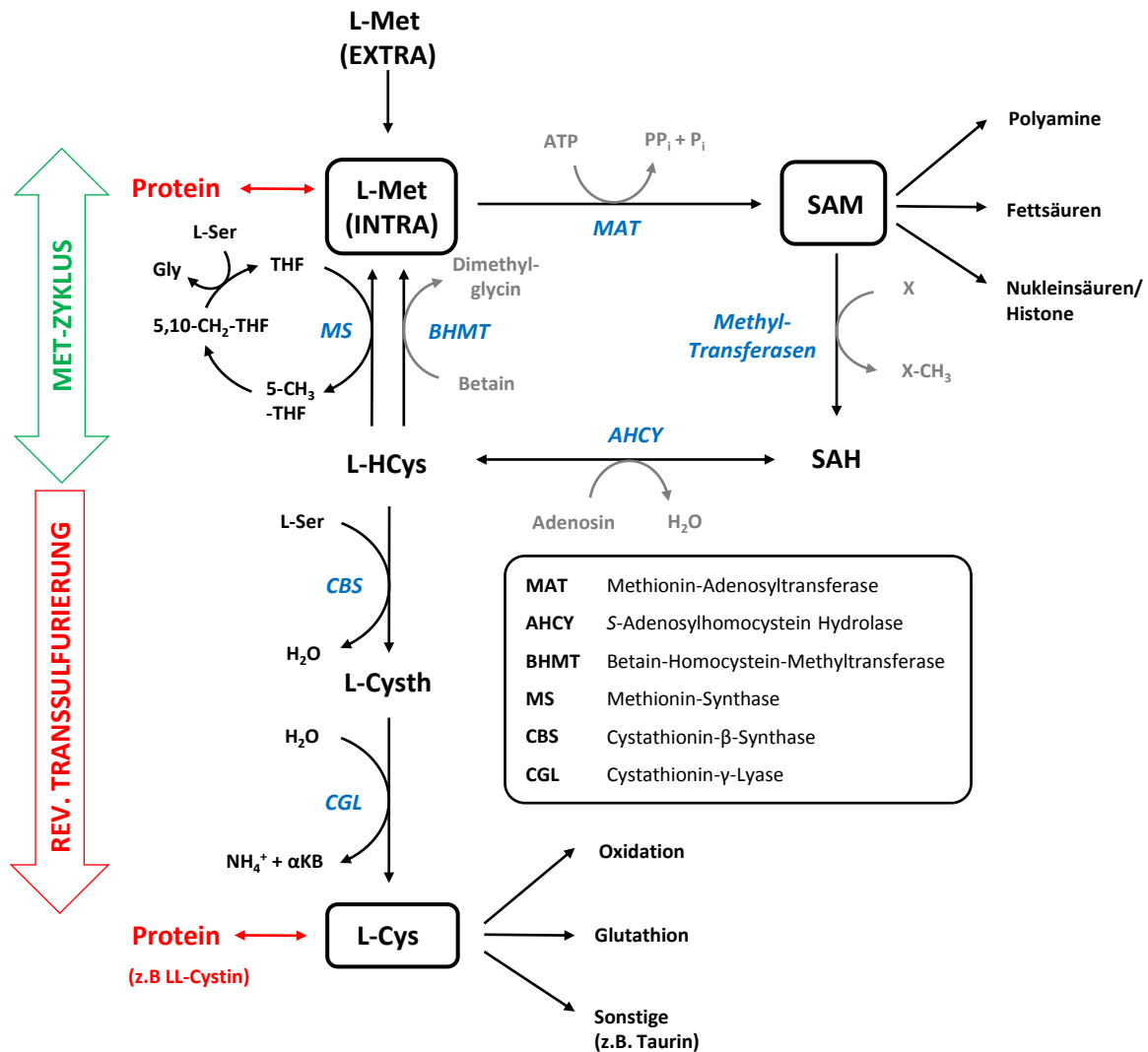


Abbildung 7.1 L-Methionin-Transmethylierungszyklus und reverse Transsulfurierung in höheren Vertebraten. (Quelle: eigene Darstellung, in Anlehnung an Brosnan et al. 2006)

7.1.2 Verwendung und Produktion von Methionin

Innerhalb der Nutztierhaltung besitzt Methionin neben weiteren essentiellen Aminosäuren wie Lysin, Threonin und Tryptophan enorme Bedeutung als Futtermittelsupplement (Leuchtenberger et al. 2005). In pflanzlichen Futtermitteln auf Basis von Weizen oder Sojamehl kommen die aufgeführten essentiellen Aminosäuren in vergleichsweise niedrigeren Anteilen vor. Hierbei können vorhandene essentielle Aminosäuren nur entsprechend dem Gehalt der limitierenden Aminosäuren zur Bildung von körpereigenen Proteinen herangezogen werden (Farkhoy et al. 2012). Dies führt neben einer verzögerten Biomassebildung auch zu einer Störung der Proteinsynthese, die beispielsweise eine negative Stickstoffbilanz zur Folge hat. Auch führt eine Überversorgung bestimmter Aminosäuren zu Aminosäure-

Imbalanzen welche in Abhängigkeit entsprechender regulatorischer Funktionen schwere Stoffwechselstörungen bewirken können (Bäßler et al. 1997). In der Geflügelmast ist der Bedarf an den schwefelhaltigen Aminosäuren L-Methionin und L-Cystein besonders ausgeprägt. Dies ist insbesondere mit einem verstärkten Aufbau von Keratin für die Gefiederausbildung und eines damit verbundenen erhöhten Bedarfs an L-Cystein erklärbar. Zu geringe Aufnahmen schwefelhaltiger Aminosäuren führen zu einer eingeschränkten Futtermittelverwertung, ausgeprägten Wachstumsinhibierungen, fehlerhaften Gefiederausbildungen sowie schweren Leberschädigungen (Leclercq et al. 1993). Zur Vermeidung derartiger Mangelerscheinungen wird ein Anteil von 5 g Methionin pro kg Tierfutter empfohlen, wobei ein Mindestgehalt von 2,5% L-Methionin im Rohprotein vorausgesetzt wird (National Research Council 1994). Der erhöhte Bedarf an schwefelhaltigen Aminosäuren wird derzeit durch Supplementierung des Tierfutters mit DL-Methionin kompensiert. Die metabolisch inaktive D-Form wird hierbei durch unspezifische D-Oxidasen zu α -Keto- γ -Methiolbutyrat desaminiert und anschließend mit einer L-Transaminase zu L-Methionin umgesetzt, wobei damit verbundene Ausbeuteverluste kritisch diskutiert werden (Friedman 1999). Gegenwärtig wird DL-Methionin hauptsächlich durch chemische Synthese mit Hilfe des Evonik-Verfahrens hergestellt (Lüssling et al. 1975). Das im Jahr 1948 entwickelte petrochemische Verfahren basiert auf der Verwendung von Acrolein (auf Basis von Rohöl), Methylmercaptan (auf Basis von Erdgas) und Blausäure (Hauer et al. 2004). Die mehrstufige Synthese wurde in Abbildung 7.2 zusammengefasst.

Aus Acrolein (1) und Methylmercaptan wird 3-Methylsulfanylpropionaldehyd (2) gewonnen, welches mit Blausäure und Ammoniumbicarbonat zu 5-(2-Methylthioethyl)hydantoin (3) umgesetzt wird. Bei 170°C wird 5-(2-Methylthioethyl)hydantoin anhand eines Überschusses von Kaliumcarbonat unter alkalischen Bedingungen hydrolysiert. Hieraus resultiert DL-Kaliummethionat (4), wobei Ammoniak und CO₂ zusätzlich anfallen, welche zur Synthese von Ammoniumcarbonat für die zweite Reaktionsstufe wiederverwertet werden. Im letzten Reaktionsschritt wird DL-Kaliummethionat (4) durch Druckbegasung von CO₂ zu DL-Methionin (5) umgesetzt. Zusätzlich anfallendes Kaliumhydrogencarbonat kann durch Erhitzen und Konzentrieren in CO₂ in Kaliumcarbonat zersetzt werden, welches in die dritte Reaktionsstufe zurückgeführt wird (Hauer et al. 2004). Das resultierende Razemat wird unter Einsatz von Lösungsmitteln (i.R. Methanol, Aceton) aufgereinigt und direkt als Futtermittelzusatzstoff

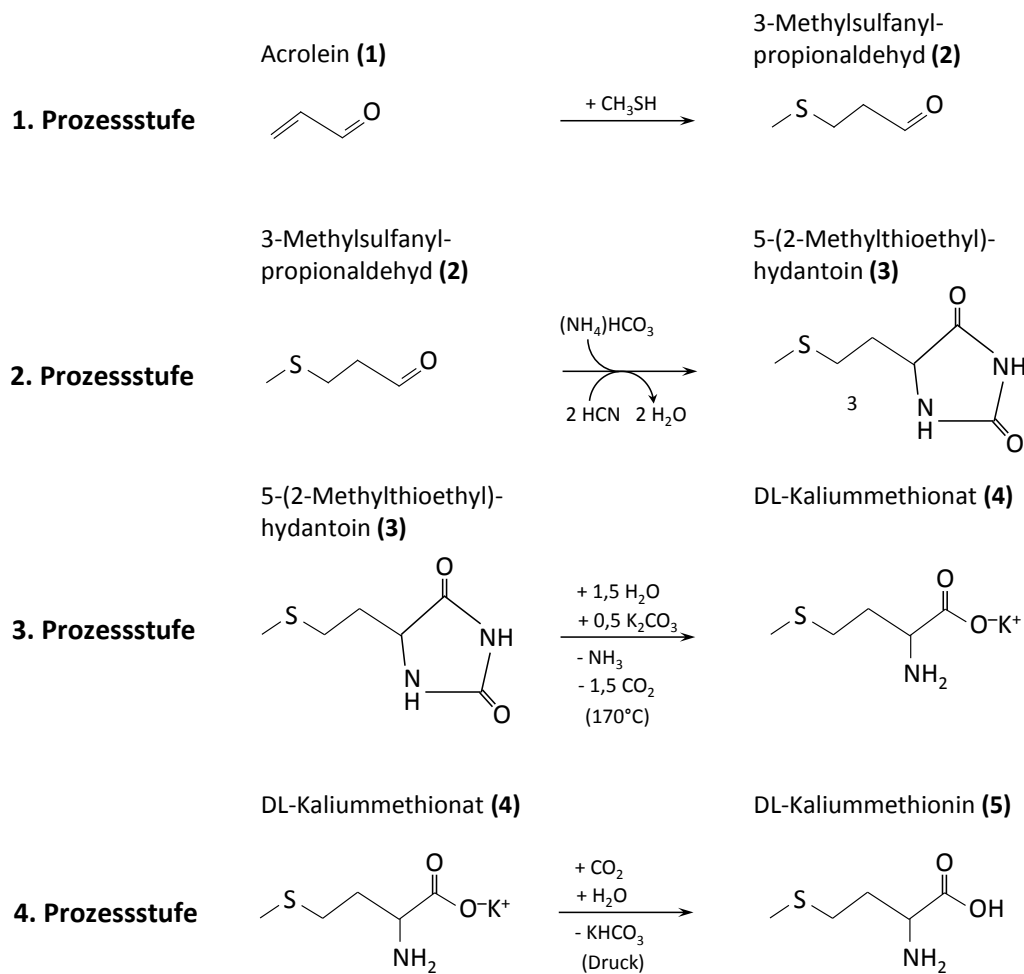


Abbildung 7.2 Chemische Synthese von DL-Methionin nach dem Evonik-Verfahren. (Quelle: eigene Darstellung, in Anlehnung an Hauer et al. 2004)

eingesetzt. Marktführer für die Produktion von DL-Methionin ist die Evonik Industries AG (MetAmino®). Die derzeitige Produktionskapazität für diesen Herstellungsprozess liegt bei 580.000 Tonnen pro Jahr und einem durchschnittlichen Verkaufspreis von 4,75 US \$/kg (4. Quartal, 2014, Willke et al. 2014). Dies entspricht etwa 60% des aktuellen Jahresbedarfs, der auf ca. 1.000.000 Tonnen geschätzt wird und stabile jährliche Wachstumsraten von ca. 5-6% aufweist (Grandviewresearch Report 2015). Angesichts einer schnell wachsenden Weltbevölkerung, eines wachsenden Wohlstands in Schwellenländern und eines damit einhergehenden rasant ansteigendem Fleischbedarfs, ist von einer weiteren Steigerung des Zuwachses in naher Zukunft auszugehen. Weitere Einsatzgebiete von Methionin liegen im Bereich pharmazeutischer Anwendungen zur Behandlung von Leberfunktionsstörungen (Jeon et al. 2001), als Antidepressiva (Mischoulon et al. 2002) oder zur Entzündungshemmung (Soeken et al. 2002). Zusätzlich wird Methionin zur Nahrungsmittelergänzung von Säuglingsmilchpulver, Infusionslösungen sowie diätetischer Lebensmittel eingesetzt

(Willke et al. 2014). In diesem Zusammenhang wird für Menschen eine tägliche Aufnahme von mindestens 13-16 mg pro kg Körpergewicht befürwortet (Fukagawa et al. 2006). Dauerhafte Unterversorgungen können zu rheumatischem Fieber, Lähmungen, Haarverlust, Leberschädigungen und Wachstumsverzögerungen führen. Darüberhinaus werden auch neurodegenerative Effekte beschrieben, die Depressionen, Schizophrenien oder Parkinsonerkrankungen befördern können (Townsend et al. 2004, Lieber et al. 1999). Für gezielte pharmakologische Anwendungen ist allerdings der Einsatz von enantiomer-reinem L-Methionin unabdingbar (Willke et al. 2014). Üblicherweise wird L-Methionin durch enzymatische Razematspaltung des chemisch synthetisierten DL-Methionin gewonnen. Hierzu wird DL-Methionin zunächst chemisch am Stickstoffatom unter Verwendung von Acetanhydrid acetyliert. Resultierende N-Acetyl-Reste können anschließend anhand immobilisierter enantioselektiver L-Acylasen abgespalten werden. Das entstandene L-Methionin wird anschließend auskristallisiert und abgetrennt. Verbliebene N-Acetylderivate (hauptsächlich D-Enantiomere) werden in die erste Prozessstufe zurückgeführt und das Verfahren mehrfach wiederholt (Hoppe et al. 1984).

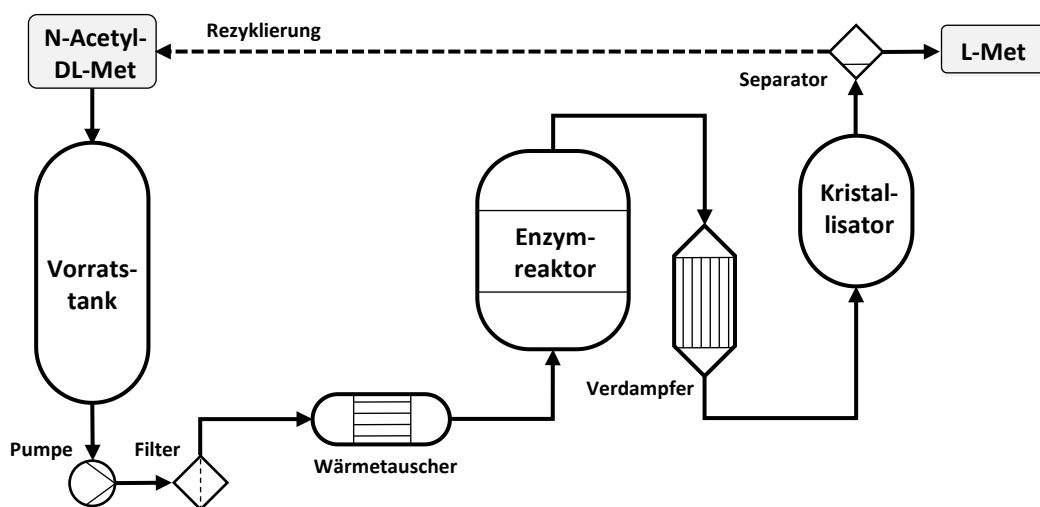


Abbildung 7.3 Schematische Darstellung zur enzymatischen Razemattrennung von DL-Aminosäuren. (Quelle: eigene Darstellung, in Anlehnung an Hauer et al. 2004)

Im Vergleich zu DL-Methionin (Futtermittelqualität) ist der globale Jahresbedarf von L-Methionin (Lebensmittel- und Pharmaqualität) mit ca. 10.000 Tonnen überschaubar. Allerdings liegt der Umsatz aufgrund vergleichsweise höherer Preise mit 30-250 US \$/kg in der gleichen Größenordnung (Willke et al. 2014). In diesem Zusammenhang wurden in der Vergangenheit verschiedene Ansätze für eine mikrobielle Synthese von Methionin unter

Verwendung rekombinanter Produktionsstämme näher untersucht (Kumar et al. 2005). Die fermentative Darstellung von L-Methionin würde unter Einsatz nachwachsender Rohstoffe eine nachhaltige Alternative zu dem chemisch basierten Syntheseansatz darstellen. Angesichts der beträchtlichen Preisvolatilität petrochemischer Ausgangsprodukte könnte gleichzeitig eine höhere Planungssicherheit erreicht werden. Die weniger aufwendige Geräteausführung und modulare Erweiterbarkeit biotechnologischer Anlagen bietet zusätzlich das Potential erheblicher Kostenreduktionen bei höherer Flexibilität entsprechender Produktionskapazitäten und Standorte. Aufgrund der Synthese von enantiomer-reinem L-Methionin entfällt darüberhinaus eine produktionstechnische aufwendige Razemattrennung von DL-Methionin. Trotz vermehrter Forschungsanstrengungen zahlreicher Firmen und Forschungsgruppen konnten ein wirtschaftlich tragfähiger Zugang auf Basis gängiger mikrobieller Produktionsplattformen bisher nicht erzielt werden (Willke et al. 2014). Unzureichende Leistungsparameter basieren hauptsächlich auf der Komplexität zugrundeliegender mikrobieller Stoffwechselwege, einer strikten zellulären Regulation und eines für die *de novo* Synthese vergleichsweise hohen Energieaufwands. Fermentative Ansätze zur L-Methionin-Produktion sind bisher nur im Labormaßstab bekannt (Willke et al. 2014). Die höchsten Leistungsdaten sind derzeit im Rahmen industrieller Forschung in Form von Patentanmeldungen veröffentlicht. So wurde laut der BASF-Patentanmeldung WO 2007/012078A1 bei Verwendung eines rekombinanten *C. glutamicum* Stammes in 56 h Prozesszeit auf Basis eines Zuckergemisches und eines komplex zusammengesetzten Mediums ein L-Methionin-Titer von 25,8 gL⁻¹ erreicht. Innerhalb mehrerer Patentanmeldungen (WO 2007/077041A1, WO 2009/043803A2) der Firma Metabolic Explorer (Metex) konnten diese Leistungsdaten unter Verwendung rekombinanter *E. coli* Stämme nochmals gesteigert werden. Auf Basis unterschiedlicher rekombinanter Genotypen konnten Glucose-basierte Ausbeuten von 12-20% (L-Methionin + N-Acetyl-Methionin) erreicht werden. Auf Basis von Sulfat und Thiosulfat-Gemischen konnten hierbei L-Methionintiter von bis zu 35 gL⁻¹ erzielt werden. Auch wenn die publizierten Leistungsparameter vielversprechend sind, scheitert die Etablierung eines wettbewerbsfähigen Verfahrens an den typischerweise hohen Anforderungen kommerzieller industrieller Prozesse. Charakteristische phänomenologische Folgen einer L-Methionin-Überproduktion sind unzureichende spezifische Produktbildungsraten, Defizite bei der Stammstabilität sowie ein strapazierter zellulärer Energiehaushalt (Kumar et al. 2005).

7.2 Grundlagen des Stoffwechsels in *Escherichia coli*

7.2.1 Zentralstoffwechsel

Der Zentralstoffwechsel von *Escherichia coli* umfasst die Glykolyse (EMP), den Pentosephosphatweg (PPP), den Citratzyklus (TCA) sowie die dem C₃/C₄-Metabolismus zugehörigen anaplerotischen Reaktionen. Seine primäre Aufgabe besteht in der Gewinnung chemisch gebundener Energie, hauptsächlich als ATP und GTP, und Reduktionspotential, in Form der Reduktionsäquivalente NADH, NADPH und FADH₂. Darüberhinaus liefert er notwendige Vorläufermoleküle für verschiedene Biosynthesewege (Neidhardt et al. 1996).

Im Falle von Glucose als Energie- und Kohlenstoffquelle erfolgt die Aufnahme aktiv über das Phosphotransferase-System (PTS). Während des Imports wird mittels einer Enzymkaskade die Phosphorylgruppe des Phosphoenolpyruvats (PEP) auf die Glucose übertragen (Gruppentranslokation), wobei Glucose-6-Phosphat (G6P) und Pyruvat entstehen (Postma et al. 1993). Erfolgt die Aufnahme von Kohlenhydraten über das PTS-System werden Stoffwechselwege zur Verwertung weniger bevorzugter Kohlenstoffquellen reprimiert (Katabolitrepression) (Schlegel 1992). Unter aeroben Bedingungen wird in *E. coli* die Glucose unter Gleichgewichtsbedingungen zu 70% über die Glykolyse und zu 30% über Pentosephosphatweg chemotroph umgesetzt (Liu et al. 2014). Die **Glykolyse** (s. Abb. 7.4) kann in zwei verschiedene Bereiche eingeteilt werden. Ausgehend von G6P findet in der initialen Phase eine Spaltung des C₆-Körpers in die C₃-Körper Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) unter Investition von ATP statt.

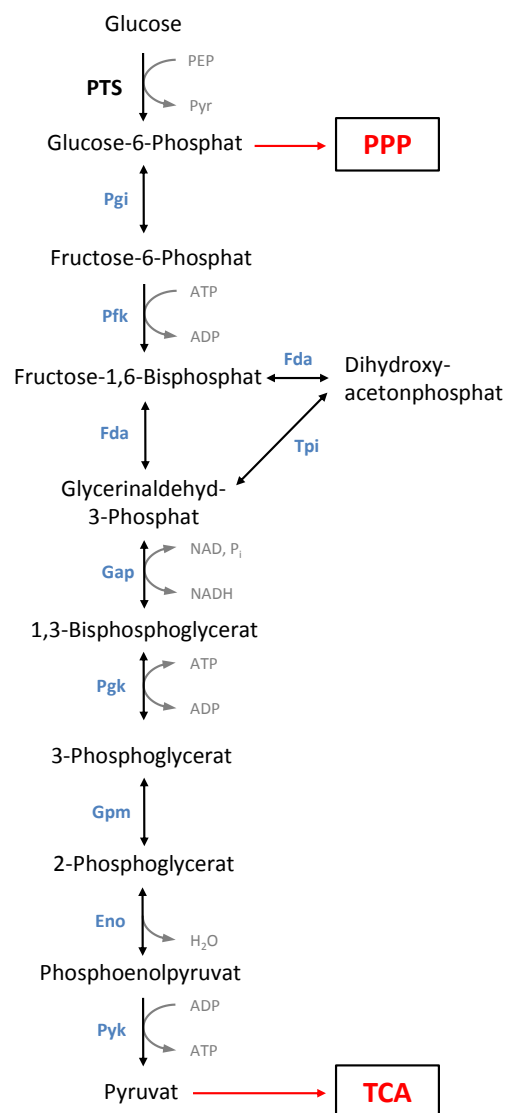


Abbildung 7.4 Die Glykolyse (EMP-Weg) in *E. coli*. Reversible Reaktionen wurden vereinfachend als Doppelpfeile dargestellt. (Quelle: eigene Darstellung, in Anlehnung an Neidhardt et al. 1996)

In der anschließenden Phase wird der bereits erfolgte Energieeinsatz amortisiert, so dass in der Gesamtbilanz pro mol Glucose netto jeweils 2 mol ATP und NADH gewonnen werden können (Neidhardt et al. 1996). Die allosterische Regulation erfolgt hauptsächlich über die quasi irreversiblen Reaktionsschritte der Phosphofruktokinase (Pfk) und Pyruvatkinase (Pyk) (Schlegel 1992). Das Endprodukt der Glykolyse ist Pyruvat, das gleichzeitig den Eingangsmetaboliten für den Citratzyklus darstellt. Zusätzlich wird G6P im oxidativen und irreversiblen Teil des **Pentosephosphatwegs** (s. Abb. 7.5) zu Ribulose-5-Phosphat (Ru5P) unter Bildung von je zwei Äquivalenten NADPH abgebaut. NADPH dient im Gegensatz zu NADH nicht der Energiegewinnung durch die Atmungskette, sondern wird als Reduktionsmittel innerhalb zahlreicher anaboler Stoffwechselreaktionen umgesetzt (Neidhardt et al. 1996). Die Regulation erfolgt hauptsächlich anhand bestehender NADP/NADPH-Verhältnisse über die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Zwf) und die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (Gnd) (Nicolas et al. 2007). Ru5P stellt ein zentrales Vorläufermolekül für die Synthese von Nukleotiden und Coenzymen dar (Neidhardt et al. 1996). Alternativ wird Ru5P im nicht-oxidativen und reversiblen Teil des Pentosephosphatwegs durch unterschiedliche Isomerasen, Epimerasen, Transaldolasen und Transketolasen zu verschiedenen langkettigen phosphorylierten Aldosen und Ketosen isomerisiert. Ausgehend von Sedoheptulose-7-Phosphat (S7P), Erythrose-4-Phosphat (E4P) und Xylulose-5-Phosphat (Xu5P) kann ein Rückfluss in die Glykolyse unter Gewinnung von Fructose-6-Phosphat (F6P) und GAP erfolgen (Schlegel 1992). Gebildetes Pyruvat wird durch ein Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplex (AceE/F, Lpd) unter Bildung von NADH zu Acetyl-CoA oxidiert, welches anschließend in den **Citratzyklus** (s. Abb. 7.6) eingespeist wird (Fries et al. 2003).

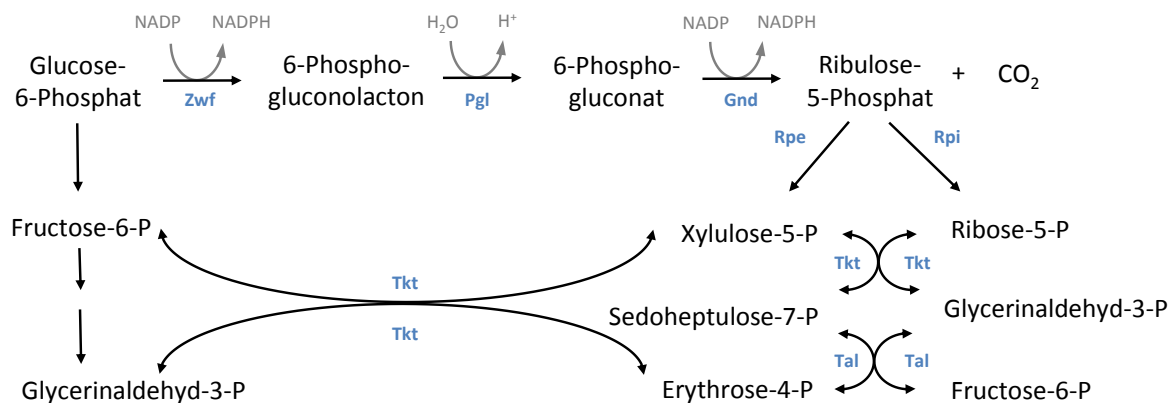


Abbildung 7.5 Der oxidative und nicht-oxidative Pentosephosphatweg (PPP) in *E. coli*. Reversible Reaktionen wurden vereinfachend als Doppelpfeile dargestellt. (Quelle: eigene Darstellung, in Anlehnung an Neidhardt et al. 1996)

Der amphibolische und zyklische Stoffwechselweg ermöglicht den oxidativen Abbau von Acetyl-CoA zu CO_2 und H_2O unter Bereitstellung von ATP sowie der Reduktionäquivalente NAD(P)H und FADH_2 zur Energiegewinnung in der Atmungskette. Unter aeroben Bedingungen können in *E. coli* somit aus 1 mol Glucose etwa 30 mol ATP synthetisiert werden (Berg et al. 2007). Eine weitere wichtige Aufgabe besteht in der Bereitstellung von Vorläufermolekülen für verschiedene anabole Synthesewege. In diesem Zusammenhang erfolgt gleichzeitig unter Bereitstellung von α -Ketoglutarat die Ammonium-Fixierung unter Bildung von L-Glutamat (Neidhardt et al. 1996). Die Regulation erfolgt hauptsächlich anhand bestehender NAD/NADH- und ADP/ATP-Verhältnisse über die Citratsynthase (GltA), die Isocitratdehydrogenase (Icd) sowie den α -Ketoglutaratdehydrogenasekomplex (SucA/B, Lpd) (Holms et al. 1996). Hinsichtlich der Bereitstellung von Vorläufermolekülen, spielen die anaplerotischen Reaktionen des **C₃/C₄-Metabolismus** (s. Abb. 7.6) eine zentrale Rolle. Neben dem bereits erwähnten Pyruvatdehydrogenasekomplex ermöglicht die Phosphoenolpyruvatcarboxylase (Ppc) dem Citratzyklus entzogene Intermediate in Form von Oxalacetat (OAA) wieder zuzuführen (Sauer et al. 2005).

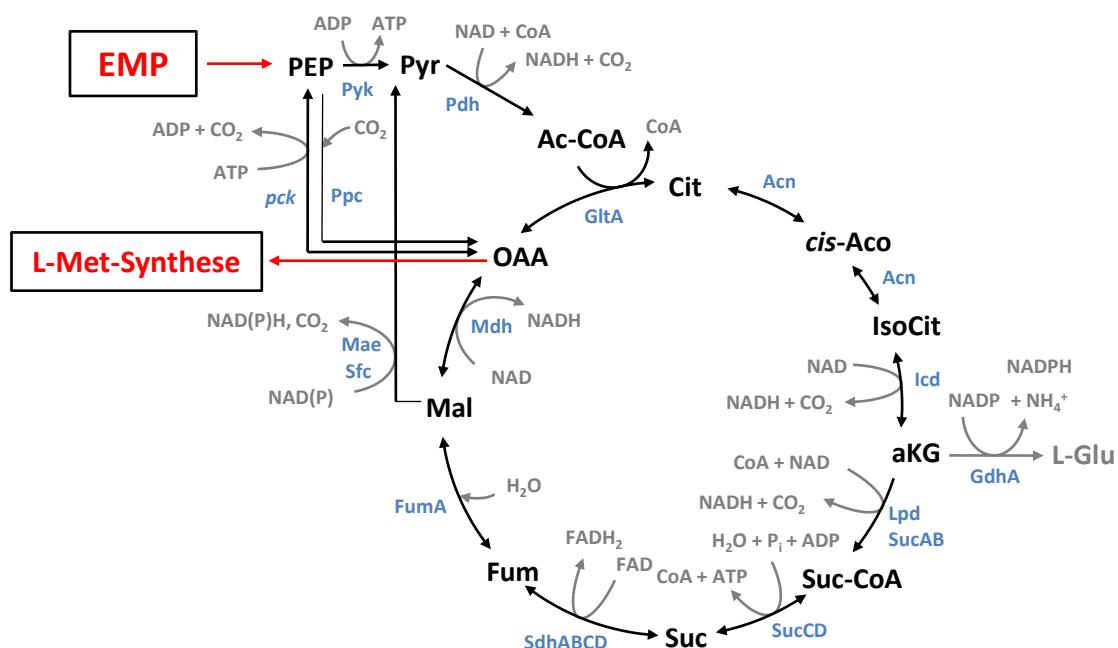


Abbildung 7.6 Der Citratzyklus (Tricarboxylic acid cycle, TCA) und C₃/C₄-Stoffwechsel (Anaplerose) in *E. coli* unter aeroben Bedingungen. Reversible Reaktionen wurden vereinfachend als Doppelpfeile dargestellt. (Quelle: eigene Darstellung, in Anlehnung an Neidhardt et al. 1996)

7.2.2 Reduktive Schwefelassimilation und L-Cystein-Synthese

Für die L-Methionin-Synthese besitzt die reduktive Schwefelassimilation eine herausragende Bedeutung. Die wichtigsten Schwefelquellen für *E. coli* sind Sulfat, Thiosulfat sowie organische Sulfonate (Kredich et al. 2008). Unter Fermentationsbedingungen ist die reduktive Assimilation von **Sulfat** (SO_4^{2-}) und **Thiosulfat** ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) hervorzuheben. Der Import beider Substrate erfolgt über ATP-abhängige ABC-Transporter (CysAUW), wobei im Anschluss eine stufenweise Reduktion zu Sulfid (H_2S) erfolgt (Sirko et al. 1990, 1995). Innerhalb der L-Methionin-Synthese ist die Schwefelfixierung der energiereichste Schritt. So werden für 1 mol extrazelluläres Sulfat (Oxidationszahl +VI) jeweils 3 mol ATP und 4 mol NADPH aufgewendet. Für die Assimilation von Thiosulfat kann aufgrund des höheren Reduktionsgrades (Oxidationszahl +II) der Energiebedarf mit jeweils 1 mol ATP und 2,5 mol NADPH vorteilhaft gemindert werden (Nakatani et al. 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurde während der Kultivierungen von *E. coli* SPOT01 Thiosulfat als Schwefelquelle eingesetzt. Die Fixierung von Thiosulfat erfolgt durch die Cysteinsynthese B (CysM) unter Umsetzung von O-Acetyl-L-Serin (O-AcSer) zu S-Sulfocystein (Maier et al. 2003). Anhand eines bisher nicht näher charakterisierten Enzyms erfolgt anschließend eine Umsetzung zu L-Cystein unter Abspaltung von Sulfit (SO_3^{2-}). Abgespaltenes Sulfit wird analog zur Umsetzung von Sulfat stufenweise zu Sulfid reduziert, welches mit O-Ac-Ser durch die Cysteinsynthese B oder die O-Acetylserin-Sulphydrolase A (CysK) zu L-Cystein umgesetzt wird (Nakatani et al. 2012). Ausgehend von L-Cystein erfolgt der anschließende Schwefeleinbau in L-Methionin indirekt über eine Transsulfurierung (s. Kap. 7.2.4). In Abbildung 7.7 wird die reduktive Assimilation von Sulfat und Thiosulfat aufgezeigt.

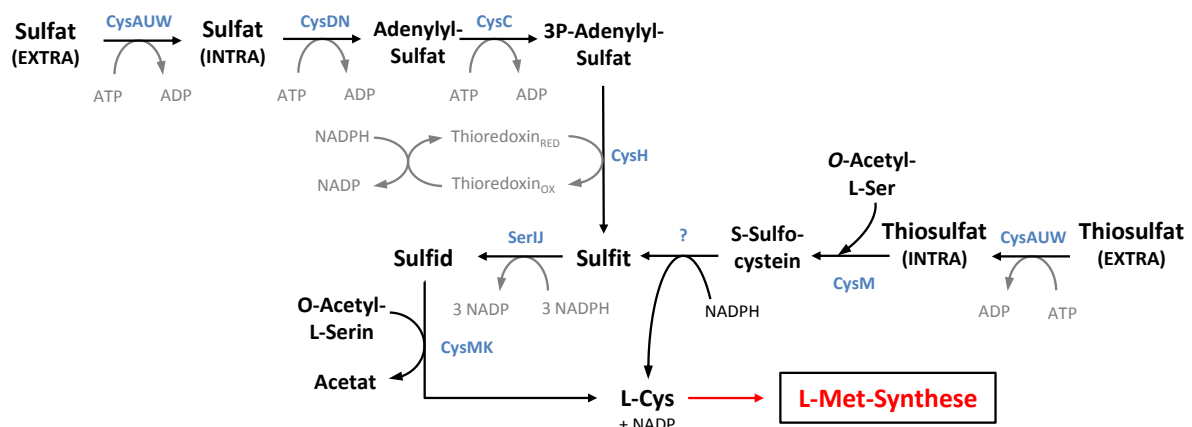


Abbildung 7.7 Die reduktive Schwefelassimilation in *E. coli* anhand von Sulfat und Thiosulfat als Schwefelquelle. Reversible Reaktionen wurden vereinfachend als Doppelpfeile dargestellt. (Quelle: eigene Darstellung, in Anlehnung an Nakatani et al. 2012)

7.2.3 C₁-Stoffwechsel

Die Aufgaben des C₁-Stoffwechsels unterscheiden sich nach der Diversität der C₁-Körper. Neben Methylgruppen (-CH₃) und Methylengruppen (-CH₂) finden sich auch Formylgruppen (-CHO) und Forminogruppen (-HCNH) in zahlreichen biochemischen Reaktionen wieder. Das Coenzym Tetrahydrofolat (THF, H₄-Folat oder FH₄) nimmt hierbei als globaler C₁-Donor eine zentrale Rolle ein (Rohlman et al. 1990). THF sowie seine Derivate kommen hierbei als polyglutamylierte Isoformen vor (Moran 1999). Für die L-Methionin-Synthese spielt der C₁-Stoffwechsel aufgrund der finalen Transmethylierung von L-Homocystein unter Umsetzung von 5-Methyl-THF eine wichtige Rolle (Whitfield et al. 1970). Die Regeneration des Methyl-THF-Pools ist hierbei eng mit der Synthese von L-Serin verbunden. Die proteinogene Aminosäure stellt ein zentrales Schlüsselmetabolit des *E. coli* Stoffwechsels dar und dient, neben seiner Verwendung zur Proteinsynthese, als Vorläufer der Glycin-, L-Cystein-, L-Tryptophan- und Phospholipidsynthese (Neidhardt et al. 1996). Anhand des Abbaus von L-Serin zu Glycin durch die Serin-Hydroxymethyltransferase (GlyA) wird eine erste Methylgruppe auf THF unter Bildung von 5,10-Methylen-THF übertragen (Schirch et al. 2005). Unter dem anschließenden Abbau von Glycin durch das *Glycin Cleavage System* (GCV) erfolgt die analoge Übertragung einer weiteren Methylgruppe. Der Multienzymkomplex ermöglicht unter Bildung von NADH eine reversible Oxidation überschüssiger Glycin-Konzentrationen zu CO₂ und NH₄⁺ (Okamura-Ikeda et al. 1993). Das resultierende 5,10-Methylen-THF kann anschließend durch die 5,10-Methyl-THF-Reduktase (MetF) unter Aufwendung von NADH zu 5-Methyl-THF reduziert werden (Saint-Girons et al. 1983). Ein weiterer Weg zur Bildung von 5,10-Methylen-THF kann unter Formylierung von THF zu 10-Formyl-THF durch Enzyme des Purin-Stoffwechsels (PurN/H) erfolgen (Zhang et al. 2008). 10-Formyl-THF wird primär zur Formylierung von tRNA-gebundenem L-Methionin anhand einer Methionyl-tRNA-Formyltransferase (Fmt) aufgewendet. Innerhalb der bakteriellen Proteinsynthese ist N-Formyl-Methionin-tRNA der zentrale Initiator der Translation (Guillon et al. 1992). Gleichzeitig kann 10-Formyl-THF durch eine Formyltetrahydrofolat-Deformylase (PurU) erneut zu THF deformyliert werden (Nagy et al. 1995). Allerdings kann 10-Formyl-THF anhand eines bifunktionalen Enzyms (FolD) der L-Methionin-Synthese wieder zugänglich gemacht werden. Hierzu wird 10-Formyl-THF durch die Methenyl-THF-Cyclohydrolase (FolD/EC 3.5.4.9) in 5,10-Methenyl-THF reversibel umgesetzt. 5,10-Methenyl-THF wird anschließend unter

Verbrauch von NADPH durch die Methenyl-THF-Dehydrogenase (FolD/EC 1.5.1.5) reversibel zu 5,10-Methylen-THF reduziert (Shen et al. 1999). Das zentrale THF-Derivat kann erneut unter Aufwendung von NADH zu 5-Methyl-THF reduziert werden. In Abbildung 7.8 wird die Regeneration des Methyl-THF-Pools anhand des Abbaus von L-Serin und Glycin unter Berücksichtigung der Purin-Synthese aufgezeigt.

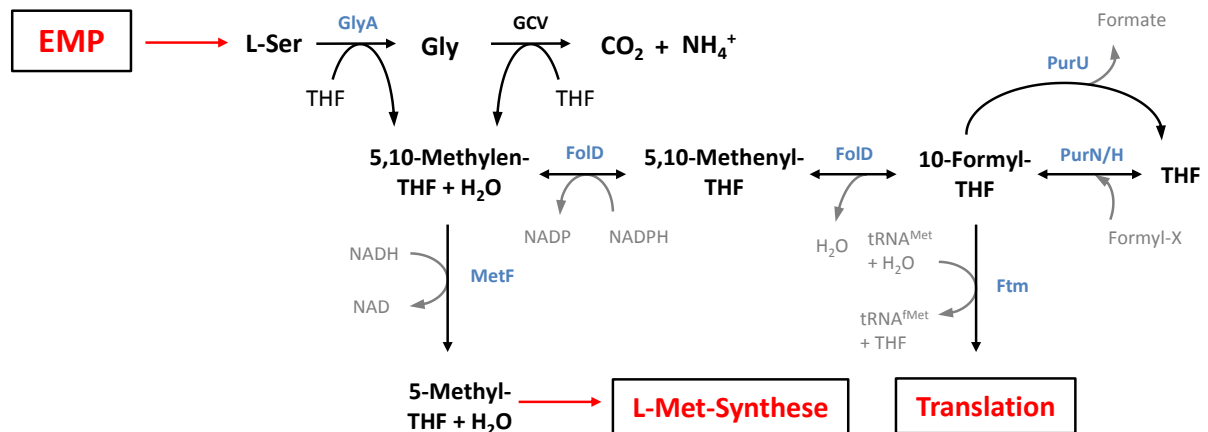


Abbildung 7.8 Der C_1 -Metabolismus und Regeneration des Tetrahydrofolats in *E. coli* anhand für die L-Methionin-Synthese relevanter Stoffwechselwege. Reversible Reaktionen wurden vereinfachend als Doppelpfeile dargestellt. (Quelle: eigene Darstellung, in Anlehnung an Neidhardt et al. 1996)

7.2.4 L-Methionin-Synthese

Aus metabolischer Sicht erfolgt die *de novo* Synthese von L-Methionin in *E. coli* anhand eines komplexen und hochverzweigten Reaktionsnetzwerks. Hierbei werden Produkte des Zentralstoffwechsels, des C_1 -Metabolismus sowie der reduktiven Schwefelassimilation zu einem Endprodukt vereint (Neidhardt et al. 1996). Das Kohlenstoffgrundgerüst wird durch die Umsetzung von L-Aspartat bereitgestellt (**TCA-Syntheseweg**). Hierzu werden Oxalacetat (Citratzyklus) und L-Glutamat durch die Aspartat-Aminotransferase (AspC) zu L-Aspartat und α -Ketoglutarat (α KG) umgesetzt (Gelfand et al 1977). L-Aspartat wird durch die Aspartatkinase (LysC) sowie die bifunktionalen Enzyme (MetL und ThrA/EC 2.7.2.4) unter Aufwendung von ATP phosphoryliert und anschließend unter Verbrauch von NADPH durch die Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase (Asd) zu L-Aspartatsemialdehyd umgesetzt (Cohen 1985). L-Aspartatsemialdehyd wird durch die Homoserin-Dehydrogenasen (MetL und ThrA/EC 1.1.1.3) unter Verbrauch von NAD(P)H zu L-Homoserin reduziert und anschließend durch die Homoserin-O-Succinyltransferase (MetA) unter Aufwendung von Succinyl-CoA (Citrat-

zyklus) zu *O*-Succinyl-L-Homoserin (OSHS) succinyliert (Born et al. 1999). Das Kohlenstoffgrundgerüst für L-Cystein zur indirekten Bereitstellung der Thiolgruppe für L-Methionin (Transsulfurierung) erfolgt durch die Umsetzung von L-Serin (**EMP-Syntheseweg**). Hierzu wird 3-Phosphoglycerat (Glykolyse) unter Gewinnung von NADH durch die 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (SerA) zu 3-Phospho-Hydroxypyruvat (3P-HPyr) oxidiert (Grant 2012). 3P-HPyr und L-Glutamat werden durch die 3-Phosphoserin-Amino-transferase (SerC) zu 3-Phosphoserin (3PS) und α KG umgesetzt (Lam et al. 1990). 3PS wird anschließend durch die Phosphoserin-Phosphatase (SerB) zu L-Serin dephosphoryliert (Kutznetsova et al. 2006).

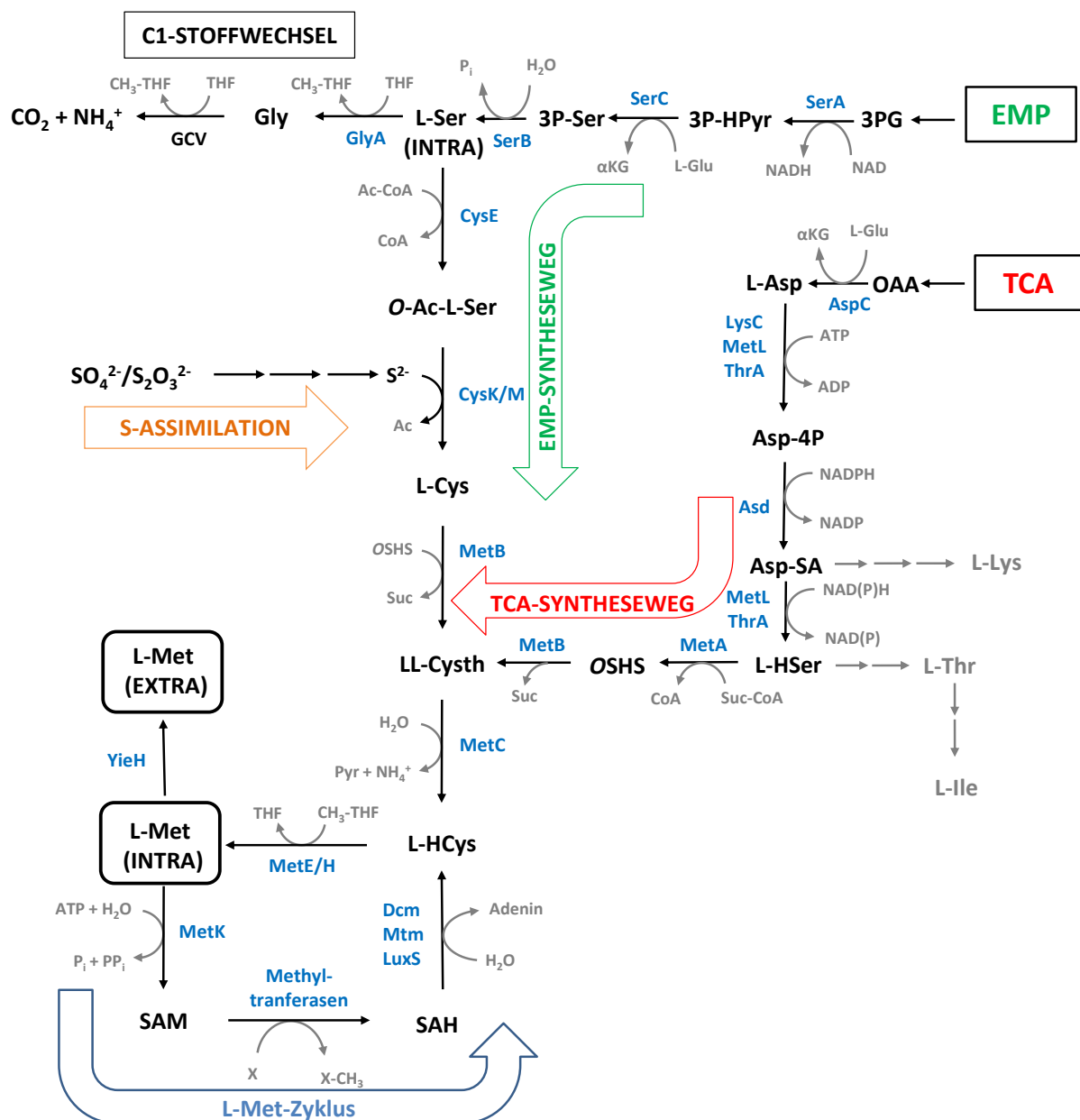


Abbildung 7.9 De novo Synthese von L-Methionin in *E. coli* mit Glucose als C-Quelle und Sulfat bzw. Thiosulfat als S-Quelle unter aeroben Bedingungen. (Quelle: eigene Darstellung, in Anlehnung an Neidhardt et al. 1996)

L-Serin wird unter Aufwendung von Acetyl-CoA (Citratzyklus) durch die Serin-Acetyltransferase (CysE) zu O-Acetyl-Serin (O-Ac-Ser) acetyliert (Hindson et al. 2003). O-Ac-Ser wird anschließend unter Umsetzung von Sulfid und Abspaltung von Acetat zu L-Cystein umgesetzt (s. Kap. 7.2.2). In den nächsten beiden Reaktionsschritten erfolgt ein Austausch des Schwefels zwischen L-Cystein und L-Homocystein anhand einer indirekten Transsulfurierung. Hierzu werden OSHS sowie L-Cystein als Endprodukte beider Synthesewege unter Abspaltung von Succinat durch die Cystathionin- γ -Synthase (MetB) zunächst zum asymmetrischen Thioether LL-Cystathionin vereint (Holbrook et al. 1990). Die Cystathionin- β -Lyase (MetC) katalysiert anschließend die Abspaltung von Pyruvat und NH_4^+ woraus L-Homocystein resultiert (Laber et al. 1996). In einem finalen Reaktionsschritt erfolgt die Transmethylierung von L-Homocystein zu L-Methionin. Die hierfür notwendige Methylgruppe wird anhand unterschiedlicher Polyglutamyl-Derivate von Methyl-THF bereitgestellt (s. Kap. 7.2.3). In einer Vitamin B₁₂ abhängigen Reaktion (Cobalamin) erfolgt die Umsetzung von Methyl-THF (monoglutamyliertes Folat) durch die Methioninsynthase (MetH) (Whitfield et al. 1970). Gleichzeitig kann anhand einer Vitamin B₁₂ unabhängigen Reaktion die Umsetzung von 5-Methyl-Tetrahydropteroyl-triglutamat (tri-glutamyliertes Folat) durch die Homocystein-Methyltransferase (MetE) erfolgen (Foster et al. 1964). Hierbei konnte aufgezeigt werden, dass die Transmethylierung durch MetH 120 Mal schneller abläuft als bei MetE (Gonzales et al. 1992). Ein Teil des synthetisierten L-Methionins wird zu S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) adenyliert, der einen weiteren globalen Methylgruppendonor darstellt. Die Methylgruppe kann von SAM durch Methyltransferasen auf verschiedenste Akzeptoren übertragen werden (z.B. DNA) woraus S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) resultiert. SAH wird anschließend in einer zweistufigen Reaktion unter Abspaltung von Adenin zu L-Homocystein hydrolysiert (SAM-Zyklus) (Halliday et al. 2010).

Die Synthese von L-Methionin ist gleichzeitig mit einem enormen Energiebedarf verbunden. Wird von einer *de novo* Synthese mit Glucose und Sufat als alleinige C- bzw. S-Quelle ausgegangen, werden je mol L-Methionin 7 mol ATP und 8 mol NADPH benötigt (Kaleta et al. 2013). Anaboles Reduktionspotential in Form von NADPH wird hauptsächlich im oxidativen Teil des Pentose-Phosphatwegs gewonnen (s. Kap. 7.2.1). Weitere Möglichkeiten zur Regeneration des NADPH-Pools bestehen innerhalb des Citratzyklus (Isocitratdehydrogenase, Icd) sowie innerhalb des C₃/C₄-Stoffwechsels anhand der gluconeogenetischen Umsetzung von Malat zu Pyruvat (NADP-abhängige Malatdehydrogenase, MaeB). Darüberhinaus besitzt

E. coli zwei verschiedene Transhydrogenasen (SthA, PntAB) die eine reversible Reduktion von NADP durch NADH ermöglichen. Insbesondere die membrangebundene Form (PntAB) wurde als weitere wichtige NADPH-Quelle identifiziert (Sauer et al. 2004).

7.2.5 Regulation der Methionin-Synthese

Die Stoffwechselwege zur Synthese von L-Methionin unterliegen einer strikten Regulation. Im Vordergrund steht der vergleichsweise hohe Energiebedarf seiner *de novo* Synthese. Auch soll eine cytotoxische Akkumulation seiner Vorstufen L-Cystein und L-Homocystein (hochreaktive Thiole) vermieden werden. Darüberhinaus weisen L-Methionin und seine Derivate ihrerseits wichtige regulatorische Funktionen innerhalb zahlreicher zellulärer Prozesse (z.B. Methyl-donor, Translationsinitiation) auf (s. Kap. 7.1.1). In *E. coli* sind die Regulationsmechanismen weitgehend aufgeklärt und finden sowohl auf allosterischer und transkriptioneller Ebene statt (Kumar et al. 2005).

7.2.5.1 Regulation auf allosterischer Ebene

L-Methionin gehört neben L-Aspartat, L-Lysin, L-Threonin und L-Isoleucin zu den Aminosäuren der Aspartatfamilie. Deren Synthese basiert auf L-Aspartat als Vorläufermolekül wobei sich die zugehörigen Stoffwechselwege hochgradig überlappen (Neidhardt et al. 1996). In diesem Zusammenhang hemmen L-Lysin, L-Threonin und L-Methionin ihre eigenen Synthesen anhand einer kumulativen Rückkopplungshemmung der Isoenzyme der Aspartatkinase (Eingangsenzyme des Synthesenetzwerks). L-Lysin inhibiert die Aktivität des Isoenzym I (LysC), L-Methionin inhibiert Isoenzym II (MetL) und L-Threonin hemmt Isoenzym III (ThrA) (Kumar et al. 2005). In diesem Zusammenhang stellen die Isoenzyme II und III bifunktionale Enzyme dar (s. Kap. 7.2.4), die gleichzeitig eine Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität aufweisen. Anhand des erwähnten Regulationsprinzip hemmen somit L-Threonin und L-Methionin zusätzlich die Bildung von L-Homoserin (Kumar et al. 2005). In Summe werden dadurch Ungleichgewichte in der Synthese der einzelnen Endprodukte verhindert (Usuda et al. 2005). Darüberhinaus inhibieren L-Methionin und SAM die Aktivität der Homoserin-O-Succinyltransferase (MetA). Hierdurch soll insbesondere eine cytotoxische Akkumulation von L-Homocystein verhindert werden (Tuite et al. 2005). In diesem Kontext ist auch eine Rückkopplungsinhibierung der

Serin-Acetyltransferase (CysE) durch L-Cystein zu werten (Cohen 2004). Beide Homocystein-verbrauchende Enzyme (MetE und MetH) unterliegen hingegen keiner Rückkopplungs-inhibierung durch L-Methionin.

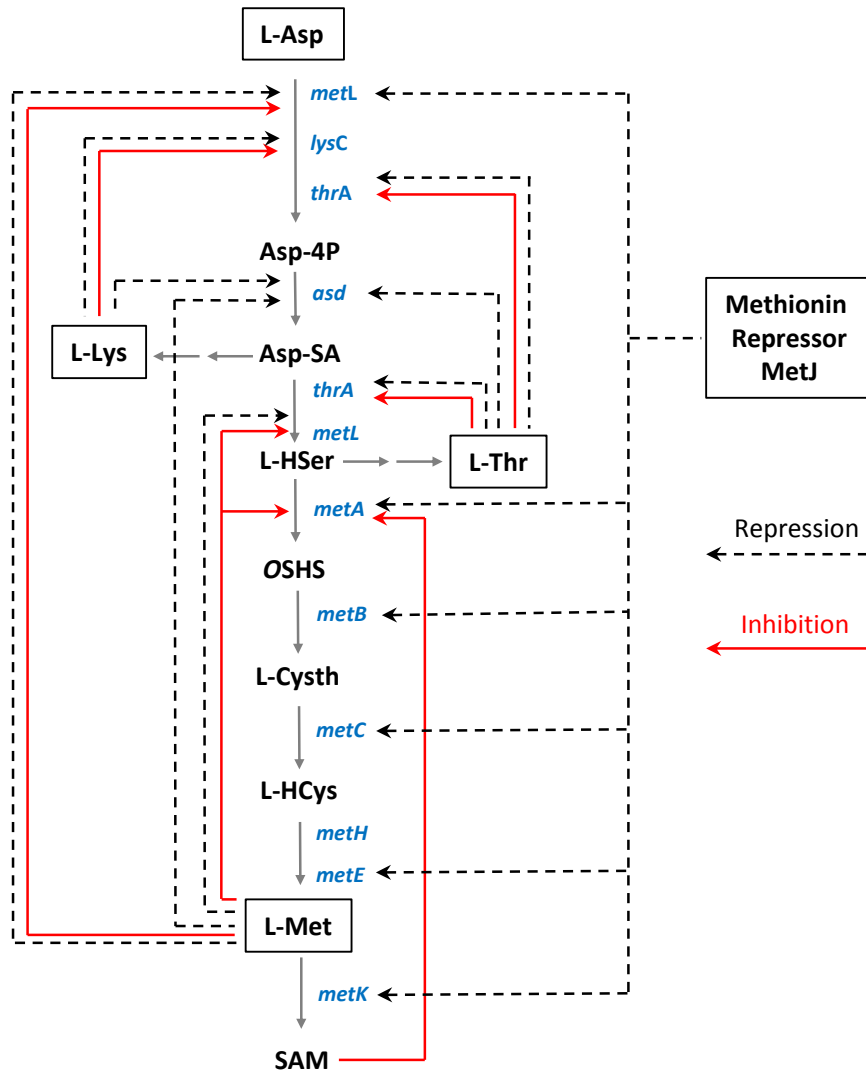


Abbildung 7.10 Wichtige allosterische und transkriptionelle Regulationswege der L-Methionin-Synthese unter Berücksichtigung des globalen Methionin-Repressors MetJ in *E. coli*. Zur verbesserten Übersicht wurden Enzyme in Form zugehöriger genetischer Notationen dargestellt. (Quelle: eigene Darstellung, in Anlehnung an Kumar et al. 1996)

7.2.5.2 Regulation auf transkriptioneller Ebene

Auf transkriptioneller Ebene spielt vor allem die Regulation der Methioninsynthese-Gene durch das **Repressorprotein MetJ** eine zentrale Rolle. Zusammen mit seinem Co-Repressor SAM reprimiert MetJ die Expression von *metA*, *metB*, *metC*, *metE* und *metF* (Usuda et al. 2005). Lediglich die Methioninsynthase MetH unterliegt keiner Repression, was sich mit der allosterischen Regulation hinsichtlich einer Vermeidung hoher L-Homocystein-Konzentrationen auffallend deckt. Eine weitere wichtige Regulation erfolgt durch das **Aktivatorprotein MetR**. Es wird für die verstärkte Expression der Methioninsynthase MetH und der Homocystein-Methyltransferase MetE benötigt. Innerhalb von *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass durch MetR die Expression von *metE* 16-fach und von *metH* 8-fach verstärkt wird (Cai et al. 1989). MetR autoregulierte seine eigene Synthese, wird aber durch MetJ reprimiert (Kumar et al. 2005). In diesem Zusammenhang fungiert L-Homocystein als Co-Aktivator. Hierbei wird insbesondere die Expression von MetE zusätzlich stimuliert, während die Expression von MetH geringfügig abgeschwächt wird (Weissbach et al. 1991). Zusätzlich wird die Autoregulation von MetR stimuliert. Solange L-Homocystein vorhanden ist, wird zudem die Expression der Serin-Hydroxymethyltransferase (GlyA) verstärkt. Ist kein L-Homocystein vorhanden, wird die Expression von *glyA* hingegen reprimiert (Membrillo-Hernandez et al. 1998). Darüberhinaus konnte eine transkriptionelle Regulation durch Vitamin B₁₂ (Cobalamin) nachgewiesen werden. In Gegenwart des Cofaktors kommt es zu einer verstärkten Expression von *metH* (Ausbildung eines Holoenzym), während die Expression von *metE* vollständig reprimiert wird (Weissbach et al. 1991). In Abbildung 7.10 wurden wichtige Wege der allosterischen und transkriptionellen Regulation der L-Methionin-Synthese in *E. coli* zusammengefasst.

7.3 Metabolomik

Die **Metabolomik** (*Metabolomics*) befasst sich mit der Identifizierung und Quantifizierung niedermolekularer Metabolite, die innerhalb biochemischer Netzwerke wechselwirken (Oldiges et al. 2007). In diesem Zusammenhang umfassen Metabolome die Gesamtheit aller Verbindungen, die innerhalb eines biologischen Systems (Zelle, Gewebe, Organismus) als Substrate bzw. Produkte von Enzymen fungieren und wichtige regulatorische Funktionen

übernehmen können. Im Gegensatz zum Genom oder Proteom stellt das Metabolom die Schnittmenge aller zellulären Regulationsmechanismen dar und repräsentiert somit weitestgehend den tatsächlichen physiologischen Zustand einer Zelle (Fiehn et al. 2003). Die Untersuchung von Konzentrationsdynamiken intrazellulärer Metabolitpools ermöglicht den vorteilhaften Zugang zu *in vivo* Kinetiken beteiligter Enzyme sowie zugrundeliegender Regulationsmechanismen und bildet somit die Grundlage für ein quantitatives Verständnis betrachteter metabolischer Netzwerke (Buchholz et al. 2002). Hierauf basierende Metabolomanalysen werden in gerichtete und ungerichtete Methoden eingeteilt. Ungerichtete Hochdurchsatz-Ansätze wie das *Metabolic Fingerprinting* (Endometabolom) oder das *Metabolic Footprinting* (Exometabolom) reduzieren den analytischen Aufwand signifikant und verfolgen eine qualitative bzw. semi-quantitative Übersichtsanalyse entsprechender Metabolite (Dunn et al. 2005a). Im Gegensatz hierzu verfolgen gerichtete Ansätze wie das Metabolic Profiling eine unverzerrte und absolute Quantifizierung eines definierten Satzes intrazellulärer Metabolite eines Stoffwechselwegs oder einer Substanzklasse unter Berücksichtigung von Proben- und Matrixeffekten (Oldiges et al. 2007). Derzeit gängige Quantifizierungsansätze innerhalb von Metabolomanalysen wurden in Tabelle 7.1 zusammengefasst. Für die Systembiologie ist insbesondere das *Metabolic Profiling* von übergeordnetem Interesse, da extrazelluläre Metabolitkonzentrationen im hohen Maße von Transportersystemen unter entsprechenden Kultivierungsbedingungen abhängen, so dass intrazelluläre Vorgänge in der Regel verborgen bleiben (Takors et al. 2007).

Tabelle 7.1 Grundlegende Begriffe der Metabolomik (Oldiges et al. 2007)

Bezeichnung	Definition
<i>Exometabolom</i>	Gesamtheit aller Metabolite außerhalb der Zelle (Kultivierungsüberstand)
<i>Endometabolom</i>	Gesamtheit aller Metabolite innerhalb der Zelle bzw. Kompartimente
<i>Target Analysis</i>	Quantitative Analyse von Substraten und/oder Produkten ausgewählter Enzyme
<i>Metabolic Fingerprinting</i>	Semi-quantitative Analyse des Endometaboloms
<i>Metabolic Footprinting</i>	Semi-quantitative Analyse des Exometaboloms
<i>Metabolic Profiling</i>	Quantitative Analyse aller Metabolite eines ausgewählten Stoffwechselwegs bzw. einer Substanzklasse (z.B. Zuckerphosphate)

7.3.1 Intrazelluläre Metabolomanalysen

Aus analytischer Sicht stellt die absolute Quantifizierung intrazellulärer Metabolite (*Metabolic Profiling*) eine große Herausforderung dar. In *E. coli* K12 sind beispielsweise derzeit ca. 1500 niedermolekulare intrazelluläre Metabolite beschrieben ($\leq 500 \text{ g mol}^{-1}$), die innerhalb des zellulären Stoffwechsels zu mehreren Tausend möglichen intrazellulären Flüssen führen (Weaver et al. 2014). Angesichts der großen Anzahl von Metaboliten verschiedenster Substanzklassen, unterschiedlichster biologischer Matrizen und Konzentrationen, die in der Regel über neun Größenordnungen variieren können (pM-mM), sind in der Vergangenheit verschiedene Analysetechniken entwickelt worden (Oldiges et al. 2007). Erste Ansätze basierten im Rahmen gerichteter Messungen einzelner Metabolite (*Target Analysis*) noch auf dem eingeschränkten Einsatz enzymatischer Assays (Bergmeyer 1984). Im Laufe der Zeit wurde das simultan erfassbare Metabolitspektrum durch die Verwendung chromatographischer Methoden stetig erweitert. Hierunter fallen der Einsatz von Dünnschichtchromatographie (TLC) (Tweeddale et al. 1998), Gaschromatographie (GC) (Womersley et al. 1981) oder Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) (Ritter et al. 2006). Co-eluierende Verbindungen komplexer biologischer Matrizen lassen sich allerdings mit rein LC- oder GC-basierten Methoden nicht vollständig differenzieren. Moderne Anwendungen basieren hingegen auf dem Einsatz von Massenspektrometrie mit weichen Ionisierungsmethoden wie der Elektrospray-Ionisierung (*Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*, ESI-MS) oder der Kernresonanzspektrometrie (*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, NMR) (Griffin et al. 2001). Im Rahmen von isotopischen Markierungsversuchen sind derartige Plattformen alternativlos. In der quantitativen Analytik werden allerdings aufgrund höherer Sensitivitäten Massenspektrometer zunehmend bevorzugt (Dunn et al. 2005b). Massenspektrometer ermöglichen die Trennung von Analyten anhand ihres Molekulargewichts und Ionisierungszustands (Masse-Ladungsverhältnis, m/z) und erlauben Messungen in vergleichsweise größeren Massenbereichen. Allerdings führen Direktinjektionen innerhalb von MS-Systemen unter Vermessung hochkomplexer Probenmatrizen zu enormen Sensitivitätsverlusten aufgrund ausgeprägter Ionensuppressions-Effekte innerhalb der Elektrospray-Ionisierung (Annesley et al. 2003). In diesem Zusammenhang hat sich die Kopplung von MS-Systemen mit Gaschromatographie (GC-MS) (Kvitvang et al. 2011), der Flüssigchromatographie (LC-MS) (Dell'mour et al. 2010) oder Kapillarelektrophorese (CE-MS)

(Ramautar et al. 2013) bewährt. Derartige Kopplungen ermöglichen eine vorteilhafte chromatographische Vortrennung entsprechender Metabolitspektren und führen unter Berücksichtigung des Retentionsverhaltens der jeweiligen Analyten zu einer Steigerung von Selektivitäten und Nachweisempfindlichkeiten (Oldiges et al. 2007). Aufgrund der hohen chemischen Diversität der Analytspektren innerhalb intrazellulärer Extrakte, ist für möglichst universelle Metabolomanalysen der multiple und zeitaufwendige Einsatz komplementärer analytischer Plattformen in der Regel unumgänglich. Resultierende Datensätze variieren hierbei allerdings oftmals bezüglich erzielbarer Präzisionen und Genauigkeiten der ermittelten Messwerte (Wang et al. 2006). Für kinetische Modellierungen intrazellulärer Reaktionsnetzwerke, im Rahmen von metabolischen Perturbationsstudien, ist allerdings eine zuverlässige und vergleichbare Quantifizierung absoluter intrazellulärer Konzentrationsdynamiken innerhalb definierter physiologischer Zustände von essentieller Bedeutung (Oldiges et al. 2004). Obwohl sich GC-MS-Methoden durch eine hohe Robustheit und Selektivität auszeichnen, setzen sich LC-MS-Systeme aufgrund ihrer vielseitigeren Einsetzbarkeit und gesteigerten Sensitivität durch weiterentwickelte Elektrospray-Ionisierungsquellen im Bereich quantitativer intrazellulärer Metabolomanalysen zunehmend durch (Luo et al. 2007).

7.3.2 LC-Tandem-MS-basierte intrazelluläre Analytik

Intrazelluläre Metabolome stellen mit 3-5% nur einen geringen Anteil bakterieller Biotrockenmassen dar (Neidhardt et al. 1996). Probenvolumina resultierender Metabolomextrakte sind somit begrenzt und enthalten teilweise sehr niedrige Analytkonzentrationen (z.B. pM). Im Gegensatz zu Makromolekülen wie Proteinen oder DNA sind schonende Aufkonzentrierungen durch Ultrafiltration aufgrund der geringen Molekulargewichte der Metabolite nicht durchführbar. In Folge werden sehr hohe Anforderungen bezüglich der Sensitivität und Selektivität eingesetzter analytischer Methoden gestellt, die MS-basierte Plattformen prinzipiell erfüllen (Oldiges et al. 2007). Im Vergleich zu anderen MS-basierten Verfahren weisen HPLC-basierte Vortrennungen entsprechender Metabolitspektren zahlreiche Vorteile auf. So ermöglichen LC-MS-Methoden die vorteilhafte direkte Messung von Metaboliten ohne vorhergehende Derivatisierung. Dies erlaubt die simultane Untersuchung

zahlreicher instabiler Substanzklassen (z.B. Cofaktoren), die durch GC-MS nicht zugänglich sind (Fei et al. 2014). Im Gegensatz hierzu ermöglichen GC-MS-Methoden nur die direkte Messung unpolarer und volatiler Analyten. Geladene und polare Metabolite erfordern hingegen umfangreiche und zeitaufwendige Derivatisierungsprotokolle, die eine zusätzliche systematische Fehlerquelle darstellen. In Folge müssen Verzerrungen der Messwerte durch ausgeklügelte Quantifizierungsstrategien wie dem Einsatz von Isotopenanaloga als Internstandards kompensiert werden (Vielhauer et al. 2011). Kapillarelektrophoresen (CE) zeigen zwar eine ausgezeichnete Kompatibilität mit ESI-Quellen ermöglichen aber nur eine chromatographische Trennung geladener und polarer Analyten (Edwards et al. 2006). Folglich werden LC-MS-Anwendungen derzeit aufgrund ihrer Vielseitigkeit als universellste analytische Plattformen zur Quantifizierung eines möglichst breiten Spektrums intrazellulärer Metabolite angesehen (Fei et al. 2014). In der Vergangenheit hat sich insbesondere der Einsatz silikabasierter Umkehrphasen (*Reversed Phase*, RP) innerhalb der Flüssigchromatographie bewährt (Kiefer et al. 2011). Im Vergleich zur Normalphasenchromatographie (NPLC) können innerhalb der Umkehrphasenchromatographie (RPLC) verbesserte Peakformen und -symmetrien erzielt werden, die zu einer signifikanten Steigerung der Trennleistung führen. Allerdings ist eine hinreichende Retention von polaren und geladenen Analyten (z.B. Aminosäuren, Nukleotide) auf den alkylierten stationären Phasen nur schwer erzielbar. Der Einsatz von Derivatisierungsreagenzien wie *ortho*-Phtahldialdehyd (OPA) in der RPLC-basierten Aminosäureanalytik bleibt auf bestimmte Substanzklassen beschränkt und stellt hinsichtlich der komplexen intrazellulären Probenmatrizen eine zusätzliche und unerwünschte Fehlerquelle dar (vgl. GC-MS) (You et al. 2007). Alternativ werden volatile Ionenpaarbildner wie Tributylamin (TBA) verwendet, die eine hinreichende Retention underivatisierter polarer Analyten auf Umkehrphasen ermöglichen (Seifar et al. 2013). Derartige Anwendungen führen allerdings aufgrund einer kontinuierlichen Co-Elution entsprechender Ionenpaarbildner innerhalb ESI-basierter MS-Systeme zu signifikanten Sensitivitätsverlusten. Im Gegensatz zu RPLC ermöglicht der Einsatz der HILIC-Chromatographie (*Hydrophilic Interaction Chromatography*) eine direkte Trennung underivatisierter polarer und geladener Analyten (Preinerstorfer et al. 2010). Innerhalb dieser Arbeit wurden zwitterionische polymerbasierte HILIC-Phasen eingesetzt (ZIC-pHILIC), die eine möglichst universelle Metabolomanalytik mit einem vorteilhaft breiten Messspektrum erlauben (Schiesel et al. 2010). Die chromatographische Optimierung stellt einen Teil der Entwicklung und Validierung der intrazellulären

Metabolomanalytik dar, wobei auf den Chromatographiemodus in Kapitel 8.9.3.1 näher eingegangen wird.

Der Einsatz von Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) ermöglicht zusätzliche Selektionen anhand des analyt-spezifischen Fragmentierungsverhaltens. Innerhalb von Triple-Quadrupol-Systemen können somit unter Berücksichtigung des Retentionsverhaltens und spezifischer Massenübergänge der jeweiligen Analyten enorme Selektivitätssteigerungen erzielt werden (Oldiges et al. 2007). Der Einsatz moderner ESI-Quellen unter pneumatischer Vernebelung ermöglicht hierbei gleichzeitig eine vorteilhaft hohe Sensitivität (Gross 2011). Innerhalb dieser Arbeit wurden Metabolomextrakte mittels einer LC-ESI-TripleQuad-MS/MS-Anlage vermessen. Der schematische Aufbau der Anlage wird in Abbildung 7.11 aufgeführt.

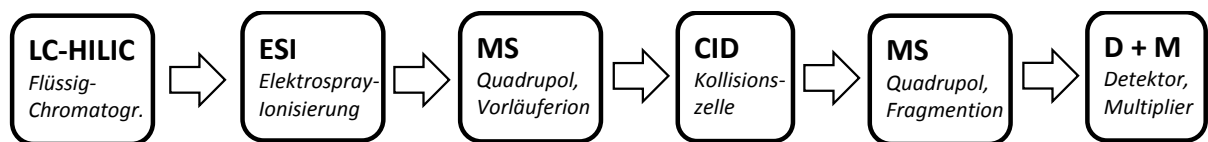


Abbildung 7.11 Schematischer Aufbau der eingesetzten LC-ESI-TripleQuad-MS/MS-Anlage. (Quelle: eigene Darstellung, in Anlehnung an Agilent Technologies, Concepts Guide, 2007)

7.3.2.1 Elektrospray-Ionisierung

Die Elektrospray-Ionisierung (ESI) ist eine Ionisierungsmethode von Analyten unter atmosphärischen Druck und repräsentiert innerhalb der Massenspektrometrie eines der am häufigsten eingesetzten Verfahren (Mashego et al. 2004). Innerhalb von LC-MS-Plattformen stellt sie die zentrale Schnittstelle (LC-ESI-MS-Kopplung) zwischen Flüssig-Chromatographie (LC) und dem Massenspektrometer-Komplex (MS) dar. Als sanfte Ionisierungsmethode (*Soft Ionization*, SI) mit dem Analyten aus der flüssigen in die Gasphase überführt werden, eignet sich das Verfahren insbesondere für nicht-volatile, leicht ionisierbare Moleküle wie Proteine, Peptide und polare Metabolite (Budzikiewicz und Schäfer 2005). Hierbei entstehen einfach oder mehrfach geladene Analytionen, die im Anschluss massenspektrometrisch nach ihren Masse-Ladungsverhältnissen (m/z) getrennt werden. Hierzu werden Probenlösungen oder chromatographische Eluate kontinuierlich in eine Metallkapillare (*Nebulizer* bzw. Vernebler) geleitet, an deren Spitze (Taylor-Kegel) eine positive oder negative Spannung im Bereich von ± 3000 - 6000 V angelegt ist. In Abhängigkeit der angelegten Polarität (ESI \pm) erfolgt hierbei eine

positive $[M+H]^+$ bzw. negative Ionisierung $[M-H]^-$ der jeweiligen Analytenmoleküle unter gleichzeitiger Versprühnung der Lösung (Elektrospray) (Gross 2011). Durch Einsatz eines ummantelnden, heißen und chemisch inerten Trägergases (i.R. Stickstoff, 150-450°C) wird die Verdampfung des Lösungsmittel unterstützt und entstehende Aerosole (Tröpfchen) stetig verkleinert. Anhand des angelegten elektrischen Felds akkumulieren resultierende geladene Analyten an der Lösungsmitteloberfläche. Nach Erreichen eines kritischen Raleigh-Limits (i.R. $\leq 1 \mu\text{m}$) übersteigt die elektrostatische Abstoßung gleichnamiger Ladungen die Oberflächenspannung des eingesetzten Lösungsmittels und es kommt zum Zerfall in kleinere Aerosole (Gross 2011). Dieser Vorgang wiederholt sich mehrmals und es entsteht ein feines Ionenspray ($\leq 10 \text{ nm}$). Die Bildung gasförmiger Ionen erfolgt anschließend entweder durch vollständige Verdampfung des Lösungsmittels (*Charged Residue Model*) oder durch Emission von Ionen aus dem Tropfen in die Gasphase (*Ion Evaporation Model*) (Thomson und Iribane 1979, Bruins 1998). Resultierende einfach oder mehrfach geladene Gasionen werden entlang des elektrischen Feldes über ein Blendensystem in das Hochvakuum des Massenspektrometers geleitet und anschließend nach ihren Masse-Ladungsverhältnissen (m/z) getrennt. Innerhalb dieser Arbeit wurde ein Elektrospray-Ionierungsquelle der Firma Agilent Technologies eingesetzt (Modell G1948B). Der patentierte orthogonale Aufbau ermöglicht eine sensitive Messung resultierender Analytionen unter minimierter Eintragung unerwünschter Probenkomponenten (*Noise Reduction*).

Quellenparameter wurden anhand des zu untersuchenden Metabolitspektrums optimiert (s. Kap. 8.9.4.2). In Abbildung 7.12 wird der schematische Aufbau der eingesetzten Elektrospray-Ionisationskammer unter Aufführung der wichtigsten Komponenten aufgezeigt. Moderne ESI-Quellen zeichnen sich insbesondere bei Einsatz organischer Lösungsmittelkomponenten (z.B. Methanol, Acetonitril) innerhalb eingesetzter Eluenten (Herabsetzung der Oberflächenspannung) durch eine hohe Sensitivität aus (Bruins 1998).

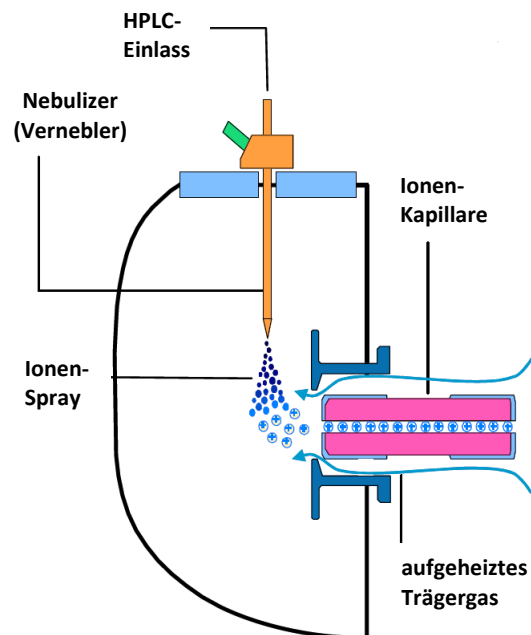


Abbildung 7.12 Schematischer Aufbau der eingesetzten Elektrospray-Ionisationsquelle (ESI) der Firma Agilent Technologies. (Quelle: modifizierte Darstellung, in Anlehnung an Agilent Technologies, Concepts Guide, 2007)

Die jeweilige Analytenresponsivität kann aber durch co-eluierende Substanzen signifikant beeinflusst werden. Bei der Vermessung hochkomplexer Probenmatrizen wie Metabolom-extrakte müssen Verzerrungen der Messwerte durch Einsatz von Quantifizierungsstrategien wie der Isotopen-Verdünnung oder Standardaddition (s. Kap. 8.10) folglich ausgeschlossen werden (Schiesel et al. 2010).

7.3.2.2 Triple Quadrupol-Tandem-Massenspektrometrie

Tandem-Massenspektrometer beruhen auf einer sequentiellen Anordnung mehrerer Massenspektrometern. Am weitesten verbreitet sind die Triple-Quadrupol-Instrumente, die auf einer linearen Anordnung von drei hintereinandergeschalteten Quadrupolen basieren (Budzikiewicz und Schäfer 2005). Quadrupole stellen Massenfilter dar und bestehen aus vier parallel angeordneten hyperbolischen Metallstäben, die jeweils paarweise miteinander elektrisch verbunden sind. An beide Stabpaare wird eine positive bzw. negative Gleichspannung (DC) angelegt. Gleichzeitig werden die Gleichspannungen mit Wechselspannungen (AC) überlagert, die um jeweils 180° in ihrer Phase verschoben sind, wodurch ein oszillierendes elektrisches Feld entsteht. Durch eine geeignete Abstimmung der Gleich- und Wechselspannungen können nur Ionen eines bestimmten Masse-Ladungsverhältnisses (m/z) eine stabile Flugbahn bilden und die Anordnung passieren. Alle anderen Ionen kollidieren mit den Metallstäben und entladen sich (Gross 2011). Unter Variation der angelegten Spannungen und Frequenzen können somit einstellbare Massenbereiche (m/z) selektiert werden. Von den drei Quadrupolen dienen der erste (Q1) und der dritte Quadrupol (Q3) als Massenfilter, während der zweite Quadrupol (Q2) als Kollisionszelle eingesetzt wird. In diesem wird eine Fragmentierung der Analytionen durch Kollision mit einem Inertgas (i.R. Stickstoff oder Argon) induziert, die durch den Gasdruck und der eingestellten Kollisionsenergie (*Collision Energy*, CE) reguliert wird (*Collision Induced Dissociation*, CID) (Gross 2011).

Die sequentielle Anordnung ermöglicht den Einsatz des Massenspektrometers in drei verschiedenen Betriebsmodi. Ionisierte Analyten werden hierzu mittels einer Ionenoptik zunächst fokussiert und über ein Potentialgefälle (Oktopol) beschleunigt (Budzikiewicz und Schäfer, 2005). Im **Full-Scan**-Modus wird lediglich der dritte Quadrupol (Q3) aktiv eingesetzt, während die ersten beiden Quadrupole (Q1 und Q2) der Transmission der Analytionen dienen. Der Modus ermöglicht innerhalb der Methodenentwicklung die Detektion von Vorläufer-

Ionen anhand ausgewählter Massenbereiche (m/z). Unter Verwendung von Referenzstandards und unter Umgehung der Flüssigchromatographie (MS-Direktinjektion) können somit die Reinheit und Stabilität der Analyten innerhalb der Elektrospray-Ionisierung (ESI) näher beurteilt werden. Im **Production-Scan**-Modus werden der erste und zweite Quadrupol (Q1 und Q2) aktiv eingesetzt, während der dritte Quadrupol (Q3) der Transmission dient. Innerhalb der Methodenoptimierung wird der Modus zur Beurteilung des CID-Fragmentierungsverhaltens selektierter Vorläufer-Ionen anhand eingesetzter Kollisionsenergien verwendet. Der **Multiple-Reaction-Monitoring**-Modus (MRM) entspricht dem konventionellen Messmodus, wobei alle drei Quadrupole aktiv eingesetzt werden. Der Modus basiert auf bereits voroptimierte analytspezifische Massenübergänge (MRM-Übergänge). Im ersten Quadrupol (Q1) werden entsprechende Vorläufer-Ionen aus Substanzgemischen selektiert. Anschließend werden die Vorläufer-Ionen innerhalb der Kollisionszelle (Q2) fragmentiert, so dass möglichst analyt-spezifische Fragment-Ionen optimal gebildet werden. Resultierende Fragment-Ionen werden innerhalb des dritten Quadrupols erneut selektiert. Der MRM-Modus bildet somit anhand definierter und optimierter Massenübergänge die Basis für die selektive Messung von Analyten innerhalb hochkomplexer Probenmatrizen wie Metabolomextrakten (Kiefer et al. 2008). Durch das schnelle Ansteuern der Stabelektroden können innerhalb weniger Millisekunden verschiedene Masse-Ladungsverhältnisse an den Quadrupolen eingestellt werden, was die simultane Vermessung mehrerer Analyten innerhalb enger Zeitbereiche ermöglicht. Da für die jeweiligen Analyten mit Ausnahme einiger isobarer Konstitutionsisomere in der Regel charakteristische Fragment-Ionen entstehen, können somit auch Analyten ohne vollständige chromatographische Trennung zuverlässig quantifiziert werden (Schiesel et al. 2010). In allen drei Modi erfolgt die Detektion selektierter Analytionen indirekt anhand einer Konversionsdynode und einen Elektronenvervielfacher (*Electron Multiplier*). Die analyt-spezifischen Signalstärken werden über die Retentionszeit der eingesetzten chromatographischen Methode aufgetragen woraus hochaufgelöste Ionenchromatogramme resultieren. In dieser Arbeit wurde ein Triple-Quadrupol-Tandem-Massenspektrometer der Firma Agilent Technologies eingesetzt. Substanzspezifische Massenübergänge sowie zugehörige MS/MS-Parameter wurden anhand des zu untersuchenden Metabolitspektrums optimiert (s. Kap. 8.9.4.3). In Abbildung 7.13 wird der

schematische Aufbau des eingesetzten Triple Quad MS/MS-Komplexes unter Aufführung der wichtigsten Komponenten aufgezeigt.

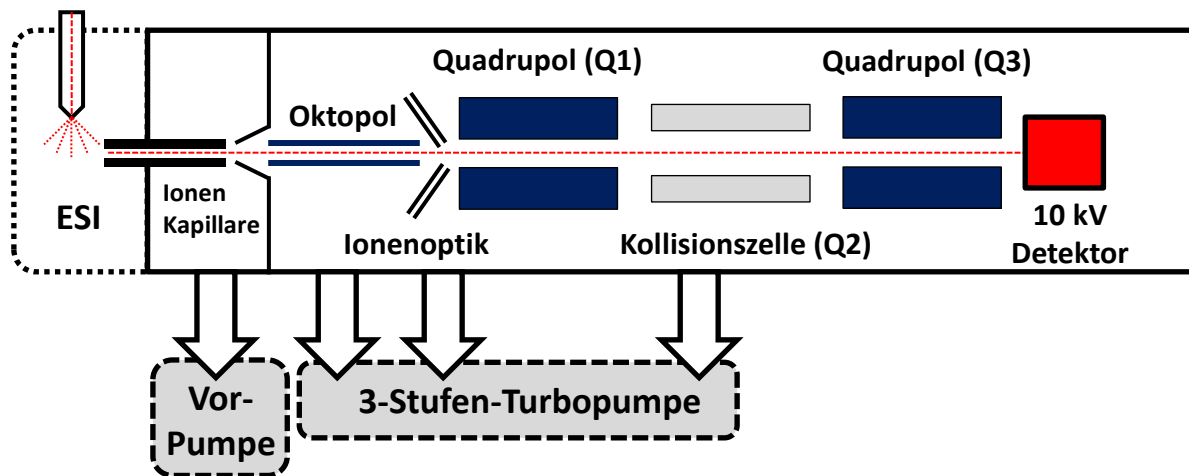


Abbildung 7.13 Schematischer Aufbau des eingesetzten Triple Quad MS/MS-Komplexes der Firma Agilent Technologies. (Quelle: eigene Darstellung, in Anlehnung an Agilent Technologies, Concepts Guide, 2007)

7.4 Stimulus-Response-Experimente (SRE)

Die rationale Stammoptimierung zur Produktivitätssteigerung zellulärer Systeme ist eine Kernaufgabe des *Systems Metabolic Engineering* (Wittmann et al. 2012). Derartige Ansätze basieren auf zielgerichtete genetische Modifikationen und setzen ein dynamisch-quantitatives Verständnis zugrundeliegender intrazellulärer Reaktionsnetzwerke voraus. Die mittlerweile klassische Vorgehensweise zur Identifizierung von intrazellulären Stoffwechsellimitierungen ist die Metabolische Kontrollanalyse (MCA) (Fell et al. 1992, Stephanopoulos 1999). Sie ist eine Berechnungsmethode, die modellgestützt Stoffwechselreaktionen identifiziert, die für die Synthese eines Zielprodukts limitierend sind. Diese basiert auf kinetischen Modellansätzen, deren experimentelle Grundlage dynamische Stoffflussanalysen innerhalb betrachteter Stoffwechselnetzwerke darstellen (Visser et al. 2002). Metabolomanalysen ermöglichen den direkten Zugang zu physiologischen Stoffwechselzuständen zellulärer Systeme in Abhängigkeit bestehender Kultivierungsbedingungen (Phänotyp). Ermittelte Gleichgewichtskonzentrationen intrazellulärer Metabolite können in diesem Zusammenhang als Endresultat aller unterliegenden zellulären Regulationsmechanismen aufgefasst werden. Dies umfasst sämtliche Regulationsebenen der Genexpression (Transkription, Translation, post-translationale Modifikation) bis hin zur allosterischen Regulation der enzymatischen Aktivität

innerhalb metabolischer Reaktionsnetzwerke (Fiehn et al. 2003). Allmähliche Veränderungen der mikrobiellen Umgebungsbedingungen (z.B. Substrat- und Produktkonzentrationen, pH-Wert) führen zu einer langfristigen Änderung bestehender Stoffflussverteilungen und bilden die Grundlage für ein quantitatives Verständnis des gesamten zellulären Stoffwechsels (Buchholz et al. 2002). Im Rahmen von Perturbationsexperimenten können hingegen kurzzeitige Auslenkungen bestehender intrazellulärer Gleichgewichtskonzentrationen erzielt werden. Anhand resultierender Konzentrationsdynamiken können anschließend Kontrolleigenschaften untersuchter Enzyme auf Stoffflüsse und Poolkonzentrationen innerhalb des Stoffwechselnetzwerks abgeleitet werden (Visser et al. 2004). Stimulus-Response-Experimente (SRE) erfordern hierbei eine abgestimmte Anwendung adäquater Perturbationsszenarien, Probennahmestrategien, Metabolomanalysen sowie mathematischer Modellierung (Oldiges 2004). Anhand einer iterativen Vorgehensweise aus Perturbationsexperiment, Stoffwechselmodellierung und genetischer Modifikation wird somit eine systematische und zielgerichtete Stammentwicklung ermöglicht (Magnus et al. 2009).

7.4.1 Metabolische Stimuli innerhalb intrazellulärer Stoffwechsel-Netzwerke

Stimulus-Response-Experimente (SRE) basieren auf einer puls-basierten zielgerichteten Perturbation fokussierter Stoffwechselwege unter Anwendung adäquater metabolischer Stimulussubstrate (Oldiges et al. 2005). Innerhalb geeigneter Zeiträume ermöglichen resultierende Konzentrationsdynamiken einen direkten Zugang zu kinetischen Eigenschaften beteiligter Enzyme sowie der allosterischen Regulation des gesamten Reaktionsnetzwerks zu definierten zellulären Zuständen und Zeitpunkten (Magnus et al. 2006). Voraussetzungen hierfür sind ein vorhergehendes metabolisches Fließgleichgewicht sowie konstante Enzymkonzentrationen des betrachteten metabolischen Netzwerks während entsprechender Stimulusphasen. In Abbildung 7.14 werden charakteristische Relaxationszeiten zellulärer Mechanismen nach entsprechenden Perturbationen aufgezeigt (Roels 1983). Massenwirkungskinetiken sowie die allosterische Regulation von Enzymaktivitäten durch Rückkopplungs- und Substratinhibierungen stellen die unmittelbare zelluläre Antwort dar. Veränderungen der Genexpression sind hierbei ungleich langsamer, wobei resultierende Enzymkonzentrationen innerhalb einer Größenordnung von ca. 10^3 s als weitgehend konstant angesehen werden können (Buchholz et al. 2002). Aussagekräftige Perturbationszeiträume

die den gegenwärtigen zellulären Phänotyp widerspiegeln, sollten somit innerhalb eines Zeitbereichs von ca. 10^0 - 10^3 s erfolgen.

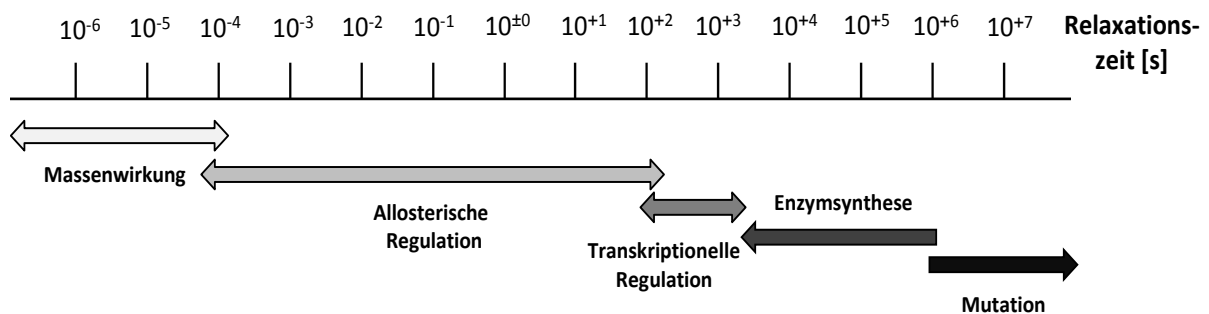


Abbildung 7.14 Relaxationszeiten unterschiedlicher zellulärer Antwortmechanismen nach erfolgter metabolischer Perturbation. (Quelle: eigene Darstellung, in Anlehnung an Roels et al. 1983)

Innerhalb von Perturbationsstudien müssen entsprechende Stimulusfunktionen sorgfältig adaptiert werden. Einerseits sollte eine starke Perturbation des gesamten Reaktionsnetzwerks erfolgen, so dass resultierende metabolische Anreicherungsprofile analytisch zugänglich sind. Andererseits sollten Zellschäden aufgrund einer nicht-physiologischen Überladung zugrundeliegender Stoffwechselsysteme vermieden werden (Oldiges et al. 2005). Optimale Stimulussubstrate müssen somit anhand unmittelbarer und konstanter Aufnahmeraten zuverlässig auslegbar sein, was eine vollständige Aufklärung zugrundeliegender Transportsysteme und -kinetiken voraussetzt. Mikrobielle Systeme wie *E. coli* oder *C. glutamicum* werden deshalb in der Regel unter Verwendung von Kohlenhydraten wie Glucose als alleinige C-Quellen innerhalb definierter Minimalmedien perturbiert (Schmitz et al. 2002). Derartige Stimulussubstrate profitieren von Kohlenhydrat-Aufnahmesystemen wie dem Phosphotransferasesystem (PTS) oder passiven Transportsystemen nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion. Die hoch-affinen Transportsysteme ermöglichen vorteilhaft hohe Aufnahmeraten, erfordern allerdings aufgrund ihrer induzierten Expression adaptierte Depletions- oder Limitierungsstrategien um eine Auslegung pulsbasierter Stimulusfunktionen zu ermöglichen (Magnus et al. 2006). Erste wegweisende Arbeiten hierzu erfolgten unter Verwendung von Glucose innerhalb von *Saccharomyces cerevisiae* Wildtypstämmen unter adaptierten Kultivierungsbedingungen (Theobald et al. 1993). Die Perturbationsstudien erfolgten innerhalb Glucose-limitierter Chemostat-Prozesse und ermöglichten somit erstmals dynamische Analysen des Zentralstoffwechsels. Im Laufe der Zeit wurden die Glucose-basierten Perturbationsstrategien stetig weiterentwickelt und auf weitere mikrobielle Produktionsplattformen wie *E. coli*

(Hurlebaus et al. 2002) oder *Z. mobilis* ausgeweitet (Weuster-Botz et al. 1997). Dies ermöglichte erstmalige kinetische Modellierungen der Glykolyse, des Pentose-Phosphatwegs oder des Citratzyklus innerhalb von Wildtyporganismen. In den letzten Jahren wurden die metabolischen Studien zunehmend auf Batch- oder Fed-Batch-Fermentationen rekombinanter Produktionsstämme unter Fokussierung anaboler Stoffwechselrouten erweitert. Hierzu zählen beispielsweise erste dynamisch-quantitative Analysen innerhalb des Synthesenetzwerks aromatischer Aminosäuren in *E. coli* (Oldiges et al. 2004) sowie der L-Valin/Leucin-Stoffwechselweg in *C. glutamicum* (Magnus et al. 2009). Essentiell ist eine möglichst unverzerrte absolute Quantifizierung resultierender instationärer Metabolitkonzentrationen, die Proben- und analytische Matrixeffekte durch aufwendige Validierungsstrategien kompensiert (Lu et al. 2006). Für derartige Perturbationsstrategien ist unabhängig von vorhandenen Aufnahmesystemen die vergleichsweise kurze Reaktionssequenz vom Signaleingang (Glucose-Puls) zum Signalausgang (betrachteter kataboler Metabolitpool) vorteilhaft. Unter Auslegung adaptierter Stimulusfunktionen (Pulsprofile) können somit starke und aussagekräftige Auslenkungen intrazellulärer Gleichgewichtskonzentrationen erzielt werden (Schmitz et al. 2002). Resultierende Konzentrationsanreicherungsprofile basieren hierbei auf Nettoraten aller Zu- und Abflüsse innerhalb eines betrachteten intrazellulären Pools und basieren somit direkt auf lokale kinetische Eigenschaften beteiligter Enzyme. Ausgehend vom Fließgleichgewicht erfolgt innerhalb der initialen Perturbationsphase eine schnelle Zunahme des Metabolitpools (Influxphase), der sich anschließend wieder der ursprünglichen Gleichgewichtskonzentration annähert (Effluxphase) (s. Abb. 7.15). Unter Fokussierung anaboler Stoffwechselwege sind entsprechende Konzentrationsdynamiken aufgrund des hohen Vernetzungsgrads des Zentralstoffwechsels sowie ausgeprägten allosterischen Rückkopplungsinhibierungen allerdings zunehmenden Verdünnungen unterworfen (*Signal Dilution*). Resultierende Perturbationsprofile besitzen einen abnehmenden Informationsgehalt und sind letztlich analytisch nicht mehr erfassbar (Schmitz et al. 2002). Eine Kompensation entsprechender Effekte kann unter einer gezielten Verstärkung zuführender Enzyme entsprechender anaboler Netzwerke erfolgen (Oldiges et al. 2004). Derartige Ansätze erfordern allerdings eine eher unerwünschte Modifikation zu untersuchender rekombinanter Produktionsstämme. Innerhalb dieser Arbeit wurde

stattdessen unter Einsatz eines alternativen Stimulussubstrats der Zentralstoffwechsel umgangen, was eine zielgerichtete Perturbation des L-Methionin-Synthesewegs ermöglichte.

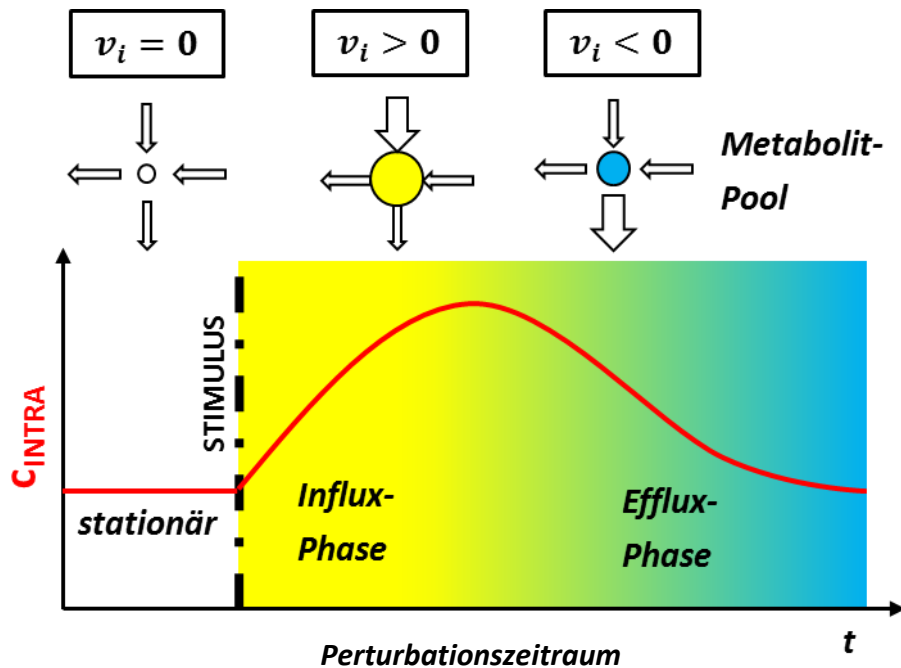


Abbildung 7.15 Konzentrationsanreicherungsprofile innerhalb metabolischer Perturbationsexperimente (SRE).
(Quelle: eigene Darstellung, Oldiges et al. 2004)

7.4.2 Intrazelluläre Probennahmestrategien

Angesichts verschiedenster Stimulus-Response-Experimente (SRE) unter Fokussierung unterschiedlicher Stoffwechselwege, mikrobieller Produzenten und Kultivierungsbedingungen, wurden in der Vergangenheit zahlreiche Probennahmestrategien entwickelt, die einen möglichst unverzerrten Zugang zu resultierende intrazelluläre Konzentrationsdynamiken erlauben. Intrazelluläre Probenaufarbeitungen umfassen grundsätzlich eine schnelle Probennahme, das *Quenching* zum schnellstmöglichen Abstoppen des zellulären Stoffwechsels sowie eine quantitative Extraktion intrazellulärer Metabolite unter Berücksichtigung analytischer Vorgaben (Dunn et al. 2005a). Die **schnelle Probennahme** ermöglicht eine repräsentative Entnahme zellulärer Biomassen unter einem weitgehenden Erhalt der jeweiligen instationären Metabolitkonzentrationen zu einem definierten Zeitpunkt. Das **Quenching** basiert auf einer temporären oder irreversiblen Inaktivierung der enzymatischen Aktivität um eine unerwünschte Umsetzung der metabolischen Perturbationsinformation während der Aufarbeitung zu vermeiden. Innerhalb der **Extraktion**

soll eine möglichst schonende Trennung „freier“ Metabolitpools entsprechender zellulärer Kompartimente (i.R. Cytoplasma) von Makromolekülen und der Biomasse erfolgen. Anhand der zeitlichen Trennung der einzelnen Teilschritte kann eine Einteilung gängiger Methoden erfolgen (Mashego et al. 2007). Aufgrund sehr hoher enzymatischer Umsatzraten stellt hierbei das schnelle Abstoppen der zellulären Stoffwechselaktivität innerhalb des integrativen Aufarbeitungsprozess eine enorme Herausforderung dar. Charakteristische Umsatzgeschwindigkeiten glykolytischer Metabolitpools liegen beispielsweise in *S. cerevisiae* in einem Bereich von ca. 1 mM s^{-1} (de Koning und van Dam 1992). In Abhängigkeit der jeweiligen Poolgrößen (i.R. μM - mM) liegen Umsatzraten (*Turnover Number*) entsprechender intrazellulärer Zentralstoffwechselfools somit im Sekunden- bis Subsekundenbereich. Ein Lösungsansatz stellen hierbei **integrative Methode** dar. Unter Verwendung einer Heizwendel ($\geq 95^\circ\text{C}$) können beispielsweise kontinuierliche Probennahmen unter gleichzeitigem Aufschluss der gesamten Zellsuspension erfolgen (Schaub et al. 2006). Die automatisierte Methode ermöglicht eine Entnahmefrequenz im Subsekundenbereich (bis zu 5 s^{-1}) bei einer gleichzeitigen permanenten thermischen Inaktivierung enzymatischer Stoffwechselaktivität. Die differentielle Bestimmung intrazellulärer Konzentrationen erfolgt anschließend anhand der Vermessung analoger Kultivierungsüberstände. Ein Nachteil der Methode liegt in einer starken Verdünnung intrazellulärer Metabolite, die insbesondere bei hohen extrazellulären Konzentrationsüberschüssen analytisch nicht zugänglich sind. Hinsichtlich der Untersuchung von Produktionsstämmen sind Adaptionen der Kultivierungsmodi unter vorteilhafter Reduktion extrazellulärer Titer (z.B. Chemostat) allerdings eher unerwünscht. **Simultane Methoden** basieren auf einem Aufschluss der gesamten Zellsuspension unmittelbar nach der Probennahme. Die Zugabe von z.B. starken Säuren oder Basen ermöglicht eine permanente Inaktivierung des Stoffwechsels unter einer gleichzeitigen Extraktion intrazellulärer Metabolite. Beispielsweise sind *Energy Charge* (EC) Bestimmungen anhand Perchlorsäure-Aufschlüsse unter anschließender HPLC-basierter Quantifizierung entsprechender Adenosinphosphat-Spezies gängig (Chapman et al. 1971). Allerdings führt die differentielle Bestimmung intrazellulärer Konzentrationen aus analytischer Sicht zu vergleichbaren Problemen. **Sequentielle Methoden** basieren auf einer quantitativen Abtrennung von Kultivierungsüberständen vor der Metabolomextraktion unter einer vorteilhaften Umgehung differentieller Vorgehensweisen. Hierbei wird unterschieden ob die Abtrennung vor oder nach der Quenching-Prozedur erfolgt. Lediglich bei letzterem ist eine automatisierte Probennahme

unter gleichzeitigem Abstoppen des Stoffwechsels im Subsekundenbereich möglich. Eine gängige Standardmethode stellt hierbei das *Cold Methanol Quenching* (CMQ) dar (de Koning and van Dam 1992). Hierzu werden Zellsuspensionen direkt in eine auf $\leq -50^\circ\text{C}$ vorgekühlte 60%ige Methanol-Wasser-Lösung gegeben, die eine temporäre Inhibierung der enzymatischen Aktivität ermöglicht. Der methanolische Quenchingüberstand wird anschließend bei $\leq -20^\circ\text{C}$ abzentrifugiert. Metabolitextraktionen erfolgen anschließend in der Regel anhand eines kalten Chloroformaufschlusses unter Einsatz wässriger methanolischer Lösungen ($\leq -20^\circ\text{C}$). Die Direkteinspritzung entsprechender Fermentationsbrühen ist im hohen Maße automatisierbar und erlaubt vergleichbar mit integrativen Ansätzen Entnahmefrequenzen von $4-5\text{ s}^{-1}$ (Oldiges et al. 2005). Als problematisch erweist sich hierbei ein erheblicher Austritt intrazellulärer niedermolekularer Metabolite (*Leakage*), der insbesondere in Prokaryonten wie *E. coli* auf einem Verlust der Membranintegrität durch Kälteschock basiert (Wittmann et al. 2004). Bilanzierungen der Metabolitverluste anhand der zusätzlichen Vermessung analoger Quenching- und Kultivierungsüberstände sind zeitaufwendig und führen zu den bereits erwähnten Nachteilen einer differentiellen Bestimmung. Alternative Methoden umgehen die Problematik durch eine vorhergehende Abtrennung des Zellpellets mittels Filtration (*Fast Filtration*) (Wittmann et al. 2004), Gelfiltration (Persicke et al. 2011), direkter Zentrifugation (*Fast Centrifugation*) (Plassmeier et al. 2007) oder Zentrifugation unter Einsatz von Silikonölphasen (*Silicone oil centrifugation*) (Park et al. 2007). Aufgrund der mehr- oder weniger zeitversetzten Stoffwechsellinaktivierung ist eine Verzerrung der Konzentrationswerte durch eine unerwünschte enzymatische Umsetzung innerhalb dieses Zeitintervalls problematisch. Unter einer weitgehenden Vermeidung des Leakage-Effekts sind isotonische Waschschriffe zusätzlich implementierbar, wodurch interzelluläre Verschleppungen vergleichsweise hoher extrazellulärer Konzentrationen abtrennbar sind. Metabolitextraktionen resultierender Zellpellets können anschließend unter kurzzeitigem Aufkochen (2-5 min) in Wasser, Ethanol oder Ethanol-Wassergemischen erfolgen (Krömer et al. 2004). Unter einem hohen Automatisierungsgrad sind die kritischen Zeitintervalle innerhalb von Filtrationsanlagen auf wenige Sekunden minimierbar. Aktuelle Methoden beschleunigen die Inaktivierungsintervalle durch ein Überschichten der Filter mit kalten wässrigen Methanol-Lösungen (*on-Filter Quenching*). Entsprechende Leakage-Effekte werden durch verkürzte Expositionszeiten signifikant gemindert (Luz et al. 2013).

7.4.3 Datenauswertung im Rahmen der Metabolischer Kontrollanalyse (MCA)

Konzentrationsdynamiken intrazellulärer Metabolitpools innerhalb von Stimulus-Response-Experimenten (SRE) bilden die Grundlage zur Entwicklung kinetischer Stoffwechselmodelle, die die detaillierteste Möglichkeit intrazellulärer Stoffflussanalysen darstellen (Weuster-Botz 1999). Intrazelluläre Metabolitkonzentrationen unterliegen hinsichtlich der unterschiedlichen zellulären Ebenen einer komplexen Regulationshierarchie, die eine Adaptation des zellulären Stoffwechsels innerhalb unterschiedlicher Umgebungsbedingungen ermöglichen. Bereits in den frühen 70er Jahren wurden in unabhängigen Arbeiten von Kacser und Burns (1973) sowie Heinrich und Rapoport (1974) quantitative Kriterien formuliert die Systemparameter auf Stoffflüsse und Metabolitkonzentrationen innerhalb der Reaktionsnetzwerke aufweisen. In Folge wurden die Konzepte stetig weiterentwickelt und stellen heute wesentliche Bausteine metabolischer Kontrollanalysen (*Metabolic Control Analysis*, MCA) dar (Visser et al. 2002). In diesem Zusammenhang können anhand von Sensitivitätsanalysen die Einflüsse einzelner enzymatischer Aktivitäten auf Gesamtflüsse intrazellulärer Netzwerksysteme in Form globaler Kontrollkoeffizienten (Flusskontrollkoeffizienten) quantifiziert werden. Insoweit wird die traditionelle Auffassung, dass die Regulation eines Gleichgewichtsflusses durch einen einzelnen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt innerhalb betrachteter Reaktionskaskaden (z.B. Eingangsreaktion) bestimmt wird, negiert. Stattdessen wird von einer geteilten Regulation aller innerhalb einer Reaktionskaskade beteiligter Enzyme auf den Gesamtfluss ausgegangen (Fell et al. 1992). Die Quantifizierbarkeit derartiger globaler Kontrolleigenschaften ermöglicht somit systematische Stammoptimierungen durch zielgerichtete genetische Modifikationen, die eher intuitive Vorgehensweisen auf Basis rein qualitativ-mechanistischer Überlegungen zunehmend ablösen (Buchholz et al. 2002). Die modellgestützte Ableitung globaler Kontrollkoeffizienten basiert auf der simultanen Bestimmung lokaler kinetischer Eigenschaften einzelner Reaktionsschritte, die direkt von *in vivo* Eigenschaften der entsprechenden Enzyme abhängen (Stephanopoulos 1999). Die lokal-kinetischen Ansätze basieren hierbei häufig auf nicht-mechanistische LinLog-Kinetiken, die eine approximative Beschreibung der jeweiligen enzymatischen Reaktionsraten in Abhängigkeit beteiligter Metabolitkonzentrationen (Elastizitäten) ermöglichen (Visser et al. 2003). Im Rahmen von Perturbationsstudien sind somit auch hoch-dynamische Konzentrationsänderungen auswertbar, die die ursprünglichen Anforderungen analytisch

nicht zugänglicher infinitesimaler Konzentrationsänderungen weitgehend überwinden (Nielsen et al. 1998). Je nach der Komplexität des betrachteten Reaktionsnetzwerks können allerdings innerhalb solcher Modelle mehrere hundert Parameter auftreten, die trotz der bereits diskutierten schwierigen experimentellen Zugänglichkeit instationärer Konzentrationsverläufe, mit einer hohen Präzision und Genauigkeit ermittelt werden müssen. Einen alternativen Weg verfolgen rein datengetriebene Ansätze, die direkt auf der Messung transienter intrazellulärer Metabolitkonzentrationen in Folge metabolischer Stimuli basieren (Oldiges et al. 2004). Im Gegensatz zu enzymatischen Elastizitäten werden lediglich maximale Effluxraten aus perturbierten Metabolitpools näher betrachtet (*Pool Efflux Capacity, PEC*). Derartige Kriterien erfordern im Vergleich zu LinLog-Kinetiken keinen großen Modellierungsaufwand zur Identifizierung enzymatischer Kontrolleigenschaften innerhalb großskaliger metabolischer Netzwerke. Alleine eine Bilanzierung einzelner Pools reicht aus, um die notwendigen maximalen Reaktionsraten der Metabolite aus diesen Pools zu bestimmen. Dies vereinfacht die notwendigen theoretischen und modellierungstechnischen Vorarbeiten um die Methodik im realen Anwendungsfall einsetzen zu können. Es handelt sich somit um einen vergleichsweise zielführenden methodischen Ansatz, der aufgrund seiner hohen Robustheit auch bei messtechnischen Unsicherheiten valide Aussagen im Rahmen von Regulationsanalysen erlaubt (Magnus et al. 2009). Darüberhinaus kann der analytische Aufwand hinsichtlich der Erhebung instationärer, intrazellulärer Metabolitkonzentrationen unter partieller Betrachtung essentieller Reaktionskaskaden innerhalb hochverzweigter Netzwerksysteme merklich reduziert werden. In dieser Arbeit wurde eine vergleichende Kontrollanalyse des L-Methionin-Synthesenetzwerks auf Basis durchgeführter Stimulus-Response-Experimente innerhalb des Produktionsstamms *E. coli* SPOT01 durchgeführt. Im Vordergrund stand die Ableitung enzymatischer Targets anhand eines LinLog-basierten kinetischen Modells und einer rein datenorientierten PEC-Auswertung.

8 Material und Methoden

8.1 Produktionsstamm

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der durch die Evonik Industries AG bereitgestellte L-Methionin-Produzent *E. coli* **SPOT01** näher untersucht. Ausgehend vom Wildtyp-Stamm *E. coli* K-12 MG1655 wurden folgende genetische Modifikationen (s. Tab. 8.1) durchgeführt:

Tabelle 8.1 Übersicht des Genotyps des L-Methionin-Produzenten *E. coli* SPOT01

Modifikation	Gen	Notation	Enzym/Transporter	Motivation
Chromosomale Deletion	<i>pykF</i>	b1676	Pyruvatkinase I	Modifikation des C ₃ /C ₄ -Stoffwechsels
	<i>pykA</i>	b1854	Pyruvatkinase II	
	<i>purU</i>	b1232	Formyltetrahydrofolat-Deformylase	Modifikation des C ₁ -Stoffwechsels
Chromosomale Verstärkung	<i>cysP</i>	b2425		Verstärkung des Thiosulfat-Imports
	<i>cysU</i>	b2424	Sulfat/Thiosulfat	
	<i>cysW</i>	b2423	Importersystem	
	<i>cysA</i>	b2422		
	<i>cysM</i>	b2421	Cystein Synthase B	Verstärkung der reduktiven Sulfatassimilation
	<i>cysI</i>	b2763	Sulfit-Reduktase	
	<i>cysJ</i>	b2764	Sulfit-Reduktase	
	<i>cysH</i>	b2762	PAPS-Reduktase	
	<i>metF</i>	b3941	Methylentetrahydrofolat-Reduktase	Verstärkung der Transmethylierung
	<i>gcvT</i>	b2905	Aminomethyltransferase	Verstärkung des <i>Glycine Cleavage</i> Systems
<i>gcvH</i>	b2904	<i>Glycine Cleavage</i> (H-Protein)		
<i>gcvP</i>	b2903	Glycin-Dehydrogenase		
Episomale Verstärkung	<i>serA</i>	b2913	D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	Verstärkung der L-Serin-Synthese
	<i>serB</i>	b4388	Phosphoserin-Phosphatase	
	<i>serC</i>	b0907	Phosphoserin-Aminotransferase	
	<i>glyA</i>	b2551	Serin Hydroxymethyltransferase	Verstärkung der Transmethylierung

Chromosomale Verstärkungen erfolgten durch Insertion starker Trc Promotoren *upstream* der jeweiligen Operatorsequenzen unter Einbau einer Spectinomycin-Resistenz. Episomale Verstärkungen erfolgten durch Überexpression auf dem Vektor pCC1BAC mit einer Chloramphenicol-Resistenz und einem IPTG-induzierbaren T7 Promotor. Die genaue Vorgehensweise kann dem Evonik Patent (WO 2012/098042A1) entnommen werden.

Die vorgenommenen Modifikationen zielen auf eine erhöhte Bereitstellung von Vorläufermolekülen für das Methionin-Synthesenetzwerk ab. Im Zentralstoffwechsel soll durch die Deletion der Pyruvatkinasen (PykF und PykA) ein Metabolitrückstau ab Phosphoenolpyruvat (PEP) und ein damit verbundener erhöhter Fluss von 3-Phosphoglycerat (3PG) in Richtung der L-Serin-Synthese erreicht werden. Gleichzeitig wird ein Teil des glykolytischen Flusses anaplerotisch zur gesteigerten Synthese des Vorläufermoleküls Oxalacetat (OAA) umgeleitet. Das für den TCA-Zyklus benötigte Pyruvat wird durch das Phosphotransferasesystem (PTS) und im Methioninsyntheseweg bereitgestellt.

Weiter soll die Bereitstellung von L-Serin (L-Ser) und Glycin (Gly) durch Überexpression der Enzyme der Serin-Biosynthese (SerA/B/C) sowie der Serin-Hydroxymethyltransferase (GlyA) erhöht werden, woraus ein erhöhter Fluss durch den C₁-Metabolismus erfolgen soll. Hieraus ergibt sich eine verbesserte Bereitstellung von Methyl-Tetrahydrofolaten (Methyl-THF) für die finale Transmethylierung von L-Homocystein (L-HCys) zu L-Methionin (L-Met). Durch eine verstärkte Expression des *Glycine Cleavage Systems* (GCV) und der 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MetF) soll die Bereitstellung von Methylgruppen weiter gesteigert werden. In diesem Zusammenhang wird ein hydrolytischer Abbau von 10-Formyltetrahydrofolat durch Deletion der Formyltetrahydrofolat-Deformylase (PurU) unterbunden.

Abschließend soll eine verbesserte Bereitstellung von Sulfid (S²⁻) bzw. von L-Cystein (L-Cys) durch Überexpression des Sulfat/Thiosulfat ABC-Transportsystems (CysPUWA), der PAPS-Reduktase (CysH), der Sulfitreduktasen (CysJ/I) und der Cystein-Synthase (CysM) erzielt werden. In Abbildung 8.1 wurden durchgeführte genetische Modifikationen anhand einer schematischen Stoffwechselkarte des Zentralstoffwechsels sowie des anabolen L-Methionin-Synthesenetzwerks zusammengefasst.

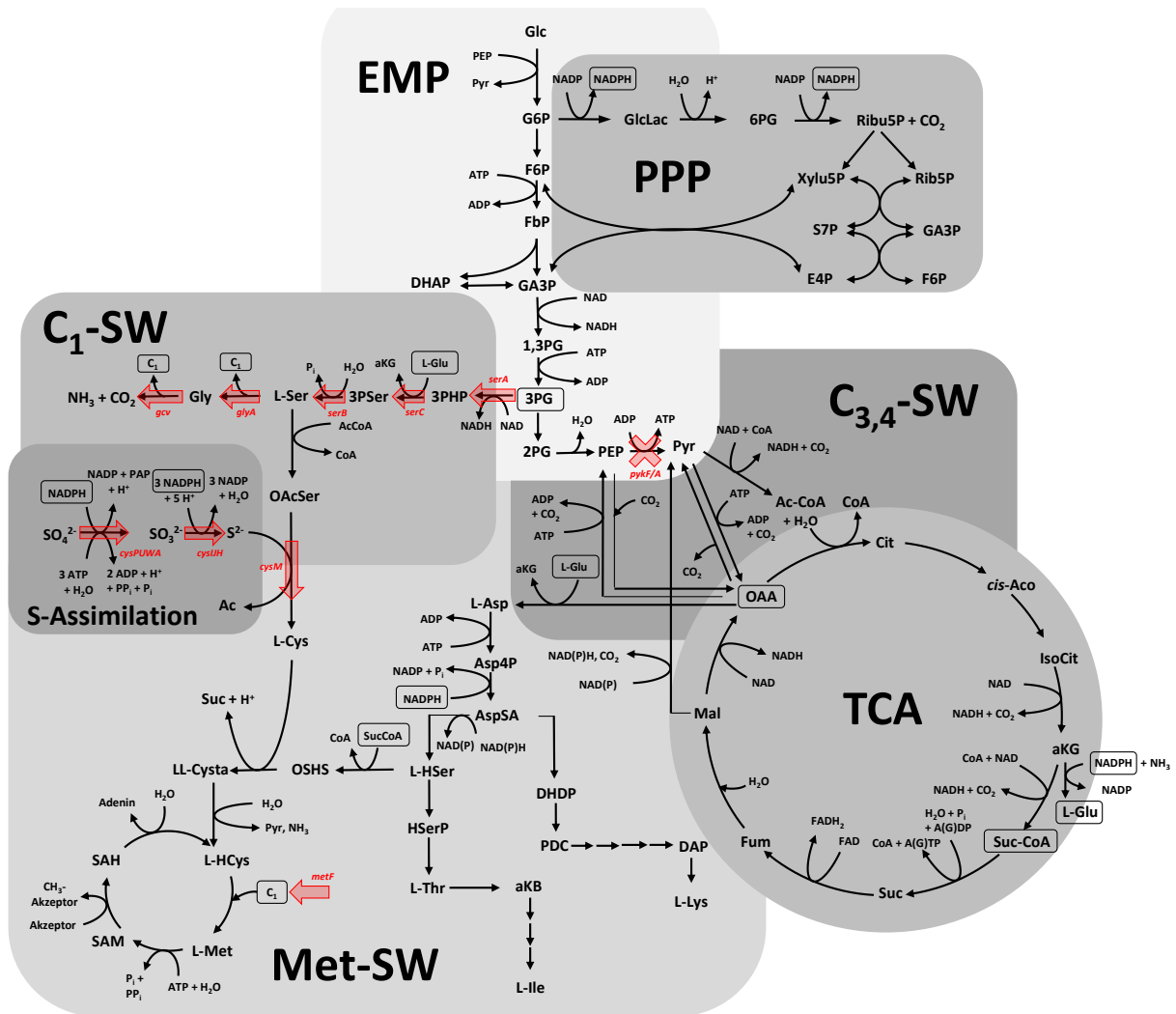


Abbildung 8.1 Genetische Modifikationen im Produktionsstamm *E. coli* SPOT01. (Quelle: eigene Darstellung unter Angaben der Evonik Industries AG, in Anlehnung an Neidhardt et al. 1996)

8.2 Medien und Reinheit

Kultivierungen von *E. coli* SPOT01 erfolgten in Minimalmedien (EcM), die auf den Vorgaben der Evonik Industries AG basierten und an die jeweiligen experimentellen Fragestellungen angepasst wurden (s. Tab. 8.4). In allen Medien wurden **D-Glucose** und **Sulfat** bzw. **Thiosulfat** als alleinige Kohlenstoff- und Schwefelquelle eingesetzt. Variable Anteile sowie nicht aufgeführte Supplemente wurden in den experimentellen Methoden gesondert aufgeführt. Kultivierungen des Wildtyp-Stamms *E. coli* K-12 MG1655 erfolgten im WHM-Minimalmedium unter Verwendung von D-Glucose als alleinige Kohlenstoffquelle (s. Tab. 8.3).

Eingesetzte Medienkomponenten waren von mindestens analytischer Reinheit und wurden von folgenden Firmen bezogen: Fluka (Buchs/Steinheim, CH/D), AppliChem (Darmstadt, D), Carl Roth (Karlsruhe, D), Riedel-de Haën (Seelze, D), Sigma-Aldrich (Steinheim, D), Merck (Darmstadt, D). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels Stimulus-Response-Experimenten die system-metabolische Antwort eines Methionin-Produzenten auf verschiedene Stimulus-substanzen näher untersucht. Eingesetzte Supplementierungs- und Stimulierungssubstrate waren von möglichst hoher Reinheit und wurden in Tabelle 8.2 zusammengefasst.

Tabelle 8.2 *Reinheit und Hersteller eingesetzter Supplementierungs- und Stimulierungssubstrate*

Substanz	Reinheit	Hersteller
[U ¹² C]-L-Serin	>99,5%	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
[U ¹³ C]-L-Serin	>95,0%, 98 atom% (¹³ C)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
L-Aspartat	>99,0%	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
L-Cystein	>98,5%	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
L-Homoserin	>98,0%	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Glycin	>99,0%	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

Tabelle 8.3 *Minimalmedium (WHM) zur Kultivierung von E. coli K12 MG1655 (Wildtyp)*

Komponente	Summenformel	MG [gmol ⁻¹]	c [gL ⁻¹]	c [mM]	
C-Quelle	Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16	8,250	41,630
N-/S-/P-Quelle (Puffer)	Di-Ammoniumhydrogenphosphat	(NH ₄) ₂ HPO ₄	132,05	1,321	10,000
	Di-Kaliumhydrogenphosphat	K ₂ HPO ₄	174,18	4,686	26,900
	Natrium-Di-Hydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄	156,01	9,844	63,100
	Di-Ammoniumsulfat	(NH ₄) ₂ SO ₄	132,14	2,680	20,282
	Di-Natriumsulfat	Na ₂ SO ₄ · 10 H ₂ O	322,19	2,000	6,208
Salze	Magnesiumsulfat	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	246,48	0,246	1,000
	Calciumchlorid	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	147,02	0,015	0,100
Spurenelemente	Zinkacetat	C ₄ H ₆ O ₄ ·2H ₂ O	219,5	0,013	0,059
	Kupfer(II)chlorid	CuCl ₂ ·2H ₂ O	170,48	0,002	0,009
	Mangan(II)chlorid	MnCl ₂ ·4H ₂ O	197,91	0,150	0,758
	Natriummolybdat	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	205,92	0,003	0,012
	Cobalt(II)chlorid	CoCl ₂ ·6H ₂ O	237,93	0,003	0,011
	Borsäure	H ₃ BO ₃	61,83	0,003	0,049
Vitamine	Thiamin · HCl (B ₁)	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS·HCl	337,27	0,010	0,030

Tabelle 8.4 Minimalmedien (EcM) zur Kultivierung von *E. coli* SPOT01 basierend auf Vorgaben der Evonik Industries AG

				EcM3(a)		EcM3(b)		EcM4		EcM5		EcM6	
	Komponente	Summenformel	MG [gmol ⁻¹]	c [gL ⁻¹]	c [mM]	c [gL ⁻¹]	c [mM]	c [gL ⁻¹]	c [mM]	c [gL ⁻¹]	c [mM]	c [gL ⁻¹]	c [mM]
C-Quelle	Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16	15,000	83,259	10,000	55,506	var	var	10,000	55,506	15,000	83,259
N-/S-/P-Quelle	Di-Ammoniumhydrogenphosphat	(NH ₄) ₂ HPO ₄	132,05	-	-	-	-	3,660	27,717	3,660	27,717	5,280	39,985
	Di-Kaliumhydrogenphosphat	K ₂ HPO ₄	174,18	1,400	8,038	1,400	8,038	-	-	-	-	-	-
	Kalium-Di-Hydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	136,09	1,910	14,035	1,910	14,035	2,040	14,990	2,040	14,990	-	-
	Ammoniumthiosulfat	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	148,21	8,300	56,002	16,600	112,003	var.	var.	2,964	19,999	-	-
	Natriumthiosulfat	(Na) ₂ S ₂ O ₃ · 7 H ₂ O	248,18	-	-	-	-	-	-	-	-	3,720	14,989
Salze	Natriumchlorid	NaCl	58,44	-	-	1,200	20,534	-	-	0,584	10,000	0,584	10,000
	Magnesiumchlorid	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	203,3	0,830	4,083	0,830	4,083	0,830	4,083	0,830	4,083	0,830	4,083
	Calciumchlorid	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	147,02	0,106	0,721	0,106	0,721	0,106	0,721	0,106	0,721	0,106	0,721
Komplex	Citrat	C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O	210,1	1,860	8,853	1,860	8,853	1,860	8,853	1,860	8,853	1,860	8,853
	EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	372,14	0,008	0,021	0,008	0,021	0,008	0,021	0,008	0,021	0,008	0,021
Spurenelemente	Eisen(III)citrat	C ₆ H ₅ FeO ₇ · H ₂ O	262,96	0,102	0,388	0,102	0,388	0,102	0,388	0,102	0,388	0,102	0,388
	Zinkacetat	C ₄ H ₆ O ₄ · 2 H ₂ O	219,50	0,013	0,059	0,013	0,059	0,013	0,059	0,013	0,059	0,013	0,059
	Kupfer(II)chlorid	CuCl ₂ · 2 H ₂ O	170,48	0,002	0,009	0,002	0,009	0,002	0,009	0,002	0,009	0,002	0,009
	Mangan(II)chlorid	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	197,91	0,150	0,758	0,150	0,758	0,150	0,758	0,150	0,758	0,150	0,758
	Natriummolybdat	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	205,92	0,003	0,012	0,003	0,012	0,003	0,012	0,003	0,012	0,003	0,012
	Cobalt(II)chlorid	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	237,93	0,003	0,011	0,003	0,011	0,003	0,011	0,003	0,011	0,003	0,011
	Borsäure	H ₃ BO ₃	61,83	0,003	0,049	0,003	0,049	0,003	0,049	0,003	0,049	0,003	0,049
Vitamine	Thiamin · HCl (B1)	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS · HCl	337,27	0,010	0,030	0,010	0,030	0,010	0,030	0,010	0,030	0,010	0,030
	Cyanocobalamin (B12)	C ₆₂ H ₈₈ CoN ₁₃ O ₁₄ P	1355,4	0,010	0,007	0,010	0,007	0,010	0,007	0,010	0,007	0,010	0,007
Antibiotika	Spectinomycin	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₇ · 2 HCl · 5 H ₂ O	495,35	0,050	0,101	0,050	0,101	0,050	0,101	0,050	0,101	0,050	0,101
	Chloramphenicol	C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅	323,13	0,012	0,037	0,012	0,037	0,012	0,037	0,012	0,037	0,012	0,037
	IPTG	C ₉ H ₁₈ O ₅ S	238,30	0,024	0,101	0,024	0,101	0,024	0,101	0,024	0,101	0,024	0,101
Puffer	MOPS	C ₇ H ₁₅ NO ₄ S	209,26	-	-	-	-	var.	var.	5,000	23,894	-	-

8.3 Stammhaltung

Die Konservierung des Produktionsstamms *E. coli* SPOT01 erfolgte in Kryokulturen im adaptierten EcM4 Minimalmedium unter Verwendung von 25% Glycerin (vv⁻¹) bei -70°C. Ausgehend von vorab erstellten Kryokulturen (25% vv⁻¹ Glycerin, LB-Medium, OD₆₀₀ ca. 45) erfolgte eine Vorkultivierung im Schüttelkolben (s. Kap. 8.4) im adaptierten EcM4 Medium (Vorkultivierung) unter zusätzlicher Verwendung von Hefeextrakt (4 gL⁻¹). Die Zellen wurden innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase geerntet (OD₆₀₀ ca. 3,0) und mit 0,9% isotonischer NaCl-Lösung (wv⁻¹) gewaschen. Die Hauptkultivierung wurde in einem 2,5-L-Rührkessel-Glasreaktor (Bioengineering) mit einem Arbeitsvolumen von 1,6 L durchgeführt (s. Kap. 8.5). Adaptiertes EcM4 Medium (Hauptkultivierung) wurde auf eine Start-OD₆₀₀ von ca. 0,1 inokuliert und die Zellen nach 23 h innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase (OD₆₀₀ ca. 14,0) 5 min bei 8000 rpm und 4°C (Avanti J-25, Beckman Coulter) abzentrifugiert. Resultierende Zellpellets wurden im adaptierten EcM4 Medium (Lagerung) unter Verwendung von 25% Glycerin (vv⁻¹) auf eine OD₆₀₀ von ca. 50 resuspendiert und in Kryoröhrchen bei -70°C gelagert. Abweichende Konzentrationen adaptierter EcM4 Minimalmedien wurden in Tabelle 8.5 zusammengefasst.

Tabelle 8.5 Abweichende Komponenten in EcM4 Minimalmedien zur Stammhaltung

Komponente	MG [gmol ⁻¹]	EcM4 (Vorkultur)		EcM4 (Hauptkultur)		EcM4 (Lagerung)	
		c [gL ⁻¹]	c [mM]	c [gL ⁻¹]	c [mM]	c [gL ⁻¹]	c [mM]
Glucose	180,16	15,00	83,3	25,00	138,8	5,00	27,8
Ammoniumthiosulfat	148,21	2,22	15,0	2,22	15,0	1,11	7,5
MOPS	209,26	5,00	23,9	-	-	-	-
Hefeextrakt	-	4,00	-	-	-	-	-

8.4 Kultivierung im Schüttelkolben

Alle Kultivierungen von *E. coli* SPOT01 erfolgten unter aeroben Bedingungen in Flüssigkulturen bei 37°C. Ausgehend von vorab erstellten Gefrierkulturen (25% vv⁻¹ Glycerin, s. Kap. 8.3) wurden 500 mL Schikanenkolben (Laborbedarf Ochs) mit entsprechendem Medium mit einer OD₆₀₀ von ca. 0,25 inokuliert. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurden die Kolben mit 10-15% ihres Gesamtvolumens befüllt und bei 145 rpm auf einem Schütteltisch (Infors AG) kultiviert. Anschließend wurden abhängig von der jeweiligen

experimentellen Anwendung Wachstumsparameter, extrazelluläre Konzentrationen (Substrate und Produkte) sowie intrazelluläre Konzentrationen (Metabolite der L-Methionin-Synthese) verfolgt. Alle ermittelten Ergebnisse basieren auf mindestens drei unabhängigen Kultivierungsexperimenten sowie auf zugehörigen Negativ-Kontrollen.

8.4.1 Medienzubereitung

Kultivierungen erfolgten in frisch zubereiteten EcM Minimalmedien. Zugehörige Schwefel-, Stickstoff- und Phosphat-Quellen sowie MOPS-Puffer wurden abgewogen und in VE-Wasser (ca. 80% des Nennvolumens) vollständig gelöst. Der pH-Wert wurde mittels 5 M KOH auf 7,6 eingestellt und die Lösung bis zum Erreichen des Nennvolumens mit VE-Wasser aufgefüllt. Die autoklavierte (121°C, 20 min) und abgekühlte Lösung wurde mit separat autoklavierten Stammlösungen (Salze, Komplexbildner, Spurenelemente) weiter vervollständigt. Unmittelbar vor der Inokulation wurde das Medium durch Zugabe von autoklavierter D-Glucose-Lösung (40% wv⁻¹), sterilfiltrierter Additive (Vitamine, Antibiotika, IPTG) und optionaler Supplemente komplettiert. Der pH-Wert wurde überprüft und im Bedarfsfall mittels 5 M KOH auf 7,2 nachjustiert. Abweichende Vorgehensweisen wurden in den experimentellen Methoden gesondert aufgeführt.

8.4.2 Supplementierungsexperimente

In umfangreichen Vorarbeiten wurden vergleichende Kultivierungen von *E. coli* SPOT01 unter Supplementierung verschiedener geeigneter Metabolite der L-Methionin-Synthese durchgeführt. Im Vordergrund stand eine erste Beurteilung der metabolischen Situation der L-Methionin-Synthese anhand resultierender Wachstumsparameter sowie spezifischer Produkt- und Nebenprodukt-Bildungsraten. Kultivierungen erfolgten unter unlimitierten Bedingungen im EcM5 Minimalmedium (s. Tab. 8.4) unter Verwendung von D-Glucose (10 gL⁻¹) und Ammoniumthiosulfat (20 mM) als alleinige Kohlenstoff- und Schwefelquelle. Die Vorlage geeigneter Supplementierungssubstrate erfolgte in einer Konzentration von 10 mM. Über den gesamten Kultivierungszeitraum (26 h) wurden extrazelluläre Probennahmen (Δt 2 h) zur Bestimmung des pH-Werts, der Biomassekonzentration (OD₆₀₀) sowie entsprechender Substrat- und Produkttiter durchgeführt.

8.4.3 Stimulierungsexperimente

In nachfolgenden Arbeiten wurden vergleichende Kultivierungen von *E. coli* SPOT01 unter Stimulierung aussichtreicher Substrate der L-Methionin-Synthese durchgeführt. Im Vordergrund stand die detaillierte Aufnahme der Transportkinetiken entsprechender Substrate unter verschiedenen Stimulierungsstrategien. Kultivierungen erfolgten unter unlimitierten Bedingungen im EcM5 Minimalmedium (s. Tab. 8.4) unter Verwendung von D-Glucose (10 gL^{-1}) und Ammoniumthiosulfat (20 mM) als alleinige Kohlenstoff- und Schwefelquelle. Über den gesamten Kultivierungszeitraum (26 h) wurden analog zu den Supplementierungsexperimenten extrazelluläre Probenahmen (Δt 2 h) zur Bestimmung des pH-Werts, der Biomassekonzentration (OD_{600}) sowie entsprechender Substrat- und Produkttiter durchgeführt. Die Zugabe von Stimulussubstraten erfolgte in verschiedenen Konzentrationen (10-30 mM) während der exponentiellen Wachstumsphase zu definierten Biomassekonzentrationen. Innerhalb von Parallelkultivierungen wurde das Verhältnis zwischen Substrat- und Biomassekonzentration konstant gehalten. Aufnahmekinetiken ausgewählter Stimulussubstrate wurden durch verkürzte Probenahmeintervalle (Δt 30 min) detailliert betrachtet.

8.4.4 Stimulus-Response-Experimente

Initiale Stimulus-Response-Experimente (SRE) mit *E. coli* SPOT01 erfolgten unter Verwendung des aussichtsreichen Stimulussubstrats L-Serin. Im Vordergrund stand eine empirische Auslegung und Adaption der Versuchsstrategie für anstehende Fed-Batch-Fermentationen von *E. coli* SPOT01 unter produktionsnahen Bedingungen. Kultivierungen erfolgten unter unlimitierten Bedingungen im EcM5 Minimalmedium (s. Tab. 8.4) unter Verwendung von D-Glucose (10 gL^{-1}) und Ammoniumthiosulfat (20 mM) als alleinige Kohlenstoff- und Schwefelquelle. Über den gesamten Kultivierungszeitraum (26 h) wurden analog zu den Vorversuchen extrazelluläre Probenahmen (Δt 2 h) zur Bestimmung des pH-Werts, der Biomassekonzentration (OD_{600}) sowie entsprechender Substrat- und Produkttiter durchgeführt. Die Zugabe des Stimulussubstrats erfolgte innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} 3,0). Die Zugabemenge wurde anhand vorab ermittelter Aufnahmekinetiken für einen Perturbationszeitraum von 40 min ausgelegt. Die während der Kultivierung erfolgten Probenahmen teilten sich in intra- (IPN) und extrazelluläre

Probennahmen (EPN) auf. IPN wurden nach der Methode des *Fast Centrifugation Treatment* (FCT, s. Kap. 8.9.1.2) erstellt und nach erfolgter Heißwasser-Extraktion (HWE, s. Kap. 8.9.2.2) relevante intrazelluläre Metabolitkonzentrationen LC-MS-basiert quantifiziert. Analog anfallende Überstände (EPN) wurden zwecks Bestimmung spezifischer Aufnahme- und Bildungsrate RPLC-basiert vermessen. Nach einer Anzuchtphase (8 h, OD_{600} ca. 2,5) erfolgten vor dem L-Serin-Stimulus jeweils zwei IPN in Abständen von Δt 10 min zur späteren Quantifizierung intrazellulärer Gleichgewichtskonzentrationen (Prä-Stimulusphase). Ab dem Stimulus erfolgten für den Zeitraum von 1 h IPN in Abständen von Δt 6 min (Stimulusphase) zur späteren Erfassung instationärer Perturbationsprofile. Anschließend wurden die Probennahmeintervalle auf 30 min (2 h) bzw. 60 min (Post-Stimulusphase) verlängert.

8.5 Kultivierung im Bioreaktor

Stimulus-Response-Experimente (SRE) mit dem Produktionsstamm *E. coli* SPOT01 wurden basierend auf Vorgaben der Evonik Industries AG in aeroben Fermentationsprozessen in Rührkesselreaktoren unter produktionsnahen Bedingungen durchgeführt. Die Überwachung aller Fermentationsprozesse erfolgte mittels eines Prozessleitsystems (LabView 2010, National Instruments). Das Kultivierungsmedium wurde radial mit Druckluft mit einer Rate von 8 L/min begast. Während der Kultivierung wurde der Reaktor mit einem Überdruck von 0,5 bar beaufschlagt um Kontaminationen vorzubeugen. Die Sauerstoffsättigung in der Flüssigphase (*Dissolved Oxygen*, DO) wurde durch eine amperometrische Sonde (Mettler-Toledo) gemessen. Die Durchmischung des Mediums erfolgte über zwei Scheibenrührer deren Start-Rührerdrehzahl (300 U/min) jeweils um 50 U/min erhöht wurde, sobald der DO in der Flüssigphase unter 30% fiel. Die Zusammensetzung des Abgases wurde mittels O_2 - und CO_2 -Sensoren (BCP O_2 bzw. CO_2 , BlueSens) bestimmt. Der pH-Wert wurde über eine pH-Elektrode (Mettler-Toledo) gemessen und durch Zuführung von 25% Ammoniumhydroxid ($v v^{-1}$) oder 25% Phosphorsäure ($v v^{-1}$) konstant auf 7,0 gehalten. Die Temperatur wurde über einen Widerstandssensor (PT100) gemessen und über einen Heizmantel und geregelten Zulauf konstant auf 37°C gehalten. Die Schaumbildung wurde durch manuelle Zugabe des Antischaummittels Struktol 674 (Schill und Seilacher) reguliert. Die Glucose-Konzentration wurde mittels eines enzymatisch-amperometrischen Verfahrens (ProcessTRACE, Trace Analytics) gemessen. Gemessene Online-Werte wurden offline in einem Laboranalysator nach enzymatisch-amperometrischen Messprinzip (LaboTRACE, Trace Analytics) korreliert.

Konventionelle extrazelluläre Probenahmen erfolgten manuell mittels eines Probenahmeventils in definierten Volumina.

8.5.1 Stimulus-Response-Experimente im 30-L-Rührkesselreaktor

Stimulus-Response-Experimente (SRE) wurden unter Einsatz des unmarkierten Stimulussubstrats [^{12}C]-L-Serin innerhalb verschiedener Prozessphasen einer etablierten Fed-Batch-Fermentation von *E. coli* SPOT01 durchgeführt. Die **Vorkultivierung** wurde in einem 2,5-L-Rührkessel-Glasreaktor (Bioengineering) mit einem Arbeitsvolumen von 1,8 L durchgeführt. Ausgehend von vorab erstellten Gefrierkulturen (25% vv^{-1} Glycerin, s. Kap. 8.3) wurde EcM3(a) Minimalmedium (s. Tab. 8.4) unter Verwendung von D-Glucose (15 gL^{-1}) und Ammoniumthiosulfat (56 mM) als alleinige Kohlenstoff- und Schwefelquelle auf eine Start- OD_{600} von ca. 0,2 inokuliert. Unter unlimitierten Bedingungen konnte nach 14 h eine OD_{600} von ca. 8,0 erreicht werden. Die **Hauptkultivierung** wurde in einem 30-L-Edelstahl-Rührkesselreaktor (Bioengineering) mit einem Arbeitsvolumen von 8,0 L durchgeführt. Hierzu wurden 6,4 L EcM3(b) Minimalmedium (s. Tab. 8.4) unter Verwendung von D-Glucose (10 gL^{-1}) und Ammoniumthiosulfat (112 mM) vorgelegt und anschließend mittels eines Überführungsschlauchs und einer Peristaltikpumpe (101U/R, Watson Marlow) mit 1,6 L Vorkultur auf eine Start- OD_{600} von ca. 1,6 inokuliert. Die Batch-Phase des Prozesses wurde für 8 h ausgelegt, wobei unter unlimitierten Bedingungen eine OD_{600} von ca. 8,5 erreicht wurde. Unter moderaten Glucose-Überschuss (ca. 4 gL^{-1}) wurde anschließend die Fed-Batch-Phase gestartet. Die Zufütterungsstrategie zielte zwecks Vergleichbarkeit durchgeführter SRE auf unlimitierte Bedingungen ab (moderater Glucose-Überschuss) und erfolgte nach folgender im Prozessleitsystem hinterlegter Gleichung:

$$F_{IN}(t) = (\mu/Y_{XS}) \cdot (c_{x0} \cdot e^{(\mu-t)}) \cdot V_R \cdot (c_{S0} - c_S) \quad [8.1]$$

Unter Berücksichtigung des Arbeitsvolumens V_R , der Wachstumsrate μ , der BTM-Konzentration c_x , des Glucose-Ausbeutekoeffizienten Y_{XS} und der vorgelegten Glucose-Konzentration c_{S0} erfolgte eine aktiv geregelte Zufütterung einer konzentrierten Glucose-Lösung (*Feed 1*). Gleichzeitig erfolgte eine sekundäre Zufütterung von Di-Ammoniumhydrogenphosphat sowie weiterer Supplemente (*Feed 2*). Die Zulauftrate wurde in diesem Fall relativ anhand der resultierenden Gesamtzulauftrate eingestellt ($20\% \text{ ww}^{-1}$). Die genaue

Zusammensetzung eingesetzter Zulaufösungen wurde in Tabelle 8.6 zusammengefasst. Die Fed-Batch-Phase wurde für 21 h ausgelegt wobei eine End-OD₆₀₀ von ca. 65,0 erreicht wurde.

Tabelle 8.6 Zusammensetzung der Zulaufösungen im Fed-Batch-Prozess von *E. coli* SPOT01

Zulauf- lösungen	Komponente	MG [gmol ⁻¹]	c [gL ⁻¹]	c [mM]
Feed 1	Glucose	180,16	461,50	2562
Feed 2	Di-Ammoniumhydrogenphosphat	132,05	138,46	1049
	Thiamin · HCl (Vit. B1)	337,27	0,010	0.03
	Cyanocobalamin (Vit. B12)	1355,4	0,010	0.007
	Spectinomycin	495,35	0,050	0.101
	Chloramphenicol	323,13	0,012	0.037
	IPTG	238,302	0,0024	0.101

Über den gesamten Kultivierungszeitraum (29 h) wurden extrazelluläre Probenahmen zur Bestimmung der Biomassekonzentration (OD₆₀₀) sowie entsprechender Substrat- und Produkttiter durchgeführt (Δt 1 h). Zusätzlich erfolgten Probenahmen zur Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) (Δt 4 h). Über Nacht (11 h) erfolgten Filtrat-Probenahmen (Δt 2 h) mittels eines automatisierten Motorventils (Besta). Resultierende Filtrate wurden mittels einer Kryostaten (RK20, Lauda) auf 5°C gekühlt. Stimulus-Response-Experimente (SRE) wurden unter Einsatz des unmarkierten Stimulussubstrats [¹²C]-L-Serin innerhalb verschiedener Prozessphasen unter unlimitierten Kultivierungsbedingungen durchgeführt. Stimuli erfolgten in Form einer Sprungfunktion nach 5,5 h in der Batch-Phase (SRE I) bei einer OD₆₀₀ von 5,3 ($c_x = 1,38 \text{ gL}^{-1}$) sowie in Fedbatch Phase nach 9,5 h (SRE II) bzw. 13,5 h (SRE III) bei einer OD₆₀₀ von 10,3 ($c_x = 2,64 \text{ gL}^{-1}$) bzw. 17,2 ($c_x = 4,41 \text{ gL}^{-1}$). Auf Grundlage der vorab ermittelten biomassespezifischen Aufnahmerate des Stimulussubstrats, der exponentiellen Wachstumsrate, des aktuellen Arbeitsvolumens sowie der aktuellen Biomassekonzentration, wurden die jeweiligen Zugabevolumina für Perturbationsperioden von 20 min ausgelegt. Die Zugabe der 3 M [¹²C]-L-Serin-Lösung erfolgte mittels einer sterilen Einwegspritze. Über den gesamten Prozessverlauf erfolgten intrazelluläre (IPN) und analoge extrazelluläre Probenahmen (EPN) durch eine semi-automatisierte volumetrische Probenahmeverrichtung (Eigenentwicklung IBVT, Uni Stuttgart) zu je vier Replikaten (n=4) pro Zeitpunkt. Intrazelluläre Proben wurden nach der Methode des *Fast Centrifugation Treatment* (FCT, s. Kap. 8.9.1.2) unter anschließender Heißwasser-Extraktion (HWE, s. Kap 8.9.2.2) erstellt. Intrazelluläre Konzentrationen relevanter Metabolite wurden anschließend LC-MS-basiert quantifiziert (s. Kap. 8.9.5.1).

Analog anfallende Überstände (EPN) wurden zur Bestimmung relevanter Substrat- und Produkttiter RPLC-basiert vermessen (s. Kap. 8.8.2). Zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit erfolgten innerhalb der Stimulusphasen (SRE I-III) Probennahmen nach festgelegtem Ablauf (s. Abb. 8.2). Unmittelbar vor dem Stimulus erfolgten zwei IPN (Δt 5 min) zur späteren Quantifizierung intrazellulärer Gleichgewichtskonzentrationen. Innerhalb der Stimulusphasen (20 min) erfolgten IPN in Abständen von Δt 2 min. In den anschließenden Auslaufphasen erfolgten nochmals zwei IPN (Δt 5 min). Zur Beurteilung der langfristigen metabolischen Situation wurden zusätzlich über den gesamten Kultivierungsverlauf weitere IPN in unregelmäßigen Abständen durchgeführt.

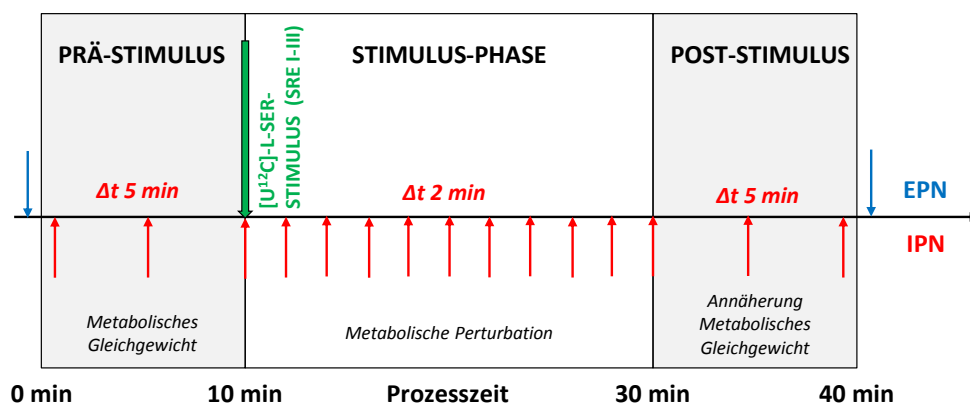


Abbildung 8.2 Intra- und extrazelluläre Probennahmen innerhalb der Perturbationsphasen von SRE I-III.

8.5.2 Stimulus-Response-Experimente im 2,5-L-Rührkesselreaktor

Aufbauend auf Resultaten vorhergehender Perturbationsexperimente wurde ein Stimulus-Response-Experiment (SRE) unter Einsatz des vollmarkierten Stimulussubstrats $[U^{13}C]$ -L-Serin und einer verbesserten Perturbationsstrategie innerhalb einer etablierten Batch-Fermentation von *E. coli* SPOT01 durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in einem 2,5-L-Edelstahl-Rührkesselreaktor (KLF2000, Bioengineering) mit einem Arbeitsvolumen von 1,7 L. Ausgehend von vorab erstellten Gefrierkulturen ($25\% \text{ vv}^{-1}$ Glycerin, s. Kap. 8.3) wurde EcM6 Minimalmedium (s. Tab. 8.4) unter Verwendung von D-Glucose (15 gL^{-1}) und Natriumthiosulfat (15 mM) als alleinige Kohlenstoff- und Schwefelquelle auf eine Start- OD_{600} von ca. 0,2 inokuliert. Unter unlimitierten Bedingungen konnte nach 21 h eine End- OD_{600} von ca. 16,0 erreicht werden. Zur Sicherstellung eines Glucose-Überschuss wurde der Titer nach 16 h auf 20 gL^{-1} erhöht. Über den gesamten Kultivierungszeitraum (21 h) erfolgten extrazelluläre Probennahmen zur Bestimmung der Biomassekonzentration (OD_{600}) sowie

entsprechender Substrat- und Produkttiter (Δt 1 h). Zusätzlich erfolgten weitere Probennahmen zur Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM). Das Stimulus-Response-Experiment (SRE) wurden unter Einsatz des vollmarkierten Stimulussubstrats [$U^{13}C$]-L-Serin nach einer Anzuchtphase unter unlimitierten Kultivierungsbedingungen durchgeführt. Der Stimulus erfolgte in Form einer Sprungfunktion nach 17,9 h in der späten Batch-Phase (SRE IV) bei einer OD_{600} von 7,9 ($c_x = 2,02 \text{ gL}^{-1}$). Auf Grundlage der vorab ermittelten biomasse-spezifischen Aufnahme- sowie aktueller Prozessparameter wurde das Zugabevolumen für eine Perturbationsperiode von 6 min ausgelegt. Für die Zugabe von 150 mM [$U^{13}C$]-L-Serin-Lösung wurde eine sterile Einwegspritze eingesetzt. Intrazelluläre (IPN) und extrazelluläre Probennahmen (EPN) erfolgten unter analoger Vorgehensweise bisheriger SRE durch eine semi-automatisierte volumetrische Probennahmeverrichtung (Eigenentwicklung IBVT, Uni Stuttgart) zu je vier Replikaten ($n=4$) pro Zeitpunkt. Intrazelluläre Metabolitextrakte wurden analog nach der FCT- (s. Kap. 8.9.1.2) und HWE-Methode (s. Kap. 8.9.2.2) erstellt. Intra- und extrazelluläre Metabolite wurden hinsichtlich relevanter Massenisotopomere LC-MS-basiert quantifiziert (s. Kap. 8.9.5.1). Extrazelluläre Proben wurden zusätzlich zur Bestimmung relevanter Substrat- und Produkttiter RPLC-basiert vermessen (s. Kap. 8.8.2). Innerhalb der verkürzten Stimulusphase (SRE IV) erfolgten Probennahmen nach dezidiertem Ablauf (s. Abb. 8.3). Unmittelbar vor dem Stimulus erfolgten zwei IPN (Δt 5 min) zur späteren Quantifizierung intrazellulärer Gleichgewichtskonzentrationen. Innerhalb der Stimulusphasen (6 min) wurden IPN in erhöhter Frequenz (Δt 1 min) durchgeführt. Nach der Stimulusphase erfolgten nochmals zwei IPN in verlängerten Zeitintervallen (Δt 2 bzw. 5 min). Außerhalb des SRE wurden über den gesamten Kultivierungsverlauf weitere IPN in unregelmäßigen Abständen durchgeführt.

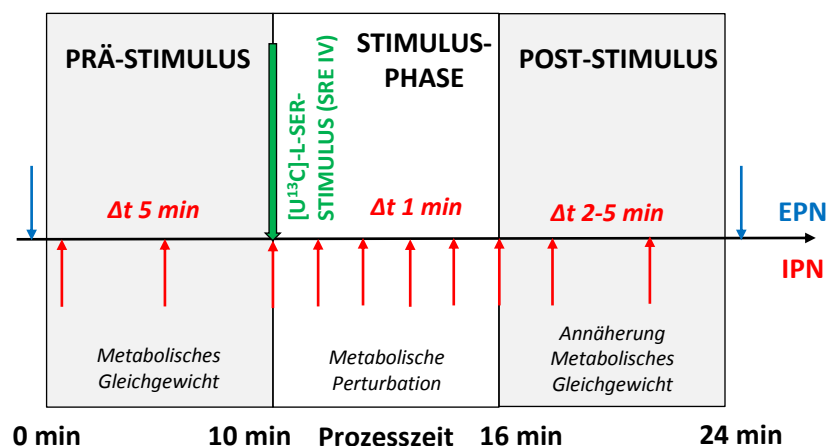


Abbildung 8.3 Intra- und extrazelluläre Probennahmen innerhalb der Perturbationsphase von SRE IV.

8.6 Bestimmung der Biomassekonzentration

Die Kontrolle des Zellwachstums in Flüssigkulturen erfolgte anhand der Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}). Vor der Messung wurde das Photometer (Ultraspec 1100) gegen die Umgebungsluft kalibriert (Referenzwert). Um eine lineare Korrelation zwischen Zelldichte und optischer Dichte zu gewährleisten, wurden entnommene Zellsuspensionen bei Bedarf mit 0,9% isotonischer NaCl-Lösung (wv^{-1}) in Polystyrol-Küvetten auf OD_{600} -Werte von 0,1 bis 0,3 verdünnt. Um die Trübung des Kultivierungsmediums zu berücksichtigen wurden gleichzeitig zellfreie Überstände in gleicher Verdünnung vermessen (Blindwert) und der OD_{600} -Wert nach folgender Formel berechnet:

$$OD_{600} = (OD_{600}^{Probe} - OD_{600}^{Blind}) \cdot VDF \quad [8.2]$$

Bei Kultivierungen im Bioreaktor wurden zusätzlich die Biotrockenmassen (BTM) bestimmt. Hierzu wurden je 10 mL Zellsuspension in vorab getrocknete und tarierte Glasröhrchen 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert (Megafuge 1.0 R). Resultierende Zellpellets wurden je zwei Mal mit 5 mL 0,9% isotonischer NaCl-Lösung (wv^{-1}) gewaschen und erneut 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellpellets in einem Trockenschrank (Binder) mehrere Tage bis zur Gewichtskonstanz bei 105°C getrocknet. Die Glasröhrchen wurden in einem Exsikkator abgekühlt und erneut gewogen. Anhand der Gewichtsunterschiede wurden die entsprechende BTM gravimetrisch bestimmt. Unter Berücksichtigung des Entnahmevolumens konnten die jeweiligen BTM-Konzentrationen (c_x) in $[gL^{-1}]$ berechnet werden. In mehreren unabhängigen Batch-Fermentationen konnte für *E. coli* SPOT01 innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase unter unlimitierten Kultivierungsbedingungen und Einsatz von D-Glucose und Thiosulfat als alleinige Kohlenstoff- und Schwefelquelle eine Korrelation zwischen der optischen Dichte (OD_{600}) und der BTM-Konzentration (c_x) aufgestellt werden (Maria Rahnert). Der ermittelte Korrelationsfaktor wurde für die nachfolgenden Versuche als gültig angenommen.

$$c_x = OD_{600} \cdot 0,2566 [g/L] \quad [8.3]$$

8.7 Materialien für analytische Methoden

Innerhalb der HPLC-basierten extrazellulären Analytik eingesetzte Chemikalien entsprachen mindestens analytischer Reinheit und wurden von folgenden Firmen bezogen: Carl Roth (Karlsruhe, D), Fluka (Steinheim, D), Merck (Darmstadt, D) und Sigma Aldrich (Steinheim, D). Eingesetzte Fließmittelkomponenten (Wasser, Methanol, Acetonitril) waren von HPLC-Qualität und wurden von Carl Roth (Karlsruhe, D) bezogen.

Für die LC-MS-basierte intrazelluläre Analytik wurden Chemikalien größtmöglicher analytischer Reinheit eingesetzt. Metabolitstandards, Reagenzien sowie ¹³C-markierte lyophilisierte Algenzellen wurden von Sigma Aldrich (Steinheim, D) bezogen. Eingesetzte Fließmittelkomponenten (Wasser, Acetonitril) waren von LC-MS-Qualität und wurden von Carl Roth (Karlsruhe, D) bezogen. Extraktionskomponenten (Wasser, Methanol, Chloroform) waren von HPLC-Qualität und wurden von Carl Roth (Karlsruhe, D) und VWR (Bruchsal, D) bezogen.

8.8 Extrazelluläre Analytik

8.8.1 Extrazelluläre Probennahme

Innerhalb von Kultivierungen erfolgten regelmäßig (i.R. Δt 1 h) extrazelluläre Probennahmen zur Bestimmung der Biomassekonzentrationen (OD₆₀₀ und BTM) sowie relevanter Substrat- und Produkttiter in Überständen. Hierzu wurden entnommenen Zellsuspensionen für 2 min bei 20.000 x g und 4°C (Eppendorf 5417R) abzentrifugiert und anfallende Überstände bei -20°C gelagert. Während der Fermentationsprozesse erfolgten außerdem Filtrat-Probennahmen unter Verwendung von 0,20 µm Spritzenfiltern (PVDF, Rotilabo®, Roth). Resultierende Überstände wurden zur Bestimmung spezifischer Aufnahme- und Bildungsraten HPLC- oder Sensor-basiert vermessen. Extrazelluläre Proben aus analogen Überständen (EPN) nach der FCT-Methode (s. Kap. 8.9.1.2) wurden im Bedarfsfall zusätzlich LC-MS-basiert vermessen.

8.8.2 Quantifizierung mittels RPLC (RP-HPLC)

Die Quantifizierung proteinogener und nicht-proteinogener Aminosäuren erfolgte HPLC-basiert innerhalb zellfreier Kultivierungsüberstände (s. Kap. 8.8.1). Messungen wurden nach dem Prinzip einer bikratischen Umkehrphasen-Chromatographie (*Reversed Phase Liquid*

Chromatography, RPLC) auf einer HPLC-Anlage der Firma Agilent Technologies (Serie 1200) nach einer adaptierten Methode (Henderson und Brooks 2010) durchgeführt. Eingesetzt wurde eine ZORBAX Eclipse Plus C18 Säule (250 x 4,6 mm, 5 µM, Agilent) unter Verwendung einer ZORBAX Eclipse Plus C18 Vorsäule (12,5 x 4,6 mm, 5 µM, Agilent). Anhand einer automatisierten Vorsäulenderivatisierung erfolgte eine Derivatisierung der polaren Analyten mit *ortho*-Phtahldialdehyd (OPA) und Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (FMOC) in Gegenwart von Mercaptopropionat (MPA) unter alkalischen Bedingungen. Die resultierenden hydrophobizierten Fluorophor-Derivate zeigen ausreichende Retention auf C₁₈-alkylierten silika-basierten stationären Phasen und ermöglichen anschließend eine hochsensitive Fluoreszenz-Detektion. Die Trennung erfolgte unter bikratischer Gradientenelution mit abfallender Polarität und einem Säulenfluss von 1,5 mL/min bei 40°C. Eluierte Aminosäurederivate wurden mit einem Fluoreszenzdetektor (FLD) bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm detektiert. Zusätzlich erfolgte eine Detektion mittels eines Diodenarraydetektors (DAD) bei einer Wellenlänge von 338 nm. Die eingesetzte HPLC-Anlage sowie Parameter zur chromatographischen Trennung wurden in Tabelle 8.7 zusammengefasst.

Tabelle 8.7 HPLC-System und Chromatographie-Bedingungen der Aminosäure-RPLC

HPLC-Anlage	Agilent 1200 Serie®	Säule	ZORBAX® Eclipse Plus C18 Säule (250 x 4,6 mm, 5 µM)
Binäre Pumpe	G1312A	Vorsäule	ZORBAX® Eclipse Plus C18 Vorsäule (12,5 x 4,6 mm, 5 µM)
Säulenthermostat	G1329A	Flussrate	1,5 mL/min
Autosampler	G1315D (ALS)	Temperatur	40°C
Thermostat	G1330B	Laufmittel A	10 mM Di-Natriumhydrogenphosphat, 10 mM Natriumtetraborat, 0,5 mM Natriumazid / pH 8,2 (HCl)
Degasser	G1379B	Laufmittel B	45% Acetonitril (vv ⁻¹), 45% Methanol (vv ⁻¹), 10% H ₂ O (vv ⁻¹)
Diode Array Detector	G1315D (DAD)	Injektion	5 µL Probe in wässriger Verdünnung
Fluorescence Detector	G1321A (FLD)	Gradient	0,84 min 2% LM B/30.56 min 2% auf 57% LM B/0,1 min 57% auf 100% LM B/5,8 min 100% LM B/0,1 min 100% auf 2% LM B/0,6 min 2% LM B

Quantifizierungen verdünnter Überstände erfolgten durch standard-basierte externe Kalibrationen (s. Kap. 8.10) innerhalb eines Kalibrationsbereichs von 1,5 μM bis 500 μM (lineare Korrelation) unter Verwendung von 50 μM L-Norvalin als internen Standard. Resultierende Chromatogramme wurden mittels eines kommerziellen Analyseprogramms (ChemStation®, Agilent Technologies) ausgewertet. Die Quantifizierung von Intermediaten des Methionin-Stoffwechsels in *E. coli* war in dieser Arbeit von besonderem Interesse. Zur Erfassung von spezifischen Nebenprodukt-Bildungsraten wurde das Messspektrum um weitere Aminosäurederivate des Synthesewegs erweitert. In Abbildung 8.4 wird das RPLC-Chromatogramm eines erstellten Standardgemisches aufgezeigt. Retentionszeiten (Peak-Notationen) aufgeführter Aminosäuren wurden in Tabelle 8.8 zusammengefasst.

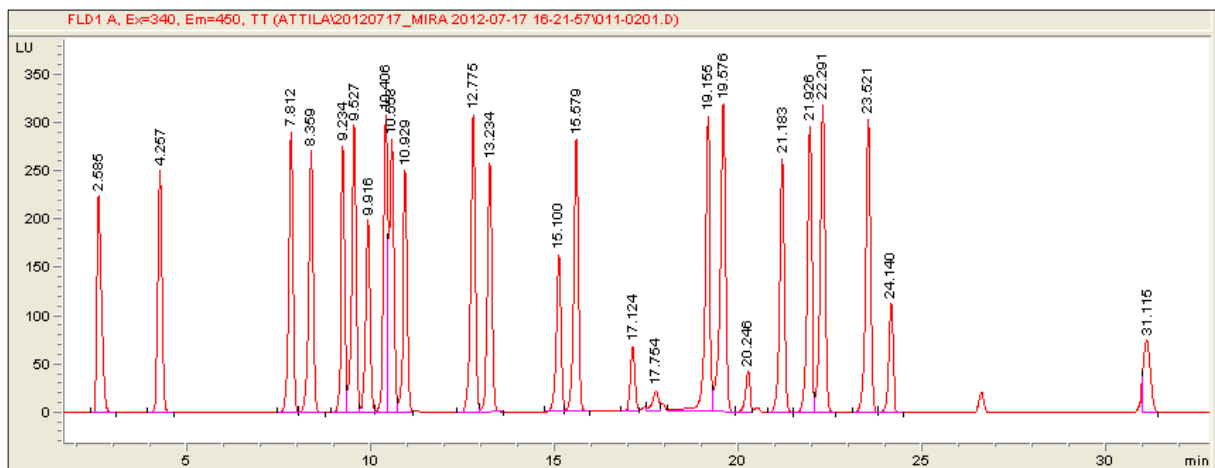


Abbildung 8.4 RPLC-Chromatogramm (FLD) einer Aminosäure-Standard-Mischung (400 μM).
(Quelle: ChemStation®, Agilent Technologies)

Tabelle 8.8 Retentionszeiten (t_R) RPLC-Auftrennung Aminosäuren (ZORBAX® Eclipse Plus C18)

t_R [min]	Metabolit	t_R [min]	Metabolit
2.585	L-Aspartat (L-Asp)	15.579	L-Tyrosin (L-Tyr)
4.257	L-Glutamat (L-Glu)	17.124	LL-Cystathionin (Cysth)
7.812	L-Asparagin (L-Asn)	17.754	LL-Cystin (LL-Cyst)
8.359	L-Serin (L-Ser)	19.155	L-Valin (L-Val)
9.234	O-Succinyl-L-Homo-Serin (OSHS)	19.576	L-Methionin (L-Met)
9.527	L-Glutamin (L-Gln)	20.246	L-Norvalin (L-Nva / IST)
9.916	L-Histidin (L-His)	21.183	L-Tryptophan (L-Trp)
10.406	L-Homoserin (L-HSer)	21.926	L-Phenylalanin (L-Phe)
10.558	Glycin (Gly)	22.291	L-Isoleucin (L-Ile)
10.929	L-Threonin (L-Thr)	23.521	L-Leucin (L-Leu)
12.775	L-Arginin (L-Arg)	24.140	L-Lysin (L-Lys)
13.234	L-Alanin (L-Ala)	31.115	L-Prolin (L-Pro)
15.100	O-Ac-L-Serin (OAS)		

8.8.3 Quantifizierung mittels Ionenaustauschchromatographie

Mittels einer Ionenaustauschchromatographie konnten Glucose sowie organische Säuren (Acetat, Lactat, Succinat, Pyruvat) in zellfreien Kultivierungsüberständen (s. Kap. 8.8.1) quantifiziert werden. Messungen erfolgten auf einer HPLC-Anlage der Firma Agilent Technologies (Serie 1200). Eingesetzt wurde eine Rezex ROA-Organic Acid H⁺ Säule (300 x 7,8 mm, 8 µM, Phenomenex) unter Verwendung einer Rezex ROA-Organic Acid H⁺ Vorsäule (50 x 7,8 mm, 8 µM, Phenomenex). Trennungen erfolgten isokratisch mit einem Säulenfluss von 0,4 mL/min unter Einsatz von 5 mM Schwefelsäure anhand einer sulfonierten Styroldivinylbenzol-basierten stationären Phase bei Raumtemperatur (RT). In diesem Zusammenhang retardieren ungeladene (bzw. protonierte) Analyten an einer dünnen polaren Schicht, die sich an der stationären Phase ausbildet (Ionenausschluss). Eluierte Analyten wurden durch Messung des Brechungsindex (RI) detektiert. Da sich hohe Phosphatkonzentrationen (Kultivierungsüberstände) nachteilig auf die Säulen-Lebensdauer auswirken, wurde vorab eine Phosphatfällung der Überstandsproben durchgeführt. Hierzu wurden die Proben verdünnt (Phosphatkonzentration ≤ 100 mM) und die Fällung unter alkalischen Bedingungen (> pH 9) durch Zugabe von 180 mM Ammoniak und 120 mM Magnesiumsulfat 5 min bei RT durchgeführt. Das Prinzip wird anhand der Fällung von Di-Kaliumhydrogenphosphat und Kalium-Di-Hydrogenphosphat anhand nachfolgender Reaktionsgleichung verdeutlicht:

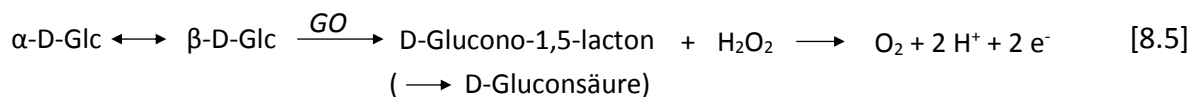


Der abzentrifugierte Überstand wurde durch Zugabe von 50 mM Schwefelsäure 15 min angesäuert (< pH 3) und erneut für 5 min bei 20.000 x g bei 4°C (Eppendorf 5417R) abzentrifugiert. Quantifizierungen verdünnter Überstände erfolgten durch standard-basierte externe Kalibrationen (s. Kap. 8.10) innerhalb eines Kalibrationsbereichs von 50 µM bis 6 mM (lineare Korrelation). Resultierende Chromatogramme wurden mittels eines kommerziellen Analyseprogramms (ChemStation®, Agilent Technologies) ausgewertet.

8.8.4 Quantifizierung mittels Biosensorik

Die Quantifizierung von D-Glucose in zellfreien Kultivierungsüberständen (s. Kap. 8.8.1) erfolgte alternativ enzymatisch-amperometrisch mit einem Laboranalysator (LaboTrace,

Trace Analytics). Das elektrochemische Messprinzip basiert auf einem Biosensor unter Verwendung immobilisierter Glucoseoxidase (GOD) welche unter Reduktion von Sauerstoff D-Glucose zu Gluconolacton oxidiert. Resultierendes Wasserstoffperoxid wird gleichzeitig an einer Platin-Elektrode (Anode) erneut zu Sauerstoff oxidiert, wobei die freigesetzten Elektronen amperometrisch erfasst werden können.



Zellfreie Überstände wurden auf Raumtemperatur gebracht (Thermomixer 5436, Eppendorf) und mittels kommerzieller Pufferlösung (TRACE Analytics) im Verhältnis 1:50 verdünnt. Kalibrierungen erfolgten vor jeder Messequenz mittels kommerzieller Kalibrationsstandards (TRACE Analytics). Im Bedarfsfall wurden die Proben innerhalb eines Kalibrationsbereichs von 0,09-9,0 gL⁻¹ vorab mit Wasser verdünnt.

8.9 Intrazelluläre Analytik

8.9.1 Intrazelluläre Probennahme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene **sequentielle Aufarbeitungsstrategien** zur Erstellung intrazellulärer Proben für die Metabolomanalyse verfolgt. Derartige Probenaufarbeitungen beinhalten die definierte Entnahme von Zellsuspensionen zu bestimmten Biomassekonzentrationen (**Zellernte**), das Abstoppen des zellulären Stoffwechsels durch schnellstmögliche Inaktivierung der enzymatischen Aktivität (**Quenching**) und eine quantitative Extraktion intrazellulärer Metabolite unter Berücksichtigung analytischer Vorgaben (**Extraktion**). Sequentielle Methoden basieren hierbei auf einer Abtrennung der extrazellulären Überstände vor der Extraktion (s. Kap. 7.4.2).

8.9.1.1 Cold Methanol Quenching

Die Methode des *Cold Methanol Quenching* (CMQ) basiert auf einer kälte-induzierten reversiblen Inhibierung des zellulären Stoffwechsels vor der Abtrennung extrazellulärer Überstände (de Koning und van Dam 1992). Zur intrazellulären Probennahme wurden jeweils 6 mL 60% wässrige Methanollösung (vv⁻¹) in 15 mL-Falcon-Gefäßen (Sarstedt) vorgelegt und ü. N. auf -70°C vorgekühlt. Zu ausgewählten Zeitpunkten erfolgten anschließend definierte

Entnahmen an Zellsuspension ($T = 37^{\circ}\text{C}$, ca. 4 mL) direkt in die vorgekühlte methanolische Quenching-Lösung ($T = -50^{\circ}\text{C}$, Verhältnis 1 : 2,5). Anschließend werden die Proben für 5 min bei $10.000 \times g$ und -20°C (Avanti J-25, Beckman Coulter) abzentrifugiert. Die Quenching-Überstände wurden abgenommen und resultierende Zellpellets in flüssigen Stickstoff (-196°C) schockgefroren und bis zur Extraktion auf -70°C gelagert. Um ein Erwärmen der Proben zu verhindern ($T < -20^{\circ}\text{C}$) erfolgten sämtliche Zwischenlagerungen in einem Kryostaten ($T = -30^{\circ}\text{C}$, Tyfoxit, Haake). Zur späteren Bilanzierung ermittelter Metabolitkonzentrationen wurden die Falcon-Gefäße zusätzlich nach jedem Teilschritt gewogen.

8.9.1.2 Fast Centrifugation Treatment

Intrazelluläre Probennahmen (IPN) während Stimulus-Response-Experimenten (SRE) erfolgten nach der Methode des *Fast Centrifugation Treatment* (FCT) (Plassmeier et al. 2007). Die Methode basiert auf einer kälte-induzierten reversiblen Inhibierung des zellulären Stoffwechsels nach Abtrennung extrazellulärer Überstände. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurden manuell oder semi-automatisiert definierte Volumina (1-2 mL) an Zellsuspension in 2 mL Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt und anschließend 20 s bei $20.000 \times g$ und 4°C (Eppendorf 5417R) abzentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ abgenommen und als analoge extrazelluläre Probe (EPN) in flüssigen Stickstoff (-196°C) weggefroren. Resultierende Zellpellets wurden in 1,5 mL 0,9% isotonischer NaCl-Lösung (wv^{-1}) gewaschen und erneut 20 s bei $20.000 \times g$ und 4°C (Eppendorf 5417R) abzentrifugiert. Der Waschüberstand wurde quantitativ abgegossen und resultierende Zellpellets zwecks temporärer enzymatischer Inaktivierung in flüssigen Stickstoff (-196°C) schockgefroren und bis zur Extraktion auf -70°C gelagert.

8.9.2 Extraktion intrazelluläre Metabolite

8.9.2.1 Chloroformaufschluss

Die nach dem methanolischen Quenching (CMQ, s. Kap. 8.9.1.1) gelagerten Zellpellets (-70°C) wurden in 1 mL 50% wässriger Methanollösung ($T = -20^{\circ}\text{C}$, vv^{-1}) unter Zusatz von $300 \mu\text{M}$ L-Norvalin als interner Standard resuspendiert. Analog zur CMQ-Probennahme erfolgten sämtliche Zwischenlagerungen in einem Kryostaten ($T = -30^{\circ}\text{C}$, Tyfoxit, Haake). Nach vollständiger Resuspension wurden jeweils 1 mL vorgekühltes Chloroform (-20°C) zugegeben und die Proben 2 h bei -20°C im Überkopfschüttler (CMV-ROM, Ltf-Labortechnik) aufgeschlossen.

Die einhergehende Proteindenaturierung führt gleichzeitig zu einer irreversiblen Inhibierung des zellulären Stoffwechsels. Durch anschließendes Zentrifugieren für 10 min bei 6000 rpm und 4°C (Eppendorf 5430 R) erfolgt eine Trennung zwischen einer oberen wässrig-methanolischen Phase, einer mittleren Interphase aus denaturierten Proteinen und Zelltrümmern und einer unteren Chloroform-Phase. Die obere Methanol-Phase wurde quantitativ abgenommen (Metabolomextrakt) und verbliebene Zelltrümmer 10 min bei 20.000 x g und 4°C (Eppendorf 5417R) abzentrifugiert. Resultierende Metabolomextrakte wurde bei -70°C gelagert und LC-MS-basiert vermessen.

8.9.2.2 Heißwasser-Extraktion

Der Aufschluss der nach der FCT-Methode erstellten Zellpellets erfolgte durch eine Heißwasser-Extraktion (Bolten et al. 2007). Vorliegende Biotrockenmassen (BTM) wurden anhand gemessener Biomassekonzentrationen (OD_{600} und c_x) für die jeweiligen Entnahmezeitpunkte interpoliert. Durch Zugabe definierter Volumina von 300 μM L-Norvalin-Lösung (Interner Standard) wurden je nach Experiment konstante Extraktionskonzentrationen von (15 gL^{-1}) bzw. (30 gL^{-1}) eingestellt. Unmittelbar nach Zugabe der Extraktionslösung wurden die Proben zur irreversiblen enzymatischen Inaktivierung in einem auf 98°C vortemperierten Wasserbad (Lauda 006T) für 2 min vorinkubiert. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass für relevante Volumina ($< 500 \mu\text{L}$) bereits nach ca. 10 s eine Temperatur oberhalb von 90°C erreicht wird. Anschließend wurden die Zellsuspensionen für ca. 20 s im Vortexer homogenisiert. Die Proben wurden erneut für 5 min im Wasserbad hitze-inkubiert um eine vollständige Extraktion intrazellulärer Metabolite zu gewährleisten. Resultierende Suspensionen wurden abschließend durch kurzes Vortexen resuspendiert, in Eiswasser schnell abgekühlt und 20 min bei 20.000 x g und 4°C (Eppendorf 5417 R) abzentrifugiert. Die Überstände (Metabolomextrakte) wurden quantitativ mit einer Pipette abgenommen und bis zur LC-MS-basierten Vermessung auf -70°C gelagert. Ermittelte Metabolitkonzentrationen wurden unter Berücksichtigung weiterer Verdünnungen auf die ursprünglich eingesetzte BTM bezogen [$\mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}$]. Im Bedarfsfall wurden abgeleitete intrazelluläre Konzentrationen unter Berücksichtigung des intrazellulären Volumens in Stoffmengenkonzentrationen [mM bzw. μM] umgerechnet. Hierfür wurde ein Volumen von 2,3 mL/g_{BTM} angenommen, welches in Arbeiten von Wang et al. 2013 für einen *E. coli* BL21 Stamm unter vergleichbaren Kultivierungsbedingungen gravimetrisch ermittelt wurde.

8.9.3 Quantifizierung mittels LC-MS/MS

8.9.3.1 HILIC Chromatographie

HILIC-Chromatographie (*Hydrophilic Interaction Chromatography*) ist eine Variante der Normalphasen-Chromatographie (*Normal Phase Liquid Chromatography*, NPLC) und basiert auf dem Einsatz polarer stationärer Phasen unter Kombination vergleichsweiser unpolarer organisch-wässriger Phasen. Der Begriff wurde erstmals durch Alpert et al. 1990 geprägt, wobei der komplexe Trennmechanismus hauptsächlich auf eine Verteilung der Analyten zwischen einer durch die stationäre Phase immobilisierten Wasserschicht (ursprünglich Teil der mobilen Phase) und einer unpolaren, vorwiegend organischen, mobilen Phase zurückgeführt wird (Nguyen et al. 2008). Im Feld LC-MS-basierter Metabolomanalysen gewinnt HILIC-Chromatographie zunehmend an Bedeutung, da sie im Gegensatz zu Umkehrphasen-Chromatographie (*Reversed Phase Liquid Chromatography*, RPLC) eine Trennung geladener und polarer underivatisierter Analyten ohne Einsatz von Ionenpaarreagenzien ermöglicht (Tang et al. 2014). Gleichzeitig zeigt sie eine ausgezeichnete Kompatibilität mit der ESI-MS-Detektion, wobei der vergleichsweise hohe organische Anteil der mobilen Phase die Sensitivität der Messungen signifikant erhöht (Nguyen et al. 2010). Üblicherweise werden für die mobile Phase Acetonitril-Wassergemische eingesetzt, wobei bikratische Elutionen mit ansteigender Polarität invers zu RPLC erfolgen. Die mobile Phase ist hierbei unter Verwendung eines Mindestanteils an Wasser ($\geq 5\% \text{ vv}^{-1}$) zunächst überwiegend unpolar. Durch Erhöhung des polaren Wasseranteils innerhalb der mobilen Phase erfolgt eine Elution der Analyten hinsichtlich ihrer ansteigenden Polarität nach dem Prinzip einer Verteilungschromatographie. Stationäre Phasen sind silika- oder polymerbasiert und werden in der Regel durch verschiedene polare funktionelle Gruppen zusätzlich modifiziert. Varianten beinhalteten Modifikationen beispielsweise mit Aminopropyl-, Amid-, Diol-, Cyanopropyl- oder Sulfobetain-Gruppen (Buszewski et al. 2012). Innerhalb dieser Arbeit wurden polymerbasierte stationäre HILIC-Phasen eingesetzt, welche mit zwitterionischen Sulfobetaingruppen modifiziert wurden (ZIC-pHILIC®, Sequant). Die zwitterionischen Sulfobetaingruppen ermöglichen eine gesteigerte Retention bzw. Selektivität anionischer und kationischer Analyten durch eine zusätzliche elektrostatische Wechselwirkung innerhalb der immobilisierten Wasserschicht (s. Abb. 8.5).

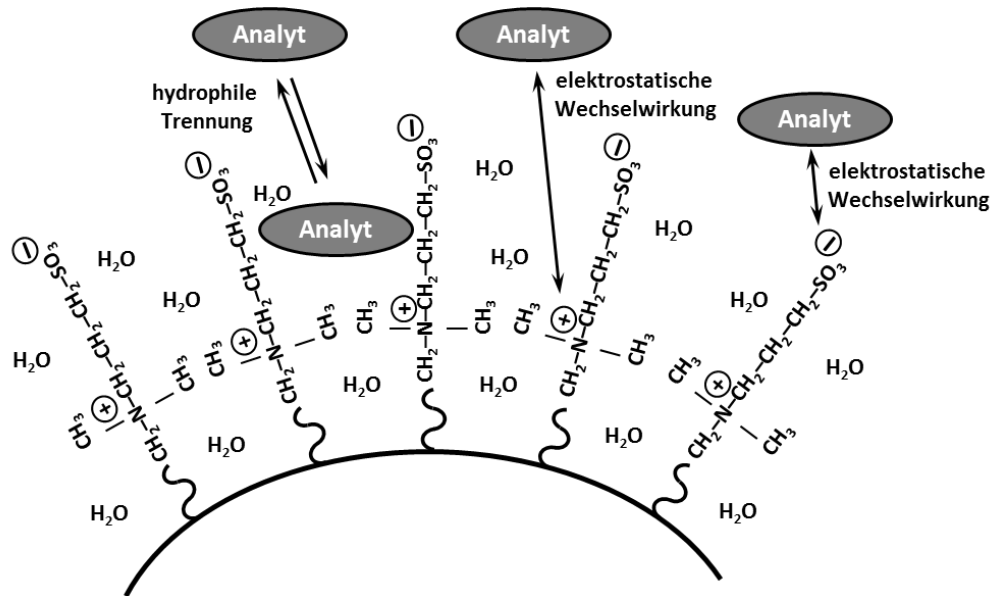


Abbildung 8.5 Retentionsmechanismen geladener bzw. polarer Analyten innerhalb von polymerbasierten zwitterionischen HILIC-Phasen (ZIC-pHILIC). (Quelle: modifizierte Darstellung, Merck-Sequnt, A Practical Guide to HILIC, 2008)

Das polymerbasierte Trägermaterial weist hierbei eine vorteilhafte Resistenz gegenüber sauren und alkalischen Bedingungen der mobilen Phase auf und ermöglicht die chromatographische Trennung innerhalb weiter pH-Bereiche (2-10) unter Einsatz relativ niedriger Pufferkonzentrationen (Dellmour et al. 2010). In Kombination mit ESI-basierten Tandem-MS-Analysen ist lediglich ein Einsatz volatiler Puffersysteme wie Ammoniumformiat oder Ammoniumacetat möglich. Eingesetzt wurden binäre Gemische aus wässrigen Puffersysteme (z.B. Ammoniumacetat) und Acetonitril unter Verwendung verschiedener pH-Werte. Die genaue Zusammensetzung ist Teil der chromatographischen Optimierung und wird separat behandelt (s. Kap. 8.9.4.1).

Ein Nachteil der HILIC-Chromatographie innerhalb von Metabolomanalysen stellen die unpolaren Startbedingungen ($\geq 90\% \text{ vv}^{-1}$ Acetonitril) dar, die nur eine beschränkte Kompatibilität mit geladenen oder polaren Metabolitspektren aufweisen. Der direkte Einsatz der vorwiegend wässrigen Proben führt in der Regel zu einer Entmischung mit der überwiegend unpolaren mobilen Phase und unterbindet eine Interaktion der Analyten mit der immobilisierten Wasserschicht als stationäre Phase. In diesem Zusammenhang kann durch eine partielle Konditionierung der Probenansätze ($\geq 50\% \text{ vv}^{-1}$ Acetonitril) an die unpolaren Startbedingungen eine Phasentrennung der Proben unter möglichst hoher Löslichkeit geladener oder polarer Analyten umgangen werden (s. Kap. 8.9.5.1). Darüberhinaus neigen

HILIC- und Normalphasen zu einer ausgeprägten Akkumulation metallischer Spurenelemente wie Eisen(III)Ionen. Dies kann zur Ausbildung metallischer Chelatkomplexe führen, die das Retentionsverhalten entsprechender Analyten unvorteilhaft beeinflusst (*Peak-Tailing*). Hierzu wurde die Exposition von Metalloberflächen innerhalb des Proben-Laufmittelwegs weitgehend eliminiert und es wurden Reinigungsprotokolle implementiert, die eine reproduzierbare chromatographische Trennung komplexer Probenmatrizen ermöglichen (s. Kap. 9.1.1). Da es sich bei der HILIC-Chromatographie um eine Verteilungschromatographie handelt, wird im Vergleich zu RPLC von der Notwendigkeit ausgedehnter Re-Equilibrierungsphasen zur Vermeidung einer unvorteilhaften Retentionszeit-Drift betrachteter Analyten ausgegangen (Buszewski et al. 2012). Die Auslegung adäquater Equilibrierungsphasen hinsichtlich resultierender Retentionszeitschwankungen war Teil der chromatographischen Optimierung und wird separat behandelt (s. Kap. 9.1.1).

8.9.3.2 Agilent 6410B Triple Quadrupol Massenspektrometer

Die Etablierung einer Methode zur absoluten Quantifizierung intrazellulärer Metabolite erfolgte auf einer LC-ESI-MS/MS-Plattform der Firma Agilent Technologies. Als chromatographisches System diente eine Agilent 1200 HPLC-Anlage, bestehend aus einer binären Pumpe, einem Degasser, einem Säulenthermostat sowie einem bioinerten Hochleistungs-Probengeber (Agilent 1260 Serie) mit Thermostat. Die massenselektive Detektion von Analyten erfolgte auf einem Agilent 6410B Triple Quadrupol Massenspektrometer unter Verwendung einer Elektrospray-Ionisierungsquelle (ESI). Eingesetzte Komponenten wurden in nachfolgender Tabelle 8.9 zusammengefasst.

Tabelle 8.9 LC-ESI-MS/MS-Plattform für die Intrazelluläre Analytik

HPLC-Anlage	Agilent 1200 Serie®	MS-Komplex	6410B Triple Quad
<i>Binäre Pumpe SL</i>	G1312B	<i>Ionenquelle</i>	G1948B (ESI)
<i>Degasser (4-Kanal-Mikro-Vakuum)</i>	G1379B	<i>Vakuumpumpe (E2M28, Edwards)</i>	G1969
<i>Säulenthermostat</i>	G1316B	<i>Stickstoff- Gasgenerator</i>	5183-2004
<i>Hochleistungs-Probengeber (bioinert, 1260 Serie®)</i>	G5667A	<i>Pumpen-Schallschutz (Quiet Cover II)</i>	G3199B
<i>Probengeber Thermostat</i>	G1330B	<i>Steuer-Rechner (HP WS xw4600)</i>	G1030AX
		<i>Software-Paket</i>	MassHunter® WS

8.9.4 Etablierung HILIC-ESI-MS/MS

Im Vordergrund stand die Entwicklung und Validierung einer universellen LC-MS-Methode zur sensitiven und selektiven Messung eines breiten Spektrums niedermolekularer Metabolite des zellulären Stoffwechsels. Die Implementierung einer polymerbasierten zwitterionischen HILIC-Chromatographie ermöglicht insbesondere die Trennung geladener und polarer Metabolite unter MS-kompatiblen Bedingungen. In diesem Zusammenhang wurden Quantifizierungsstrategien entwickelt, die eine direkte und absolute Quantifizierung underivatisierter Analyten innerhalb hochkomplexer Probenmatrizen (Metabolomextrakte) ermöglichen.

8.9.4.1 Optimierung chromatographischer Bedingungen

Die Etablierung einer chromatographischen Methode erfolgte anhand einer ZIC-pHILIC Säule (Sequant, 150 x 2.1 mm, 5 µm) unter Verwendung einer Vorsäule (Sequant ZIC-pHILIC, 20 x 2.1 mm, 5 µm). Eingesetzt wurden wässrige Puffersysteme (Ammoniumacetat) mit organischem Anteil (Acetonitril) unter einer bikratischen Gradientenelution mit ansteigender Polarität. Die Optimierung der chromatographischen Bedingungen basierte auf dem Einsatz von Referenzstandards ausgewählter hochpolarer Metabolite des Zentral-Stoffwechsels (G6P, F6P, FbP, 6PG, PEP, Mal, Suc, Cit). Durch Optimierung des pH-Werts der mobilen Phase (pH 5,2-9,2), der eingesetzten Pufferkonzentration (2-20 mM Ammoniumacetat), der Flussrate (0,05-0,20 mL/min), der Säulentemperatur (20-60°C) sowie der Gradientensteigung des zugeschalteten polaren Eluenten B (2,5-5% B/min), konnten signifikante Steigerungen hinsichtlich Sensitivität und Selektivität eingesetzter Metabolit-Mischungen erzielt werden. Optimierte Bedingungen der eingesetzten chromatographischen Methode wurden in Tabelle 8.10 zusammengefasst.

Tabelle 8.10 Optimierte HILIC Chromatographie-Bedingungen (ZIC-pHILIC)

HPLC-System	Agilent 1200 Serie®
Säule	ZIC-pHILIC® 150 x 2.1 mm, 5 µm (Sequant)
Vorsäule	ZIC-pHILIC® 20 x 2.1 mm, 5 µm (Sequant)
Flussrate	0,2 mL/min
Temperatur	40°C
Puffer / pH Wert	10 mM Ammoniumacetat / pH 9,2
Laufmittel A	90% ACN (vv ⁻¹) / 10% H ₂ O (vv ⁻¹) + Puffer
Laufmittel B	10% ACN (vv ⁻¹) / 90% H ₂ O (vv ⁻¹) + Puffer
Injektion	5 µL Probe in 60% ACN (vv ⁻¹)
Gradient	1 min 0% LM B, 30 min 0% auf 75% LM B, 4 min 75% auf 100% LM B, 5 min 100% LM B, 10 min 100% auf 0% LM B, 5 min 0% LM B

8.9.4.2 Optimierung der Quellenparameter (ESI)

Das eingesetzte Tandem-Massenspektrometer (Agilent 6410B) nutzt eine orthogonale Elektrospray-Ionisierungsquelle (ESI) unter pneumatischer Vernebelung chromatographischer Eluate durch Stickstoff. Unter Umgehung der LC erfolgte durch Direktinjektion von Einzel-Referenzstandards eine Optimierung globaler Quellenparameter hinsichtlich maximaler Signalintensität. Eingesetzt wurden analog zur chromatographischen Optimierung Metabolite des Zentralstoffwechsels (s. Kap. 8.9.4.1). Im Vordergrund standen der Stickstoff-Gasfluss (7-13 L/min), Nebulizer-Druck (Vernebler) (15-60 psi) und die angelegte Kapillarspannung (3000-4000 V). Optimierte Bedingungen globaler Quellenparameter wurden in Tabelle 8.11 zusammengefasst.

Tabelle 8.11 Optimierte globale Quellenparameter (ESI)

MS-System	Agilent 6410B Triple Quadrupol MS
Ionenquelle	Electro Spray Ionization (ESI)
Nebulizergas	Stickstoff
Gasfluss	10 L/min
Gas-Temperatur	350°C
Nebulizer-Druck	30 psi
Kapillarspannung	4000 V
Polarität	ESI+ und ESI-
Messmodus	Multiple Reaction Monitoring (MRM)

8.9.4.3 Optimierung metabolit-spezifischer MS/MS Parameter

Die Optimierung substanzspezifischer Massenübergänge sowie zugehöriger MS/MS-Parameter erfolgte anhand verschiedener Betriebsmodi des eingesetzten Triple Quadrupol Massenspektrometers (Agilent 6410B) im Rahmen sequentieller Fließinjektionsanalysen. MS-Direktinjektionen von Einzel-Referenzstandards erfolgten mit einer Laufmittelzusammensetzung (50% $v v^{-1}$ Acetonitril, 10 mM Ammoniumacetat, pH 9,2) die näherungsweise den angestrebten Elutionsbedingungen (s. Kap. 8.9.5.1) entspricht. Der **Full-Scan**-Modus (s. Kap. 7.3.2.2) ermöglichte anhand voroptimierter globaler Quellenparameter eine Detektion entsprechender Analyten innerhalb ausgewählter Masse-Ladungsbereiche (m/z). Unter Verwendung des positiven (ESI+) oder negativen Ionisierungsmodus (ESI-) wurden resultierende Vorläufer-Ionenspezies (Quasi-Molekül-Ionen) hinsichtlich ihrer Quellenstabilität und Signalintensität selektiert. Im **Production-Scan**-Modus (s. Kap. 7.3.2.2) wurde das CID-Fragmentierungsverhalten geeigneter Vorläufer-Ionen anhand eingesetzter Kollisionsenergien (CE) näher untersucht. Resultierende analytspezifische Massenübergänge (MRM-Übergänge) wurden hinsichtlich ihrer Signalintensität und Selektivität beurteilt. Ausgewählte MRM-Übergänge wurden anschließend im **Multiple-Reaction-Monitoring**-Modus (MRM) (s. Kap. 7.3.2.2) weiter analysiert. Die MRM Übergänge wurden mit einer *dwell time* von 100 ms und einer Auflösung von 0,3 bzw. 0,1 Da (FWHM, *full width at half-maximum height*) für den ersten (Q_1) und dritten Quadrupol (Q_3) gemessen. Im Vordergrund stand eine abschließende Optimierung eingesetzter Kollisionsenergien (CE in V) und Fragmentorspannungen (F in V) als substanzspezifische MS/MS-Parameter. Im Laufe dieser Arbeit konnten für **62 intrazelluläre Metabolite** spezifische MRM-Übergänge mit zugehörigen optimierten MS/MS-Parameter erfolgreich etabliert werden. Das Messspektrum ermöglicht die underivatisierte Messung von Aminosäuren, Carbonsäuren, Zuckerphosphaten, Nukleotiden sowie Coenzymen. Ein besonderer Schwerpunkt wurde auf die Quantifizierung anaboler Metabolite der L-Methionin-Synthese sowie angrenzender Stoffwechselwege gelegt. MRM-Übergänge analoger ^{13}C -markierter Massenisotopomere wurden anhand bestehender Vorläufer- und Produkt-Ionenspezies abgeleitet. Optimierte MRM-Übergänge mit zugehörigen MS/MS-Parametern unmarkierter sowie analoger voll-markierter Analyten für die Isotopen-Verdünnungs-Massenspektrometrie (IDMS) wurden in Tabelle 8.12 zusammengefasst.

Tabelle 8.12 MS/MS-Parameter für 62 intrazelluläre Metabolite unter Aufführung zugehöriger MRM-Übergänge für unmarkierte [$U^{12}C$] und vollmarkierte [$U^{13}C$] Analyten

Metabolite		DETEKTIONSPARAMETER						
		Pol.	$U^{12}C$ -MRM		MS/MS		$U^{13}C$ -MRM	
Kürzel	Bezeichnung		Vorläufer (m/z)	Fragment (m/z)	CE [V]	Frag. [V]	Vorläufer (m/z)	Fragment (m/z)
aKB	α -Ketobutyrat	(-)	145	101	4	70	150	105
Fum	Fumarat	(-)	115	71	3	70	119	74
Suc	Succinat	(-)	117	73	9	82	121	76
Mal	Malat	(-)	133	115	7	80	137	119
aKG	α -Ketoglutarat	(-)	145	101	4	70	150	105
Cit	Citrat	(-)	191	111	10	90	197	116
IsoCit	Isocitrat	(-)	191	173	6	90	197	179
cis-Aco	cis-Aconitat	(-)	173	85	10	60	179	89
Xu5P	Xylulose-5-Phosphat	(-)	229	97	4	70	234	97
6PG	6-Phosphogluconat	(-)	275	97	12	100	281	97
E4P	Erythrose-4-Phosphat	(-)	199	97	4	70	203	97
R5P	Ribose-5-Phosphat	(-)	229	97	6	90	234	97
Ru5P	Ribulose-5-Phosphat	(-)	229	97	6	90	234	97
F6P	Fructose-6-Phosphat	(-)	259	97	10	100	265	97
G6P	Glucose-6-Phosphat	(-)	259	97	12	100	265	97
FbP	Fructose-1,6-bis-Phos.	(-)	339	97	15	100	345	97
DHAP	Dihydroxyaceton-Phos.	(-)	169	97	4	60	172	97
PEP	Phosphoenolpyruvat	(-)	167	79	14	70	170	79
2PG	2-Phosphoglycerat	(-)	185	79	38	90	188	79
3PG	3-Phosphoglycerat	(-)	185	97	14	80	188	97
NAD	Nicotinamid-Adenin-D.	(+)	666	649	65	135	687	670
NADP	Nicotinamid-Adenin-D.-P	(+)	744	136	58	135	765	141
AMP	Adenosinmonophosphat	(-)	346	79	60	135	356	79
ADP	Adenosindiphosphat	(-)	426	79	98	135	436	79
ATP	Adenosinetrphosphat	(-)	506	79	108	135	516	79
GMP	Guanosinmonophosphat	(-)	362	79	60	135	372	79
GDP	Guanosindiphosphate	(-)	442	79	108	135	452	79
GTP	Guanosintriphosphat	(-)	522	79	108	135	532	79
CMP	Cytosinmonophosphate	(-)	322	79	60	135	331	79
CDP	Cytosindiphosphat	(-)	402	79	98	135	411	79
CTP	Cytosintriphosphat	(-)	482	79	108	135	491	79
UMP	Uridinmonophosphat	(-)	323	79	60	135	332	79
UDP	Uridindiphosphat	(-)	403	79	98	135	412	79
UTP	Uridintriphosphat	(-)	483	79	108	135	492	79
cAMP	cykl. Adenosinmonophos.	(-)	328	134	22	135	338	139
AIBA	α -Aminoisobutyrat	(+)	104	58	10	75	-	-
GABA	γ -Aminobutyrat	(+)	104	87	10	75	-	-
L-HSer	L-Homoserin	(+)	120	74	10	75	124	77
O-Ac-Ser	O-Acetylserin	(+)	148	60	20	60	153	62
OSHS	O-Succinyl-L-Homoserin	(+)	220	102	8	70	228	106
L-Cysth	L-Cystathionin	(+)	223	88	27	85	230	91
Gly	Glycin	(+)	76	30	8	70	78	31
L-Ala	L-Alanin	(+)	90	44	10	70	93	46
L-Ser	L-Serin	(+)	106	60	10	75	109	62
L-Pro	L-Prolin	(+)	116	70	17	75	121	74
L-Val	L-Valin	(+)	118	72	10	75	123	76
L-Thr	L-Threonin	(+)	120	74	9	75	124	77
L-Leu	L-Leucin	(+)	132	44	20	75	138	47
L-Ile	L-Isoleucin	(+)	132	44	20	75	138	47
L-Asn	L-Asparagin	(+)	133	74	15	70	137	76
L-Asp	L-Aspartat	(+)	134	74	13	75	138	76
L-Gln	L-Glutamin	(+)	147	84	18	70	152	88
L-Lys	L-Lysin	(+)	147	84	17	75	153	89
L-Glu	L-Glutamat	(+)	148	84	17	75	153	88
L-Met	L-Methionin	(+)	150	56	17	75	155	59
L-Phe	L-Phenylalanin	(+)	166	120	12	75	175	128
L-Arg	L-Arginin	(+)	175	70	30	75	181	74
L-Trp	L-Tryptophan	(+)	205	188	4	75	216	199
L-His	L-Histidine	(+)	156	110	13	85	162	115
L-Nva	L-Norvalin	(+)	118	72	10	75	123	76
L-Cys*	S-Carboxyl-L-Cystein	(+)	180	89	15	75	183	92
L-HCys*	S-Carboxyl-L-Homocystein	(+)	194	56	18	70	198	59

*Derivatisierung mit Iodessigsäure (Carducci et al. 1999) (s. Kap. 8.9.5.2)

8.9.4.4 Methodenvalidierung HILIC-ESI-MS/MS

Eine Validierung der entwickelten HILIC-ESI-MS/MS Methode erfolgte für **56 intrazelluläre Metabolite** des zellulären Stoffwechsels unter sauren (pH 5,6) und alkalischen (pH 9,2) Bedingungen der mobilen Phase. Um Säuleneffekte durch einen pH-Wechsel zu umgehen wurden die Messungen unter alkalischen und sauren Bedingungen jeweils auf zwei ZIC-pHILIC Säulen (Sequant) unter Verwendung von ZIC-pHILIC-Vorsäulen (Sequant) derselben Charge (*Sorbent Lot No. P110327*) durchgeführt. Um die Aussagekraft der Messungen zu erhöhen wurden interne Standards zur Kontrolle ESI-MS/MS-spezifischer Schwankungsbreiten nicht aber zur Normalisierung resultierender Peakflächen eingesetzt. In Abhängigkeit des Polaritätsmodus (ESI+ oder ESI-) sowie metabolit-spezifischer Retentionszeiten wurde das Metabolitspektrum in drei Messgruppen eingeteilt und definierte Standard-Mischungen erstellt.

Im Vordergrund stand eine Beurteilung der **chromatographischen Trennleistung** hinsichtlich der Reproduzierbarkeit von Retentionszeiten, der Peakbreiten und Peaksymmetrien. Darüberhinaus wurden metabolit-spezifische **Linearitätsbereiche** und **Bestimmungsgrenzen** (Methodische Detektionslimits, MDL) ermittelt. Hierfür wurde unter Fokussierung geringer Konzentrationen ($\leq 5 \mu\text{M}$) ein Kalibrationsbereich von 1 nM bis 5 μM unter Verwendung von 12 Konzentrationsstufen untersucht. Anschließend wurde das Linearitätsverhalten ausgewählter Analyten anhand eines erweiterten Kalibrationsbereich von 0,5 μM bis 200 μM unter Verwendung von 12 Konzentrationsstufen näher betrachtet. Weiter wurde die **ESI-Responsivität** der Analyten unter alkalischen und sauren Bedingungen sowie die **Reproduzierbarkeit** resultierender Peakflächen anhand der Messung von 5 μM Referenzstandards analysiert. Abschließend wurde die **Stabilität** der Analyten nach der chromatographischen Probenaufarbeitung und Lagerung bei 5°C (Hochleistungsprobengeber) innerhalb periodischer Direktinjektionen (0, 7, 14, 21 h) von 5 μM Referenzstandards unter alkalischen Bedingungen der mobilen Phase (50 % v^{-1} Acetonitril) näher beurteilt.

8.9.4.5 Quantifizierung in *E. coli* Metabolomextrakten

Die Eignung der entwickelten alkalischen HILIC-ESI-MS/MS-Methode (pH 9,2) wurde anhand der absoluten Quantifizierung ausgewählter Metabolite innerhalb von Metabolomextrakten des Wildtyp-Stamms *E. coli* K-12 MG1655 (DSMZ, Braunschweig) näher beurteilt.

Kultivierungen erfolgten im Schüttelkolben unter unlimitierten Bedingungen (s. Kap. 8.4) im adaptierten WHM-Minimalmedium (s. Tab. 8.3) unter Verwendung von D-Glucose ($7,5 \text{ gL}^{-1}$) als alleinige Kohlenstoffquelle. Intrazelluläre Probenahmen erfolgten innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase bei einer Biotrockenmassekonzentration von ca. 2 gL^{-1} (OD_{600} ca. 7,8) nach der beschriebenen FCT- und HWE-Methode (s. Kap. 8.9.1.2 und 8.9.2.2). Zur Untersuchung des Einflusses probenbasierter Matrixeffekte erfolgte die Messung absoluter Analytkonzentrationen unter Anwendung der externen Kalibrierung (s. Kap. 8.10.1), der Isotopen-Verdünnungsmassenspektrometrie (s. Kap. 8.10.3) und der Standardaddition (s. Kap. 8.10.4) als Quantifizierungsstrategie. Standardreihen für externe Kalibrierungen wurden mittels unmarkierter Referenzstandard-Mischungen erstellt. Auf Grundlage initialer Konzentrationsabschätzungen (*Spikes*, s. Kap. 8.10.4) wurden unter Verwendung von 7 Konzentrationsstufen analytspezifische Kalibrationsbereiche eingestellt. Für die Quantifizierung nach der Isotopen-Verdünnungsmassenspektrometrie wurden externe Standardreihen und Proben mit einer konstanten Menge vollmarkierten ^{13}C -Algenextrakten (Sigma-Aldrich) versetzt. Zur Erstellung externer Kalibrierfunktionen wurden Peakflächen unmarkierter Referenzstandards mit Peakflächen vollmarkierter U^{13}C -Analoge normalisiert und gegen die eingesetzten Standardkonzentrationen aufgetragen. Standardadditionen wurden mittels definierter Probenaufstockungen durch analytspezifische Kalibrierreihen unmarkierter Referenzstandards umgesetzt. Basierend auf Konzentrationsabschätzungen wurde eine vierfache Aufstockung der Probenmatrix (x_0 - x_4) durchgeführt. Interne Kalibrierfunktionen wurden anhand Auftragung der Peakflächen sukzessiv aufgestockter Analyten gegen die eingesetzten Referenzstandard-Konzentrationen erstellt. Zur Erhöhung der Aussagekraft erfolgte die absolute Quantifizierung intrazellulärer Metabolite unter Anwendung der aufgeführten Strategien innerhalb einer Messequenz. Ermittelte Werte wurden mit publizierten intrazellulären Metabolit-Konzentrationen von *E. coli* Wildtyp-Stämmen unter vergleichbaren Kultivierungsbedingungen verglichen und diskutiert.

8.9.5 Quantifizierung intrazellulärer Metabolite der L-Met-Synthese

8.9.5.1 Alkalische HILIC-ESI-MS/MS

Quantifizierungen intrazellulärer Metabolite der L-Methionin-Synthese sowie angrenzender anaboler Stoffwechselwege (*Metabolic Profiling*) erfolgten auf einer LC-ESI-MS/MS-Plattform (s. Kap. 8.9.3.2). Die nach der FCT- und HWE-Methode erstellten Metabolomextrakte von *E. coli* SPOT01 (s. Kap. 8.9.1.2 und 8.9.2.2) wurden unter Verwendung einer etablierten HILIC-ESI-MS/MS-Methode (s. Kap. 8.9.4) unter alkalischen Bedingungen (pH 9,2) vermessen. Die bikratische Trennung der underivatisierten Analyten erfolgte auf einer ZIC-pHILIC Säule mit Vorsäule (Sequant) unter optimierten chromatographischen Bedingungen (s. Kap. 8.9.4.1). Dies wurde unter initialen Einsatz des unpolaren Laufmittel A (90% vv^{-1} ACN, 10 mM Ammoniumacetat / pH 9,2) unter anschließender Zuschaltung des polaren Laufmittels B (10% vv^{-1} ACN, 10 mM Ammoniumacetat / pH 9,2) umgesetzt. Um eine Phasentrennung der wässrigen Metabolomextrakte und Kultivierungsüberstände zu vermeiden, musste eine Probenaufbereitung hinsichtlich der organischen Startbedingungen (90% vv^{-1} ACN) der HILIC-Chromatographie erfolgen. Hierzu wurden die Proben vorab mit 60 % ACN (vv^{-1}) und 10 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 9,2) angesetzt. Dies ermöglichte eine möglichst hohe Löslichkeit insbesondere geladener und polarer Metabolite unter Umgehung einer Präzipitation oder Entmischung der Proben innerhalb der mobilen Phase. Aufbereitete Proben wurden 10 min bei 20.000 x g und 4°C (Eppendorf 5417 R) abzentrifugiert und in Glasgefäße (Brown) mit Mikroeinsätzen (100-200 μL , Brown) überführt. Ein exemplarischer Probenansatz wird in Tabelle 8.13 aufgeführt.

Tabelle 8.13 Exemplarischer Probenansatz für die alkalische HILIC-Chromatographie (ZIC-pHILIC)

Komponente	Zugabe [μL]	Konzentration	Verdünnungsfaktor
Metabolitextrakt	20	var	5,00
Standardmischung / H_2O	19	var	5,26
1 M Ammoniumacetat (pH 9,2)	1	10 mM	100,00
Acetonitril (ACN)	60	60% (vv^{-1})	1,67
Gesamt	100		

Die Elektrospray-Ionisierung der eluierten anabolen Analyten erfolgte im positiven (ESI+) Ionisierungsmodus unter optimierten globalen Quellenbedingungen (s. Kap. 8.9.4.2). Anschließend wurden die ionisierten Analyten $[M+H]^+$ im *Multiple Reaction Modus* (MRM) anhand voroptimierter Massenübergänge sowie zugehöriger MS/MS-Parameter (Kollisionsenergie, Fragmentorspannung) mit einer Messzeit (*dwell time*) von 100 ms detektiert. Die selektiven Messungen erfolgten mit einer Trennschärfe von 0,3 Da für den ersten Quadrupol (Vorläufer-Ionen) und 0,1 Da für den dritten Quadrupol (Fragment-Ionen). Um eine ausreichende Peakauflösung zu erzielen musste bei einem Messspektrum von über 20 Metaboliten die Gesamtmethode in sinnvolle Retentionszeitfenster aufgeteilt werden. Innerhalb derartiger Messzeitfenster wird die Anzahl programmierbarer Massenübergänge durch die Peakbreite und die Zykluszeit limitiert. Die Zykluszeit ergibt sich aus der Anzahl programmierter MRM-Übergänge, der jeweiligen Messdauer (*dwell time*) und der Umschaltzeit des Massenspektrometers zwischen zwei MRM-Übergängen. Angesichts chromatographischer Peakbreiten von 0,5-2 min wurden die Messzeitfenster derart eingestellt, dass eine Zykluszeit von 2 s nicht überschritten wurde. Hieraus ergab sich, dass während der Elution eines Analyten mindestens 15-20 Zyklen (Messpunkte) durchlaufen wurden. In Abbildung 8.6 wird das MRM-Ionenchromatogramm für Metabolite der L-Methionin-Synthese sowie angrenzender anaboler Stoffwechselwege aufgezeigt. Peaknotationen, Retentionszeiten sowie zugehörige Messzeitfenster wurden in Tabelle 8.14 zusammengefasst. Eingesetzte interne Standards wurden hervorgehoben.

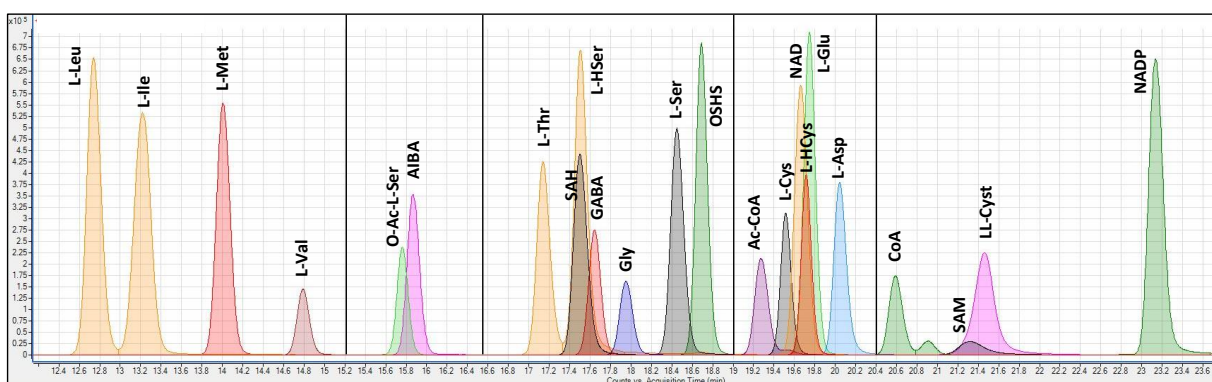


Abbildung 8.6 MRM-Ionenchromatogramm (ESI+) von Metabolitstandards (20 µM) der L-Met-Synthese. (Quelle: Auswertung MassHunter®, Agilent Technologies)

Tabelle 8.14 Zeitfenster/Retentionszeiten (t_R) von Metaboliten der L-Met-Synthese (ZIC pHILIC®/ pH 9,2)

Messzeitfenster [min]	Notation	t_R [min]	Metabolit	Messzeitfenster [min]	Notation	t_R [min]	Metabolit	
Periode I [0-15,2]	L-Leu	12,7	L-Leucin	Periode III [16,5-19,0]	L-Ser	18,4	O-Acetyl-L-Serin	
	L-Ile	13,2	L-Isoleucin		OSHS	18,7	O-Succinyl-L-Homoserin	
	L-Met	14,0	L-Methionin		Periode IV [19,0-20,4]	Ac-CoA	19,3	Acetyl-Coenzym A
	L-Nva	14,4	L-Norvalin			L-Cys*	19,5	L-Cystein
	L-Val	14,8	L-Valin			L-HCys*	19,7	L-Homocystein
Periode II [15,2-16,5]	O-Ac-Ser	15,7	O-Acetyl-L-Serin	NAD	19,6	Nicotinamidadenin-dinukleotid		
	AIBA	15,9	α-Amino-butyrat	L-Glu	19,8	L-Glutamat		
Periode III [16,5-19,0]	L-Thr	17,1	L-Threonin	Periode V [20,4-40,0]	L-Asp	20,1	L-Aspartat	
	L-HSer	17,5	L-Homo-Serin		CoA	20,6	Coenzym A	
	SAH	17,5	S-Adenosyl-L-Homocystein		SAM	21,3	S-Adenosyl-L-Methionin	
	GABA	17,6	γ-Amino-butyrat		LL-Cyst	21,5	LL-Cystathionin	
	Gly	17,9	Glycin		NADP	23,1	Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat	

*Derivatsierung mit Iodessigsäure (Carducci et al. 1999) (s. Kap. 8.9.5.2)

Absolute Quantifizierungen von Analyten in *E. coli* SPOT01 Metabolomextrakten erfolgten nach der Methode der Standardaddition (s. Kap. 8.10.4) unter vierfacher Aufstockung der Probenmatrix. Adaptierte Kalibrationsmatrizen wurden anhand von Konzentrationsabschätzungen durch einfache Aufstockungen der Probenmatrix (*Spiken*) erstellt. Peakflächen wurden durch globale Internstandards (L-Nva, AIBA, GABA) normalisiert. Methodische Fehlerbestimmungen basierten auf der Ermittlung der Rest-Standardabweichung erstellter interner Regressionsgeraden (s. Kap. 8.10.5). In Abbildung 8.7 wird eine exemplarische Kalibrationsgerade zur absoluten Quantifizierung von intrazellulärem L-Methionin innerhalb eines erstellten *E. coli* SPOT01 Metabolomextrakts aufgezeigt.

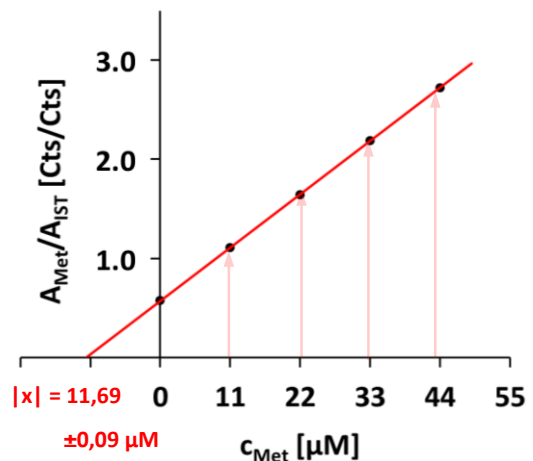


Abbildung 8.7 Absolute Quantifizierung von L-Methionin mittels Standardaddition. (innerhalb eines *E. coli* SPOT01 Extrakts).

8.9.5.2 Derivatisierungsstrategien für L-Cystein und L-Homocystein

Im besonderen Fokus standen die Aminosäuren L-Cystein und L-Homocystein als Schlüsselmetabolite der L-Methionin Synthese. Die messtechnische Herausforderung bestand in der hohen Reaktivität freier Thiolgruppen, die unter oxidativen Bedingungen zu Dimerisierungen mit anderen Thiolreagenzien führt. Die Messung der underivatisierten Thiolreagenzien erwies sich als inkompatibel mit den chromatographischen Bedingungen der entwickelten HILIC-ESI-MS/MS-Methode. In vorhergehenden Arbeiten konnte bereits eine OPA-RPLC-Methode (s. Kap. 8.8.2) zur Quantifizierung von L-Cystein und L-Homocystein innerhalb extrazellulärer Proben anhand einer Derivatisierung (Carboxymethylierung) der freien Thiolgruppen unter reduzierenden Bedingungen erfolgreich etabliert werden (Carducci et al. 1999). Die Methode weist eine hohe Robustheit in komplexen Proben-Matrizen sowie eine vergleichsweise hohe Variabilität hinsichtlich der Derivatisierungsparameter auf (Krömer et al. 2006). Thiolreagenzien werden unter alkalischen ($> \text{pH } 8$) und reduzierenden Bedingungen (z.B. Zugabe von Mercaptopropionat, MPA) mittels Iodessigsäure durch eine nukleophile Substitutionsreaktion unter Abspaltung eines Iodidsalzes carboxymethyliert. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 8.8 anhand von L-Cystein dargestellt.

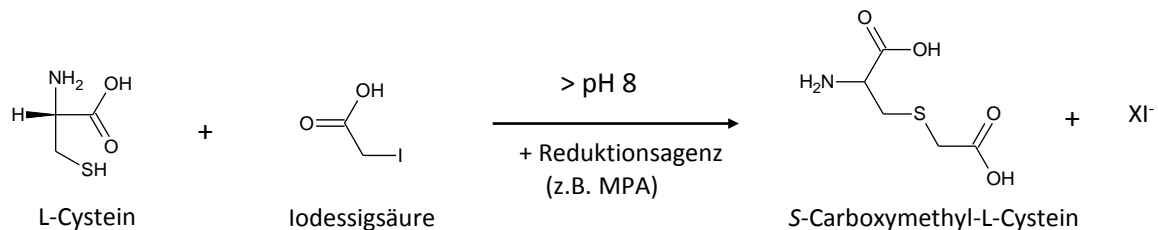


Abbildung 8.8 Carboxymethylierung von L-Cystein mit Iodessigsäure unter reduzierenden Bedingungen. (Quelle: eigene Darstellung, in Anlehnung an Carducci et al. 1999)

Die Derivatisierungsstrategie wurde an die Bedingungen der etablierten alkalischen HILIC-ESI-MS/MS-Methode adaptiert. Hierdurch sollte eine simultane Quantifizierung aller relevanter anaboler Metabolite auf einer einheitlichen Plattform erfolgen. Die Derivatisierung intrazellulärer Metabolomextrakte wurde in die analytische Probenaufbereitung (s. Kap. 8.9.5.1) implementiert. Durch Zugabe von 1% Mercaptopropionat-Lösung (vv^{-1}) wurden die Thiolagenzien initial reduziert. Anschließend erfolgte die Zugabe Iodessigsäure-Lösung (150 gL^{-1}) und die Proben wurden bis zur vollständigen Derivatisierung für 48 h bei RT inkubiert. Verwendete Agenzien wurden in 75 mM Ammoniumacetatpuffer angesetzt und vorab unter Verwendung von Ammoniumhydroxid auf pH 9,2 titriert. Um die Einheitlichkeit

der Derivatisierung von Analyt und Referenzstandards zu ermöglichen wurde als Quantifizierungsstrategie die Standardaddition (s. Kap. 8.10.4) gewählt. Ein exemplarischer Probenansatz wird in Tabelle 8.15 aufgeführt.

Tabelle 8.15 Exemplarischer Probenansatz (Derivatisierung) für die alkalische HILIC-Chromatographie

Komponente	Zugabe [μL]	Konzentration	Verdünnungsfaktor
Metabolitextrakt	10	var	10,00
Std-Mischung (L-(H)Cys) / H_2O	16,7	var	6,00
150 gL^{-1} Iodessigsäure in 75 mM Ammoniumacetat (pH 9,2)	6,7	10 gL^{-1}	15,00
1% (vV^{-1}) 3-Mercaptopropionat in 75 mM Ammoniumacetat (pH 9,2)	6,7	-	15,00
48 h Inkubation bei RT			
Acetonitril (ACN)	60	60% (vV^{-1})	1,67
Gesamt	100		

Im Anschluss erfolgte die Zugabe von Acetonitril (60% vV^{-1}) und die Proben wurden 10 min bei 20.000 x g und 4°C (Eppendorf 5417 R) abzentrifugiert. Die Derivatisierungsansätze wurden mit angepassten MRM-Übergängen (s. Tab. 8.12) LC-MS-basiert vermessen.

8.9.5.3 ^{13}C Massenisotopomeranalysen

^{13}C -Isotopomeranalysen basieren auf der Verteilung stabiler ^{13}C -Isotope (Markierungssignal) innerhalb eines Stoffwechselnetzwerks (Niedenführ et al. 2015). Unter Verwendung ^{13}C -markierter Substrate resultieren verschiedene Metabolit-Isotopomere, die sich massenspektrometrisch detektieren lassen (Buescher et al. 2015). In diesem Zusammenhang stellen Isotopomere (kurz für Isotopen-Isomere) die verschiedenen Markierungszustände dar, die ein Metabolit aufweisen kann. Positions-Isotopomere beschreiben hierbei die Anzahl und die exakte Position der ^{13}C -Isotope innerhalb eines Moleküls. Für einen betrachteten Metabolit mit n Kohlenstoffatomen ergeben sich somit unter Vernachlässigung weiterer Kohlenstoffisotope 2^n verschiedene Markierungszustände bzw. Positions-Isotopomere (Choi et al. 2011). Massen-Isotopomere beschreiben hingegen Isotopomer-Gruppen, die sich in der Anzahl vorhandener ^{13}C -Isotope unterscheiden. Für ein Molekül mit n Kohlenstoffatomen ergeben sich hierbei n+1 Massen-Isotopomer-Spezies (Choi et al. 2011). Da massenspektrometrische Messungen (MS) auf der Detektion des Massenunterschieds

zwischen ^{12}C - und ^{13}C -Isotope basieren, können prinzipiell auch nur Massen-Isotopomer-Spezies erfasst werden (Buescher et al. 2015). Die Anwendung der Kernresonanzspektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) erlaubt zwar die Erfassung definierter Positions-Isotopomere, ist aber für die Messung intrazellulärer Metabolitpools (i.R. μM Bereich) nicht sensitiv genug (Lane et al. 2008). Die Anwendung der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) ermöglicht allerdings unter Berücksichtigung des Fragmentierungsverhaltens der jeweiligen Analyten indirekte Rückschlüsse auf die ursprüngliche ^{13}C -Markierungsposition (Choi et al. 2011). Da CID-Fragmentierungen auf wenige energetisch begünstigte intramolekulare Bruchstellen beschränkt bleiben, sind allerdings eindeutige Zuordnungen in der Regel nicht möglich. Für ein Metabolit mit n Kohlenstoffatomen im Vorläufermolekül und m Kohlenstoffatomen im Fragmentmolekül kann die Anzahl messbarer MRM-Übergänge x anhand nachfolgender Gleichung berechnet werden (Choi et al. 2011):

$$x = (n - m + 1) \cdot (m + 1) \quad [8.6]$$

Für L-Serin (C_3 -Körper) ergeben sich beispielsweise für einen optimierten [U^{12}C]-Massenübergang von [m/z 106 \rightarrow 60] mit $n = 3$ C-Atomen im Vorläufer-Ion und $m = 2$ C-Atomen im Fragment-Ion, 8 Positions-Isotopomere, 4 Massen-Isotopomer-Spezies und 6 messbare MRM-Übergänge. In dieser Arbeit wurden Perturbationsexperimente des Methionin-Synthese-Stoffwechsels unter Verwendung des alternativen und vollmarkierten Stimulus-Substrats [U^{13}C]-L-Serin durchgeführt. Innerhalb des hoch-verzweigten Reaktionsnetzwerks können instationäre Konzentrationsverläufe resultierender ^{13}C -markierter Metabolitpools vorteilhaft auf die direkte Metabolisierung des Stimulus-Substrats zurückgeführt werden. Unter Berücksichtigung von Perturbationsverläufen unmarkierter U^{12}C -Metabolitpools kann der Informationsgehalt gemessener Datensätze für anschließende metabolische Kontrollanalysen (MCA) signifikant gesteigert werden. Die hohe und konstante spezifische Aufnahmerate des netzwerk-inhärenten Stimulussubstrat ermöglichte zudem eine starke Perturbation des gesamten Netzwerks, so dass der natürliche isotopische Hintergrund bestehender unmarkierter intrazellulärer ^{12}C -Metabolitpools (für ^{13}C 1,082%) weitgehend vernachlässigt werden konnte (Crown et al. 2013) (s. Kap. 9.5.2.2). Aufgrund der bekannten Reaktionsstöchiometrien konnten resultierende MRM-Übergänge eindeutig auf entsprechende Positions-Isotopomere zurückgeführt werden (s. Kap. 9.5.2.1).

8.10 Analytische Quantifizierungsstrategien

LC-ESI-MS/MS-basierte Verfahren ermöglichen die sensitive und selektive Messung von Analyten innerhalb intrazellulärer Metabolomextrakte. Die hochkomplexen biologischen Matrizen können allerdings zu analyt-spezifischen Verzerrungen des Messwerts führen (Matrixeffekt) (Annesley et al. 2003). Um derartige Matrixeffekte sowie Verluste während der Probenaufarbeitung zu kompensieren, wurden in der Vergangenheit eine Vielzahl von Quantifizierungsstrategien entwickelt.

8.10.1 Externe Kalibrierung

Externe Kalibrierungen basieren auf Standardreihen, die innerhalb geeigneter Konzentrationsbereiche separat von der Probe vermessen werden. Zugehörige Kalibrierfunktionen werden in der Regel durch lineare oder nicht-lineare Regression resultierender Messpunkte durch die Methode der kleinsten Quadrate bestimmt. Anschließend können Probensignale anhand der ermittelten Kalibrierfunktion quantifiziert werden. Voraussetzung für die Methode ist, dass Referenzstandards und Proben eine vergleichbare Matrix aufweisen. Systematische Fehler werden nicht abgebildet.

8.10.2 Methode des internen Standards

Der Einsatz interner Standards ermöglicht die Kompensation systematischer Fehler durch Probenaufbereitung und Matrixeffekte. Voraussetzung ist, dass der eingesetzte interne Standard in seinem physikalischen und chemischen Verhalten dem Analyten möglichst ähnlich ist und simultan vermessen werden kann. Hierzu wird die gleiche Konzentration des internen Standards zu Standard- und Probenlösung gegeben und vermessen. Durch Auftragung normalisierter Analytensignale (relative Bezugsgröße) können resultierende Probenkonzentrationen korrigiert werden. Ideale interne Standards berücksichtigen Aufarbeitungseffekte ab dem Zeitpunkt der Zugabe. Die Methode ist sowohl auf externe als auch interne Kalibrationen (Standardaddition) anwendbar. Innerhalb dieser Arbeit wurden die nicht-proteinogenen Aminosäuren L-Norvalin, α -Aminobuttersäure und γ -Aminobuttersäure als interne Standards eingesetzt.

8.10.3 Isotopen-Verdünnungs-Massenspektrometrie

Die massenselektive Detektion von MS-Anlagen ermöglicht die Anwendung der Isotopen-Verdünnungs-Massenspektrometrie (*Isotope Dilution Mass Spectrometry*, IDMS) als Quantifizierungsstrategie innerhalb stark matrix-belasteter Proben. Die Methode erlaubt eine vorteilhafte (zeitsparende) externe Kalibrierung der Analyten unter Einsatz isotopenmarkierter Analoga (i.R. $U^{13}C$), welche die Anforderungen an interne Standards bestmöglich erfüllen. Hierzu werden die standard-basierte Kalibrierreihe sowie Proben mit einer konstanten Menge an Internstandardlösung versetzt und vermessen. Anschließend werden die Peakflächen des unmarkierten Referenzstandards ($U^{12}C$) mit den Peakflächen des analogen vollmarkierten Internstandards ($U^{13}C$) normalisiert ($U^{12}C/U^{13}C$) und gegen die eingesetzten Konzentrationen ($U^{12}C$) aufgetragen. Die resultierende lineare Ausgleichgerade (s. Kap. 8.10.1) wird in Abhängigkeit der Matrixeffekte und des Responsivitätsverhaltens der Ionenquelle (ESI) korrigiert. Ein Nachteil der Methode besteht in der limitierten Zugänglichkeit eines breiten Spektrums adäquater isotopenmarkierter Analoga. Zusätzlich ist der Einsatz ^{13}C -markierter Internstandards innerhalb gängiger ^{13}C Massenisotopomeranalysen (s. Kap. 8.9.5.3) nicht möglich. In dieser Arbeit wurden als Internstandardlösungen Extrakte aus kommerziell erhältlichen vollständig ^{13}C -markierten lyophilisierten Algenzellen (> 99 atom% ^{13}C , Lot No. 487945, Sigma-Aldrich) eingesetzt. Zur Vermeidung unnötiger Probenverdünungen wurden hochkonzentrierte Metabolomextrakte nach der Methode der Heißwasser-Extraktion (s. Kap. 8.9.2.2) bei einer BTM-Konzentration von 90 gL^{-1} erstellt.

8.10.4 Standardaddition (Interne Kalibrierung)

Im Gegensatz zur Isotopen-Verdünnungsstrategie (IDMS, s. Kap. 8.10.3) stellt die Methode der Standardaddition eine messtechnisch aufwendigere Alternative dar, ermöglicht aber unabhängig von der Verfügbarkeit von ^{13}C -Analoga als interne Standards eine quantitative Analyse stark matrix-belasteter Proben. Die Methode basiert auf einer Probenaufstockung mittels einer standard-basierten Kalibrierreihe (interne Kalibrierung). Hierzu wird die jeweilige Probe in mehrere Aliquots aufgeteilt. Die Nullprobe wird mit H_2O aufgestockt, während die anderen Aliquote mit dem gleichen Volumen an Referenzstandard mit steigender Konzentration versetzt werden. Folglich ist die Probenkonzentration in allen Ansätzen gleich, lediglich die Konzentration des addierten Standards steigt linear an. Innerhalb des spezifischen

Linearitätsbereich (s. Tab. 9.1 bzw. 9.2) ergibt sich für jeden Analyten eine interne Kalibrationsgerade, die den Zusammenhang zwischen Peakfläche und Aufstockung darstellt. Unter Ermittlung des Achsenabschnitts b (Nullprobe) und der Steigung m kann die ursprüngliche Probenkonzentration x_e des Analyten nach folgender Formel berechnet werden. Diese entspricht dem Betrag des Nullpunkts der internen Kalibrationsgeraden ($y=0$).

$$x_e = b/m, \text{ mit } m = \frac{\sum_i(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i(x_i - \bar{x})^2}; b = \bar{y} - m\bar{x} \quad [8.7]$$

x_i	Konzentration addierter Standard
\bar{x}	Mittelwert von x_i
y_i	gemessene Peakflächen
\bar{y}	Mittelwert von y_i
m	Steigung der internen Kalibrationsgeraden
b	Achsenabschnitt der internen Kalibrationsgeraden
x_e	Nullpunkt der internen Kalibrationsgeraden (Probenkonzentration)

Ein Nachteil der Methode ist die arbeitsintensive Probenvorbereitung und die lange Messzeit, da eine interne Kalibrierung für jede Probe durchgeführt werden muss. Absolute Quantifizierungen intrazellulärer Metabolite des Methionin-Stoffwechsels in *E. coli* SPOT01 wurden mittels Standardaddition unter vierfacher Aufstockung der Probenmatrix (x_0 - x_4) realisiert. Im Vordergrund stand eine einheitliche Derivatisierung von Metabolit und Quantifizierungsstandards im Rahmen der implementierten Derivatisierungsstrategie zur Acetylierung von L-Cystein und L-Homocystein (s. Kap. 8.9.5.2). Gleichzeitig konnte die absolute Bestimmung von Massenisotopomerpools innerhalb ^{13}C -markierter Perturbationsexperimente mit einer einheitlichen Quantifizierungsstrategie erfolgen. Konzentrationsabschätzungen erfolgten durch einfache Aufstockungen der Probenmatrix (*Spiken*) und ermöglichten unabhängig von der gewählten Quantifizierungsstrategie die Erstellung adaptierter Kalibrationsmatrizen.

8.10.5 Methodische Fehlerbestimmung Standardaddition

Ein Nachteil der Standardaddition ist die arbeitsintensive Probenvorbereitung und die lange Messzeit, da eine interne Kalibrierung für jede Probe durchgeführt werden muss. Um den Messaufwand sinnvoll zu begrenzen, erfolgte die methodische Fehlerbestimmung ermittelter Konzentrationen alternativ anhand der Standardabweichung $S_{y/x}$ der linearen Regression der internen Kalibrationsgeraden (Rest-Standardabweichung). Für die ermittelten intrazellulären

Konzentrationen x_e können die zugehörigen Standardabweichungen s_{x_e} nach folgender Gleichung berechnet werden.

$$s_{x_e} = \frac{s_{y/x}}{b} \cdot \left[\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \cdot \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right]^{\frac{1}{2}}, \quad \text{mit} \quad s_{y/x} = \left[\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2} \right]^{\frac{1}{2}} \quad [8.8]$$

y_i	gemessene Peakfläche
\hat{y}_i	approximierte Peakfläche aus linearer Regression
n	Anzahl der Kalibrationspunkte
$(n - 2)$	Freiheitsgrad
$s_{y/x}$	Standardabweichung der Regressionsgeraden
x_i	Konzentration addierter Standard
\bar{x}	Mittelwert von x_i
\bar{y}	Mittelwert von y_i
m	Steigung der Regressionsgeraden
s_{x_e}	Standardabweichung der ermittelten Analytenkonzentration

8.11 Berechnung spezifischer Raten und Ausbeuten

8.11.1 Spezifische Wachstumsraten

Die spezifische Wachstumsrate μ gibt Aufschluss über den zeitlichen Verlauf der Zellzunahme und wurde auf Grundlage ermittelter OD_{600} - bzw. BTM-Werte berechnet. Ausgehend von einer Bilanzierung der Biomasse m_x in [g] kann sie folgendermaßen definiert werden:

$$\frac{dm_x}{dt} = m_x \cdot \mu \quad [8.9]$$

Unter Bilanzierung der Biomassekonzentration c_x in [g/L] ergibt sich:

$$\frac{d(c_x \cdot V_R)}{dt} = \mu \cdot c_x \cdot V_R \quad [8.10]$$

$$c_x \cdot \frac{dV_R}{dt} + V_R \cdot \frac{dc_x}{dt} = \mu \cdot c_x \cdot V_R \quad [8.11]$$

wobei V_R das Kultivierungsvolumen in [L] beschreibt. Für ein Batch-Prozess kann aufgrund eines konstanten Volumens V_R die Gleichung [8.11] weiter vereinfacht werden:

$$V_R \cdot \frac{dc_x}{dt} = \mu \cdot c_x \cdot V_R \quad [8.12]$$

Unter Trennung der Variablen kann von einer Startkonzentration c_{x0} zum Zeitpunkt $t = 0$ bis zu einer Konzentration c_x zum Zeitpunkt t integriert werden:

$$c_x(t) = c_{x0} \cdot e^{\mu \cdot t} \quad [8.13]$$

Für die exponentielle Wachstumsphase kann die Wachstumsrate als konstant angesehen werden ($\mu = \mu_{max}$) und ist für den jeweiligen bakteriellen Genotyp charakteristisch. Anhand einer logarithmischen Auftragung des Verlaufs der Biotrockenmassekonzentration über die Prozesszeit in [h] kann die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} in [h^{-1}] mittels linearer Regression nach der Methode der kleinsten Quadrate ermittelt werden.

$$\ln c_x(t) = \ln c_{x0} + \mu_{max} \cdot t \quad [8.14]$$

8.11.2 Spezifische Ausbeuten

Die spezifische Ausbeute Y ist eine auf ein Substrat bezogene, differentielle Bildungsrate und wird gewöhnlich in [gg^{-1}] angegeben. Die prozesstechnisch relevantesten Ausbeuten sind die substratspezifische Produktausbeute Y_{PS} , die biomassespezifische Produktausbeute Y_{PX} und die substratspezifische Biomasseausbeute Y_{XS} :

$$Y_{PS} = \frac{dm_P/dt}{dm_S/dt} = \frac{dm_P}{dm_S} \quad [8.15]$$

$$Y_{PX} = \frac{dm_P/dt}{dm_X/dt} = \frac{dm_P}{dm_X} \quad [8.16]$$

$$Y_{XS} = \frac{dm_X/dt}{dm_S/dt} = \frac{dm_X}{dm_S} \quad [8.17]$$

8.11.3 Spezifische Aufnahme- und Syntheseraten

Die Substrataufnahmerate q_s beschreibt den biomassespezifischen Verbrauch eines Substrats pro Zeiteinheit. Analog beschreibt die Produktbildungsrate q_p die biomassespezifische Produktbildung pro Zeiteinheit. Gewöhnlich werden beide Raten in [$g_{S/P} \cdot (g_X \cdot h)^{-1}$] oder in [$\mu mol_{S/P} \cdot (g_X \cdot h)^{-1}$] angegeben. Ausgehend von einer Bilanzierung der Substrat- (m_s in [g]) bzw. Produktmasse (m_p in [g]) können sie folgendermaßen definiert werden:

$$\frac{dm_s}{dt} = -q_s \cdot m_x \quad [8.18]$$

$$\frac{dm_P}{dt} = +q_P \cdot m_x \quad [8.19]$$

wobei m_x die Biomasse in [g] beschreibt. Unter Verwendung der Gleichung [8.9] können sie in Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate μ ausgedrückt werden:

$$q_S = -\mu \cdot \frac{dt}{dm_x} \cdot \frac{dm_S}{dt} = -\mu \cdot \frac{dm_S}{dm_x} \quad [8.20]$$

$$q_P = \mu \cdot \frac{dt}{dm_x} \cdot \frac{dm_P}{dt} = \mu \cdot \frac{dm_P}{dm_x} \quad [8.21]$$

Unter Einbeziehung der substratspezifischen Biomasseausbeute Y_{XS} (s. Gl. [8.17]) bzw. der biomasse-spezifischen Produktausbeute Y_{PX} (s. Gl. [8.16]) können die Raten folgendermaßen ermittelt werden:

$$q_S = -\frac{\mu}{Y_{XS}} \quad [8.22]$$

$$q_P = \mu \cdot Y_{PX} \quad [8.23]$$

8.12 Daten-Analyse (MCA)

Auf Grundlage durchgeführter Stimulus-Response-Experimente (s. Kap. 9.3 und 9.5) und resultierender dynamischer Datensätze erfolgte eine umfassende quantitative Metabolomanalyse des Methionin-Stoffwechsels. Intrazelluläre Perturbationsprofile ermöglichten den direkten Zugang zu *in vivo* Kinetiken und metabolischen Regulationsmechanismen beteiligter Enzyme unter prozessnahen Bedingungen. Im Rahmen der Metabolischen Kontrollanalyse (MCA) wurde zum einen ein **modellgestützter Ansatz** (s. Kap. 8.12.2) zur Ableitung lokaler und globaler Kontrollkoeffizienten verfolgt. Zum anderen wurden basierend auf einem **rein datengestützten Ansatz** (s. Kap. 8.12.3) Effluxkapazitäten beteiligter Enzyme ermittelt.

8.12.1 MCA Parameter

Die metabolische Kontrollanalyse (MCA) ist eine Berechnungsmethode, die eine quantitative Beschreibung der metabolischen Regulation innerhalb komplexer Stoffwechselnetzwerke ermöglicht (Stephanopoulos 1999). Hierbei basiert sie auf Koeffizienten, die die Kontrolleigenschaften von Enzymen auf Variablen des Netzwerkssystems quantifizieren. Elastizitätskoeffizienten ε basieren auf lokalen kinetischen Eigenschaften der jeweiligen Enzyme und beschreiben die auf einen Referenzzustand (angezeigt durch 0) normierten Änderungen der Reaktionsrate v aufgrund infinitesimaler Änderung der jeweiligen Metabolitkonzentration. Metabolite können in diesem Zusammenhang als Substrate, Produkte, Inhibitoren oder Effektoren auftreten (Fell, 1992):

$$\varepsilon_{ij}^{x0} = \frac{x_j^0}{v_i^0} \cdot \left(\frac{dv_i}{dx_j} \right)^0 \quad [8.24]$$

Die Konzentrationskontrollkoeffizienten C^x bzw. die Flusskontrollkoeffizienten C^J beschreiben im gleichen Zusammenhang die auf einen Referenzzustand (angezeigt durch 0) normierte Änderung der Metabolitkonzentration x_i bzw. des Flusses J_i durch infinitesimale Änderung der jeweiligen Enzymkonzentration e_j (Kresnowati *et al.* 2005).

$$C_{ij}^{x0} = \frac{e_j^0}{x_i^0} \cdot \left(\frac{dx_i}{de_j} \right)^0 \quad [8.25]$$

$$C_{ij}^{J0} = \frac{e_j^0}{J_i^0} \cdot \left(\frac{dJ_i}{de_j} \right)^0 \quad [8.26]$$

Aus den lokalen Kontrollkoeffizienten (Elastizitäten) können nach einer Berechnungsvorschrift (Visser *et al.* 2002) unter Verwendung der stöchiometrischen Matrix S , dem Gleichgewichtsfluss J^0 und dem Einheitsvektor i die globalen Kontrollkoeffizienten berechnet werden.

$$C^{x0} = -(S[J^0]E^{x0})^{-1} \cdot SJ^0 \quad [8.27]$$

$$C^{J0} = -E^{x0}(S[J^0]E^{x0})^{-1} \cdot SJ^0 + i = E^{x0}C^{x0} + i \quad [8.28]$$

8.12.2 Kinetisches Modell basierend auf dem LinLog Ansatz

Für die Ermittlung der MCA-Parameter anhand instationärer Datensätze wurde ein MatLab-Programm (Mathworks, MatLab R2013) nach der Methode von Kresnowati et al. 2005 unter Verwendung eines nicht-mechanistischen linear-logarithmischen Ansatzes (LinLog) erstellt. Die LinLog-Kinetik verwendet eine nicht-lineare Schätzfunktion f_i zur Beschreibung der enzymatischen Reaktionsraten v_i eines metabolischen Netzwerks. Hierbei steht die enzymatische Reaktionsrate v in linearer Abhängigkeit zu den jeweiligen Enzymkonzentration e , den kinetischen Parametern a , p_i und q_j sowie den Logarithmen der unabhängigen Metabolitkonzentrationen c_j und abhängigen Metabolitkonzentrationen x_i :

$$v = e(a + \sum p_i \ln x_i + \sum q_j \ln c_j) \quad [8.29]$$

In diesem Zusammenhang werden abhängige Metabolitkonzentrationen durch die Eigenschaften des Reaktionsnetzwerks festgelegt (i.R. intrazelluläre Metabolite). Im Gegensatz dazu können unabhängige Metabolitkonzentrationen unbeeinflusst von den Netzwerkeigenschaften verändert werden (i.R. extrazelluläre Metabolite). Unter Einführung des metabolischen Fließgleichgewichts (*steady state*) als Referenzzustand innerhalb von Perturbationsexperimenten (angezeigt durch 0) können unter Verwendung der Enzymkonzentration e^0 , der abhängigen Metabolitkonzentration x_i^0 , der unabhängigen Metabolitkonzentration c_i^0 und des Gleichgewichtsflusses J^0 zugehörige kinetische Parameter als Elastizitäten ε^0 definiert werden (Visser et al. 2003).

$$\frac{v}{j^0} = \left[\frac{e}{e^0} \right] \left(1 + \sum \varepsilon_i^0 \ln \frac{x_i}{x_i^0} \right) \left(1 + \sum \varepsilon_j^0 \ln \frac{c_j}{c_j^0} \right) \quad [8.30]$$

Unter Annahme, dass jede Reaktion durch ein unterschiedliches Enzym katalysiert wird (Wu et al. 2004) folgt für ein metabolisches Netzwerk aus n_x abhängigen Metaboliten, n_c unabhängigen Metaboliten und n_r Reaktionen in Matrixschreibweise:

$$\frac{v}{j^0} = \left[\frac{e}{e^0} \right] \left(i + E_x^o \ln \left(\frac{x}{x^0} \right) + E_c^o \ln \left(\frac{c}{c^0} \right) \right) \quad [8.31]$$

i	$(n_r \times 1)$ Einheitsvektor
$E_x^o (E_c^o)$	$(n_r \times n_x)$ bzw. $(n_r \times n_c)$ Matrix der Elastizitäten für (un-)abhängige Metabolitpools
x/x^0	$(n_x \times 1)$ Vektor der normalisierten abhängigen Metabolitkonzentrationen
c/c^0	$(n_c \times 1)$ Vektor der normalisierten unabhängigen Metabolitkonzentrationen
e/e^0	$(n_r \times n_r)$ Matrix der normalisierten Enzymkonzentrationen
v/j^0	$(n_r \times 1)$ Vektor der normalisierten Reaktionsraten

Die numerische Ermittlung der lokalen Kontrollkoeffizienten (Elastizitäten) wurde auf Grundlage quantifizierter dynamischer Metabolitdaten mittels eines Zweischrittverfahrens nach der Methode von Kresnowati et al. 2005 durchgeführt. Dabei erfolgte eine erste Berechnung der Elastizitäten mittels linearer Regression. Eine anschließende nicht-lineare Optimierung diente der weiteren Parameteranpassung. Anhand der metabolischen Massenbilanz (s. Gl. [8.32]) werden die auftretenden Raten v zunächst durch normalisierte Raten v/j^0 des LinLog Ansatzes substituiert. Die Substitution erfolgt unter Annahme konstanter Enzymkonzentrationen ($e/e^0=1$) innerhalb des Perturbationszeitraums. Gleichzeitig wird im Gleichgewichtszustand der Term $S \cdot J^0 \cdot i$ per Definition gleich Null gesetzt (s. Gl. [8.33]). Dadurch wird für ein metabolisches Netzwerk, mit der stöchiometrischen Matrix S , ein Differentialgleichungssystem für die logarithmierten und normalisierten Metabolitkonzentrationen in linearer Abhängigkeit der jeweiligen Elastizitäten erzielt (s. Gl. [8.34]).

$$dx/dt = Sv \tag{8.32}$$

$$\frac{v}{j^0} = \left(i + E_x^0 \ln \frac{x}{x^0} + E_c^0 \ln \frac{c}{c^0} \right) \tag{8.33}$$

$$\frac{dx}{dt} = SJ^0 \begin{bmatrix} E_x^0 & E_c^0 \end{bmatrix} \begin{pmatrix} \ln\left(\frac{x}{x^0}\right) \\ \ln\left(\frac{c}{c^0}\right) \end{pmatrix} \tag{8.34}$$

S	$(n_r \times n_x)$ stöchiometrische Matrix
J^0	$(n_r \times n_x)$ Matrix der Gleichgewichtsflüsse v_i^0
dx/dt	zeitliche Veränderung der Metabolitkonzentrationen

Die schrittweise Integration der Gleichung [8.34] über jedes Zeitintervall $[t_{i-1}, t_i]$ für n_t Messpunkte und n_x Metaboliten führt zu $(n_{t-1}) \cdot n_x$ Gleichungen:

$$x_{t_i} - x_{t_{i-1}} = SJ^0 \begin{bmatrix} E_x^0 & E_c^0 \end{bmatrix} \int_{t_{i-1}}^{t_i} \begin{pmatrix} \ln\left(\frac{x}{x^0}\right) \\ \ln\left(\frac{c}{c^0}\right) \end{pmatrix} dt \tag{8.35}$$

Der lineare Zusammenhang zwischen den unbekanntem Elastizitäten E^0 und den Konzentrationsdifferenzen $x_{t_i} - x_{t_{i-1}}$ ermöglicht eine Parameteridentifikation mittels linearer Regression. Die integrierten Logarithmen der normalisierten Metabolitkonzentrationen wurden mit Hilfe der Trapezregel im Intervall $[t_{i-1}, t_i]$ anhand dynamischer Messdaten berechnet. Sie bilden zusammen mit der stöchiometrischen Matrix S und der Matrix der Gleichgewichtsflüsse J^0 in Folge die Daten-Matrix Y . Unter Umformung der Elastizitätsmatrizen E^0 in einen Lösungsvektor b ergibt sich für die Gleichung [8.35] in vereinfachter Schreibweise:

$$a = Y \cdot b \quad [8.36]$$

$$b = [Y^T \cdot Y]^{-1} \cdot Y^T \cdot a \quad [8.37]$$

a	$(n_t - 1) \cdot n_x$ Vektor der Differenzen der jeweiligen Metabolitkonzentrationen $x_{t_i} - x_{t_{i-1}}$
b	n_e Vektor unbekannter Elastizitätskoeffizienten
Y	$(n_t - 1) \cdot n_x \times n_e$ Datenmatrix mit integrierten Logarithmen der normalisierten Metabolitkonzentrationen

Zugehörige Elastizitätskoeffizienten ϵ^0 können durch Lösen des Gleichungssystem [8.37] ermittelt werden. Bei der initialen linearen Regression wird als Zielfunktion die Summe der quadrierten Abweichungen der gemessenen und berechneten Metabolitkonzentrationen minimiert, wodurch ein Anpassung der Modellparameter (Elastizitäten) an die dynamischen Datensätze erzielt wird. In einer folgenden nicht-linearen Optimierung dienen die ermittelten Elastizitäten als Startwerte. Als Algorithmus der nicht-linearen Optimierung wurde die Innere-Punkt-Methode (MatLab R2013, 'interior point') gewählt. Aus den ermittelten Elastizitäten können anschließend unter Verwendung der Gleichung [8.28] zugehörige globale Flusskontrollkoeffizienten C^j abgeleitet werden.

8.12.3 PEC Analyse (Pool Efflux Capacity)

Das Kriterium der *Pool Efflux Capacity* (PEC) basiert auf der Kapazität eines Enzyms innerhalb eines Reaktionsnetzwerks Substrate in Produkte umzuwandeln (Oldiges et al. 2004). Der Ansatz ist rein datengetrieben und ermöglicht eine Kontrollanalyse betrachteter metabolischer Netzwerke ohne aufwendige kinetische Modellierung. Die Berechnungsmethode stützt sich hierbei ausschließlich auf gemessene instationäre Konzentrationsverläufe ausgewählter Metabolite innerhalb durchgeführter Perturbationsexperimente (Magnus et al. 2009). Hierzu werden zwischen zwei Messpunkten die zeitliche Änderungsrate der Metabolitkonzentration x_i bestimmt und auf die Poolgröße des Metaboliten im Fließgleichgewicht x_i^0 bezogen:

$$v_i^{x_0} = \frac{1}{x_i^0} \cdot \frac{dx_i(t)}{dt} \quad [8.38]$$

Eine derartige normalisierte Poolgeschwindigkeit v_i^0 in $[\text{min}^{-1}]$ beschreibt somit die Nettorate aller Zu- und Abflüsse eines betrachteten intrazellulären Metabolitpools. Bei positivem Vorzeichen liegt netto eine Zunahme des Metabolitpools vor (Influx), bei negativem Vorzeichen eine Abnahme und ein damit verbundener Ausfluss aus dem Pool (Efflux). In

diesem Zusammenhang werden *Pool Efflux Capacities* als maximale Netto-Ausflussraten perturbierter intrazellulärer Metabolitpools aufgefasst (s. Gl. [8.39]). Innerhalb von Reaktionsnetzwerken sind die jeweiligen PEC-Werte somit eng mit lokalen kinetischen Parametern (Elastizitäten, s. Gl. [8.24]) direkt nachgeschalteter Enzyme verknüpft. Im Kern berücksichtigt das Kriterium somit die maximal möglichen Reaktionsraten von Enzymen innerhalb eines metabolischen Netzwerks. Im direkten Vergleich sind hohe PEC-Werte mit hohen Elastizitäten gekoppelt und deuten auf Enzyme mit niedriger Flusskontrolle. Niedrige PEC-Werte sind mit niedrigen Elastizitäten gekoppelt und signalisieren Enzyme mit hoher Flusskontrolle und verweisen somit auf aussichtreiche Modifikationsstellen zur rationalen Stammentwicklung.

$$\left(|v_i^{x^0} < 0|_{max} \right)_{min} \quad [8.39]$$

8.12.4 Umsatzzeiten Metabolitpools

Die Umsatzzeit τ in [s] (*Turnover Number*) beschreibt die Zeit bis zur vollständigen Erneuerung eines Metabolitpools i unter Berücksichtigung aller metabolischer Zu- und Abflüsse. Unter Gleichgewichtsbedingungen kann sie als Quotient zwischen der Gleichgewichtskonzentration des jeweiligen Metaboliten x_i^0 und des Gleichgewichtsflusses J_i^0 durch diesen Pool aufgefasst werden (Nikerel et al. 2009).

$$\tau_i = \frac{x_i^0}{J_i^0} \quad [8.40]$$

x_i^0	Gleichgewichtskonzentration des jeweiligen Metabolitpools i
J_i^0	Gleichgewichtsfluss durch den jeweiligen Metabolitpool i
τ_i	Umsatzzeit des jeweiligen Metabolitpools i

Die Verteilung der Gleichgewichtsflüsse innerhalb eines lokalen intrazellulären Reaktionsnetzwerks kann anhand der ermittelten spezifischen Substrataufnahme- und Produktbildungsraten vollständig berechnet werden. Voraussetzung hierfür ist die Annahme eines stationären Zustandes (Fließgleichgewichts), bei dem sich die intrazelluläre Metabolitkonzentration mit der Zeit nicht ändert (exponentielle Wachstumsphase). Für die metabolische Massenbilanz eines Reaktionsnetzwerks aus m Metaboliten und n Raten folgt demnach:

$$S \cdot v = 0 \quad [8.41]$$

v	Reaktionsraten eines metabolischen Netzwerks
S	Stöchiometrische Reaktionsmatrix

Die Struktur des jeweiligen Netzwerks wird in Form einer stöchiometrischen Matrix S ($m \times n$) beschrieben. Die Matrixeinträge entsprechen den stöchiometrischen Koeffizienten der jeweiligen Reaktion, wobei Produktkoeffizienten ein positives und Eduktkoeffizienten ein negatives Vorzeichen aufweisen. Der Vektor v umfasst alle Reaktionsraten des betrachteten Netzwerks. Dieser kann in die Vektoren empirisch ermittelter Flüsse v_m und zu bestimmender Flüsse v_k aufgeteilt werden:

$$S_m v_m + S_k v_k = 0 \quad [8.42]$$

S_m bzw. S_k	($m \times q$) bzw. ($m \times (n-q)$) Stöchiometrische Matrix mit q gemessenen Flussraten
v_m	($q \times 1$) Vektor der experimentell ermittelten Flüsse
v_k	(($n-q$) \times 1) Vektor der zu bestimmenden ($n-q$) Reaktionsraten

Innerhalb eines bestimmten Reaktionssystems können die unbekanntenen Flüsse anschließend folgendermaßen berechnet werden (Mauch et al. 2000):

$$v_k = -(S_k)^{-1} S_m v_m \quad \text{mit } \dim(S_k) \neq 0 \quad [8.43]$$

8.12.5 Informationsreichtum instationärer Datensätze

Die Schätzung eines Parametervektors in einem dynamischen System wird oft über eine Optimierung gelöst, die nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate abläuft. Die zu bestimmenden Parameter sind meist unbekannt und können hinsichtlich ihres Wertebereichs nicht ausreichend eingegrenzt werden. Daher wird eine Qualitätsanalyse der Parameter vorgenommen, die die Identifizierbarkeit der ermittelten Parameter überprüfen soll. Der Informationsgehalt der instationären Datensätze kann anhand einer Fisher-Informationmatrix (FIM) überprüft werden (Kresnowati et al. 2005). Sie ist folgendermaßen definiert:

$$FIM = (\nabla_{\theta} Z)^T Q (\nabla_{\theta} Z) \quad [8.44]$$

Z	Vektorfunktion
θ	zu ermittelnder Parametervektor
∇_{θ}	Ableitung der Vektorfunktion Z nach Parametervektor θ
Q	Gewichtungsmatrix
FIM	Fisher-Informationsmatrix

Hierbei beschreibt die Vektorfunktion Z die zu optimierende Funktion. Sie entspricht in diesem Fall der Berechnungsvorschrift der linearen Regression (s. Gl. [8.37]). Der zu ermittelnde Parametervektor θ entspricht hierbei dem Lösungsvektor b . Die Ableitung der Vektorfunktion Z nach b entspricht der Datenmatrix Y . Wird die Gewichtungsmatrix Q nicht weiter berücksichtigt besitzt die FIM für den betrachteten Fall somit folgende Form:

$$FIM = Y^T \cdot Y \quad [8.45]$$

Die Y -Matrix beinhaltet die über die Zeitintervalle integrierten normalisierten Logarithmen der Metabolitkonzentrationen. Die ermittelten Messdaten sind daher maßgebend für den Inhalt der FIM. Durch eine Eigenwertbetrachtung der FIM kann die Präzision der ermittelten Messdaten analysiert werden. Hierfür wird ein Verhältnis aus dem größten und dem kleinsten Eigenwert der FIM gebildet. Dieser Wert entspricht der Konditionszahl und ist ein Maß für die Genauigkeit der ermittelten Parameter. Gut konditionierte System weisen eine geringe Konditionszahl auf und sind in der Lage Parameter mit einem hohen Konfidenzintervall zu identifizieren, d.h. für die Eingangsdaten existiert eine eindeutige Lösung, die sich durch potentielle Fehler in den Eingangsdaten nur geringfügig ändert.

9 Resultate und Diskussion

9.1 Entwicklung und Validierung einer intrazellulären Metabolomanalytik

Innerhalb dieser Arbeit wurde eine universelle **LC-ESI-MS/MS-Methode** entwickelt, die eine absolute Quantifizierung eines breiten Spektrums niedermolekularer Schlüsselmetabolite des zellulären Stoffwechsels ermöglicht. Der Einsatz einer polymerbasierten zwitterionischen HILIC-Chromatographie (ZIC-pHILIC) erlaubte die direkte chromatographische Trennung von Aminosäuren, Carbonsäuren, Zuckerphosphaten, Nukleotiden sowie Coenzymen innerhalb erstellter komplexer Probenmatrizen in einem weiten pH-Bereich (s. Kap. 8.9.4.1). Die Elektrospray-basierte Tandem-MS-Analyse (ESI-MS/MS) ermöglichte die sensitive und selektive Messung underivatisierter Metabolite mit optimierten MRM-Übergängen (s. Kap. 8.9.4.3) unter Berücksichtigung von Matrixeffekten anhand etablierter Quantifizierungsstrategien (s. Kap. 8.10). Darüberhinaus erfolgte eine systematische Validierung der optimierten **HILIC-ESI-MS/MS-Methode** unter sauren (pH 5,6) und alkalischen (pH 9,2) Bedingungen der mobilen Phase für **56 intrazelluläre Metabolite**. Im Vordergrund stand eine vergleichende Bewertung standard-basierter Linearitätsbereiche, Bestimmungsgrenzen, Responsivitäten, Messstabilitäten sowie chromatographischer Trennleistungen betrachteter Metabolite (s. Kap. 8.9.4.4). Die Praktikabilität der Methode wurde anhand absoluter Quantifizierungen ausgewählter Metabolite innerhalb von Metabolomextrakten aus *E. coli* Biomassen unter Vergleich publizierter intrazellulärer Gleichgewichtskonzentration beurteilt (s. Kap. 8.9.4.5). Zusätzlich wurde der Einfluss probenbasierter Matrixeffekte unter vergleichender Anwendung gängiger Quantifizierungsstrategien evaluiert. Aufgeführte Konzentrationswerte [μM bzw. nM] von innerhalb der methodischen Validierung eingesetzten Referenzstandards beziehen sich auf ein Injektionsvolumen von 5 μL .

Ergebnisse dieses Kapitels wurde in Zusammenarbeit mit **Herrn Andres Sánchez-Kopper** in der Fachzeitschrift „*Analytical Biochemistry: Methods in the Biological Science*“ unter folgendem Titel publiziert:

Teleki A, Sánchez-Kopper A, Takors R. **Alkaline conditions in hydrophilic interaction liquid chromatography for intracellular metabolite quantification using tandem mass spectrometry**. *Analytical Biochemistry* 2015 April 15;475:4-13.

9.1.1 Chromatographische Trennleistung

Anhand eingesetzter Referenzstandard-Mischungen erfolgte eine Beurteilung der chromatographischen Trennleistung der polymerbasierten zwitterionischen stationären Phase (ZIC-pHILIC) unter optimierten bikratischen Bedingungen (s. Kap. 8.9.4.1). Untersucht wurden die **Reproduzierbarkeit** von **Retentionszeiten** sowie resultierende **Peakbreiten** und **Peaksymmetrien** des ausgewählten Metabolitspektrums unter Verwendung saurer (pH 5,6) und alkalischer (pH 9,2) Bedingungen der mobilen Phase.

Alle untersuchten **56 Metabolite** zeigten hinreichende Retention ($t_R > 10$ min) außerhalb des Totvolumens (t_0 ca. 2,2 min) der HILIC-Säule. In diesem Retentionsbereich eluieren stark hydrophobe Verbindungen, die nur eine geringe Wechselwirkung mit der HILIC-Phase eingehen. Die hohe Anzahl co-eluierender Verbindungen dieses Bereiches würde innerhalb der Elektrospray-Ionisierung zu einer unvorteilhaft hohen Ionensuppression entsprechender Analyten führen (Schiesel et al. 2010). Die Reproduzierbarkeit der analyt-spezifischen Retentionszeiten war unter beiden Bedingungen der mobilen Phase innerhalb einer Messserie sehr hoch. Unter alkalischen Bedingungen wiesen 98% der untersuchten Metabolite Standardabweichungen unterhalb von 0,03 min (< 1,8 s) auf. Unter sauren Bedingungen erfüllten 88% der Analyten dieses Kriterium. Die höchsten Retentionszeitschwankungen konnten für Cytidintriphosphat (CTP) und Guanosintriphosphat (GTP) unter sauren Bedingungen festgestellt werden mit Standardabweichungen von 0,17 min (10,2 s) bzw. 0,12 min (7,2 s). Die hohe Reproduzierbarkeit der Analytenretention konnte auch bei Vergleich unterschiedlicher Messserien bestätigt werden. Unter alkalischen bzw. sauren Bedingungen wiesen 98% bzw. 80% der Metabolite absolute Abweichungen unterhalb von 0,04 min (< 2,4 s) auf. Die jeweiligen Retentionszeiten sowie zugehörige Standardabweichungen des untersuchten Metabolitspektrums wurden in Tabelle 9.1 bzw. 9.2 eingefügt.

Die hohe Stabilität analyten-spezifischer Retentionszeiten ist besonders vorteilhaft für die simultane Messung eines möglichst breiten Metabolitspektrums innerhalb eines chromatographischen Laufs. Trotz einer limitierten Gesamtselektivität können Messzeitfenster des MS-Komplex vergleichsweise eng gewählt werden (je nach Peakbreite ≤ 1 min) und signifikante Sensitivitätssteigerungen durch eine erhöhte Peakauflösung erzielt

werden. Da es sich bei der HILIC um eine Verteilungschromatographie handelt, sind verhältnismäßig ausgedehnte Re-Equilibrierungsphasen zur Vermeidung einer Retentionszeitdrift essentiell (Buszewski et al. 2012). Die Ergebnisse der chromatographischen Optimierung zeigten, dass bei Verwendung von ZIC-pHILIC-Säulen eine Re-Equilibrierungsphase von ca. 8-10 Säulenvolumina zwischen den Probeninjektionen ausreichend ist. Unter der Voraussetzung, dass eine initiale Equilibrierung von ca. 50 Säulenvolumina nach Einbau der Säule durchgeführt wurde, konnten unter Verwendung alkalischer Bedingungen auch für stark matrixbelastete Proben wie Metabolomextrakte analyt-spezifische Retentionszeiten mit Standardabweichungen größtenteils unterhalb von 0,06 min (< 3,6 s) erzielt werden (s. Tab. 9.3). Bei Verwendung unterschiedlicher Säulenchargen oder neu erstellter Laufmittel sind geringfügige globale Verschiebungen der jeweiligen Retentionszeiten (ca. 0,5-1 min) nicht auszuschließen. Um entsprechende Abweichungen bei der Erstellung eines Messprogramms zu berücksichtigen sind initiale standard-basierte Testläufe unerlässlich.

Hinsichtlich der Peakgeometrien konnten für Aminosäuren und organische Säuren unter beiden Bedingungen vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Peakformen phosphorylierter Verbindungen wie Zuckerphosphate und Nukleotide konnten hingegen unter alkalischen Bedingungen signifikant verbessert werden. In diesem Zusammenhang zeigten speziell mehrfach phosphorylierte Verbindungen wie Nukleotide oder Fructose-1,6-bis-Phosphat innerhalb von HILIC-Phasen ein ausgeprägtes *Peaktailing*. Diesbezüglich wiesen auch weitere stark anionische Analyten wie Citrat und Isocitrat ein vergleichbar asymmetrisches Peakverhalten auf. Insbesondere letztere sind in Verbindung mit Metall-Ionen als charakteristische Komplexbildner bekannt. Derartige Peakverbreiterungen führen zu signifikanten Sensitivitätsverlusten und werden auf die Interaktion der Substanzen mit exponierten Stahloberflächen innerhalb der HPLC-Anlage und Nebulizernadel zurückgeführt (Asakawa et al. 2008). Dieser Umstand wurde bereits bei der Implementierung der HILIC-Chromatographie berücksichtigt. Durch Einbau eines bioinerten Hochleistungsprobengebers (s. Kap. 8.9.3.2) und Verwendung von PEEK-Kapillaren (Polyetheretherketon) konnte die Exposition von Metalloberflächen innerhalb des Proben-Laufmittelwegs weitgehend eliminiert werden. Darüberhinaus neigen HILIC- und Normalphasen zur ausgeprägten Akkumulation metallischer Spurenelemente wie Eisen(III)Ionen (Preinerstorfer et al. 2010). Geringfügige Kontaminationen innerhalb der Laufmittelkomponenten führen hierbei zu einer

fortgesetzten Anreicherung der eingesetzten HILIC-Säulen. Dies führt insbesondere bei stark anionischen Substanzen zur Ausbildung von metallischen Chelatkomplexen die das Retentionsverhalten entsprechender Analyten unvorteilhaft beeinflussen (Pesek et al. 2011). Durch routinemäßige Injektion hochkonzentrierter EDTA-Lösungen (*Flushing*, 100 μL , 1 gL^{-1}) konnten derartige Effekte signifikant reduziert werden (Pesek et al. 2011).

Im Gegensatz zu silika-basierten Phasen ermöglicht der Einsatz der polymerbasierten HILIC-Phase chromatographische Trennungen unter alkalischen Bedingungen ($\leq \text{pH } 10$). Arbeiten von Tuytten et al. 2006 zeigen das störende Wechselwirkungen anionischer Analyten unter hoch-alkalischen Bedingungen (25% Ammoniumhydroxid, pH 12) wirksam unterdrückt werden können. Die systematische Validierung eines breiten Spektrums anaboler und kataboler Metabolite bestätigt diese Ergebnisse. In Abbildung 9.1 wurde der unterschiedliche Einfluss des pH-Werts der mobilen Phase auf das Peakverhalten der exemplarischen Analyten L-Phenylalanin (L-Phe) und Adenosintriphosphat (ATP) anhand 5 μM Referenzstandards innerhalb der ZIC-pHILIC-Chromatographie aufgezeigt. Alkalische Bedingungen führten bei stark anionischem ATP zur verbesserten Retention und signifikanten Sensitivitätssteigerung. Eine Zusammenstellung von MRM-Chromatogrammen des unter alkalischen und sauren Bedingungen untersuchten Metabolitspektrums wurde in den Anhang eingefügt (s. Kap. 12.1).

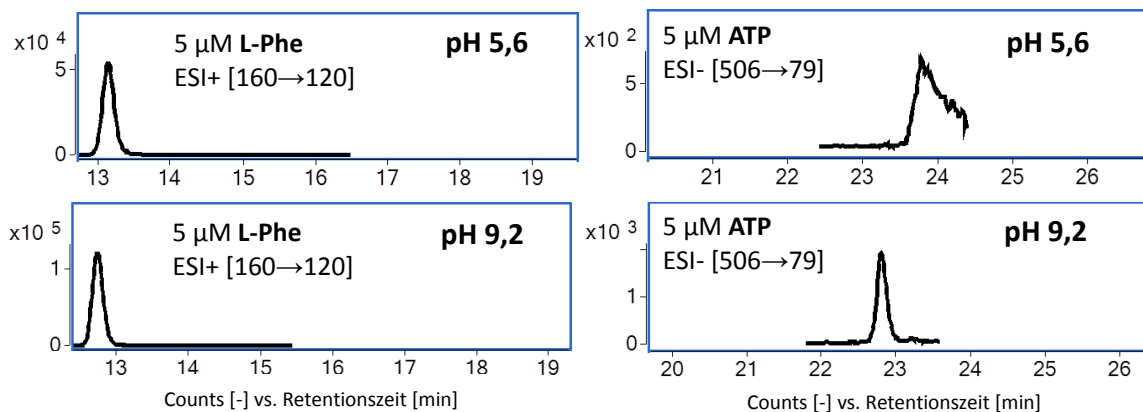


Abbildung 9.1 Einfluss des pH-Werts der mobilen Phase auf das Analyten-Peakverhalten (ZIC-pHILIC). (Quelle: modifizierte Darstellung, Teleki et al. 2015)

Die hohe Selektivität der Tandem-Massenspektrometrie basiert auf der kombinierten Messung von Vorläufer- und Fragment-Ionen (MRM-Übergang). In diesem Zusammenhang stellen isobare Analyten massengleiche Moleküle mit identischem Fragmentierungsverhalten dar (Konstitutionsisomere). Selektive Messungen sind in diesem Fall nur nach vorheriger chromatographischer Trennung durchführbar (Preinerstorfer et al. 2010). Qualität und

Eignung der etablierten chromatographischen Methode für quantitative Metabolomanalysen können anhand derartiger Trennleistungen näher beurteilt werden. In Abbildung 9.2 wurde die chromatographische Trennung exemplarischer Konstitutionsisomere mit identischer Fragmentierung (L-Leucin/L-Isoleucin sowie Glucose-6-Phosphat/Fructose-6-Phosphat) unter alkalischen und sauren Bedingungen aufgezeigt.

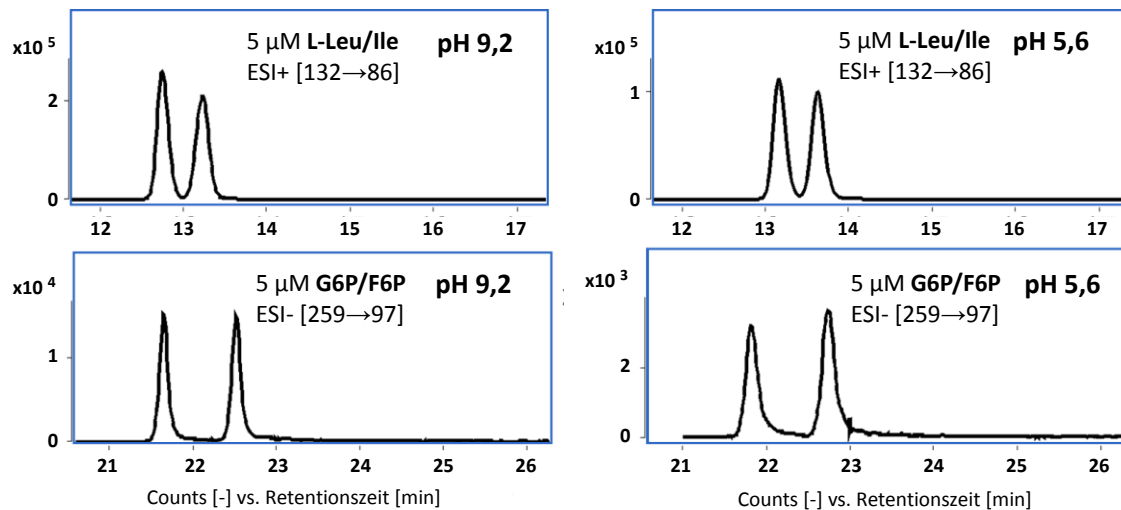


Abbildung 9.2 Chromatographische Trennung isobarer Analyten unter alkalischen und sauren Bedingungen (ZIC-pHILIC). (Quelle: modifizierte Darstellung, Teleki et al. 2015)

Weitere Beispiele für isobare Analyten innerhalb des zellulären Stoffwechsels, für die eine vollständige Trennung unter den optimierten chromatographischen Bedingungen erzielt werden konnte, sind L-Glutamin/L-Lysin (ESI+ [147→84]) und L-Threonin/L-Homoserin (ESI+ [120→74]). Die Konstitutionsisomere 2-Phosphoglycerat/3-Phosphoglycerat (ESI- [185→79]) sowie Ribose-5-Phosphat/Ribulose-5-Phosphat (ESI- [229→97]) konnten hingegen nur teilweise getrennt werden. Da die Entwicklung einer möglichst universellen LC-MS/MS-Methode im Vordergrund stand, wurde von einer weiteren Optimierung zu Lasten der Trennleistung anderer Metabolite abgesehen. Aus metabolischer Sicht stellen die genannten Zuckerphosphate direkt aufeinanderfolgende Metabolite dar, die innerhalb von Stoffwechselmodellen unproblematisch zu Poolkonzentrationen zusammengefasst werden können.

9.1.2 Linearitätsbereiche, Bestimmungsgrenzen und Stabilität untersuchter Analyten

Untersucht wurden Linearitätsbereiche von **56 Metaboliten** unter Verwendung saurer (pH 5,6) und alkalischer (pH 9,2) Bedingungen der mobilen Phase. Hinsichtlich einer absoluten Quantifizierung in mikrobiellen Metabolomextrakten wurde anhand von Referenzstandards

zunächst ein Arbeitsbereich niedriger Konzentrationen von 1 nM bis 5 µM unter Verwendung nicht-äquidistanter Kalibrierreihen näher analysiert. Analyt-spezifische Konzentrationsbereiche wurden als linear angesehen wenn ermittelte Korrelationskoeffizienten (R^2) von mindestens drei gemittelten Kalibrationskurven $> 0,98$ waren. Um die Ionisierungseffizienz der jeweiligen Analyten möglichst unverzerrt abzubilden, wurden interne Standards (s. Kap. 8.10.2) nur zur Kontrolle des globalen Quellenverhaltens eingesetzt. Resultierende metabolit-spezifische Linearitätsbereiche zeigten eine starke Abhängigkeit von eingesetzten pH-Werten innerhalb der mobilen Phase. Unter alkalischen Bedingungen konnte ein Median von ca. 30 nM für die unteren Linearitätsgrenzen des untersuchten Metabolitspektrums erzielt werden. Unter sauren Bedingungen lag dieser Wert in Verbindung mit durchgängig geringeren metabolit-spezifischen Sensitivitäten mit 120 nM signifikant höher. Weiter zeigten unter alkalischen Bedingungen 40% der untersuchten Metabolite einen vorteilhaft weiten Arbeitsbereich von 5-20 nM für die unteren Linearitätsgrenzen und 5 µM für die oberen Linearitätsgrenzen. Innerhalb saurer Bedingungen erfüllten lediglich 12% der untersuchten Analyten dieses Kriterium. Metabolit-spezifische Linearitätsbereiche wurden in Tabelle 9.1 bzw. 9.2 aufgeführt.

Anschließend wurde das Linearitätsverhalten von Referenzstandards ausgewählter Analyten innerhalb eines erweiterten Kalibrationsbereichs von 0,5 µM bis 200 µM unter alkalischen Bedingungen analysiert. Innerhalb derart erweiterten Arbeitsbereichen zeigen moderne ESI-Quellen in der Regel einen ausgeprägt sigmoidalen Zusammenhang zwischen eingesetzten Analyten-Konzentrationen und resultierenden Peakflächen (Tang et al. 2004). Das Responsivitätsverhalten ist hierbei stark abhängig von eingestellten globalen Quellenparametern (s. Kap. 8.9.4.2), der Ionisierungseffizienz des eingesetzten Analyten und der jeweiligen Zusammensetzung der mobilen Phase (s. Kap. 8.9.4.1). Bei der Vermessung komplexer biologischer Extrakte wird die Responsivität zusätzlich durch die jeweilige co-eluierende Matrix beeinflusst (Schiesel et al. 2010). In Abbildung 9.3 wurde das exemplarische Responsivitätsverhalten standard-basierter Kalibrierreihen von drei Metaboliten unter alkalischen Bedingungen der mobilen Phase aufgeführt. Im ersten Fallbeispiel zeigten Carbonsäuren wie Malat (Mal) bei Konzentrationen > 50 µM ein ausgeprägtes Sättigungsverhalten. Im zweiten Fallbeispiel wiesen Zuckerphosphate wie Fructose-6-Phosphat (F6P) einen sehr weiten linearen Arbeitsbereich auf (> 200 µM). Im dritten Fallbeispiel zeigten

Nukleotide wie Adenosintriphosphat (ATP) bei Konzentrationen > 50 μM eine erhöhte Ionisierungseffizienz auf.

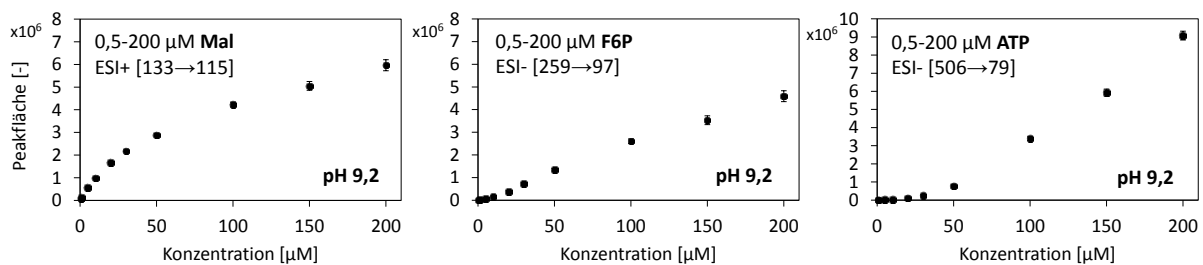


Abbildung 9.3 ESI-MS Responsivitätsverhalten standard-basierter Kalibrierreihen (0,5-200 μM) exemplarischer Metabolite unter alkalischen Bedingungen (pH 9,2) der mobilen Phase (ZIC-pHILIC). (Quelle: modifizierte Darstellung, Teleki et al. 2015)

Das nicht-lineare Responsivitätsverhalten untersuchter Fallbeispiele unterstreicht die Problematik einer rein relativen ESI-basierten Quantifizierung entsprechender Metabolitkonzentrationen. Hierbei ist in Abhängigkeit gewählter Arbeitsbereiche eine direkte lineare Korrelation zwischen Signalintensität und zugrundeliegender Konzentration in der Regel unzulässig. Für hochdynamische Metabolitdaten in Folge von Perturbationsexperimenten ist somit eine Bestimmung metabolit-spezifischer Linearitätsbereiche und/oder eine Erweiterung des Arbeitsbereichs durch Einsatz adäquater Internstandards (i.R. ^{13}C -Analoge) unumgänglich.

Die Bestimmung methodischer Detektionslimits (MDL) erfolgte anhand einer systematischen Auswertung der Standardreihen zur Linearitätsbestimmung der jeweiligen Analyten. Als untere Grenze des untersuchten Kalibrationsbereich wurde mit 1 nM eine Konzentration gewählt, die sich unterhalb der erwartbaren Nachweisgrenze der betrachteten Metabolite befindet. Die methodischen Detektionslimits wurden in diesem Zusammenhang anhand der Analytenkonzentration bestimmt, die mindestens eingesetzt werden muss, dass unter dreifacher Messung ($n=3$) ein statistisch signifikanter Peak (t-Test) oberhalb des Hintergrundrauschens resultiert (Wells et al. 2011). Hierbei wurde die Standardabweichung δ ($n-1 = 2$ Freiheitsgrade) der niedrigsten Konzentration des jeweiligen Linearitätsbereichs (untere Linearitätsgrenze) mit einem Ausdehnungskoeffizient ($t = 6,96$) multipliziert, der ein 99%iges Konfidenzintervall definiert. Resultierende Detektionslimits des untersuchten Metabolitspektrums variierten hierbei in einem Konzentrationsbereich von 2,2-744,3 nM unter alkalischen Bedingungen und 4,2-2949,3 nM unter sauren Bedingungen. In Verbindung mit durchweg höheren metabolit-spezifischen Sensitivitäten wiesen unter alkalischen

Bedingungen 89% der untersuchten Metabolite MDLs unterhalb von 100 nM auf. Unter sauren Bedingungen erfüllten lediglich 46% der Metabolite dieses Kriterium. Das geringste Detektionslimit konnte unter alkalischen Bedingungen für Malat mit 2,23 nM erzielt werden. In Abbildung 9.4 wurden Metabolite des untersuchten Spektrums unter Vergleich alkalischer und saurer Bedingungen anhand erzielter MDL-Bereiche gruppiert.

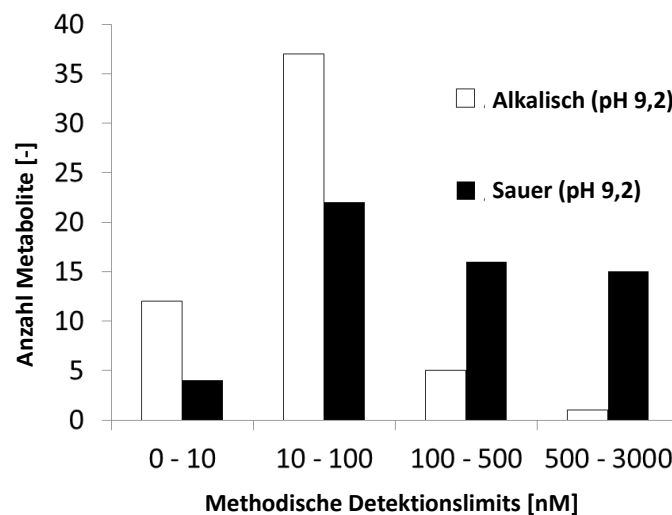


Abbildung 9.4 Einteilung untersuchter Metabolite anhand erzielbarer methodischer Detektionslimits (MDL) unter alkalischen und sauren Bedingungen der mobilen Phase (ZIC-pHILIC). (Quelle: modifizierte Darstellung, Teleki et al. 2015)

Unter Vergleich alkalischer oder saurer Bedingungen konnten die größten Unterschiede hinsichtlich erzielbarer Detektionslimits für NADP, Fumarat, Isocitrat, L-Aspartat, L-Glutamin sowie für Nukleotid-Diphosphate und -Triphosphate festgestellt werden. Resultierende MDLs sind in diesen Fällen 20 bis 50 mal niedriger unter alkalischen Bedingungen. Ein Überblick der unter beiden Bedingungen erzielten metabolit-spezifischen Detektionslimits wurde in Tabelle 9.1 bzw. 9.2 eingefügt. In Folge wurde die Messstabilität des eingesetzten Metabolit-spektrums innerhalb üblicher Messzeiträume (< 24 h) durch periodische Direktinjektionen (0, 7, 14, 21 h) von 5 µM Referenzstandards unter analytischer Probenaufarbeitung (s. Kap. 8.9.5.1) und alkalischen Bedingungen (pH 9,2) der mobilen Phase (50 % $v v^{-1}$ ACN) evaluiert. Phosphorylierte Analyten sowie organische Säuren zeigten hierbei keinen Signalabbau. Untersuchte Aminosäuren zeigten lediglich einen moderaten Abbau unterhalb von 20%. L-Glutamin und Erythrose-4-Phosphat stellten mit höheren Abbauraten Ausnahmen dar und sollten zur Kompensation des Signalverlusts nach der Methode der Isotopen-Verdünnungs-Massenspektrometrie (s. Kap. 8.10.3) quantifiziert werden. Eine Zusammenstellung von

Stabilitätsanalysen normalisierter Signalintensitäten untersuchter Metabolite unter alkalischen Bedingungen wurde im Anhang (s. Kap. 12.2) eingefügt.

9.1.3 ESI-MS-Responsivität unter alkalischen und sauren Bedingungen

In Folge wurde der Einfluss des pH-Werts der mobilen Phase auf die ESI-MS-Responsivität untersuchter Metabolite anhand 5 μM Referenzstandards näher analysiert. Um vergleichbare Bedingungen innerhalb der Elektrospray-Ionisierung zu erzielen, wurden unter alkalischen und sauren Bedingungen für die mobile Phase 10 mM Ammoniumacetat-Puffer vergleichbarer Ionenstärke eingesetzt. Hierzu wurden die Puffersysteme jeweils mit äquimolaren Mengen an Essigsäure bzw. Ammoniumhydroxid titriert um einen pH-Wert von 5,6 bzw. 9,2 zu erzielen. Um beide Szenarien zu vergleichen wurden anhand alkalischer Bedingungen erzielte Peakflächen mit analogen Peakflächen unter sauren Bedingungen normalisiert. Unter alkalischen Bedingungen konnten im Vergleich zu sauren Bedingungen für 70% der untersuchten Metabolite signifikant gesteigerte Signalintensitäten oberhalb eines Faktors von 1,5 festgestellt werden. Anhand der resultierenden Steigerungen wurde das Metabolitspektrum in drei Gruppen aufgeteilt. Die normalisierten Peakflächen wurden in Abbildung 9.5 aufgeführt.

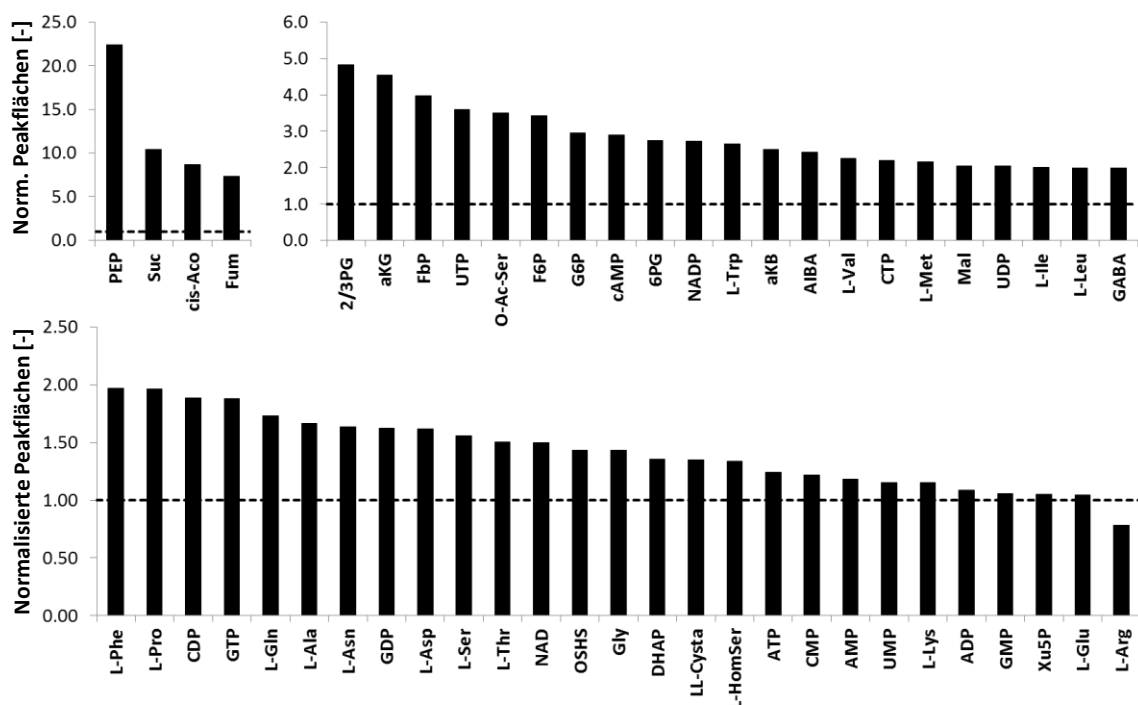


Abbildung 9.5 Einfluss des pH-Werts der mobilen Phase auf analyt-spezifische ESI-MS-Responsivitäten (ZIC-PHILIC). Aufgezeigte Peakflächen wurden anhand 5 μM Referenzstandards unter alkalischen Bedingungen (pH 9,2) erzielt und mit analogen Peakflächen unter sauren Bedingungen normalisiert. (Quelle: modifizierte Darstellung, Teleki et al. 2015)

In zahlreichen Studien wurde bereits von einem starken Einfluss des pH-Werts der mobilen Phase auf die Elektrospray-basierten Ionisierungseffizienzen entsprechender Analyten ausgegangen (Silvester et al. 2013, Preinerstorfer et al. 2010). Hierbei wird in der Regel ein direkter Zusammenhang zwischen der ESI-MS-Responsivität und den jeweiligen Gleichgewichtskonzentrationen ionisierbarer Spezies innerhalb der mobilen Phase aufgestellt. Beispielsweise werden Aminosäuren aufgrund signifikant höherer Signalintensitäten üblicherweise im positiven Ionisierungsmodus (ESI+) detektiert. Hierbei werden saure Bedingungen der mobilen Phase bevorzugt, um die Signalintensität durch verstärkte Ionisierung bzw. Protonierung (H^+ -Überschuss) der jeweiligen Analyten $[M+H]^+$ zu steigern (Piraud et al. 2003). Analog werden phosphorylierte Analyten, die üblicherweise im negativen Ionisierungsmodus (ESI-) detektiert werden, bevorzugt unter alkalischen Bedingungen gemessen um eine verstärkte Ionisierung bzw. Deprotonierung (OH^- -Überschuss) entsprechender Analyten $[M-H]^-$ zu erzielen (Beck et al. 2001). In diesem Zusammenhang verweisen allerdings weitere Studien auf eine unerwartete Signalsteigerung zahlreicher Analyten unter Verwendung alkalischer Bedingungen der mobilen Phase. So konnten bei LC-MS-basierten Messungen von Peptiden im positiven Ionisierungsmodus (ESI+) signifikante Sensitivitätssteigerungen unter Verwendung von 10 mM Ammoniumhydroxid (pH 10) innerhalb der mobilen Phase erzielt werden (Tomlinson et al. 2003). Die erstmalige Entwicklung silika-basierter C18-alkylierter Umkehrphasen mit höherer Resistenz gegen alkalische Bedingungen ($> pH 8$) ermöglichte zudem systematische Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses des pH-Werts der mobilen Phase auf die ESI-MS-Responsivität eines breiten Spektrums pharmazeutischer Analyten. Auch hierbei konnten, insbesondere unter Verwendung des positiven Ionisierungsmodus, deutliche Sensitivitätssteigerungen unter Verwendung alkalischer pH-Werte erzielt werden (Peng et al. 2008). Innerhalb von Elektrospray-Ionisierungsstudien unter Direktinjektion von Aminosäure-Standards, definierte bereits Mansoori et al. 1997 diese Phänomen als „*Wrong-Way-Round-Ionization*“ (WWR). Derartige WWR-Mechanismen stellen eine direkte und vorhersagbare Abhängigkeit analyten-spezifischer ESI-MS-Responsivitäten vom pH-Wert verwendeter Eluenten in Frage. Innerhalb der letzten Jahre wurden verschiedene Mechanismen kontrovers diskutiert, die das anomale Ionisierungsverhalten entsprechender Analyten erklären. In diesem Zusammenhang wurde unter alkalischen Bedingungen beispielsweise eine zusätzliche elektrolytische Erzeugung von Protonen (H^+) oder eine von Elektrospray-Tröpfchen-Oberflächenschichten ausgehende

Protonenemission postuliert (Tso et al. 2011). Diskutiert werden auch Gasphasen-Protonentransfers durch, während der Elektrospray-Ionisierung entstehende, starke Gassäuren wie Ammonium (NH_4^+) oder eine chemische Ionisierung durch Corona-Entladungseffekte innerhalb der Gasphase (Cheng et al. 2001).

Unabhängig von eingesetzten Ionisierungsmodi ($\text{ESI}\pm$) oder zugrundeliegenden Mechanismen konnte innerhalb dieser Studie eine im Vergleich zu sauren Bedingungen größtenteils stark gesteigerte Sensitivität unter alkalischen Bedingungen für ein breites Spektrum gängiger Metabolite des zellulären Stoffwechsels festgestellt werden. Die verbliebenen 30% der untersuchten Metabolite wiesen vergleichbare oder leicht gesteigerte Signalintensitäten auf. Lediglich bei L-Arginin konnte unter sauren Bedingungen eine vergleichsweise höhere Signalintensität erzielt werden. Folgerichtig konnten unter alkalischer Bedingung für 90% der untersuchten Metabolite auch verbesserte methodische Detektionslimits (MDL) unterhalb von 100 nM mit signifikant niedrigeren unteren Linearitätsgrenzen festgestellt werden (s. Kap. 9.1.2). Hierbei konnten für 66% der Analyten vorteilhaft niedrige Linearitätsgrenzen in einem Konzentrationsbereich von 5-50 nM erreicht werden.

Die gesteigerte Signalintensität insbesondere phosphorylierter Metabolite innerhalb des negativen Ionisierungsmodus (ESI^-) entspricht hierbei dem erwartungsgemäßen Ionisierungsverhalten betrachteter Analyten. Andererseits weicht das Verhalten entsprechender Analyten im positiven Ionisierungsmodus (ESI^+) stark von „klassischen“ Annahmen ab und kann durch erwähnte WWR-Mechanismen erklärt werden. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die jeweilige ESI-MS -Responsivität von zahlreichen interferierenden Effekten wie der chemischen Eigenschaften der betrachteten Analyten, den pH-Werten, verwendete Pufferspezies sowie organischen Lösungsmittelanteilen innerhalb der mobilen Phase abhängen (Mansoori et al. 1997). In diesem Zusammenhang können nur weitergehende Untersuchungen einzelner charakteristischer Metabolite unterliegende Ionisierungsmechanismen und diesbezüglich dominante Einflussparameter aufdecken.

Tabelle 9.1 Übersicht ermittelter Linearitätsbereiche ($\leq 5 \mu\text{M}$), Regressionskoeffizienten, methodischer Detektionslimits und Retentionszeiten untersuchter Metabolite unter alkalischen (pH 9,2) und sauren Bedingungen (pH 5,6) der mobilen Phase (ZIC-pHILIC) (1. Teil) (Teleki et al. 2015)

		Linearitätsbereich						Methodische Detektionslimits				Retentionszeit			
		Alkalisch			Sauer			Alkalisch	Sauer	Alkalisch	Sauer	Alkalisch		Sauer	
Metabolit	Polarität	Min (nM)	Max (nM)	R ²	Min (nM)	Max (nM)	R ²	(nM)	pmol (on column)	(min)	(min)				
aKB	(-)	50	5000	1.0000	50	5000	0.9998	20.7	4.2	0.10	0.02	8.02 ± 0.04	8.63 ± 0.07		
Fum	(-)	50	5000	0.9999	500	5000	0.9951	33.8	606.0	0.17	3.03	22.07 ± 0.02	22.57 ± 0.01		
Suc	(-)	500	5000	0.9999	500	5000	0.9976	117.1	138.0	0.59	0.69	20.59 ± 0.02	20.12 ± 0.01		
Mal	(-)	20	5000	0.9998	20	5000	0.9998	2.2	8.5	0.01	0.04	21.83 ± 0.01	22.14 ± 0.01		
aKG	(-)	50	5000	0.9974	100	5000	0.9916	9.4	59.6	0.05	0.30	21.42 ± 0.02	21.77 ± 0.01		
Cit	(-)	50	5000	0.9938	1000	5000	0.9838	439.6	513.3	2.20	2.57	24.15 ± 0.01	23.97 ^c ± 0.02		
IsoCit	(-)	20	5000	0.9953	500	5000	0.9945	21.5	454.1	0.11	2.27	24.83 ± 0.01	24.75 ^c ± 0.02		
cis-Aco	(-)	20	1000	0.9899	50	5000	0.9854	3.9	41.6	0.02	0.21	23.08 ± 0.01	22.76 ± 0.01		
Xu5P	(-)	50	5000	0.9884	200	5000	0.9953	30.1	181.9	0.15	0.91	21.15 ± 0.01	21.14 ± 0.01		
6PG	(-)	1000	5000	0.9903	1000	5000	0.9950	744.3	1131.1	3.72	5.66	24.03 ± 0.01	24.53 ± 0.01		
E4P ^b	(-)	-	-	-	2000	5000	0.9972	-	1713.6	-	8.57	-	-	21.73 ± 0.11	
R5P ^a	(-)	20	5000	0.9973	50	5000	0.9956	154.5	67.5	0.77	0.34	21.11 ± 0.02	- ± -		
Ru5P ^a	(-)	20	5000	0.9973	50	5000	0.9956	154.5	67.5	0.77	0.34	21.27 ± 0.01	- ± -		
F6P	(-)	50	5000	0.9954	100	5000	0.9990	35.1	53.2	0.18	0.27	21.63 ± 0.02	21.81 ± 0.01		
G6P	(-)	50	5000	0.9972	100	5000	0.9992	33.5	79.3	0.17	0.40	22.49 ± 0.02	22.72 ± 0.01		
FbP	(-)	500	5000	0.9998	2000	5000	0.9980	360.8	2949.3	1.80	14.75	24.99 ± 0.01	25.93 ± 0.07		
DHAP	(-)	200	5000	0.9990	500	5000	0.9985	53.9	423.1	0.27	2.12	20.77 ± 0.01	20.78 ± 0.01		
PEP	(-)	50	5000	0.9904	500	5000	0.9994	86.5	532.7	0.43	2.66	23.61 ± 0.02	24.07 ± 0.02		
2PG ^a	(-)	100	5000	0.9874	500	5000	0.9984	87.8	148.4	0.44	0.74	22.86 ± 0.02	23.32 ± 0.02		
3PG ^a	(-)	100	5000	0.9874	500	5000	0.9984	87.8	148.4	0.44	0.74	23.11 ± 0.02	23.61 ± 0.02		
NAD	(+)	10	5000	0.9982	20	5000	0.9963	7.6	13.1	0.04	0.07	19.64 ± 0.01	20.03 ± 0.01		
NADP	(+)	20	2000	0.9901	500	5000	0.9847	31.4	1495.0	0.16	7.47	23.15 ± 0.01	23.51 ± 0.01		
AMP	(-)	50	5000	0.9995	100	5000	0.9987	13.4	144.1	0.07	0.72	19.41 ± 0.01	19.33 ± 0.01		
ADP	(-)	100	5000	0.9928	1000	5000	0.9832	40.1	1428.0	0.20	7.14	21.31 ± 0.01	22.08 ± 0.03		
ATP	(-)	100	5000	0.9925	1000	5000	0.9836	59.6	1130.4	0.30	5.65	22.80 ± 0.02	23.75 ± 0.05		
GMP	(-)	100	5000	0.9990	100	5000	0.9960	49.9	198.5	0.25	0.99	22.07 ± 0.01	22.11 ± 0.01		
GDP	(-)	100	5000	0.9844	1000	5000	0.9975	70.9	2274.7	0.35	11.37	23.95 ± 0.02	24.91 ± 0.03		
GTP	(-)	500	5000	0.9915	2000	5000	0.9971	102.4	1525.2	0.51	7.63	25.45 ± 0.01	26.73 ^c ± 0.12		
CMP	(-)	100	5000	0.9990	100	5000	0.9974	49.9	160.8	0.25	0.80	21.38 ± 0.01	21.34 ± 0.01		

^a Unzureichende chromatographische Trennung von isobaren Konstitutionsisomeren: R(u)5P = Ribose/Ribulose-5-Phosphat; 2(3)PG = 2/3-Phosphoglycerat.

^b Unzureichende Stabilität unter alkalischen Bedingungen (pH 9,2)

Tabelle 9.2 Übersicht ermittelter Linearitätsbereiche ($\leq 5 \mu\text{M}$), Regressionskoeffizienten, methodischer Detektionslimits und Retentionszeiten untersuchter Metabolite unter alkalischen (pH 9,2) und sauren Bedingungen (pH 5,6) der mobilen Phase (ZIC-pHILIC) (2. Teil) (Teleki et al. 2015)

		Linearitätsbereich						Methodische Detektionslimits				Retentionszeit	
		Alkalisch			Sauer			Alkalisch	Sauer	Alkalisch	Sauer	Alkalisch	Sauer
Metabolit	Polarität	Min (nM)	Max (nM)	R ²	Min (nM)	Max (nM)	R ²	(nM)	pmol (on column)	Metabolit	Polarität		
CDP	(-)	50	5000	0.9905	1000	5000	0.9938	56.3	1030.1	0.28	5.15	23.21 ± 0.01	24.02 ± 0.01
CTP	(-)	200	5000	0.9915	1000	5000	0.9842	51.9	2004.1	0.26	10.02	24.66 ± 0.01	25.90 ± 0.17
UMP	(-)	100	5000	0.9991	100	5000	0.9985	4.7	123.4	0.02	0.62	20.54 ± 0.01	20.40 ± 0.01
UDP	(-)	50	5000	0.9858	500	5000	0.9840	39.2	1094.0	0.20	5.47	22.57 ± 0.01	23.33 ± 0.02
UTP	(-)	100	5000	0.9968	2000	5000	0.9850	72.8	1711.8	0.36	8.56	24.11 ± 0.01	25.24 ± 0.01
cAMP	(-)	100	5000	0.9970	100	5000	0.9988	59.3	375.8	0.30	1.88	15.35 ± 0.01	15.65 ± 0.01
AIBA	(+)	20	5000	0.9996	50	5000	0.9938	41.7	3.6	0.21	0.02	15.86 ± 0.01	16.26 ± 0.01
GABA	(+)	10	5000	0.9994	20	5000	0.9920	12.7	18.2	0.06	0.09	17.64 ± 0.01	18.02 ± 0.01
L-Hom-Ser	(+)	20	5000	0.9990	50	5000	0.9963	10.2	22.0	0.05	0.11	17.51 ± 0.01	17.92 ± 0.01
O-Ac-Ser	(+)	20	5000	0.9996	200	5000	0.9986	33.3	286.0	0.17	1.43	15.76 ± 0.01	15.00 ± 0.01
OSHS	(+)	10	5000	0.9991	50	5000	0.9956	14.0	38.3	0.07	0.19	18.69 ± 0.01	19.08 ± 0.01
LL-Cysta	(+)	10	5000	0.9953	50	5000	0.9938	4.9	22.6	0.02	0.11	21.45 ± 0.01	22.10 ± 0.01
Gly	(+)	200	5000	0.9992	500	5000	0.9963	28.5	99.2	0.14	0.50	17.96 ± 0.01	18.37 ± 0.01
L-Ala	(+)	100	5000	0.9990	200	5000	0.9956	41.0	167.5	0.20	0.84	16.91 ± 0.01	17.32 ± 0.01
L-Ser	(+)	100	5000	0.9988	200	5000	0.9964	9.9	140.9	0.05	0.70	18.45 ± 0.01	18.90 ± 0.01
L-Pro	(+)	10	5000	0.9992	50	5000	0.9968	9.1	66.8	0.05	0.33	14.37 ± 0.01	14.76 ± 0.01
L-Val	(+)	20	5000	0.9991	100	5000	0.9964	26.4	49.7	0.13	0.25	14.54 ± 0.01	14.94 ± 0.01
L-Thr	(+)	50	5000	0.9993	100	5000	0.9967	43.1	97.6	0.22	0.49	17.14 ± 0.01	17.58 ± 0.02
L-Leu	(+)	20	5000	0.9993	20	5000	0.9965	7.9	35.9	0.04	0.18	12.74 ± 0.01	13.15 ± 0.01
L-Ile	(+)	20	5000	0.9990	20	5000	0.9966	17.2	22.2	0.09	0.11	13.22 ± 0.01	13.64 ± 0.01
L-Asn	(+)	50	5000	0.9991	100	5000	0.9964	15.0	100.6	0.08	0.50	18.35 ± 0.01	18.79 ± 0.01
L-Asp	(+)	50	5000	0.9989	200	5000	0.9972	31.7	192.0	0.16	0.96	20.05 ± 0.01	20.52 ± 0.01
L-Gln	(+)	20	5000	0.9987	50	5000	0.9959	3.4	54.6	0.02	0.27	17.95 ± 0.01	18.37 ± 0.01
L-Lys	(+)	20	5000	0.9987	100	5000	0.9933	20.7	36.3	0.10	0.18	24.40 ± 0.01	24.78 ± 0.01
L-Glu	(+)	100	5000	0.9991	100	5000	0.9965	37.9	49.6	0.19	0.25	19.75 ± 0.01	20.18 ± 0.01
L-Met	(+)	20	5000	0.9990	20	5000	0.9966	16.8	21.9	0.08	0.11	14.01 ± 0.01	14.43 ± 0.01
L-Phe	(+)	20	5000	0.9989	20	5000	0.9965	4.1	4.9	0.02	0.02	12.69 ± 0.01	13.14 ± 0.01
L-Arg	(+)	20	3000	0.9936	100	3000	0.9869	6.1	49.9	0.03	0.25	24.65 ± 0.01	25.01 ± 0.01
L-Trp	(+)	20	5000	0.9991	50	5000	0.9983	65.5	67.9	0.33	0.34	13.84 ± 0.01	14.27 ± 0.01
L-His ^b	(+)	-	-	-	200	5000	0.9860	-	106.3	-	0.53	-	18.35 ± 0.02

^b Unzureichende Stabilität unter alkalischen Bedingungen (pH 9,2)

9.1.4 Quantifizierung in bakteriellen Metabolomextrakten

Die Anwendbarkeit der etablierten und validierten alkalischen HILIC-ESI-MS/MS-Methode (pH 9,2) für quantitative Metabolomanalysen wurde anhand der absoluten Quantifizierung ausgewählter Analyten innerhalb intrazellulärer Extrakte aus *E. coli* Biomassen näher beurteilt. Im Vordergrund stand insbesondere die Evaluierung probenbasierter Matrix-Effekte, die innerhalb der ESI-MS-basierten Metabolomik als Hauptursache für ungenaue bzw. unzuverlässige Konzentrationsbestimmungen angesehen werden (Dunn et al. 2005a, Kiefer et al. 2008). Hierzu wurden verschiedene Quantifizierungsstrategien auf Grundlage vorheriger Konzentrationsabschätzungen (*Spiken*, s. Kap. 8.10.4) für ausgewählte Metabolite entwickelt. Absolute Konzentrationen intrazellulärer Metabolite wurden anhand einer konventionellen externen Kalibrierung, einer externen Kalibrierung nach der Isotopen-Verdünnungs-Massenspektrometrie (IDMS) und einer internen Kalibrierung nach dem Prinzip der Standard-Addition ermittelt und anschließend miteinander verglichen. Externe Kalibrationen basierten auf Standardreihen innerhalb metabolit-spezifischer Kalibrationsbereiche. Für Standard-additionen wurden Probenaliquots mit steigender Konzentration an Referenzstandard versetzt. Untersuchte Metabolitpools wurden hierbei nicht (x_0), einfach (x_1), doppelt (x_2), dreifach (x_3) und vierfach (x_4) definiert aufgestockt. Resultierende absolute intrazelluläre Konzentrationen für sechs exemplarische Metabolite wurden auf die innerhalb der Heißwasser-Extraktion (s. Kap. 8.9.2.2) eingesetzte Biotrockenmasse bezogen [$\mu\text{mol}/\text{g}_{\text{BTM}}$] und wurden anhand der eingesetzten Quantifizierungsstrategie in Abbildung 9.6 aufgeführt.

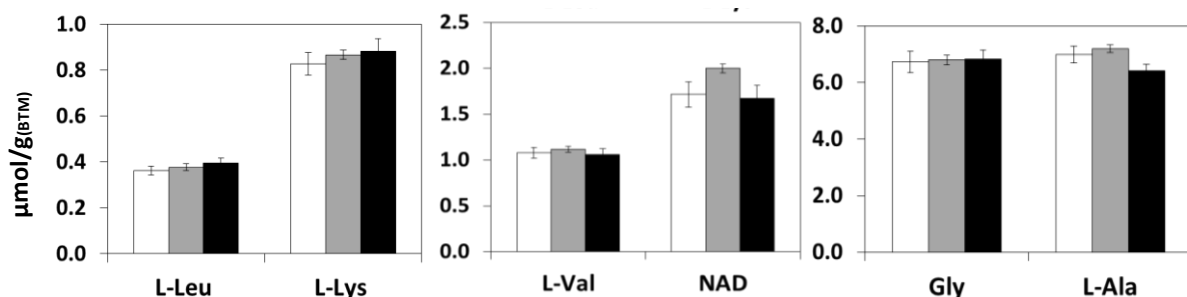


Abbildung 9.6 Absolute intrazelluläre Konzentrationen ausgewählter Metabolite in *E. coli* K12 MG1655 Biomassen anhand drei verschiedener Quantifizierungsstrategien und Messung von Quadruplikaten ($n=4$): Standard-basierte externe Kalibrierung (weiß), Isotopen-Verdünnung (grau), Standardaddition (schwarz). (Quelle: modifizierte Darstellung, Teleki et al. 2015)

Basierend auf vier unabhängigen Messungen eines Metabolomextrakts ($n=4$) konnten unter Verwendung der standard-basierten externen Kalibrierung und der Standardaddition

Standardabweichungen im Bereich von 4-8% erzielt werden. Messdaten unter Verwendung der IDMS zeigten etwas höhere Präzision und resultierende Standardabweichungen variierten im Bereich von 1-4%. Ermittelte intrazelluläre Konzentrationen zeigen unter Vergleich der eingesetzten Kalibrierstrategien nur geringe Abweichungen. Mit Ausnahme von NAD (< 10%) zeigten die ermittelten Werte Abweichungen unterhalb von 6% auf. Eine anschließende Varianzanalyse unter Anwendung der einfachen ANOVA (*one-way analysis of variance*) konnte diese Einschätzung bestätigen ($F_{\text{krit}} = 4,256$). Zugehörige Retentionszeiten wiesen im Vergleich zu Referenzstandard-Analysen (s. Kap. 9.1.1) vergleichbare Abweichungen unterhalb von 0,05 min (< 3,0 s) auf. Weiter wiesen entsprechende lineare Kalibrierfunktionen unabhängig von der verwendeten Quantifizierungsstrategie gute ($R^2 \geq 0,99$) bis sehr gute ($R^2 \geq 0,999$) Regressionskoeffizienten auf. Besprochene Messparameter wurden in Tabelle 9.3 zusammengefasst.

Tabelle 9.3 Retentionszeiten, Kalibrierfunktionen und zugehörige Parameter absolut quantifizierter Metabolite (Teleki et al. 2015)

Metabolit	t_R [min]	Externe Kalibrierung			Isotopen Verdünnung			Standardaddition			ANOVA*	
		Steigung	Abschnitt	R^2	Steigung	Abschnitt	R^2	Steigung	Abschnitt	R^2	F	P Value
L-Leu	13.17 ±0.04	3.20E+05	3.80E+04	0.9910	4.01E-01	4.50E-02	0.9913	3.28E+05	2.55E+05	0.9986	3.560	0.0726
L-Lys	24.94 ±0.05	2.41E+05	2.90E+04	0.9975	5.08E-02	4.10E-03	0.9969	2.35E+05	4.09E+05	0.9995	1.622	0.2503
L-Val	14.98 ±0.04	1.42E+05	4.23E+03	0.9969	2.59E-01	3.40E-03	0.9975	1.45E+05	2.99E+05	0.9989	1.379	0.3002
NAD	20.06 ±0.05	4.25E+04	-2.74E+03	0.9978	1.31E+00	-8.93E-02	0.9982	4.40E+04	1.36E+05	0.9994	9.193	0.0067
Gly	18.42 ±0.05	1.91E+04	7.34E+03	0.9994	7.77E-02	-1.96E-02	0.9991	1.95E+04	2.60E+05	0.9999	0.121	0.8876
L-Ala	17.36 ±0.05	6.93E+04	-5.56E+04	0.9977	5.03E-02	-3.82E-02	0.9984	7.06E+04	8.90E+05	0.9997	1.778	0.2235

* $F_{\text{crit}} = 4.256$

Die Analyse der Messdaten zeigt hinsichtlich der untersuchten exemplarischen Metabolite eine erfolgreiche Reduzierung bzw. Eliminierung bestehender probenbasierter Matrixeffekte. Aufgrund der Trennleistung der HILIC-Chromatographie konnte die Co-Elution unerwünschter, die Ionisierungseffizienz beeinflussender Matrixkomponenten, innerhalb der entsprechenden Retentionszeitfenster hinreichend minimiert werden. Obwohl das untersuchte Metabolitspektrum in diesem Fall eine vorteilhafte standard-basierte externe Kalibrierung mit ausreichender Präzision ermöglicht, könnten Quantifizierungen weiterer Metabolite aufwendigere Strategien erfordern um eine matrix-basierte Verzerrung des Messwerts auszuschließen (Annesley et al. 2003). Darüberhinaus stand lediglich eine Bewertung der entwickelten alkalischen HILIC-ESI-MS/MS-Methode hinsichtlich der Quantifizierung intrazellulärer Gleichgewichtskonzentrationen innerhalb erstellter

Metabolomextrakte im Vordergrund. In Folge basieren die Daten auf einer einzelnen Metabolomextraktion und berücksichtigen keine einhergehende metabolische Dynamik, die zu einer Veränderung resultierender Probenmatrizen führen würde. Wenn auch die Probenaufbereitung oder Extraktionsprotokolle nicht im Fokus dieser Optimierung standen, wiesen ermittelte Daten eine hohe Übereinstimmung mit zuvor publizierten intrazellulären Gleichgewichtskonzentrationen in *E. coli* Wildtypstämmen unter vergleichbaren Kultivierungsbedingungen auf. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass intrazelluläre Poolkonzentrationen stark vom jeweiligen Stammkontext, der Kultivierungsstrategie, der eingesetzten Probenaufarbeitungsmethode oder ermittelter bzw. angenommener intrazellulärer Volumina abhängen (Hiller et al. 2007). Gleichwohl standen die ermittelten Poolkonzentrationen von L-Alanin und L-Lysin in guter Übereinstimmung mit publizierten Daten von Bennett et al. (2009) und Yuan et al. (2006). Gemessene NAD- und L-Valin-Pools lagen zwar in gleichen Konzentrationsbereichen, zeigten aber signifikante Abweichungen zu vorab ermittelten Daten (Hiller et al. 2007, Buchholz et al. 2001). Gleichgewichtskonzentrationen von Glycin und L-Leucin wurden für *E. coli* unter vergleichbaren Kultivierungsbedingungen noch nicht publiziert.

9.1.5 Alkalische HILIC-ESI-MS/MS für intrazelluläre Metabolomanalysen

Aus analytischer Sicht besteht das übergeordnete Ziel der Metabolomik in einer zuverlässigen absoluten Quantifizierung aller Metabolite eines zellulären Netzwerks, die den aktuellen physiologischen Zustand betrachteter Zellen innerhalb bestimmter Zeitpunkte möglichst präzise widerspiegelt (Oldiges et al. 2004). Angesichts der hohen chemischen Diversität und Komplexität unterschiedlichster biologischer Matrizen, stellen quantitative möglichst universelle Metabolomanalysen nach wie vor eine große Herausforderung dar (Dunn et al. 2005b). Innerhalb von LC-MS-basierten Metabolomanalysen werden in diesem Zusammenhang derzeit größtenteils RPLC- (Kiefer et al 2011, Luo et al. 2007) oder HILIC-Anwendungen (Gika et al. 2012, Rappold et al. 2011) eingesetzt. Neben zahlreichen Vorteilen wie einer hohen Robustheit und einer vergleichsweise unkomplizierten Implementierung von RPLC-Säulen, ist eine hinreichende Retention insbesondere polarer oder geladener Analyten innerhalb silika-basierter Umkehrphasen (RP) nur schwer erzielbar (Nguyen 2008). Beispielsweise weisen niedermolekulare Metabolite mit sauren funktionellen Gruppen in ihrer deprotonierten Form innerhalb von RPLC-Anwendungen nur eine unzureichende Retention

auf. Eine Absenkung des pH-Werts zur verbesserten Retention entsprechender Analyten, führt in der Regel zu inakzeptabel schlechten Peakgeometrien basischer oder zwitterionischer Analyten (Peng et al. 2008). In Folge müssen Metabolomanalysen komplexer Probenmatrizen hoher chemischer Diversität unvorteilhaft unter Implementierung mehrerer verschiedener chromatographischer Methoden analysiert werden. Alternativ können volatile Ionenpaarreagenzien wie Trifluoressigsäure (TFA) oder Tributylamin (TBA) zur verbesserten Trennleistung underivatisierter Analyten auf Umkehrphasen in Kombination mit Tandem-MS-Analysen eingesetzt werden (Seifar et al. 2013, Michopoulos et al. 2014). Allerdings ist der Einsatz derartiger Agenzien hinsichtlich einer reproduzierbaren chromatographischen Trennleistung entsprechender Analyten aufgrund einer fortgesetzten Modifikation der stationären Phase problematisch und erfordert den Einsatz aufwendiger Reinigungsprotokolle (Qu et al. 2002). Hinzu kommen Sensitivitätseinbußen aufgrund einer kontinuierlichen Co-Elution entsprechender Ionenpaarbildner innerhalb der Eluenten (Ionensuppression) sowie eine fortwährende Kontamination des MS-Komplexes. In diesem Zusammenhang gewinnt der Einsatz von HILIC-Chromatographie innerhalb quantitativer Metabolomanalysen zunehmend an Bedeutung, da eine direkte Trennung underivatisierter polarer und geladener Analyten bei gleichzeitiger Kompatibilität mit einer ESI-MS-Detektion ermöglicht wird (Preinerstorfer et al. 2010). Der Einsatz polymer-basierter stationärer HILIC-Phasen ermöglicht hierbei chromatographische Trennungen eines breiten Metabolitspektrums komplexer Probenmatrizen innerhalb weiter pH-Bereiche der mobilen Phase (2-10). Obwohl alkalische Bedingungen die chromatographische Trennleistung multipler Metabolomextrakte und ESI-MS-basierte Sensitivitäten signifikant steigern, fokussieren die meisten LC-MS-basierten Methoden unabhängig von der eingesetzten stationären Phase saure oder neutrale Bedingungen innerhalb der mobilen Phase (Kiefer et al. 2001, Piraud et al. 2003). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine robuste alkalische HILIC-ESI-MS/MS-Methode entwickelt werden, die eine sensitive und simultane Messung anionischer, kationischer und zwitterionischer Metabolite des zellulären Stoffwechsels ermöglicht. Der Einsatz zwitterionischer Sulfobetaingruppen innerhalb der mobilen Phase (ZIC-pHILIC) erhöht die Selektivität der Methode signifikant und ermöglicht die gleichzeitige Trennung dutzender Metabolite innerhalb eines chromatographischen Laufs.

9.2 Entwicklung von alternativen Stimulus-Response-Experimenten innerhalb des Methionin-Stoffwechsels von *E. coli* SPOT01

9.2.1 Evaluierung intrazellulärer Probennahme-Strategien

Zur Realisierung einer intrazellulären Metabolomanalytik für die absolute Quantifizierung von Konzentrationsdynamiken innerhalb von Perturbationsexperimenten von *E. coli* SPOT01 war die Entwicklung adäquater Probennahmestrategien erforderlich. Innerhalb von Fermentationen unter produktionsnahen Bedingungen war eine Unterscheidung intra- und extrazellulärer Konzentrationen essentiell (s. Kap. 9.2.4). Unter dieser Anforderung kamen lediglich sequentielle Aufarbeitungsverfahren unter quantitativer Abtrennung von Fermentationsüberständen in Betracht. Eine gängige Standardmethode stellt hierbei das *Cold Methanol Quenching* (CMQ) dar, die eine unmittelbare kälte-basierte Inaktivierung des zellulären Stoffwechsels ermöglicht, wobei eine Mediumsabtrennung anschließend erfolgt (de Koning und van Dam, 1992). Allerdings wird das Verfahren hinsichtlich eines Verlust der Membranintegrität durch Kälteschock und eines damit einhergehenden Austritts intrazellulärer Metabolite (*Leakage*) insbesondere in Prokaryonten wie *C. glutamicum* und *E. coli* zunehmend kritisch diskutiert (Wittmann et al. 2004). Andere Methoden wie das *Fast Centrifugation Treatment* (FCT) umgehen die Problematik durch eine vorhergehende Mediumsabtrennung mittels Zentrifugation (Plassmeier et al. 2007). Allerdings wird dabei eine verzögerte Inaktivierung des zellulären Stoffwechsels (i.R. Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff) mit einer möglichen Verfälschung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen aufgrund unerwünschter enzymatischer Aktivität in Kauf genommen (Persicke et al. 2011) (s. Kap. 7.4.2).

In Folge sollte die Leakage-Problematik des *Cold Methanol Quenching* hinsichtlich der absoluten Quantifizierung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen in *E. coli* SPOT01 näher beurteilt werden. Innerhalb von Fed-Batch-Fermentationen unter produktionsnahen Bedingungen wurde hierzu ein manuelles CMQ in verschiedenen exponentiellen Wachstumsphasen von *E. coli* SPOT01 zu je vier Replikaten (n=4) durchgeführt (s. Kap 8.9.1.1). Zur Beurteilung des kältebasierten Metabolitverlusts erfolgten gleichzeitig analoge Probennahmen gleicher Suspensionsvolumina nach der FCT-Methode (s. Kap. 8.9.1.2). Um eine Vergleichbarkeit beider Ansätze zu gewährleisten, wurde auf einen Waschschrift innerhalb der FCT-Probennahme verzichtet. Auch erfolgte die anschließende Extraktion

intrazellulärer Metabolite für beide Anwendungen anhand eines kältebasierten Chloroform-Aufschlusses unter vergleichbaren Bedingungen (s. Kap. 8.9.2.1). Resultierende Metabolom-extrakte wurden anschließend hinsichtlich charakteristischer Metabolite anaboler Stoffwechselwege vermessen. Da sich die LC-MS-basierte Metabolomanalytik (s. Kap. 8.9.4.5) zu diesem Zeitpunkt noch in der Entwicklungsphase befand, erfolgte alternativ die absolute Quantifizierung von Aminosäuren nach der OPA-RPLC-Methode unter einer externen Kalibrierung und Verwendung von L-Norvalin als Internstandard (s. Kap. 8.8.2) (Krömer et al. 2006). CMQ- und FCT-basierte Proben wiesen hierbei untereinander größtenteils Standardabweichungen unterhalb von 15% auf. Allerdings wurden in CMQ-basierten Metabolom-extrakten durchwegs signifikant niedrigere Konzentrationen ermittelt. In Abbildung 9.7 wurde der CMQ-basierte Metabolitverlust von *E. coli* SPOT01 für ein breites Spektrum von 17 Aminosäuren aufgeführt. Hierzu wurden die zwischen CMQ- und FCT-Proben ermittelten intrazellulären Konzentrationsdifferenzen auf die FCT-Konzentrationswerte bezogen. Gleichzeitig erfolgte eine RPLC-basierte Quantifizierung der Kultivierungsüberstände. Aufgrund hoher extrazellulärer L-Methionin- und L-Isoleucin-Titer und einer damit einhergehenden Verzerrung der intrazellulären Konzentrationen aufgrund von Verschleppung, wurde in diesem Falle auf eine Gegenüberstellung verzichtet.

$$Leakage(i)[\%] = \frac{c_i(FCT) - c_i(CMQ)}{c_i(FCT)} \cdot 100\% \quad [9.1]$$

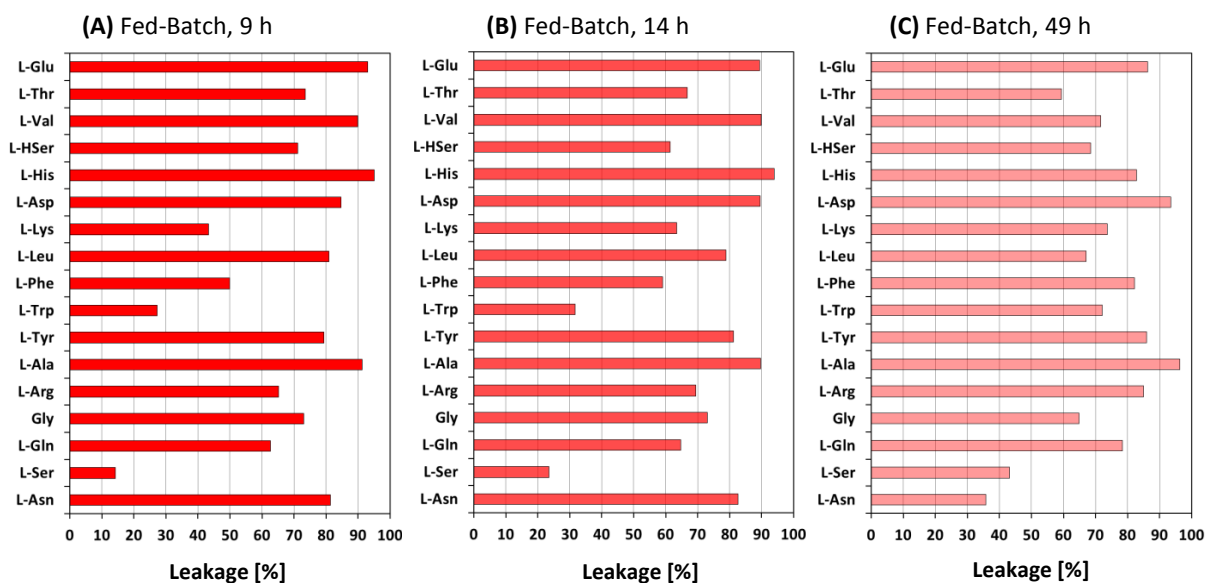


Abbildung 9.7 Quantifizierung des kältebasierten metabolit-spezifischen Leakage-Effekts anhand CMQ-basierter intrazellulärer Probenahmen innerhalb eines Fed-Batch-Prozess von *E. coli* SPOT01.

Aufgezeigt wurden metabolit-spezifische Leakageverluste anhand CMQ-basierter intrazellulärer Probennahmen innerhalb verschiedener Prozessphasen eines Fed-Batch-Prozess von *E. coli* SPOT01. Probennahmen erfolgten in der frühen (9 h, c_x ca. $10,8 \text{ gL}^{-1}$) (A), der mittleren (14 h, c_x ca. $18,3 \text{ gL}^{-1}$) (B) sowie der sehr späten Fed-Batch-Phase (49 h, c_x ca. $43,8 \text{ gL}^{-1}$) (C). Anhand des Vergleichs von CMQ- und FCT-Extrakten konnte ein hoher und variabler Leakage-Effekt bezüglich der untersuchten Metabolite festgestellt werden. Metabolitverluste beliefen sich hierbei auf 15-95%. Für alle drei Probennahme-Zeitpunkte bzw. Biomassekonzentrationen konnte für ca. 80% der untersuchten Metabolite ein Konzentrationsverlust von über 50% festgestellt werden. Die sehr hohen Leakageverluste standen im Einklang mit bereits publizierten Werten für *E. coli*. Hierbei konnte beispielsweise für L-Glutamat und L-Alanin übereinstimmend ein Verlust von $> 90\%$ festgestellt werden (Canelas et al. 2009). Der Effekt erscheint metabolit-spezifisch und ist auch über längere Prozessphasen übertragbar, was die Annahme eines diffusiven Metabolitverlusts aufgrund einer beeinträchtigten Membranintegrität weiter stützt (van Gulik et al. 2010). So konnte unter Vergleich der drei verschiedenen Probennahme-Zeitpunkte für 70% der Aminosäuren ein reproduzierbarer Verlust mit einer Standardabweichung unterhalb von 20% erzielt werden. In diesem Zusammenhang erfolgte zusätzlich eine Bilanzierung basierend auf der Vermessung gewogener Metabolitextrakte sowie analoger Kultivierungsüberstände und methanolischer Quenchingüberstände. Unter Verwendung FCT-basierter Konzentrationen als Referenzwerte konnte lediglich für drei Analyten (L-Asp, L-His und L-HSer) des untersuchten Metabolit-spektrums eine ausreichende Wiederfindung mit 80-120% erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Für dynamisch quantitative Analysen absoluter intrazellulärer Metabolitkonzentrationen erscheint das *Cold Methanol Quenching* ungeeignet. Im Gegensatz hierzu ermöglicht das *Fast Centrifugation Treatment* weitgehend Leakage-freie Probennahmen unter definierteren Bedingungen (Plassmeier et al. 2007). Allerdings ist eine unerwünschte enzymatische Perturbation instationärer Metabolitkonzentrationen durch ein zeitverzögertes Quenching im Rahmen von Stimulus-Response-Experimenten (SRE) als kritisch zu bewerten. Die Evolvierung dieser Methodik hinsichtlich einer Beschleunigung der Probennahme unter Implementierung einer geeigneten Perturbationsstrategie stellt einen zentralen Aspekt dieser Arbeit dar und wird gesondert behandelt (s. Kap. 9.2.4).

9.2.2 Entwicklung adaptierter Perturbationsstrategien

Ein übergeordnetes Ziel dieser Arbeit lag in der Entwicklung alternativer Perturbationsstrategien des intrazellulären L-Methionin-Synthesenetzwerks innerhalb des rekombinanten Produktionsstamms *E. coli* SPOT01. Stimulus-Response-Experimente (SRE) basieren auf einer stimulus-induzierten Perturbation metabolischer Netzwerke und einer anschließenden quantitativen Auswertung resultierender dynamischer Anreicherungsprofile untersuchter intrazellulärer Metabolit-Pools (s. Kap. 7.4). Die Erfassung der transienten Perturbationsverläufe ermöglicht hierbei einen direkten Zugang zu zugrundeliegenden komplexen metabolischen Regulationsmechanismen entsprechender Reaktionsnetzwerke (Oldiges et al. 2005).

Bisherige Stimulus-Response-Experimente konzentrieren sich in diesem Zusammenhang größtenteils auf die Analyse des Zentralmetabolismus innerhalb von Wildtyp-Stämmen unter adaptierten Kultivierungsbedingungen und Verwendung unmarkierter Glucose als Stimulussubstrat (Magnus et al. 2006). In diesem Zusammenhang profitieren derartige Perturbationsstrategien unabhängig von vorhandenen Aufnahmesystemen von den vergleichsweise kurzen Reaktionskaskaden vom Signaleingang (Stimulussubstrat) zum Signalausgang (Oldiges et al. 2004). Hinsichtlich der Perturbation anaboler Metabolitpools sind entsprechende Reaktionskaskaden vergleichsweise länger, wobei die resultierenden Konzentrationsdynamiken aufgrund des hoch-verzweigten Stoffwechsel-Netzwerks sowie einhergehender allosterischer Rückkopplungsinhibierungen (*Feedback Inhibition*) starken Verdünnungen unterworfen sind (s. Kap. 7.4.1). Dieses Phänomen wird auch als *Signal Dilution* bezeichnet und stellt eine grundlegende Limitierung innerhalb zielgerichteter Perturbationsstudien anaboler Netzwerke dar (Schmitz et al. 2002).

Im Gegensatz zu konventionellen Perturbationsstudien lag der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Durchführung und Auswertung von **Stimulus-Response-Experimenten** innerhalb des **anabolen Methionin-Stoffwechsels** des Produzenten *E. coli* SPOT01 unter produktionsrelevanten Kultivierungsbedingungen. Die Untersuchung des hochverzweigten und einer strikten transkriptionellen und allosterischen Regulation unterliegenden Synthesenetzwerks erforderte die Entwicklung einer zielgerichteten alternativen Perturbationsstrategie. Dies beinhaltete die Identifizierung und Charakterisierung geeigneter alternativer

Stimulussubstrate, die unter Umgehung des Zentralstoffwechsels und angesichts der bestehenden Transportersituation des Produzenten eine direkte und auslegbare Perturbation des Netzwerk-Komplexes ermöglichen. Potentielle Kandidaten stellen somit Metabolite des Synthesenetzwerks selbst bzw. benachbarter Stoffwechselwege dar, deren Einsetzbarkeit allerdings durch die hohen Anforderungen an Stimulussubstrate limitiert wird. Optimale Stimulussubstrate verhalten sich innerhalb der Kultivierungsbedingungen weitgehend chemisch inert und werden unmittelbar nach Zugabe (Stimulus) mit einer möglichst hohen und über weite Konzentrationsbereiche hinweg konstanten spezifischen Rate aufgenommen (Oldiges et al. 2005).

Angesichts einer unmodifizierten Transportersituation (*E. coli* K12 MG1655) des rekombinanten Produktionsstamms, wurden insbesondere proteinogene und nicht-proteinogene Aminosäuren als vielversprechend eingestuft. In Supplementierungsexperimenten wurden zunächst Handhabbarkeit und Aufnahmekapazitäten möglicher Kandidaten unter Vorlage ausgewählter Substrate (10 mM) innerhalb adaptierter Minimalmedien und unlimitierten Kultivierungsbedingungen (Schüttelkolben) näher untersucht (s. Kap. 8.4.2). Eingesetzt wurden die Aminosäuren L-Cystein, L-Aspartat, L-Serin, L-Homoserin und Glycin. In Abbildung 9.8 wurde die genaue topologische Lage (rote Pfeile) der netzwerk-inhärenten Stimulussubstrate in eine schematische Darstellung der Methionin-Synthese sowie benachbarter anaboler Stoffwechselwege eingefügt.

In nachfolgenden Arbeiten wurden vergleichende Kultivierungen unter Verwendung aussichtsreicher Stimulussubstrate der L-Methionin-Synthese durchgeführt. Im Fokus standen hierbei L-Aspartat, L-Serin und L-Homoserin. Der Einsatz von L-Cystein führte aufgrund der hohen Reaktivität der Thiolreagenz zu inkonsistenten extrazellulären Titerverläufen, die sich erst im fortgeschrittenen Kultivierungsverlauf stabilisierten. Auch Glycin wurde aufgrund einer unzureichenden Aufnahmekapazität innerhalb des betrachteten Kultivierungszeitraums (26 h) als Stimulussubstrat ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt).

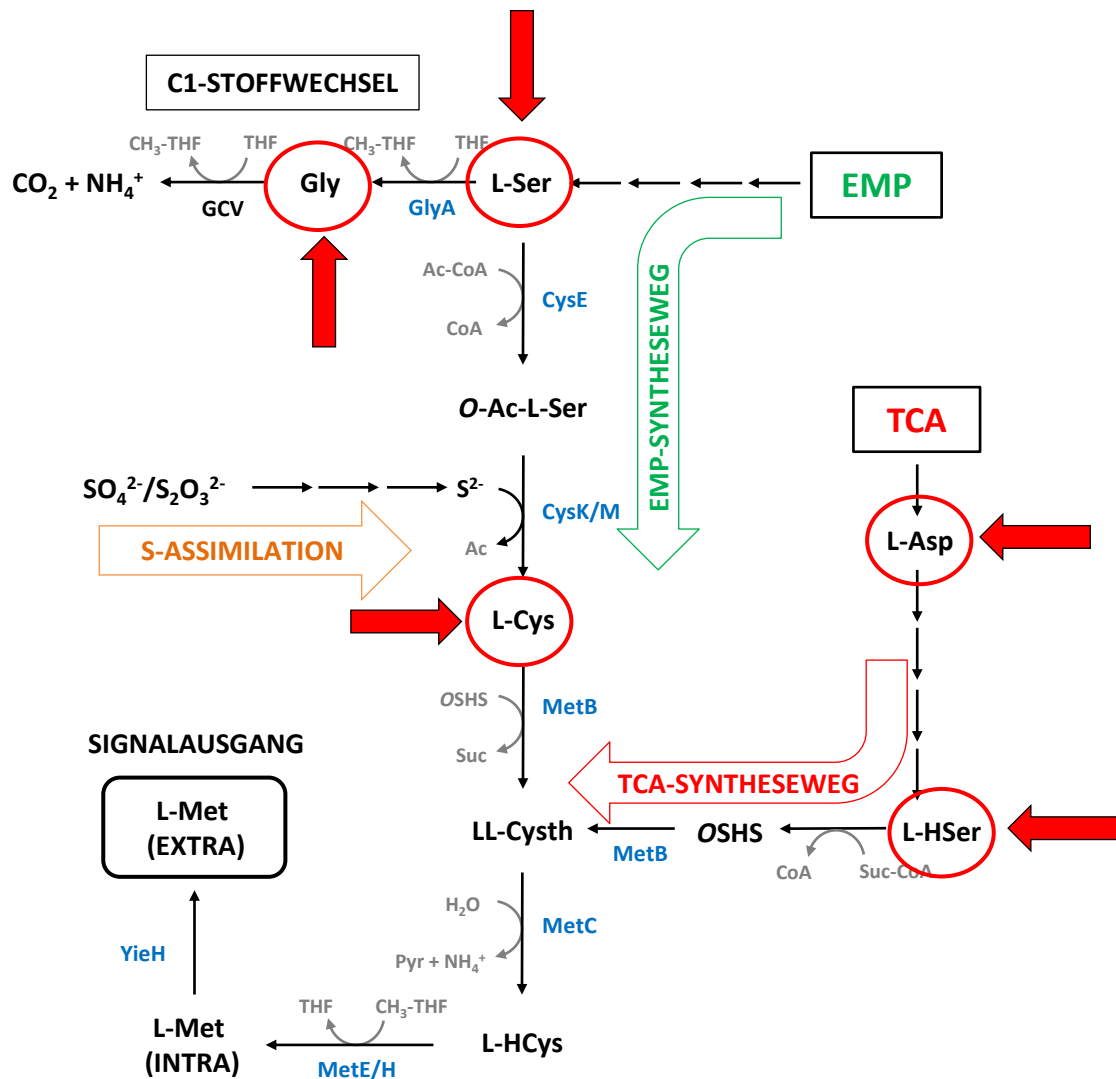


Abbildung 9.8 Schematische Darstellung des L-Methionin-Synthesenetzwerks in *E. coli* SPOT01 mit topologischer Lage potentieller netzwerk-inhärenter Stimulussubstrate. (Quelle: eigene Darstellung, in Anlehnung an Neidhardt et al. 1996)

Im Vordergrund der Stimulierungsexperimente stand die detaillierte Untersuchung der Transportkinetiken entsprechender Substrate durch verkürzte Probenahmeintervalle ab Stimulus (Δt 30 min) unter verschiedenen Stimulierungsstrategien. Stimulierungen erfolgten innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase zu definierten Biomassekonzentrationen unter analogen Kultivierungsbedingungen. In Abbildung 9.9 wurden die Ergebnisse einer vergleichenden Kultivierung unter Stimulierung von L-Serin, L-Aspartat und L-Homoserin in einer Konzentration von 10 mM bei einer Biomassekonzentration von OD₆₀₀ ca. 1,0 (4,5 h) zusammengefasst. Aufgeführte Resultate basieren jeweils auf vier unabhängigen Kultivierungen (n=4).

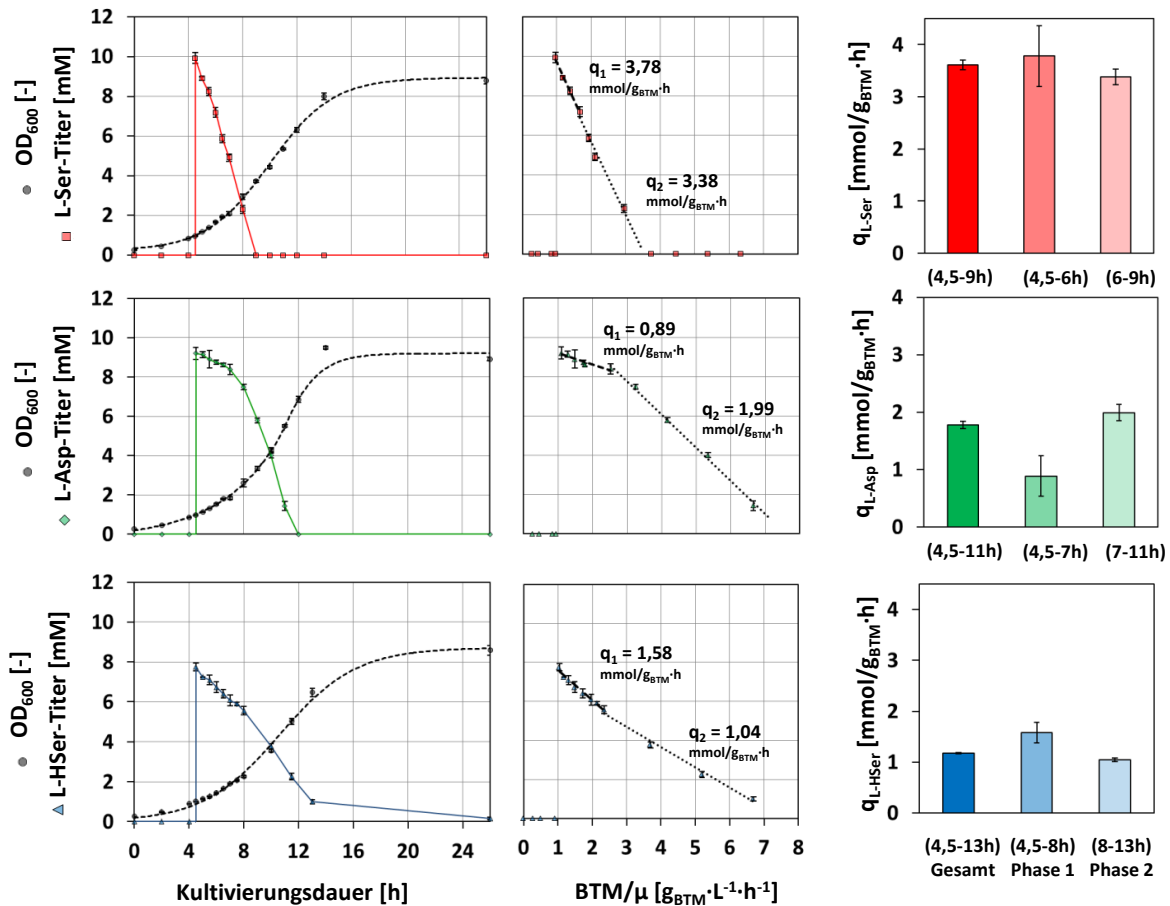


Abbildung 9.9 Kultivierungsverläufe sowie biomassespezifische Aufnahmeraten von L-Serin (rot), L-Aspartat (grün) und L-Homoserin (blau) innerhalb von Stimulierungsexperimenten von *E. coli* SPOT01 unter unlimitierten Wachstumsbedingungen.

Aufgeführt wurden Kultivierungsverläufe und extrazelluläre Substrattiter unter drei unterschiedlichen Stimulierungsszenarien. Hinsichtlich der Auslegung von Stimulus-Response-Experimenten stand eine Beurteilung der Transportkinetik potentieller Stimulussubstrate unter einer nicht adaptierten Transportersituation und übertragbaren Kultivierungsbedingungen im Vordergrund. Resultierende biomassespezifische Transportraten wurden anhand des Aufnahmeverhaltens in verschiedene Phasen eingeteilt und graphisch aufgetragen. Zugehörige Kultivierungsparameter wurden in Tabelle 9.4 zusammengefasst.

Tabelle 9.4 Wachstumsparameter sowie spezifische Substratausbeuten und Aufnahmeraten innerhalb von Stimulierungs-Experimenten von *E. coli* SPOT01 (10 mM, OD₆₀₀ ca. 1,0)

Substrat	Wachstumsparameter		Spezifische Ausbeuten			Spezifische Raten		
	μ [h ⁻¹]	OD ₆₀₀ [-] (stationär)	Y _{S/X} (Gesamt) [mmol/g _{BTM}]	Y _{S/X} (Phase 1) [mmol/g _{BTM}]	Y _{S/X} (Phase 2) [mmol/g _{BTM}]	q _S (Gesamt) [mmol/g _{BTM} h]	q _S (Phase 1) [mmol/g _{BTM} h]	q _S (Phase 2) [mmol/g _{BTM} h]
Negativ	0,253 ±0,001	8,55 ±0,11	-	-	-	-	-	-
L-Aspartat	0,264 ±0,003	8,92 ±0,10	(4,5-11,0h) 6,725 ±0,235	(4,5-7,0h) 3,366 ±1,338	(7,0-11,0h) 7,551 ±0,535	(4,5-11,0h) 1,774 ±0,062	(4,5-7,0h) 0,888 ±0,353	(7,0-11,0h) 1,992 ±0,141
L-Serin	0,256 ±0,001	8,78 ±0,15	(4,5-9,0h) 14,076 ±0,343	(4,5-6,0h) 14,739 ±2,284	(6,0-9,0h) 13,184 ±0,581	(4,5-9,0h) 3,612 ±0,088	(4,5-6,0h) 3,782 ±0,586	(6,0-9,0h) 3,383 ±0,149
L-Homoserin	0,273 ±0,002	8,58 ±0,24	(4,5-13,0h) 4,320 ±0,048	(4,5-8,0h) 5,794 ±0,745	(8,0-13,0h) 3,821 ±0,136	(4,5-13,0h) 1,178 ±0,013	(4,5-8,0h) 1,580 ±0,203	(8,0-13,0h) 1,042 ±0,037

Die Aufnahme von L-Aspartat konnte anhand linearisierter Verläufe in zwei klar unterscheidbare Phasen aufgeteilt werden. Innerhalb der ersten 2,5 h erfolgte eine unmittelbare aber unregelmäßige Substrataufnahme mit relativen Standardabweichungen von ca. 40% (n=4) mit einer vergleichsweise niedrigen Importrate von durchschnittlich 0,89 [mmol/g_{BTM}·h]. Im weiteren Verlauf (≥ 2,5 h) stabilisiert und steigert sich die spezifische Aufnahmerate auf durchschnittlich 1,99 [mmol/g_{BTM}·h]. Für die Aufnahme von L-Aspartat werden für *E. coli* K12 derzeit fünf unterschiedliche Aufnahmesysteme beschrieben. Der GltP Transporter (K_m ca. 5 μM) ist ein H⁺-abhängiger Symporter für L-Glutamat und L-Aspartat (Schellenberg et al. 1977). Der hoch-affine GltIJKL Transporter (K_m ca. 0,5 μM) ist eine ATP-abhängiger ABC-Transporter für L-Glutamat und L-Aspartat (Linton et al. 1998). Die niederaffinen und unspezifischen Dicarboxysäuren-Transporter (K_m ca. 5 mM) DctA, DcuA und DcuB sind H⁺- bzw. Succinat-abhängige Symporter für L-Aspartat, Malat, Fumarat und Succinat (Lo et al. 1977, Six et al. 1994). Die hohe Variabilität innerhalb der initialen Aufnahmephase verweist auf einen unspezifischen L-Aspartat-Import und eine indifferente Transportersituation innerhalb vorliegender Kultivierungsbedingungen. Die signifikante Zunahme der spezifischen Aufnahmerate innerhalb der zweiten Aufnahmephase verweist auf eine Induktion L-Aspartat-spezifischer Aufnahmesysteme.

Für die Aufnahme von L-Serin konnte mit durchschnittlich 3,61 [mmol/g_{BTM}·h] eine vergleichsweise hohe Importrate erzielt werden. Zusätzlich erfolgte die Aufnahme über den gesamten Zeitraum mit einer weitgehend konstanten Rate und vergleichsweise geringer Variabilität. Innerhalb der ersten 1,5 h erfolgte eine unmittelbare Substrataufnahme mit 3,78 [mmol/g_{BTM}·h], welche sich im weiteren Verlauf (≥ 1,5 h) mit 3,38 [mmol/g_{BTM}·h] kaum reduzierte. Für die Aufnahme von L-Serin werden für *E. coli* K12 derzeit drei unterschiedliche

Aufnahmesysteme beschrieben. Der SstT (YgjU) Transporter ist ein hoch-affiner Na⁺-gekoppelter Symporter (K_m ca. 8 μ M) für L-Serin und L-Threonin (Ogawa et al. 1998). Der SdaC Transporter ist ein weiterer hoch-affiner H⁺-abhängiger Symporter (K_m ca. 5 μ M) für L-Serin (Hama et al. 1988, Shao et al. 1994). Der TdcC Transporter ist ebenfalls ein hoch-affiner H⁺-abhängiger Symporter (K_m ca. 6 μ M), der allerdings nur unter anaeroben Bedingungen exprimiert wird und innerhalb vorliegender Kultivierungsbedingungen keine Rolle spielt (Sumantran et al. 1990, Ogawa et al. 1998). Der unmittelbare sowie weitgehend invariable und konstante Import von L-Serin basiert mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den konstitutiv exprimierten SstT Symporter, der vergleichsweise hohe Transportraten aufweist (Kim et al. 2002). In diesem Zusammenhang wird auch eine verstärkte Co-Expression des SdaC Transporter mit der Serin-Dehydratase II (SdaB) bei erhöhtem Energiebedarf diskutiert. Da die Expression des *sdaBC* Operons der Katabolitrepression unterliegt, ist allerdings unter unlimitierten Kultivierungsbedingungen (Glucose-Überschuss) von einer untergeordneten Rolle auszugehen (Shao et al. 1994).

Die Aufnahme von L-Homoserin erfolgte weitgehend analog zum Aufnahmeverhalten von L-Serin mit einer deutlich niedrigeren Importrate von durchschnittlich 1,18 [mmol/g_{BTM}·h]. Innerhalb der ersten 3,5 h erfolgte eine unmittelbare Substrataufnahme mit 1,58 [mmol/g_{BTM}·h], welche sich im weiteren Verlauf (\geq 3,5 h) auf 1,04 [mmol/g_{BTM}·h] reduzierte. Für die Aufnahme von L-Homoserin wird in der Literatur lediglich ein unspezifischer Transport gemeinsam mit den Aminosäuren L-Alanin, L-Cystein, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Phenylalanin, L-Threonin, L-Tyrosin und L-Valin beschrieben (Templeton et al. 1974). Ein zugehöriger Transporter wurde allerdings bisher nicht näher charakterisiert.

Als **optimales Stimulussubstrat** für den anabolen L-Methionin-Stoffwechsel erwies sich **L-Serin**. Die vergleichsweise hohe und konstante Aufnahme rate des Substrats erlaubt eine auslegbare und starke Perturbation des gesamten Reaktionsnetzwerks. Die vergleichsweise günstige topologische Lage des Schlüsselmetabolits ermöglicht zudem, ausgehend von intrazellulärem L-Serin, die zielgerichtete Perturbation eines weitgehend linearen Reaktionswegs (EMP-Syntheseweg) bis hin zu extrazellulärem L-Methionin (s. Abb. 9.8). Innerhalb exponentieller Wachstumsphasen von *E. coli* SPOT01 erwies sich insbesondere die hohe Reproduzierbarkeit der biomassespezifischen Ausbeute bzw. Aufnahme rate als vorteilhaft. In unabhängigen Experimentierreihen konnte unter Verwendung analoger

Stimulierungsstrategien zu unterschiedlichen Zeitpunkten bzw. Biomassekonzentrationen sowie unter Einsatz unterschiedlicher L-Serin-Konzentrationen eine hohe Übereinstimmung ermittelter Aufnahmeraten erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Beispielsweise konnte unter Einsatz von 20 mM L-Serin bei einer OD_{600} von ca. 2,0 eine durchschnittliche spezifische Aufnahmerate von $3,85 \pm 0,18$ [mmol/g_{BTM}·h] bzw. eine spezifische Substratausbeute von $14,10 \pm 0,66$ [mmol/g_{BTM}·h] ermittelt werden.

9.2.3 Initiale Stimulus-Response-Studien

Auf Grundlage der entwickelten Perturbationsstrategie und optimierten intrazellulären Probenahme erfolgten erste Stimulus-Response-Studien von *E. coli* SPOT01 unter Verwendung des alternativen Stimulussubstrats L-Serin. Basierend auf der hohen und konstanten Aufnahmerate von L-Serin (s. Kap. 9.2.2) wurde eine starke Perturbation des gesamten Methionin-Synthesenetzwerks unter Auslegung einer entsprechenden extrazellulären Stimulusfunktion (Pulsprofil) angestrebt. Anhand abgeleiteter Resultate konnte eine Konzeption anstehender Stimulus-Response-Experimente (SRE) innerhalb von Fed-Batch-Fermentationen des Produktionsstamms unter produktionsnahen Bedingungen erfolgen.

SRE wurden in drei unabhängigen Schüttelkolbenkultivierungen innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase unter unlimitierten Kultivierungsbedingungen durchgeführt. Der Stimulus erfolgte durch Zugabe von 2 mM [¹²C]-L-Serin bei einer Biomasse-Konzentration von OD_{600} ca. 3,0 wobei die Zugabemenge für einen Perturbationszeitraum von 40 min ausgelegt worden ist. Gleichzeitig wurden drei vergleichende Kultivierungen ohne Stimuluszugabe als analoge Negativkontrollen durchgeführt. Intra- und extrazelluläre Probenahmen erfolgten nach dezidiertem Ablauf (s. Kap. 8.4.4) und wurden anhand der FCT- und HWE-Methode (s. Kap. 8.9.1.2 bzw. 8.9.2.2) erstellt. Zur Bestimmung relevanter intrazellulärer Gleichgewichtskonzentrationen wurden unmittelbar vor Zugabe von L-Serin (Prä-Stimulusphase) intrazelluläre Probenahmen durchgeführt. Nach Zugabe des Stimulussubstrats waren unter manueller Durchführung Probenahmen in Abständen von Δt 6 min realisierbar (Stimulus-Phase). Anschließend wurde die Probenahmeintervalle sukzessive verlängert (Post-Stimulusphase). In Abbildung 9.10 wurden Kultivierungsverläufe und extrazelluläre Substrat- und Produkttiter der Stimuluskultivierungsreihe aufgeführt.

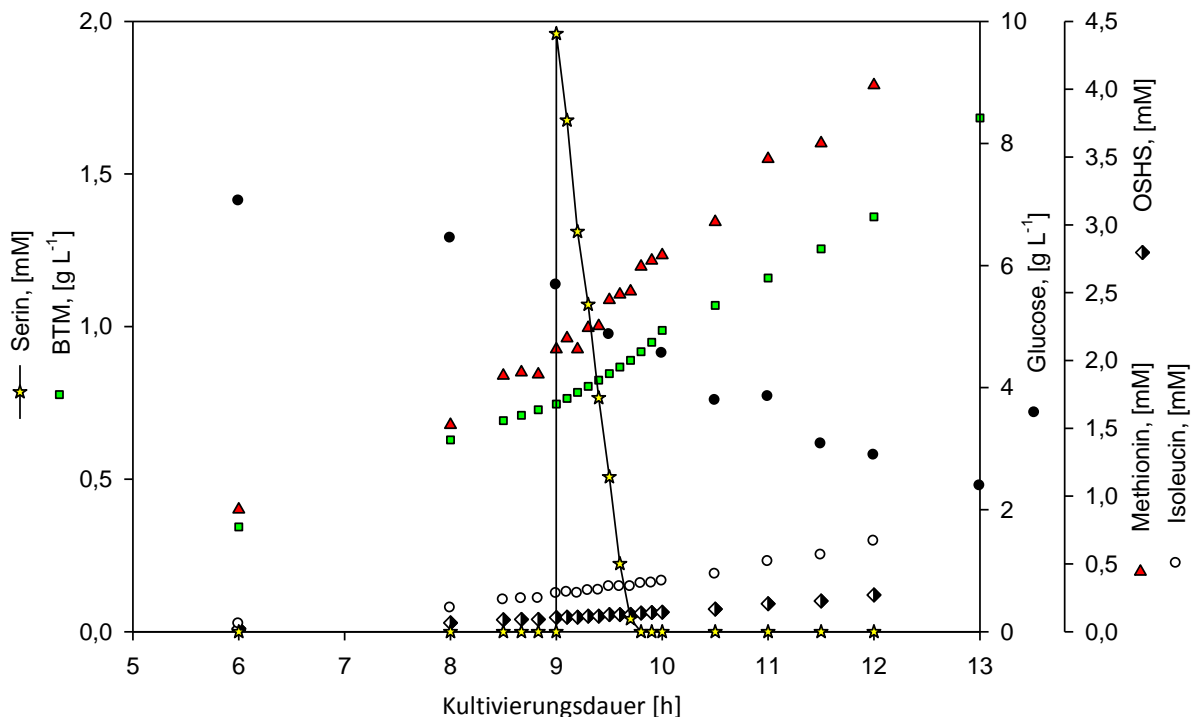


Abbildung 9.10 *Initiale Stimulus-Response-Studien unter Verwendung des alternativen Stimulussubstrats L-Serin innerhalb unlimitierter Kultivierungsbedingungen von E. coli SPOT01 (SRE-Reihe).*

Während des Perturbationszeitraums konnte innerhalb der SRE-Kultivierungsreihe eine durchschnittliche spezifische L-Serin-Aufnahmerate von ca. 3,32 [mmol/g_{BTM}·h] erzielt werden. Kultivierungsreihen mit und ohne Stimuluszugabe wiesen hierbei vergleichbare Kultivierungsparameter auf. Ermittelte durchschnittliche L-Methionin Bildungsraten waren mit ca. 700 [µmol/g_{BTM}·h] über den gesamten Kultivierungszeitraum (26 h) annähernd konstant. Innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase (0-12 h) konnten für die Nebenprodukte L-Isoleucin und O-Succinyl-L-Homoserin durchschnittliche Bildungsraten von ca. 125 [µmol/g_{BTM}·h] bzw. 50 [µmol/g_{BTM}·h] ermittelt werden. Innerhalb der stationären Wachstumsphase (12-26 h) erfolgt ein rapider Anstieg der Nebenproduktbildung mit durchschnittlichen Bildungsraten von ca. 670 [µmol/g_{BTM}·h] für L-Isoleucin bzw. 150 [µmol/g_{BTM}·h] für O-Succinyl-L-Homoserin. Ermittelte Parameter waren hierbei weitestgehend konsistent mit Resultaten bisheriger Kultivierungen unter unlimitierten Bedingungen. Zugehörige Wachstumsparameter und L-Serin-Stimulusparameter während der SRE-Phase wurden in Tabelle 9.5 zusammengefasst. Biomassespezifische Produkt- und Nebenprodukt-Ausbeuten sowie analoge Bildungsraten wurden in Tabelle 9.6 zusammengefasst.

Tabelle 9.5 Wachstumsparameter sowie spezifische L-Serin-Substratausbeuten und Aufnahmezeiten innerhalb SRE-Studien von *E. coli* SPOT01

Experiment	Wachstumsparameter (0-12h)			L-Serin-Stimulusphase (9-10 h)			
	μ [h ⁻¹]	End-OD ₆₀₀ [-]	Y _{X/Glc} [mmol/g _{BTM}]	Stimulus-OD ₆₀₀ [-]	Stimulus-L-Ser [mM]	Y _{L-Ser/X} [mmol/g _{BTM}]	q _{L-Ser} [mmol/g _{BTM} ·h]
Negativ	0,251±0,003	8,55 ±0,06	0,219±0,002	-	-	-	-
L-Serin-SRE	0,250±0,006	8,66 ±0,14	0,218±0,004	3,00	2,00	13,284±0,984	3,321±0,246

Tabelle 9.6 Spezifische Produkt- und Nebenprodukt-Ausbeuten sowie analoge Bildungsraten innerhalb SRE-Studien von *E. coli* SPOT01

Experiment	L-Methionin	L-Isoleucin		O-Succinyl-L-Homoserin	
	Y _{L-Met/X} [mmol/g _{BTM}]	Y _{L-Ile/X} [mmol/g _{BTM}]	Y _{L-Ile/X} [mmol/g _{BTM}]	Y _{OShS/X} [mmol/g _{BTM}]	Y _{OShS/X} [mmol/g _{BTM}]
Negativ	(0-26h) 3,056 ±0,134	(0-12h) 0,518 ±0,030	(12-26h) 2,623 ±0,335	(0-12h) 0,183 ±0,037	(12-26h) 0,513 ±0,018
L-Serin-SRE	(0-26h) 2,838 ±0,134	(0-12h) 0,488 ±0,030	(12-26h) 2,714 ±0,457	(0-12h) 0,202 ±0,018	(12-26h) 0,660 ±0,037
	q _{L-Met/X} [mmol/g _{BTM} ·h]	q _{L-Ile/X} [mmol/g _{BTM} ·h]	q _{L-Ile/X} [mmol/g _{BTM} ·h]	q _{OShS/X} [mmol/g _{BTM} ·h]	q _{OShS/X} [mmol/g _{BTM} ·h]
Negativ	(0-26h) 0,710 ±0,034	(0-12h) 0,130 ±0,008	(12-26h) 0,656 ±0,084	(0-12h) 0,046 ±0,009	(12-26h) 0,128 ±0,005
L-Serin-SRE	(0-26h) 0,764 ±0,034	(0-12h) 0,122 ±0,008	(12-26h) 0,679 ±0,114	(0-12h) 0,050 ±0,005	(12-26h) 0,165 ±0,009

Zur Bestimmung intrazellulärer Konzentrationen wurden resultierende Metabolomextrakte LC-MS-basiert vermessen. Die absolute Quantifizierung erfolgte im positiven MRM-Modus (ESI+) unter Verwendung der entwickelten alkalischen HILIC-ESI-MS/MS-Methode (s. Kap. 8.9.5.1) hinsichtlich aller relevanter Metabolite der L-Methionin-Synthese sowie angrenzender Stoffwechselwege (22 Analyten). Als Quantifizierungsstrategie wurde eine interne Kalibrierung nach der Methode der Standardaddition (s. Kap. 8.10.4) eingesetzt. Im Vordergrund stand eine Beurteilung der adaptierten Perturbationsstrategie hinsichtlich einer starken und reproduzierbaren Auslenkung des intrazellulären Stoffwechselnetzwerks. Berechnete Umsatzzahlen (*Turnover Number*) untersuchter intrazellulärer Metabolitpools (Gleichgewichtszustand) lagen in Abhängigkeit der jeweiligen Poolgrößen im Sekundenbereich (0,4-50 s). Angesichts einer vergleichsweise langsameren Beprobungsstrategie und einer zeitverzögerten Inaktivierung der enzymatischen Aktivität (bei vollständig manueller Durchführung ca. 3 min) erfolgten intrazelluläre Probenahmen unter einer permanenten Überladung des gesamten Netzwerksystems innerhalb einer zeitlich ausgedehnten Perturbationsperiode (40 min).

In Abbildung 9.11 wurden die Perturbationsverläufe von drei exemplarischen Metabolitpools des anabolen Synthesenetzwerks aufgezeigt. Aufgrund des hohen analytischen Aufwands wurden in diesem Fall zwei unabhängige SRE-Kultivierungen sowie eine nicht perturbierte Kultivierung (Negativkontrolle) berücksichtigt. Der erste Zeitpunkt (0 min) entspricht der jeweiligen intrazellulären Gleichgewichtskonzentration. Der L-Serin-Stimulus erfolgte zum Zeitpunkt $t = 6$ min (gestrichelte rote Linie). Weitere Zeitpunkte entsprechen Konzentrationen der Stimulusphase (6-46 min) oder Post-Stimulusphase (> 46 min). Gemessene intrazelluläre Konzentrationen wurden auf die ursprünglich entnommene Biotrockenmasse normiert [$\mu\text{mol}/\text{g}_{\text{BTM}}$]. Aufgezeigte Standardabweichungen basieren auf fünffacher Vermessung der Metabolomextrakte unter vierfacher Aufstockung der Probenmatrix nach der methodischen Fehlerbestimmung der Standardaddition (s. Kap. 8.10.5). Relative Standardabweichungen lagen hierbei weitgehend unter 15%. **O-Acetyl-L-Serin** stellt ein direktes Folgemetabolit von L-Serin dar und zeigte innerhalb der initialen Stimulusphase eine ausgeprägte Konzentrationsauslenkung mit einer maximalen Poolzunahme um den Faktor 25. Die Perturbationsprofile der beiden unabhängigen SRE-Kultivierungen waren weitgehend reproduzierbar, wobei die ursprünglichen Gleichgewichtskonzentrationen innerhalb der Post-Stimulusphase wieder erreicht wurden. Analoge Gleichgewichtskonzentrationen der Negativkontrolle blieben hierbei über den gesamten Zeitraum annähernd konstant. Auch bei **L-Methionin** konnte eine signifikante und reproduzierbare stimulus-induzierte Konzentrationsauslenkung des intrazellulären Pools erzielt werden. Aufgrund der längeren und verzweigten Reaktionskaskade konnte allerdings nur noch eine maximale Poolzunahme um den Faktor 2 erreicht werden (Signalverdünnung). Darüberhinaus unterliegen zahlreiche Enzyme des Synthesewegs Rückkopplungsinhibierungen nachfolgender Intermediate (s. Kap. 7.2.5.1) und verstärken die Verdünnung resultierender Konzentrationsdynamiken zusätzlich. Entsprechende Perturbationsprofile zeigten hierbei auffällig oszillierende Konzentrationsauslenkungen, die über die Stimulusphase fortbestehen und sich erst in der späten Post-Stimulusphase wieder den ursprünglichen Gleichgewichtskonzentrationen annähern. **L-Lysin** gehört wie Methionin zu den Aminosäuren der Aspartatfamilie. Das Intermediat ist zwar Teil des anabolen Stoffwechselkomplexes ist aber mit L-Serin nur indirekt über ein hochverzweigtes Reaktionsnetzwerk verbunden (s. Abb. 7.9). Trotz der unvorteilhaften topologischen Lage des Metabolits konnte auch in diesem Fall eine signifikante und

reproduzierbare Konzentrationsauslenkung mit einer maximalen Poolzunahme um den Faktor 3 erreicht werden.

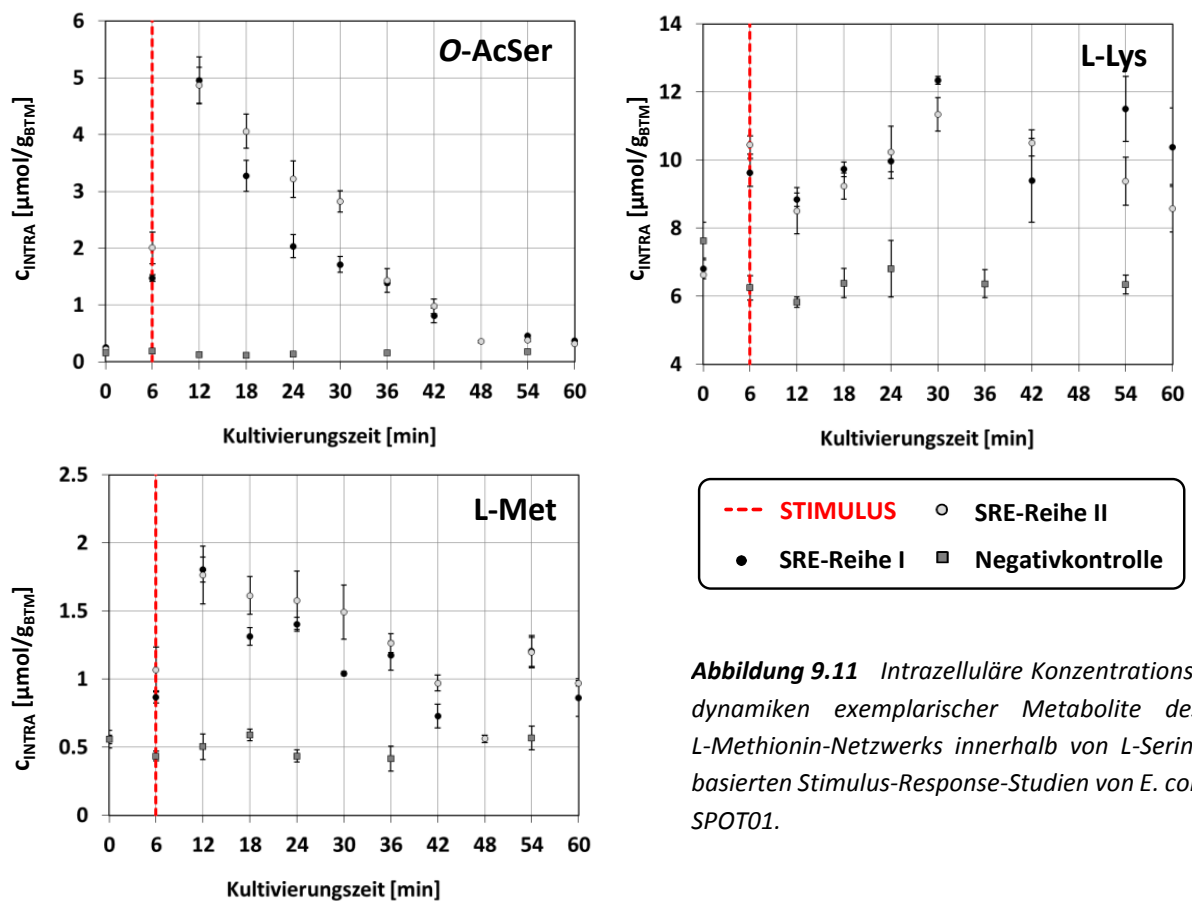


Abbildung 9.11 Intrazelluläre Konzentrationsdynamiken exemplarischer Metabolite des L-Methionin-Netzwerks innerhalb von L-Serin-basierten Stimulus-Response-Studien von *E. coli* SPOT01.

9.2.4 Perturbations- und Probennahmestrategien in Stimulus-Response-Experimenten

Stimulus-Response-Experimente (SRE) erfordern die abgestimmte Entwicklung einer intrazellulären Analytik sowie adaptierter Perturbations- und Probennahmestrategien hinsichtlich vorliegender Kultivierungsbedingungen (s. Kap. 7.4). Ein zentraler Aspekt dieser Arbeit bildete die Konzeption adäquater Stimulusszenarien innerhalb des intrazellulären L-Methionin-Synthesenetzwerks des Produktionsstamm *E. coli* SPOT01 unter Produktionsbedingungen. In diesem Zusammenhang wurde in umfangreichen Vorarbeiten eine LC-MS-basierte Analytik zur absoluten Quantifizierung fokussierter intrazellulärer Metabolite (*Metabolic Profiling*) entwickelt. Die Methode erlaubt die sensitive und selektive Messung von 22 Analyten des L-Methionin-Stoffwechsels innerhalb eines chromatographischen Laufs unter Berücksichtigung von Matrixeffekten anhand optimierter Quantifizierungsstrategien

(s. Kap. 9.1.5). In anschließenden Transportkinetik-Studien konnte mit L-Serin ein netzwerk-inhärentes Stimulussubstrat identifiziert werden, dass unter vorteilhafter Umgehung des Zentralstoffwechsels einhergehende Signalverdünnungen signifikant reduziert. Die hohe und konstante Aufnahmerate ermöglicht zudem eine zielgerichtete und starke Perturbation des komplexen und hochverzweigten Reaktionsnetzwerks.

Hinsichtlich der Probennahmestrategie war unter produktionsnahen Bedingungen eine Trennung extra- und intrazellulärer Metabolite essentiell. In Batch- oder Fed-Batch-Prozessen sind hierbei enorme und mit fortgesetzter Kultivierungsdauer zunehmende Konzentrationsunterschiede zwischen intra- und extrazellulären Metabolitkonzentrationen zu beachten. So konnte während des Perturbationszeitraums durchgeführter initialer Stimulus-Response-Studien (s. Kap. 9.2.3) für extrazelluläres L-Methionin ein auf die Biotrockenmasse bezogener [$\mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}$] 400-facher Konzentrationsüberschuss ermittelt werden. LC-MS-basierte Messungen vergleichbarer intrazellulärer Extrakte aus *E. coli* Biomassen (s. Kap 9.1.4) wiesen hierbei für vier technische Replikaten ($n=4$) Standardabweichungen von 4-8% für die Standardaddition und 1-4% für Isotopenverdünnung als Quantifizierungsstrategie auf. Differentielle Vorgehensweisen innerhalb integrativer oder simultaner Aufschlussmethoden sind somit nur eingeschränkt einsetzbar (s. Kap. 7.4.2). Auch war eine Anpassung entsprechender Prozessmodi oder Kultivierungsplattformen in diesem Fall unerwünscht (Schaub et al. 2006). Somit kamen nur sequentielle Methoden wie das *Cold Methanol Quenching* (CMQ) oder das *Fast Centrifugation Treatment* (FCT) unter quantitativer Abtrennung von Kultivierungsüberständen in Betracht. Allerdings führten CMQ-basierte Probennahmen zu kälte-induzierten Leakage-Effekten mit hohen und variablen Metabolitverlusten von 15-95% (s. Kap. 9.2.1). Bilanzierungen die auf der Vermessung von Extrakten sowie analoger Kultivierungs- und Quenchingüberstände basieren, sind hinsichtlich quantitativer Analysen von Konzentrationsdynamiken unter gegebenen Kultivierungsbedingungen nur eingeschränkt möglich. In diesem Zusammenhang ermöglichen FCT-basierte Methoden weitgehend Leakage-freie Probennahmen unter der vorteilhaften Implementierung isotonischer Waschschriffe (Bolten et al. 2007). Allerdings muss die zeitverzögerte Inaktivierung des zellulären Stoffwechsels und eine mögliche Verzerrung intrazellulärer Konzentrationen als kritisch angesehen werden (Gulik et al. 2010). Für Metabolomextrakte aus FCT-Probennahmen unter anschließender Heißwasser-Extraktion konnte bereits eine hohe Übereinstimmung intrazellulärer Gleichgewichtskonzentrationen mit zuvor publizierten

Daten erzielt werden (s. Kap. 9.1.4). Ermittelte Umsatzzahlen untersuchter intrazellulärer Metabolitpools des L-Methionin-Synthesenetzwerks lagen in Abhängigkeit der jeweiligen Poolgrößen im Sekundenbereich. Die Beprobungsstrategie mit einer vergleichsweise langsameren Stoffwechsel-Inaktivierung erforderte somit eine starke Adaption der Perturbationsstrategie. Die hohe Importrate von L-Serin ermöglichte hierbei intrazelluläre Probenahmen innerhalb ausgedehnter Perturbationsphasen unter einer permanenten Überladung des gesamten Netzwerksystems anhand einer stufenartigen Stimulusfunktion. Innerhalb der Stimulus-Response-Studien konnte unter derartigen Bedingungen eine hohe Reproduzierbarkeit instationärer Konzentrationsverläufe erzielt werden. Durch Verkleinerung der Probenmengen (*Down-Scaling*) und unter Einsatz einer semi-automatisierten volumetrischen Probennahmeverrichtung konnte in Folge der Beprobungsvorgang weiter beschleunigt werden, wobei zugehörige Perturbationsphasen sukzessive verkürzt wurden.

9.3 Stimulus-Response-Experimente in Fed-Batch Kultivierungen

Auf Grundlage der durchgeführten Stimulus-Response-Studien (s. Kap. 9.2.3) konnte eine empirische Auslegung von Stimulus-Response-Experimenten (SRE) innerhalb von Fed-Batch-Fermentationen von *E. coli* SPOT01 unter produktionsnahen Bedingungen erfolgen. Im Vordergrund stand die Adaption der Perturbationsstrategie unter Verwendung des netzwerk-inhärenten Stimulussubstrats L-Serin und die Implementierung einer beschleunigten semi-automatisierten intrazellulären Probennahme innerhalb unlimitierter Kultivierungsbedingungen. Die Probenaufarbeitung wurde hinsichtlich einer anschließenden LC-MS-basierten Vermessung resultierender metabolischer Anreicherungsprofile abschließend optimiert. Die Versuche erfolgten in Zusammenarbeit mit **Frau Maria Rahnert**. Im Rahmen eines parallelen Teilprojekts (Energetisch optimierte Fermentationsführung) wurde der produktionsnahe Fed-Batch-Prozess von *E. coli* SPOT01 durch Frau Rahnert etabliert und optimiert.

9.3.1 Stimulus-Response-Experimente im 30-L-Rührkesselreaktor

Stimulus-Response-Experimente (SRE) wurden unter Einsatz des unmarkierten Stimulussubstrats [$U^{12}C$]-L-Serin innerhalb verschiedener Prozessphasen einer etablierten Fed-Batch-Fermentation von *E. coli* SPOT01 durchgeführt. Ausgehend von einer Vorkultivierung in einem 2,5-L-Rührkessel-Glasreaktor erfolgte die Hauptkultivierung in einem 30-L-Edelstahl-Rührkesselreaktor. Die Batch-Phase wurde für 8 h ausgelegt. In der anschließenden Fed-Batch-Phase wurde die Zufütterungsstrategie hinsichtlich unlimitierter Wachstumsbedingungen (geringfügiger Glucose-Überschuss) ausgelegt. SRE sollten hierbei innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase unter vergleichbaren Kultivierungsbedingungen erfolgen. Stimuli erfolgten in Form einer Sprungfunktion unter Zugabe von 3 M [$U^{12}C$]-L-Serin-Lösung nach 5,5 h in der Batch-Phase (SRE I) sowie in der Fed-Batch Phase nach 9,5 h (SRE II) bzw. 13,5 h (SRE III). Die Stimulusphasen wurden unter Variation der jeweiligen Zugabevolumina für 20 min ausgelegt. Über den gesamten Prozessverlauf erfolgten intrazelluläre (IPN) und analoge extrazelluläre Probennahmen (EPN) zu je vier Replikaten ($n=4$) pro Zeitpunkt.

Der Einsatz einer semi-automatisierten volumetrischen Probennahmeverrichtung ermöglichte die vorteilhafte Beschleunigung der diskontinuierlichen Probenaufbereitung nach der FCT- und HWE-Methode (s. Kap. 8.9.1.2 bzw. 8.9.2.2). Die Zeitspanne bis zur einer temporären Inaktivierung des zellulären Stoffwechsels (Quenching) konnte hierbei signifikant auf ca. 1 min reduziert werden. Zur Bestimmung intrazellulärer Gleichgewichtskonzentrationen wurden unmittelbar vor Zugabe von L-Serin (Prä-Stimulusphase) intrazelluläre Probennahmen durchgeführt. Unter Anwendung eines dezidierten Probennahmeablaufs (s. Abb. 8.2) konnten innerhalb der Perturbationsperioden der SRE Messintervalle von $\Delta t=2$ min erzielt werden (Stimulusphase). Anschließend wurde die Probennahmeintervalle sukzessive verlängert (Post-Stimulusphase). In Abbildung 9.12 wurden Kultivierungsverläufe sowie relevante extrazelluläre Substrat- und Produkttiter innerhalb der drei verschiedenen Prozessphasen (SRE I-III) aufgeführt. Aufgrund der bestehenden Abgasanalytik konnten zusätzlich resultierende OUR- (*Oxygen Uptake Rate*) und CER-Verläufe (*Carbon Dioxide Emitting Rate*) ermittelt werden.

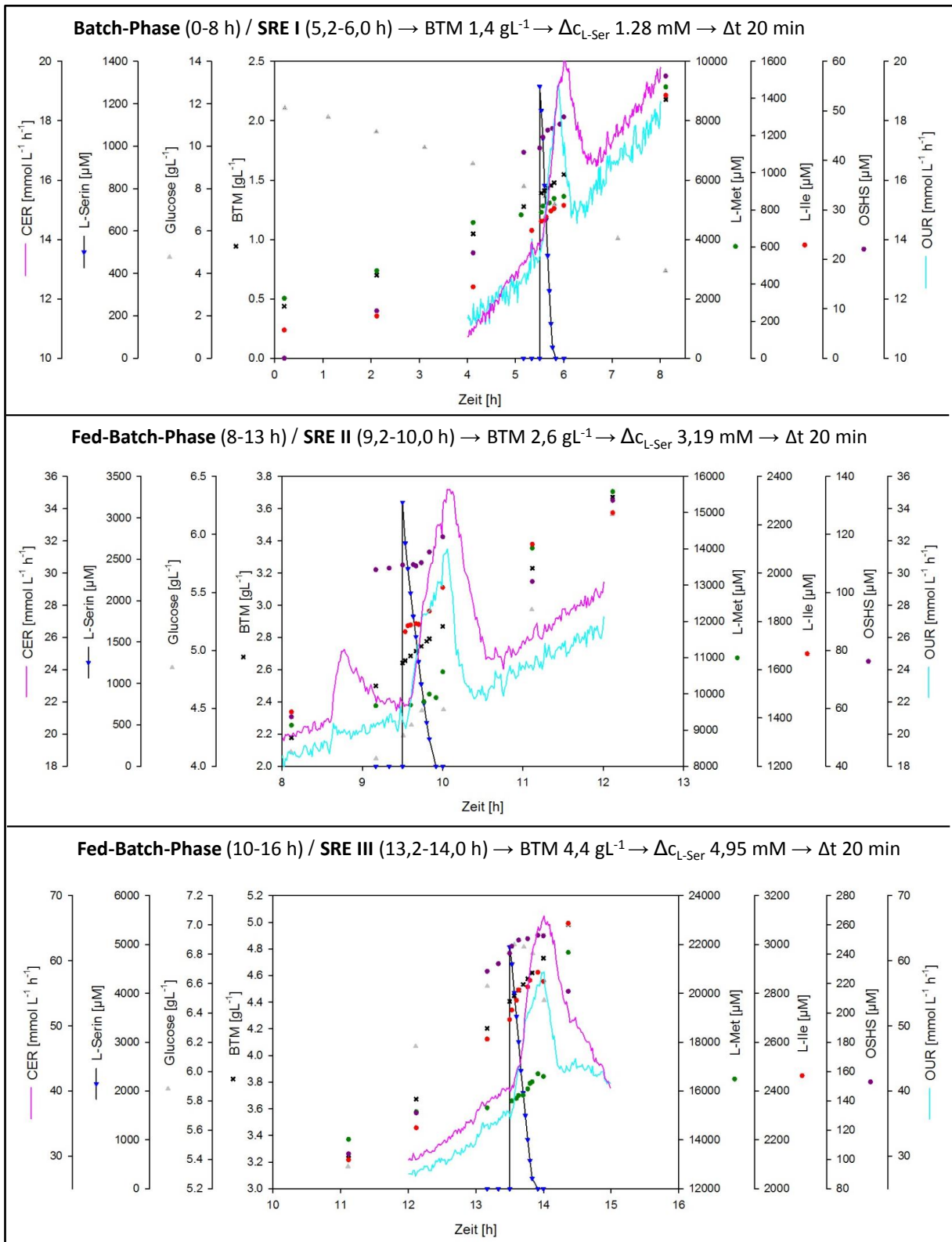


Abbildung 9.12 Kultivierungsverläufe sowie extrazelluläre Substrat- und Produkttiter durchgeführter Stimulus-Response-Experimente (SRE I-III) innerhalb drei verschiedener Prozessphasen einer Fed-Batch-Fermentation von *E. coli* SPOT01 unter unlimitierten Kultivierungsbedingungen.

Die Ausbeuten der Nebenprodukte L-Isoleucin und O-Succinyl-L-Homoserin zeigten über den gesamten Prozessverlauf ein variables Verhalten, wobei innerhalb der ersten 14 h durchschnittliche Ausbeuten von ca. 0,61 [mmol/g_{BTM}] bzw. ca. 0,06 [mmol/g_{BTM}] erzielt wurden. Die durchschnittlichen biomassespezifischen L-Methionin- und D-Glucose-Ausbeuten waren mit ca. 3,21 [mmol/g_{BTM}] bzw. ca. 0,21 [g_{Glc}/g_{BTM}] über den gesamten Prozessverlauf (29 h) annähernd konstant. Aufgrund eines Rückgangs der Wachstumsrate μ über den Prozessverlauf wurden allerdings rückläufige analoge Bildungs- bzw. Aufnahmeraten festgestellt. So konnte innerhalb der Batch-Phase (0-5 h) vor SRE I eine reproduzierbare spezifische L-Methionin-Bildungsrate von ca. 680 [μ mol/g_{BTM}·h] ermittelt werden, welche allerdings innerhalb des weiteren Verlaufs der Fed-Batch-Phase kontinuierlich auf ca. 260 [μ mol/g_{BTM}·h] (25-29 h) abnahm. Wachstumsparameter, biomassespezifische Produkt- und Nebenprodukt-Ausbeuten sowie analoge Bildungs- und Aufnahmeraten wurden in Tabelle 9.7 zusammengefasst.

Tabelle 9.7 Wachstumsparameter und spezifische Produkt- und Nebenprodukt-Ausbeuten sowie analoge Bildungsraten innerhalb eines SRE-Fed-Batch-Prozess von *E. coli* SPOT01

Wachstumsparameter (0-29h)				D-Glucose	L-Methionin	L-Isoleucin	O-Succinyl-L-Homoserin
Prozess-Phase	Zeitraum	μ [h ⁻¹]	Bereich BTM [gL ⁻¹]	$Y_{X/Glc}$ [g _{BTM} /g _{Glc}]	$Y_{L-Met/X}$ [mmol/g _{BTM}]	$Y_{L-Ile/X}$ [mmol/g _{BTM}]	$Y_{OSH5/X}$ [mmol/g _{BTM}]
Batch	0 - 5 h	0,214±0,007	0,42-1,24	0,187±0,015	3,163±0,029	0,358±0,023	0,041±0,009
(Fed-)Batch	6 - 9 h	0,150±0,007	1,55-2,43	0,234±0,018	3,163±0,402	0,915±0,137	0,055±0,009
Fed-Batch	10 - 13 h	0,120±0,004	2,87-4,11	0,205±0,006	3,264±0,214	0,541±0,053	0,078±0,005
Fed-Batch	25 - 29 h	0,075±0,006	12,71-16,68	0,206±0,016	3,505±0,154	0,488±0,030	-0,014±0,002
Prozess-phase	Zeitraum	μ [h ⁻¹]	Bereich BTM [gL ⁻¹]	$q_{Glc/X}$ [g _{Glc} /g _{BTM} ·h]	$q_{L-Met/X}$ [mmol/g _{BTM} ·h]	$q_{L-Ile/X}$ [mmol/g _{BTM} ·h]	$q_{OSH5/X}$ [mmol/g _{BTM} ·h]
Batch	0 - 5 h	0,214±0,007	0,42-1,24	1,141±0,127	0,677±0,042	0,077±0,005	0,009±0,002
(Fed-)Batch	6 - 9 h	0,150±0,007	1,55-2,43	0,641±0,079	0,474±0,060	0,137±0,021	0,008±0,001
Fed-Batch	10 - 13 h	0,120±0,004	2,87-4,11	0,587±0,037	0,392±0,026	0,065±0,006	0,009±0,001
Fed-Batch	25 - 29 h	0,075±0,006	12,71-16,68	0,364±0,057	0,263±0,012	0,037±0,002	-0,001±0,000

Innerhalb der Perturbationsphasen von SRE I-III konnten für das Stimulus-Substrat [U¹²C]-L-Serin trotz rückläufiger Wachstumsraten weitgehend reproduzierbare spezifische Aufnahmeraten in einem Bereich von ca. 3,15-3,46 [μ mol/g_{BTM}·h] erreicht werden. Erzielte Perturbationszeiträume variierten somit unwesentlich zwischen 18-22 min. Hierbei konnte im direkten Vergleich der SRE eine sukzessive Steigerung der biomassespezifischen Ausbeuten festgestellt werden. Innerhalb SRE I konnten analog zu bisherigen Kultivierungen unter

unlimitierten Bedingungen eine spezifische L-Serin-Ausbeute von ca. 15,03 [mmol/g_{BTM}] erzielt werden. Innerhalb von SRE III erfolgte die L-Serin-Aufnahme mit einer signifikant gesteigerten Ausbeute von ca. 23,03 [mmol/g_{BTM}]. In diesem Zusammenhang ist von einer Adaption der Transportersituation in Folge vorhergehender L-Serin-Stimuli auszugehen. Zugehörige L-Serin-Stimulusparameter während der jeweiligen SRE-Phasen wurden in Tabelle 9.8 zusammengefasst.

Tabelle 9.8 Spezifische L-Serin-Substratausbeuten und Aufnahmeraten von SRE I-III innerhalb eines Fed-Batch-Prozess von *E. coli* SPOT01

SRE-Parameter		Prä-Stimulus (Δt 20 min)	Stimulus-Phase (Δt 20 min)		Post-Stimulus (Δt 10 min)	Stimulussubstrat	
Experiment	Zeitraum [h]	BTM [gL ⁻¹]	L-Ser-Puls [mM]	BTM [gL ⁻¹]	BTM [gL ⁻¹]	q _{L-Ser} [mmol/gBTM·h]	Y _{L-Ser/X} [mmol/gBTM]
SRE I (Batch)	5,17-6,00	1,28-1,38	1,28	1,28-1,38	1,38-1,38	3,458±0,065	15,030±0,285
SRE II (Fed-Batch)	9,17-10,00	1,28-1,39	3,19	1,28-1,39	1,28-1,39	3,150±0,085	18,859±0,514
SRE III (Fed-Batch)	13,17-14,00	1,28-1,40	4,95	1,28-1,40	1,28-1,40	3,260±0,095	23,028±0,674

In allen SRE konnte ein kurzzeitiger stimulus-induzierter Anstieg der CO₂-Emissionsrate (CER) und O₂-Aufnahmerate (OUR) ermittelt werden. Aufgrund des verhältnismäßig höheren Anstiegs des CER stieg der zugehörige respiratorische Quotient (Stoffmengenverhältnis n_{CO₂}/n_{O₂}) von näherungsweise 1,0 auf ca. 1,5. Der kurzzeitige Anstieg der respiratorischen Aktivität ist konsistent mit der intrazellulären Umsetzung von LL-Cystathionin zu Pyruvat und L-Homocystein durch die Cystathionin-β-Lyase (MetC). In diesem Zusammenhang erscheint aufgrund aerober und unlimitierter Kultivierungsbedingungen (Glucose-Überschuss) eine direkte Umsetzung von L-Serin zu Pyruvat durch vorhandene Serin-Dehydratasen (SdaA/B, TdcB/G) eher unwahrscheinlich (Shao et al. 1994). Der zusätzlich erhöhte Anstieg des CER basiert auf der partiellen Umsetzung des L-Serin-Stimulus durch die Serin-Hydroxymethyltransferase (GlyA) zu Glycin und der anschließenden Bildung von CO₂ durch das *Glycine Cleavage System* (GCV).

9.3.2 LC-MS-basierte Messung intrazellulärer Konzentrationen

Die aus der Heißwasser-Extraktion (HWE) resultierenden Metabolomextrakte (intrazelluläre Proben) wurden LC-MS-basiert vermessen. Die Messung erfolgte im positiven MRM-Modus (ESI+) unter Verwendung der entwickelten alkalischen HILIC-ESI-MS/MS-Methode (s. Kap. 8.9.5.1) hinsichtlich aller relevanter Metabolite der L-Methionin-Synthese sowie

angrenzender Stoffwechselwege (22 Analyten). Absolute Quantifizierungen erfolgten unter Verwendung einer internen Kalibrierung nach der Methode der Standardaddition unter zusätzlicher Verwendung von L-Norvalin als Internstandard (s. Kap. 8.10.4). Intrazelluläre Konzentrationen wurden auf die innerhalb der Extraktion eingesetzten Biotrockenmassen (30 gL^{-1}) normiert [$\mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}$].

9.3.2.1 Langfristiger Verlauf intrazellulärer Gleichgewichtskonzentrationen

Zur Beurteilung der langfristigen metabolischen Situation der L-Methionin-Synthese von *E. coli* SPOT01, innerhalb von Fed-Batch-Fermentationen unter unlimitierten Bedingungen, wurde der Verlauf von Gleichgewichtskonzentrationen relevanter intrazellulärer Metabolite näher untersucht. In Abbildung 9.13 wurden intrazelluläre Gleichgewichtskonzentrationen innerhalb der Prä-Stimulusphasen durchgeführter SRE I-III für 12 exemplarische Metabolite des Reaktionsnetzwerks aufgezeigt. Zeitbereiche anschließender Perturbationsphasen (rot gestrichelte Linien) wurden entsprechend markiert. Aufgezeigte Standardabweichungen basieren auf vier intrazellulären Probennahmen ($n=4$) je Zeitpunkt. Mit Ausnahme des hochvolatilen intrazellulären L-Serin-Pools konnten hierbei größtenteils relative Standardabweichungen unterhalb von 10% erreicht werden. Für direkt aufeinanderfolgende Probennahmezeitpunkte ($\Delta t = 5 \text{ min}$) innerhalb einer Prä-Stimulusphase konnte eine zufriedenstellende Wiederfindung mit Abweichungen unterhalb von 20% erzielt werden. Innerhalb des betrachteten Zeitraums (8 h) wies ein Großteil der betrachteten Metaboliten unter unlimitierten Kultivierungsbedingungen eine hohe Konstanz bezüglich ihrer Gleichgewichtskonzentrationen auf. Allerdings konnte für intrazelluläres L-Isoleucin- und L-Methionin eine hiervon klar abweichende lineare Zunahme der Poolkonzentrationen festgestellt werden. Auch der L-Homocysteinpool wies eine starke Zunahme der intrazellulären Konzentration innerhalb der späteren Kultivierungsphase auf. In diesem Zusammenhang waren die im Vergleich zum L-Cystein-Pool viel höheren Konzentrationswerte ($1,6\text{-}2,9 \text{ } [\mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}\cdot\text{h}]$) besonders auffallend. Das stöchiometrische Übergewicht an L-Homocystein gegenüber L-Cystein lag bereits innerhalb der Batch-Phase bei einem Faktor von 12, der sich im Verlauf der Fed-Batch-Phase nochmals auf einen Faktor von 21 steigerte.

Die Regulation innerhalb des L-Methionin-Reaktionsnetzwerks (s. Kap. 7.2.5) deutet darauf hin, dass insbesondere eine Akkumulation cytotoxischer L-Homocystein-Konzentrationen

vermieden werden soll. In diesem Zusammenhang hemmen die Endprodukte L-Methionin und L-Threonin ihre eigenen Synthesen durch eine kumulative Rückkopplungsinhibierung der Homoserin-Dehydrogenase-Isoenzyme MetL und ThrA (Kumar et al. 2005). L-Methionin und S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) inhibieren zudem das Folgeenzym Homoserin-O-Succinyl-Transferase (MetA) um einen Überschuss an O-Succinyl-L-Homoserin (OSHS) zu vermeiden (Lee et al. 1966). Zusätzlich unterliegen die beiden Homocystein verbrauchenden Enzyme MetE und MetH keiner allosterischen Kontrolle. Auf transkriptioneller Ebene reguliert das globale Repressorprotein MetJ zusammen mit seinem Co-Repressor SAM die Expression der Gene der Methionin-Synthese (Usuda et al. 2005). Lediglich die Methioninsynthese MetH unterliegt keiner Repression wodurch eine fortgesetzte Umsetzung von L-Homocystein sichergestellt wird.

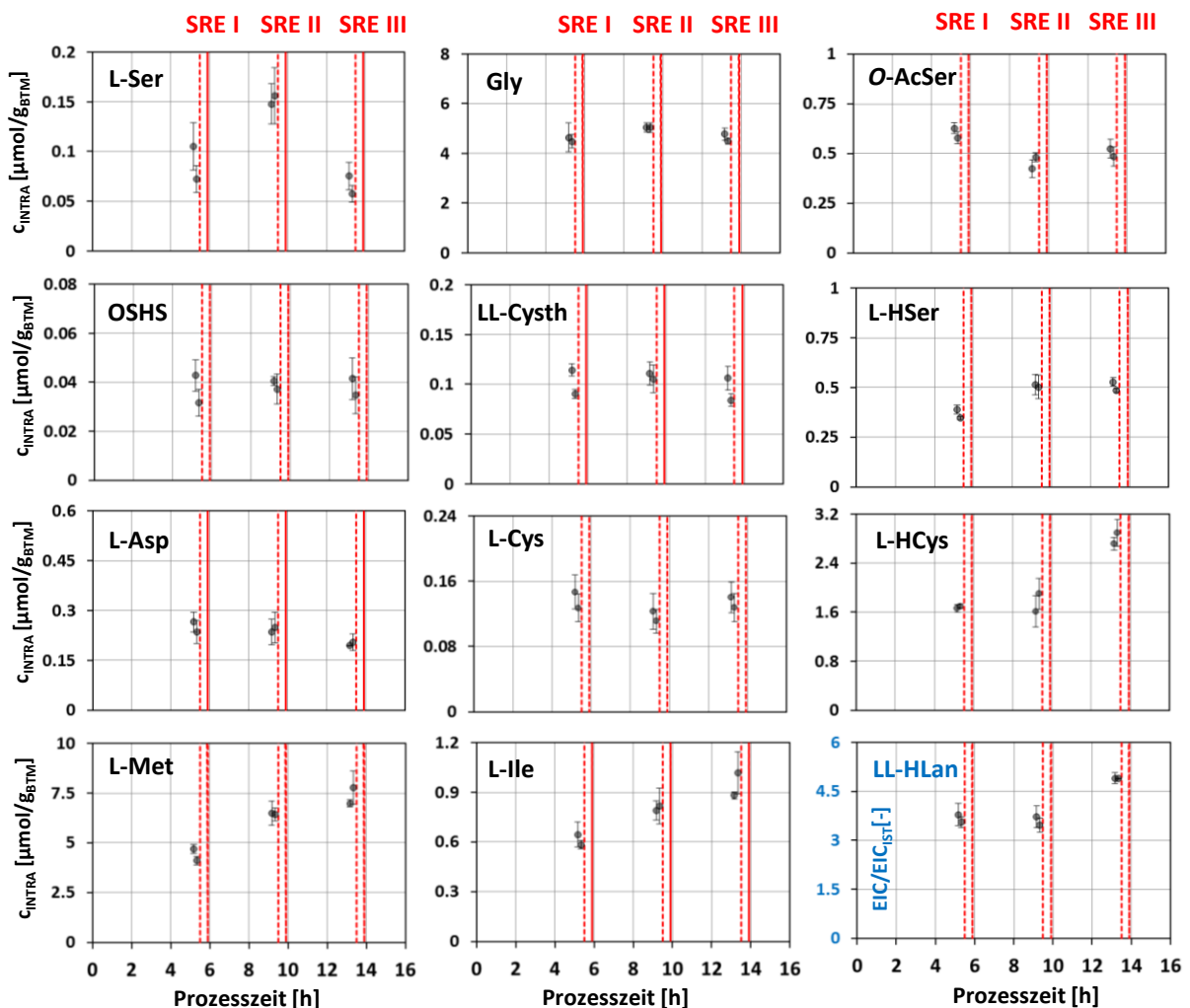


Abbildung 9.13 Verlauf intrazellulärer Gleichgewichtskonzentration von Metaboliten des L-Methionin-Synthesenetzwerks innerhalb einer Fed-Batch-Fermentation (0-16 h) von *E. coli* SPOT01.

In den letzten Jahren wurde der Wirkmechanismus einer Toxizität von L-Homocystein in *E. coli* und anderen Bakterien kontrovers diskutiert. Im menschlichen Plasma führen erhöhte Homocysteinkonzentrationen zu einer Bildung von hochreaktivem Homocystein-Thiolacton (Ferretti et al. 2004). Homocystein-Thiolacton wird durch Fehlbeladung von Methionyl-tRNA-Synthetasen mit Homocystein gebildet. Resultierende Thiolactone reagieren insbesondere mit Lysin-Seitenketten und führen zu einer unspezifischen Homocysteinylierung von Proteinen (Jakubowski et al. 2000). Derartige Homocysteinylierungen führen zu Funktionsverlusten, Multimerisierungen sowie Präzipitationen betroffener Proteine und stehen beim Menschen im Zusammenhang von Gefäßerkrankungen (Jakubowski et al. 1999). In *E. coli* wird zwar von einem vergleichbaren Mechanismus ausgegangen, allerdings konnte nachgewiesen werden, dass hohe L-Methionin-Konzentrationen eine unspezifische Beladung entsprechender Methionyl-tRNA-Synthetasen im hohen Maße kompetitiv hemmen (Jakubowski et al. 1990). In weiterführenden Arbeiten konnte die wachstumshemmende und toxische Wirkung von L-Homocystein in *E. coli* auf eine gestörte *de novo* Synthese verzweigtkettiger Aminosäuren zurückgeführt werden. Diese basiert hauptsächlich auf einer Inhibition der Threonin-Deaminase (IlvA) durch L-Homocystein, welche L-Threonin zu α -Ketobutyrat abbaut und das Eingangsenzym zur L-Isoleucin-Synthese darstellt (Tuite et al. 2005). Innerhalb von Enzymassays mit aufgereinigter Threonin-Deaminase aus *E. coli* konnte *in vitro* eine vollständige Inhibition der Enzymaktivität unter Zugabe von $\geq 0,8-1$ mM L-Homocystein bewirkt werden. Eine Umrechnung (s. Kap. 8.9.2.2) der ermittelten intrazellulären L-Homocystein-Konzentrationen innerhalb *E. coli* SPOT01 zeigt, dass der kritische Konzentrationsbereich mit 0,75-1,25 mM bereits erreicht bzw. überschritten ist (Wang et al. 2013). Dies stellt eine konventionelle L-Isoleucin-Synthese auf Basis eines L-Threoninabbaus in Frage (Neidhardt et al. 1996). Das ist insoweit bemerkenswert, da L-Isoleucin das Hauptnebenprodukt von *E. coli* SPOT01 darstellt und innerhalb unlimitierter exponentieller Wachstumsbedingungen bis zu 20% der Gesamtausbeute ausmacht (s. Tab 9.6 und 9.7).

In unabhängigen Arbeiten von Krömer et al. 2006 zur Untersuchung des L-Methionin-Stoffwechsels in *Corynebacterium glutamicum* unter analogen Kultivierungsbedingungen, konnte ein alternativer Weg für die Isoleucin-Synthese ausgehend von Intermediaten der L-Methionin-Synthese aufgezeigt werden. Innerhalb von $\Delta mcbR$ Deletionsmutanten mit vergleichbaren intrazellulären L-Homocystein-Konzentrationen (ca. 3,4 $\mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}$) konnte

durch NMR-Analysen eine drastische Akkumulation der ungewöhnlichen schwefelhaltigen Diaminosäure LL-Homolanthionin ($210 \mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}$) nachgewiesen werden. Anhand von Markierungsstudien konnte aufgezeigt werden, dass die Synthese von LL-Homolanthionin auf einer unspezifischen Umsetzung von OSHS und L-Homocystein durch die Cystathionin- γ -Synthase (MetB) zurückzuführen ist. Die symmetrische Thioether-Verbindung wird anschließend durch eine unspezifische Umsetzung durch die Cystathionin- β -Lyase (MetC) erneut zu L-Homocystein abgebaut. Im Gegensatz zur konventionellen Umsetzung des asymmetrischen Thioethers LL-Cystathionin entsteht hierbei anstelle von Pyruvat α -Ketobutyrat, das wiederum ein wichtiger Vorläufermetabolit innerhalb der L-Isoleucin-Synthese darstellt (Uren 1987). Ein derartiges metabolisches Szenario wäre für die Methionin-Synthese in *E. coli* höchst unvorteilhaft, da die Akkumulation von LL-Homolanthionin und eine damit verbundene alternative L-Isoleucin-Syntheseroute unweigerlich zu einem Energie- und Kohlenstoffverlust innerhalb der Methionin-Synthese führen würde (Krömer et al. 2006).

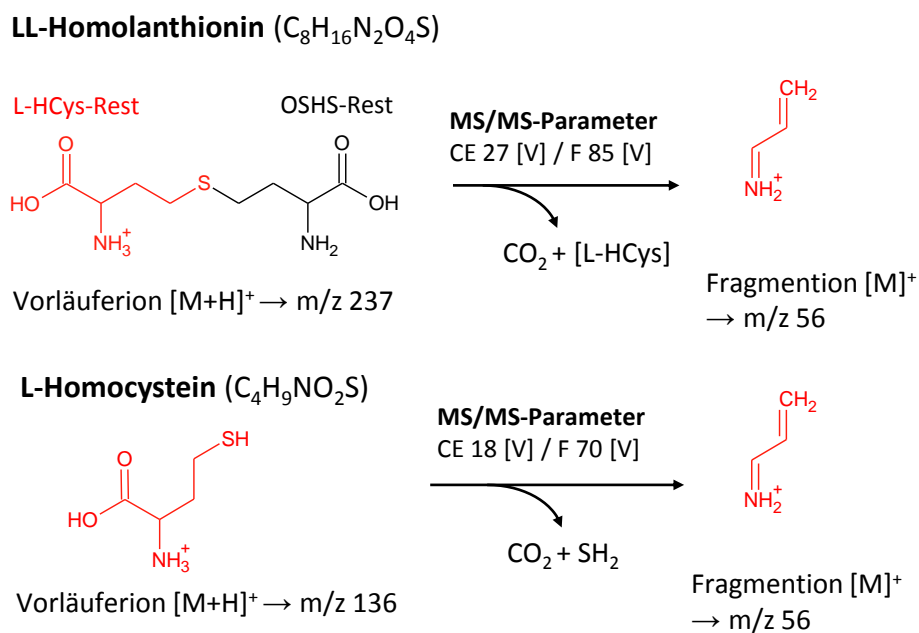


Abbildung 9.14 MS/MS-Parameter zur relativen Quantifizierung des symmetrischen Thioethers LL-Homolanthionin unter Aufführung des analogen Fragmentierungsverhaltens von L-Homocystein.

In Folge wurde eine LC-MS-basierte Quantifizierung von LL-Homolanthionin innerhalb von Metabolomextrakten von *E. coli* SPOT01 angestrebt. Aufgrund nicht erhältlicher kommerzieller Standards konnte lediglich eine relative Quantifizierung des ungewöhnlichen Metabolits anhand der optimierten HILIC-ESI-MS/MS-Methode zu analogen MS/MS-

Parametern von LL-Cystathionin erfolgen (s. Abb. 9.14). Auch wenn dadurch keine absolute Konzentrationsangaben möglich waren, konnte im Vergleich zur Responsivität von LL-Cystathionin eine Akkumulation von LL-Homolanthionin in signifikant hohen Konzentrationen nachgewiesen werden. Der langfristige relative Konzentrationsverlauf (*Extracted Ion Count*, EIC) korreliert hierbei mit der Zunahme des L-Homocysteinpools in der fortgeschrittenen Kultivierungsphase und wurde unter einer Normalisierung mit dem Internstandard L-Norvalin in der Abbildung 9.13 mitaufgeführt. In *E. coli* konnte eine LL-Homolanthion-Akkumulation bereits innerhalb für L-Methionin auxotrophen Deletionsmutanten der Methioninsynthase (MetE/H) nachgewiesen werden (Huang et al. 1963). Basis für den Akkumulationszyklus bildet die vergleichsweise geringe Substratspezifität des Transsulfurierungsenzym Cystathionin- γ -Synthase (MetB). In *C. glutamicum* liegen die K_m -Werte von MetB bei 260 μ M für L-Cystein und 540 μ M für L-Homocystein (Krömer et al. 2006). Auch wenn Vergleichswerte für *E. coli* fehlen ist aufgrund des starken Übergewichts an L-Homocystein (hier bis zu 21-facher Überschuss) von einer unspezifischen Umsetzung auszugehen. Untermuert wird diese Einschätzung, dass aufgrund einer offensichtlichen Unterversorgung von L-Cystein der Produktionsstamm nach einem Weg sucht überflüssiges OSHS abzubauen, was sich letztlich in einer Ausschleusung von OSHS widerspiegelt (zweithäufigstes Nebenprodukt). Die Cystathionin- β -Lyase (MetC) besitzt in *E. coli* eine vergleichsweise höhere Affinität zu LL-Cystathionin (K_m 0,18 mM) (Lodha et al. 2010) als zu LL-Homolanthionin (K_m 4,54 mM) (Dwivedi et al. 1982). In diesem Zusammenhang wird die zeitverzögerte verstärkte Bildung von L-Isoleucin (nach ca. 6 h Kultivierungszeit) begreiflich, da offensichtlich zunächst eine kritische Akkumulationskonzentration an LL-Homolanthionin erreicht werden muss, damit die alternative L-Isoleucin-Synthese einsetzen kann. Inwieweit der beschriebene Akkumulationszyklus der gezielten Detoxifikation überschüssiger L-Homocystein-Konzentrationen dient kann nicht abschließend beurteilt werden. Allerdings scheint die unspezifische Umsetzung in ein vergleichsweise schwer spaltbares Akkumulationsprodukt den Anstieg intrazellulärer L-Homocystein-Konzentrationen zu verlangsamen. Das abgeleitete metabolische Szenario wurde anhand einer erweiterten schematischen Darstellung der L-Methionin-Synthese in *E. coli* SPOT01 zusammengefasst (s. Abb. 9.15).

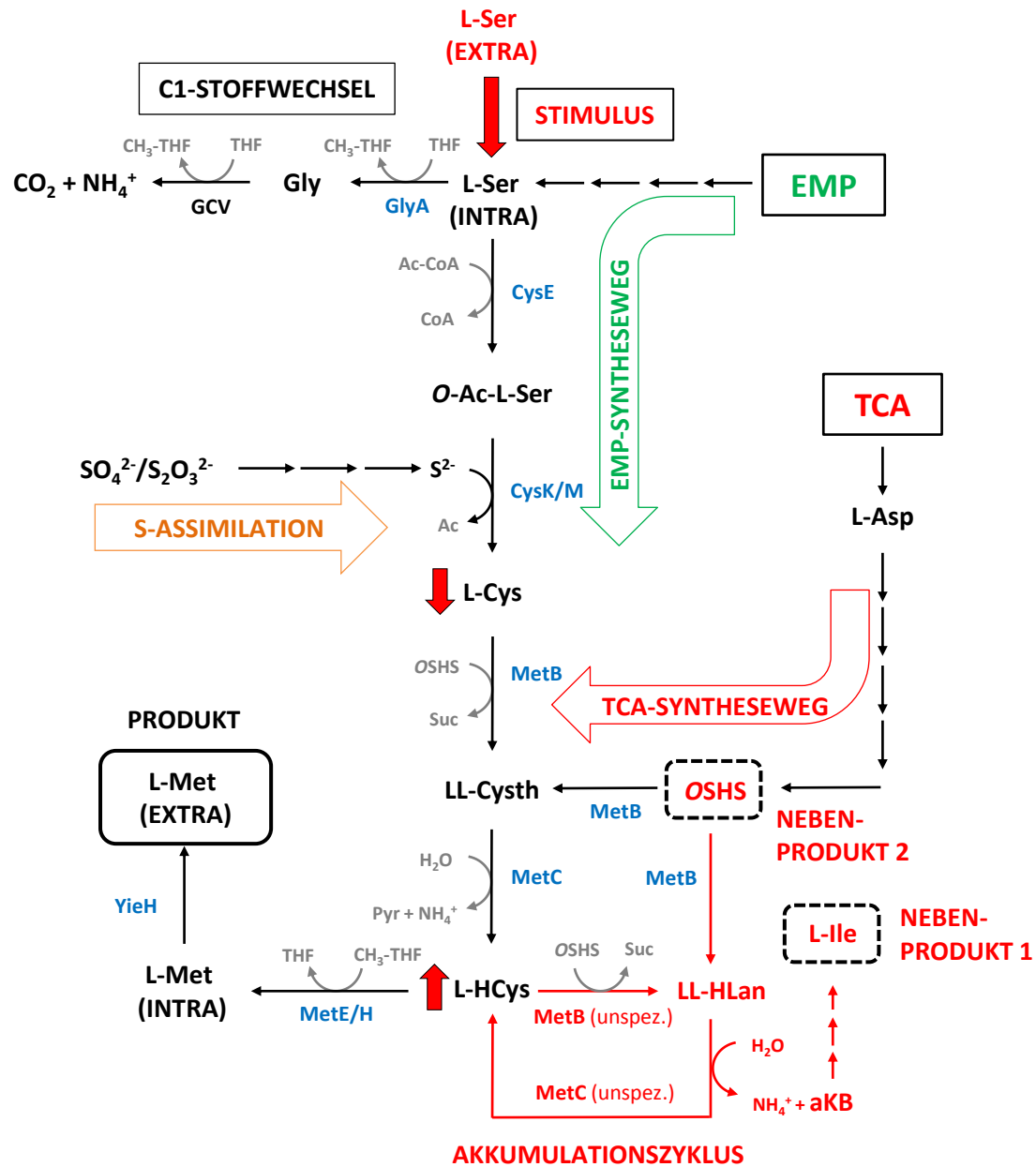


Abbildung 9.15 Metabolische Situation der L-Methionin-Synthese in *E. coli* SPOT01 unter Berücksichtigung des L-Homocystein/LL-Homolanthionin-Akkumulationszyklus (unpezifische Detoxifikation) und Bildung der Haupt-Nebenprodukte L-Isoleucin und O-Succinyl-L-Homoserin. (Quelle: eigene Darstellung, in Anlehnung an Neidhardt et al. 1996 und Krömer et al. 2006)

9.3.2.2 Stimulus-induzierte intrazelluläre Perturbationsprofile

Die adaptierten Stimulus-Response-Experimenten (SRE I-III) bildeten die Basis für eine aussagekräftige metabolische Auslenkung des gesamten L-Methionin-Synthesenetzwerks innerhalb prozessrelevanter Kultivierungsbedingungen. Unter Verwendung von $[U^{12}C]$ -L-Serin als Stimulus-Substrat wurden insbesondere Metabolite des EMP-Synthesewegs (s. Abb. 9.15 und 9.19) fokussiert. In den Abbildungen 9.16-18 wurden Konzentrationsdynamiken innerhalb der Perturbationsphase von SRE I-III für 12 exemplarische Metabolite des EMP-Synthesewegs sowie direkt abzweigender Routen aufgezeigt. Der L-Serin-Puls erfolgte bei $t = 10$ min mit einer ausgelegten Stimulusphase von 20 min, die entsprechend markiert wurde (rot gestrichelte Linien). Die Bestimmung instationärer Konzentrationsdynamiken basierte auf vier intrazelluläre Probenahmen ($n=4$) pro Zeitpunkt in Abständen von $\Delta t = 2$ min.

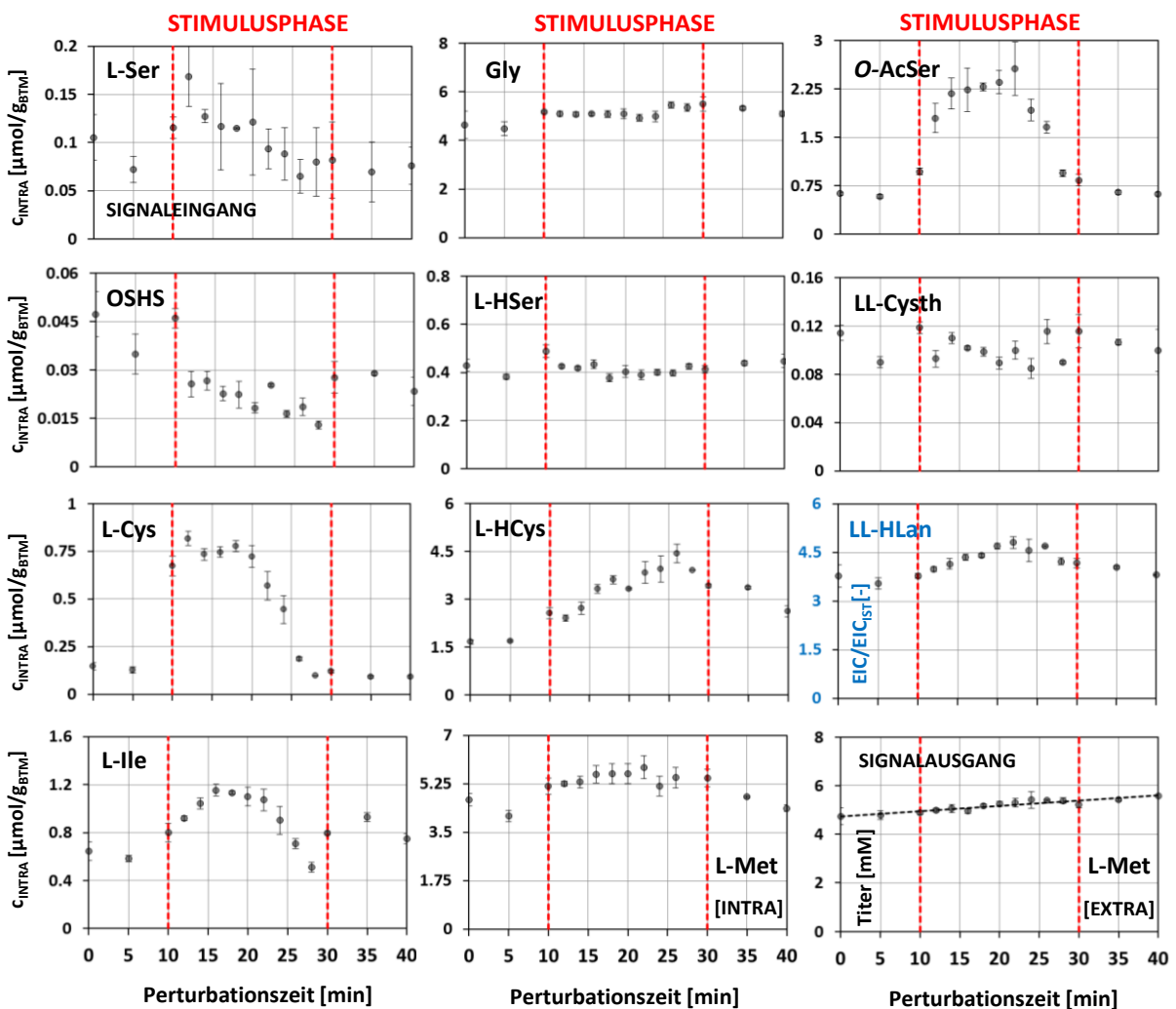


Abbildung 9.16 Stimulus-induzierte Perturbationsprofile von Metaboliten des L-Methionin-Synthesenetzwerks aus SRE I (Batch-Phase, 5,5 h) innerhalb von Fed-Batch-Fermentationen von *E. coli* SPOT01.

Trotz der beabsichtigten Konzentrationsdynamik konnten mit der adaptierten Perturbations- und Beprobungsstrategie relative Standardabweichungen größtenteils unterhalb von 20% erzielt werden. Eine Ausnahme stellte der intrazelluläre L-Serin-Pool dar (Signaleingang), der als Knotenpunkt innerhalb des anabolen Netzwerksystems unter gleichzeitiger Umsetzung mehrerer nachgeschalteter Enzyme einen variableren Verlauf aufwies. Für die verschiedenen Prozessphasen konnte eine vergleichbare dynamische Systemantwort innerhalb des untersuchten Reaktionsnetzwerks erzielt werden. Die ausgeprägtesten Konzentrationsanreicherungen konnten für Metabolite entlang des EMP-Synthesewegs erzielt werden. Hierbei wiesen der *O*-Acetyl-L-Serin- (*O*-Ac-Ser) und der L-Cystein-Pool (L-Cys) die stärksten Konzentrationsauslenkungen auf mit einer Steigerung um 390-450% bzw. 390-650%. Metabolitpools direkt abzweigender Routen zeigten vergleichsweise geringere Anreicherungen.

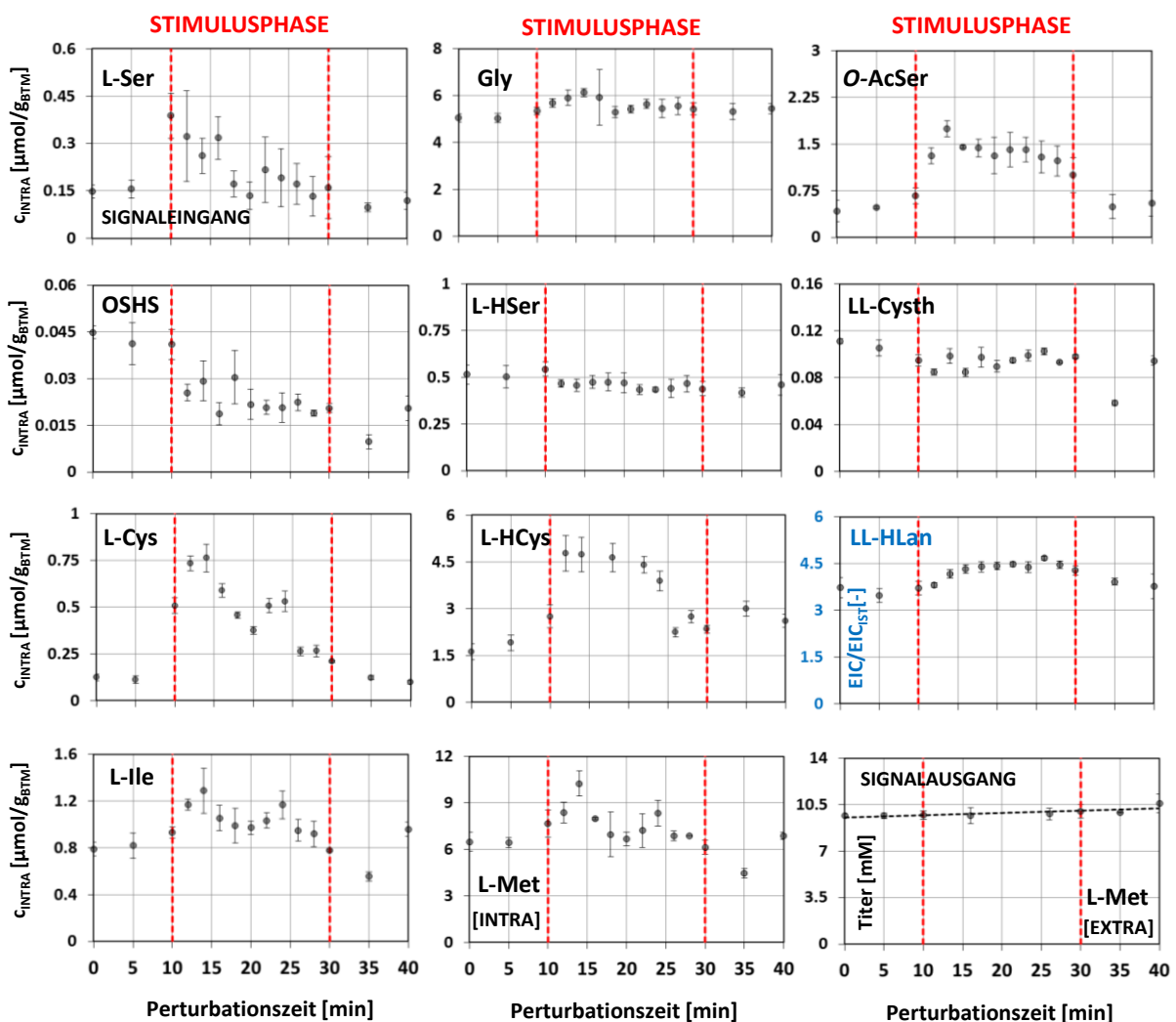


Abbildung 9.17 Stimulus-induzierte Perturbationsprofile von Metabolite des L-Methionin-Synthesenetzwerks aus SRE II (Fed-Batch-Phase, 9,5 h) innerhalb von Fed-Batch-Fermentationen von *E. coli* SPOT01.

Im Falle von *O*-Succinyl-L-Homoserin (OSHS) konnte darüberhinaus eine Stimulus-induzierte Poolabnahme um 60-70% festgestellt werden. Das ist konsistent mit der kurzzeitig gesteigerten L-Cystein-Verfügbarkeit und deckt sich mit dem beobachteten OSHS-Überschuss, der zu einer Ausschleusung des Metabolits führt. Auch für den intrazellulären L-Methionin-Pool (L-Met) konnte ein leicht verzögerter (Δt 4-6 min) Poolanstieg um 35-59% erzielt werden. Aufgrund der festgestellten Akkumulationssituation bezüglich L-Homocystein (L-HCys) erscheint hier ein regulatorischer Einfluss durch eine kurzfristige Erhöhung der L-Serin-Verfügbarkeit sehr wahrscheinlich. Neben seiner Funktion als Vorläufermetabolit der L-Methionin-Synthese stellt L-Serin das zentrale Donorsubstrat innerhalb des C1-Stoffwechsels dar. Dies stellt insbesondere die Transmethylierungskapazität als möglichen limitierenden Faktor in den Vordergrund.

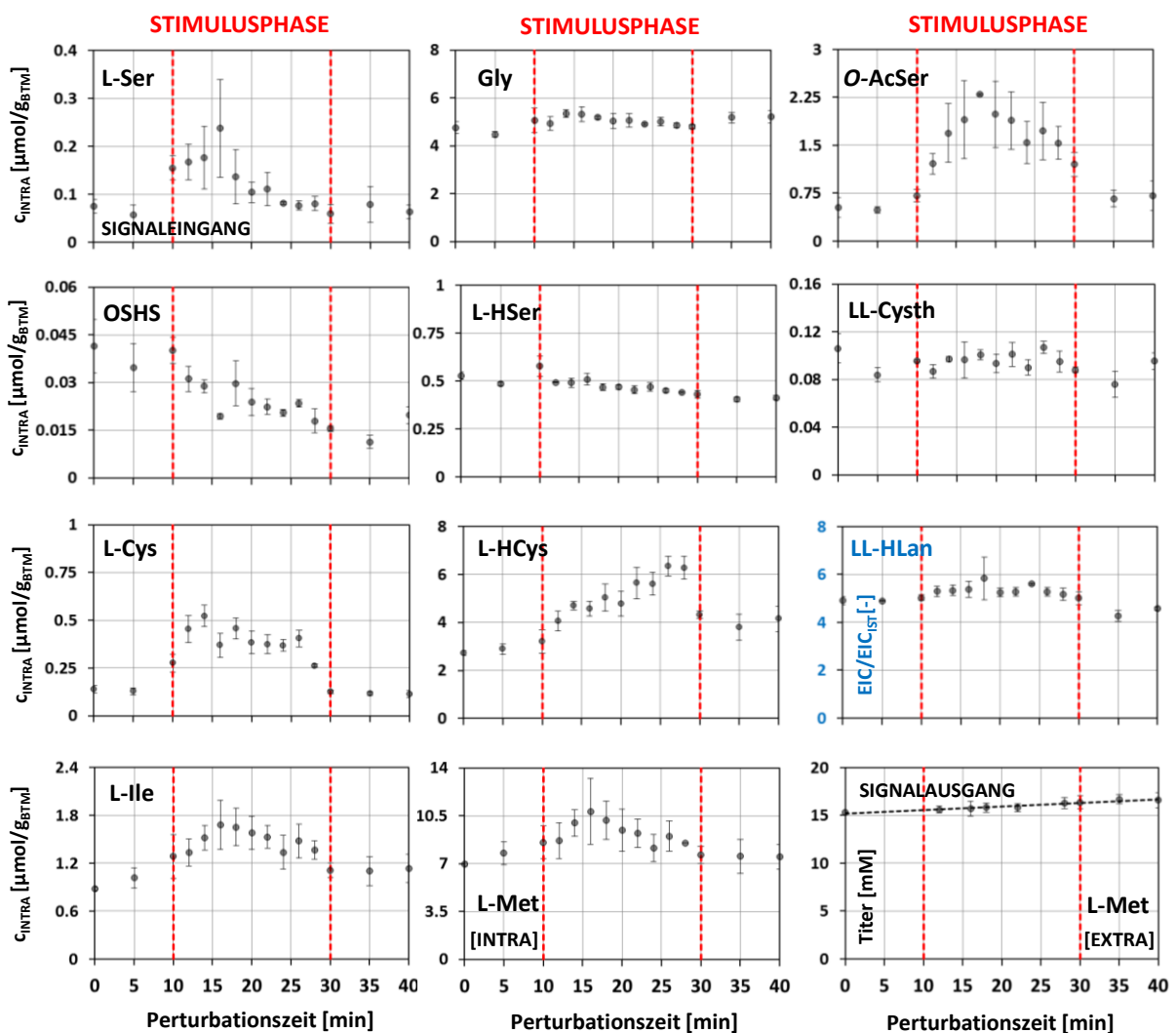


Abbildung 9.18 Stimulus-induzierte Perturbationsprofile von Metaboliten des L-Methionin-Synthesenetzwerks aus SRE III (Fed-Batch-Phase, 13,5 h) innerhalb von Fed-Batch-Fermentationen von *E. coli* SPOT01.

Anhand der angegebenen MS/MS-Parameter (s. Abb. 9.14) erfolgte zusätzlich eine relative Bestimmung (EIC normalisiert mit dem Internstandard L-Norvalin) des Akkumulationsprodukts LL-Homolanthionin (LL-HLan). Hierbei konnte eine übereinstimmende kurzfristige Konzentrationssteigerung um ca. 30% erzielt werden. Dies korreliert mit einer Steigerung der L-Isoleucin-Konzentration (L-Ile) um ca. 60-80%. Als Ausgangspunkt der L-Isoleucin-Synthese zeigt der L-Homoserin-Pool allerdings keine signifikante Konzentrationszunahme. Dies unterstützt die Einschätzung einer alternativen L-Isoleucin-Synthese unter Abbau von LL-Homo-Lanthionin (s. Abb. 9.13). Zusätzlich wurde der Verlauf des extrazellulären L-Methionin-Titers (Signalausgang) innerhalb der SRE aufgezeigt. Aufgrund der enormen Konzentrationsunterschiede zwischen intra- und extrazellulären L-Methionin (z.B. SRE I \rightarrow $n_{\text{EXTRA}}/n_{\text{INTRA}} = 790$) unter Produktionsbedingungen, war eine mögliche Beeinflussung der spezifischen L-Methionin-Syntheserate innerhalb der jeweiligen Stimulusphasen analytisch allerdings nicht zugänglich (s. Kap. 9.2.4).

9.4 Daten-Analyse von SRE unter Verwendung von [U¹²C]-L-Serin

Die aus den Stimulus-Response-Experimenten (SRE) resultierenden dynamischen Konzentrationsprofile wurden für eine umfassende Datenanalyse im Rahmen der Metabolischen Kontrollanalyse (MCA) verwendet. Ziel war die Ableitung von *in vivo* Kinetiken und Regulationsmechanismen innerhalb des betrachteten metabolischen Netzwerks. Hierzu wurde ein modellbasierter Ansatz unter Verwendung einer LinLog-Kinetik (s. Kap. 8.12.2) und ein rein datenbetriebener Ansatz unter Verwendung des PEC-Kriteriums (s. Kap. 8.12.3) verfolgt. Darüberhinaus wurden bestehende Datensätze hinsichtlich ihrer Informationsreichhaltigkeit statistisch analysiert (s. Kap. 8.12.5).

9.4.1 Metabolische Kontrollanalyse (MCA) anhand des LinLog Ansatzes

Als Grundlage für die modellbasierte Analyse instationärer Datensätze diene ein vereinfachtes Reaktionsnetzwerk des Methionin-Synthesewegs. Die lineare Reaktionssequenz startet mit dem intrazellulären L-Serin-Pool (Signaleingang) und endet im extrazellulären L-Methionintiter (Signalausgang). Hierbei werden sechs Reaktionsschritte bzw.

Enzyme mit fünf abhängigen und zwei unabhängigen Metabolitpools berücksichtigt (s. Abb. 9.19). Im Rahmen der Metabolischen Kontrollanalyse (MCA) wurden Regulationseigenschaften beteiligter Enzyme auf Stoffflussverteilungen innerhalb des betrachteten Reaktionsnetzwerks quantitativ analysiert. Anhand stimulus-induzierter Perturbationsprofile wurden zunächst lokale Kontrollkoeffizienten (Elastizitäten) abgeleitet. Derartige Elastizitäten basieren auf lokalen kinetischen Eigenschaften der jeweiligen Enzyme und beschreiben die normierte Änderung der Reaktionsrate in Abhängigkeit beteiligter Metabolitkonzentrationen (s. Kap. 8.12.1). In diesem Zusammenhang wurden entsprechende Reaktionsraten v mit der Annahme konstanter Enzymkonzentrationen während der Stimulusphase (20 min) unter Verwendung eines approximativen linear-logarithmischen Ansatzes (LinLog) bestimmt (s. Kap. 8.12.2). Entsprechende Elastizitäten wurden MatLab-basiert nach der Methode von Kresnowati et al. 2005 innerhalb eines Zweischrittverfahrens numerisch ermittelt. Zunächst erfolgte eine erste Abschätzung der Elastizitäten mittels linearer Regression (s. Gl. [4.37]).

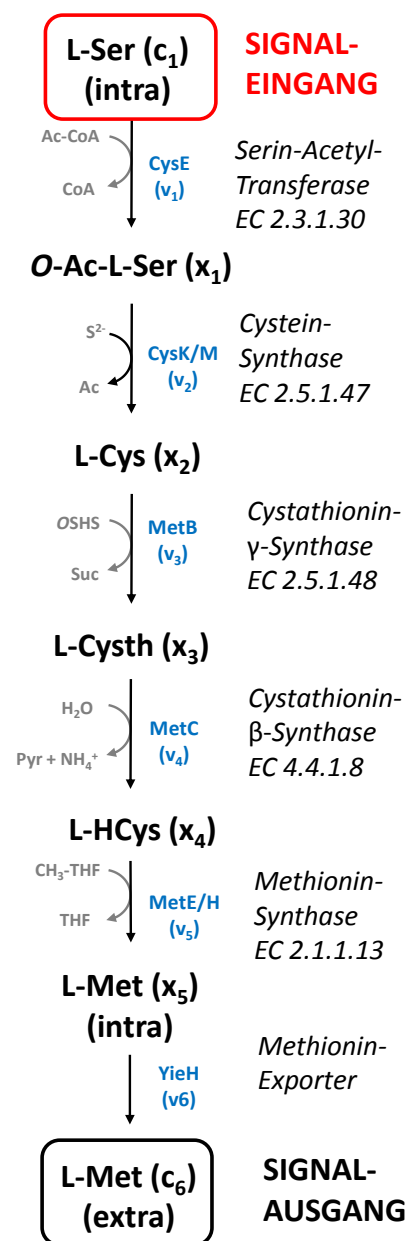


Abbildung 9.19 Lineare Reaktionssequenz zur L-Methionin-Synthese aus L-Serin (EMP-Weg). (Quelle: eigene Darstellung)

Hierzu wurde anhand einer aufgestellten stöchiometrischen Matrix S des betrachteten metabolischen Netzwerks, einer Matrix J^0 der jeweiligen Gleichgewichtsflüsse J_i^0 und der gemessenen stationären und instationären intrazellulären Konzentrationen x_i^0 bzw. $x_i(t)$ entsprechender Metabolite eine Datenmatrix Y aufgestellt. Zugehöriger Gleichgewichtsflüsse wurden anhand der ermittelten spezifischen Produktbildungsrate $q_{L\text{-Met}} 656 \pm 16$ [$\mu\text{mol}/\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h}$] innerhalb der Batch-Phase (0-8h, s. Abb. 9.26/C) berechnet. Intrazelluläre Gleichgewichtskonzentrationen untersuchter Metabolitpools wurden innerhalb von SRE durch Messungen unmittelbar vor Stimuluszugabe berücksichtigt (Prä-Stimulusphase). Instationäre Konzen-

trationsprofile (Stimulusphase) wurden vorab polynomial (cubicinterp, MatLab R2013) oder durch Splinefunktionen (smoothingspline, MatLab R2013) approximiert und interpoliert. Dadurch konnten instationäre Konzentrationen $x_i(t)$ der jeweiligen Metaboliten zu jedem beliebigen Zeitpunkt t ermittelt werden. Hieraus resultierende abgeschätzte Elastizitäten dienten als Startwerte für eine anschließende nicht-lineare Optimierung der lokalen Kontrollkoeffizienten (interior point, MatLab R2013). Berechnete Elastizitäten für die innerhalb verschiedener Prozessphasen einer Fed-Batch-Fermentation durchgeführten Stimulus-Response-Experimente (SRE I-III) wurden in Tabelle 9.9 zusammengefasst (s. Kap. 8.5.1).

Tabelle 9.9 Berechnete Elastizitäten anhand eines LinLog-basierten Modells und SRE I-III innerhalb verschiedener Prozessphasen einer Fed-Batch-Fermentation von *E. coli* SPOT01

SRE I (Batch-Phase / 5,5 h / OD₆₀₀ ca. 5,3)						
		Metabolit (Konzentration)				
Enzym (Rate)		<i>O</i> -Ac-Ser (x_1)	L-Cys (x_2)	LL-Cysth (x_3)	L-HCys (x_4)	L-Met (x_5)
CysE	(v_1)	0.087	-0.0045	0.0082	-0.0032	-0.0106
CysK/M	(v_2)	0.0484	-0.0265	-0.0658	-0.0047	-0.0541
MetB	(v_3)	0.0569	-0.0291	-0.0795	0.0004	-0.0832
MetC	(v_4)	0.0571	-0.0291	-0.079	0.0004	-0.0843
MetH	(v_5)	0.0204	-0.0229	-0.084	0.0158	-0.0026
MetExp	(v_6)	0.0023	-0.011	-0.1465	0.0154	0.0158

SRE II (Fed-Batch-Phase / 9,5 h / OD₆₀₀ ca. 10,3)						
		Metabolit (Konzentration)				
Enzym (Rate)		<i>O</i> -Ac-Ser (x_1)	L-Cys (x_2)	LL-Cysth (x_3)	L-HCys (x_4)	L-Met (x_5)
CysE	(v_1)	-0.0034	0.0027	-0.0145	-0.0002	-0.0012
CysK/M	(v_2)	0.0152	-0.0711	-0.031	0.057	0.0727
MetB	(v_3)	0.0195	-0.0976	-0.0748	0.0739	0.1066
MetC	(v_4)	0.0194	-0.0969	-0.0756	0.073	0.1063
MetH	(v_5)	0.1121	-0.1742	0.5153	0.1866	0.1418
MetExp	(v_6)	0.0612	-0.3989	-0.6341	0.2839	0.3046

SRE III (Fed-Batch-Phase / 13,5 h / OD₆₀₀ ca. 17,2)						
		Metabolit (Konzentration)				
Enzym (Rate)		<i>O</i> -Ac-Ser (x_1)	L-Cys (x_2)	LL-Cysth (x_3)	L-HCys (x_4)	L-Met (x_5)
CysE	(v_1)	0.0149	-0.0078	0.27	-0.0188	-0.0095
CysK/M	(v_2)	0.0836	-0.0845	0.1808	-0.0364	-0.0911
MetB	(v_3)	0.0877	-0.0957	0.0574	0.0024	-0.0685
MetC	(v_4)	0.0865	-0.0957	0.0535	0.0051	-0.0668
MetH	(v_5)	0.0743	-0.166	-0.6179	0.2255	0.1341
MetExp	(v_6)	0.2115	-0.417	0.4449	0.0247	0.2624

Aufgeführt ist der Einfluss abhängiger Metabolitkonzentrationen auf Reaktionsraten bzw. Enzyme der betrachteten linearen Reaktionssequenz innerhalb des L-Methionin-Synthesenetzwerks. Einträge unterhalb der Diagonalen der Elastizitätsmatrix (fett markiert) beschreiben den Einfluss der Metabolitpools als Substrate auf zugehörige Reaktionsraten bzw. Enzyme. In diesem Zusammenhang beschreiben positive Elastizitäten eine Steigerung der Reaktionsraten bei Zunahme der jeweiligen Substratkonzentrationen. Ein derartiges Verhalten wird übereinstimmend für aller drei SRE für die Substratpools *O*-Acetyl-L-Serin, L-Homocystein und L-Methionin beschrieben. Hingegen beschreiben negative Elastizitäten ein Absinken der Reaktionsraten bei Zunahme der jeweiligen Substratkonzentrationen. Derartige Substratinhibierungen werden größtenteils für die Substrate L-Cystein und LL-Cystathionin beschrieben. Eintragungen oberhalb der Matrixdiagonalen beschreiben den Einfluss der Metabolitpools als Produkte auf ihre jeweiligen Reaktionsraten bzw. Enzyme. Weitere Eintragungen beschreiben in Abhängigkeit ihres Vorzeichens Einflüsse der Metabolitpools als Aktivatoren oder Inhibitoren auf die jeweiligen Reaktionsraten. Beispielsweise werden innerhalb von SRE I und SRE III mit Ausnahme der Methionin-Synthase (MethH) ausgeprägte Rückkopplungsinhibierungen durch eine Zunahme des L-Methioninpools beschrieben, welche sich mit der bekannten allosterischen Regulation innerhalb des Synthesewegs weitgehend decken (s. Kap. 7.2.5). Resultate aus SRE II bilden dieses erwartbare Regulationsverhalten nur unzureichend ab.

Die innerhalb der SRE gemessenen dynamischen Konzentrationsprofile konnten durch das LinLog-Modell weitgehend simuliert werden. Die aus den Elastizitäten von SRE I-III berechneten Modellverläufe (blau) sind in Abbildung 9.20 zusammengefasst. Gleichzeitig werden die entsprechenden Interpolationsfunktionen der gemessenen instationären Konzentrationen (rot) mitaufgeführt. Allerdings konnten trotz der damit verbundenen Approximation der Messdaten auffällige Oszillationen der Perturbationsprofile durch die LinLog-Kinetik nicht hinreichend beschrieben werden. Besonders ausgeprägt ist dieses Verhalten beim intrazellulären L-Methioninpool. Die besten Übereinstimmungen konnten in diesem Zusammenhang für SRE I und SRE III erzielt werden. Innerhalb von SRE II waren größere Abweichungen insbesondere für die Konzentrationsdynamiken von *O*-Acetyl-L-Serin, L-Cystein und LL-Cystathionin feststellbar.

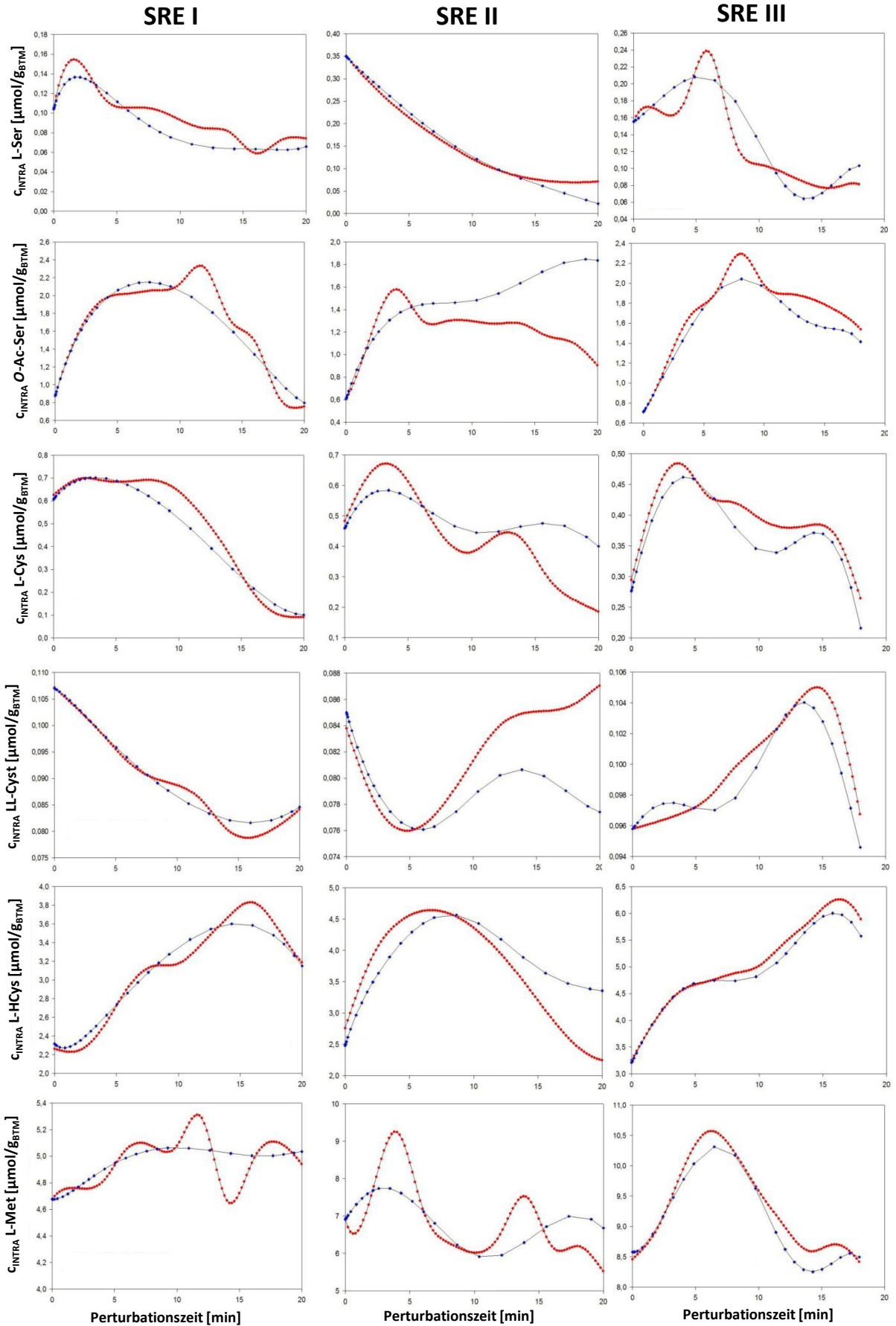


Abbildung 9.20 Interpolationsfunktionen gemessener instationärer Metabolitkonzentrationen (rot) und berechnete LinLog-Modellverläufe (blau) innerhalb der Stimulusphasen von SRE I-III.

Aus den ermittelten lokalen Kontrollkoeffizienten wurden zugehörige globale Flusskontrollkoeffizienten (FCC) abgeleitet (s. Gl. [8.26] und [8.28]) und in Tabelle 9.10 zusammengefasst. FCC beschreiben die normierten Änderungen der Reaktionsraten in Abhängigkeit der jeweiligen Enzymkonzentrationen (s. Kap. 8.12.1). In diesem Zusammenhang repräsentieren hohe FCC Enzyme mit hoher Kontrolle auf den Gesamtfluss. Niedrige FCC repräsentieren hingegen Enzyme mit geringer Kontrolle auf den Gesamtfluss. Im direkten Vergleich untereinander beschreiben somit derartige FCC den Grad der Kontrolle beteiligter Enzyme auf die Flussverteilung innerhalb des untersuchten Netzwerks auf systemischer Ebene (Fell 1992).

Tabelle 9.10 Berechnete Flusskontrollkoeffizienten (FCC) anhand SRE I-III innerhalb verschiedener Prozessphasen einer Fed-Batch-Fermentation von *E. coli* SPOT01

Enzym (Rate)		Flusskontrollkoeffizienten (FCC)		
		SRE I	SRE II	SRE III
CysE	(v_1)	1.25	0.7101	1.0054
CysK/M	(v_2)	-1.04	0.8521	0.3276
MetB	(v_3)	17.76	-10.5087	-9.3208
MetC	(v_4)	-16.96	9.9287	8.9687
MetH	(v_5)	-0.13	0.0104	0.0375
MetExp	(v_6)	0.13	0.0074	-0.0184

Bei einem Vergleich der ermittelten Kontrollkoeffizienten der drei SRE innerhalb verschiedener Prozessphasen wird deutlich, dass teilweise ein deutlich anderes Enzymverhalten beschrieben wird. Hierbei ist allerdings nicht auszuschließen, dass einige ermittelte Elastizitätskoeffizienten lediglich durch zufällige mathematische Zusammenhänge beliebiger Stichproben hätten zu Stande kommen können und somit zu verzerrten Flusskontrollkoeffizienten führen. In diesem Zusammenhang wurde der Informationsgehalt der ermittelten instationären Datensätze anhand einer Fisher-Informationsmatrix (FIM, s. Kap. 8.12.5) näher untersucht. Die Eigenwertbetrachtung der FIM führte abhängig vom zu modellierenden SRE zu großen Konditionszahlen zwischen $5,9 \cdot 10^5$ und $6,6 \cdot 10^6$. Dies deutet auf eine lang gestreckte Form des Konfidenzintervalls und eine schlechte Identifizierbarkeit einiger Parameter bzw. Elastizitäten hin (Kresnowati et al. 2005). Auch wenn nur eine begrenzte Anzahl der berechneten Elastizitätskoeffizienten aufgrund einer ausgeprägten linearen Abhängigkeit fehlerbehaftet ist, führt die Ableitung globaler Flusskontrollkoeffizienten

auf Basis des gesamten Datensatzes dennoch zu verzerrten Werten. Den abgeleiteten globalen Kontrollkoeffizienten konnte somit nur eine geringe Validität beigemessen werden.

9.4.2 Metabolische Kontrollanalyse (MCA) anhand des PEC Ansatzes

Ausgehend von der linearen Reaktionssequenz des L-Methionin-Synthesewegs (s. Abb. 9.19) wurden die resultierenden Konzentrationsdynamiken alternativ mit einem rein datenbetriebenen Ansatz zur Identifizierung von Enzymen mit hoher Flusskontrolle weiter untersucht. Der Ansatz basiert auf dem direkten Vergleich maximaler Netto-Ausflussraten (*Pool Efflux Capacities, PEC*) untersuchter Metabolitpools innerhalb eines perturbierten intrazellulären Reaktionsnetzwerk (s. Kap 8.12.3). Analog zu den Elastizitätskoeffizienten basieren entsprechende PEC-Werte auf lokalen kinetischen Eigenschaften der jeweiligen Enzyme, berücksichtigen jedoch vereinfachend lediglich die maximal möglichen Reaktionsraten direkt nachgeschalteter Enzyme. Auf Grundlage dynamischer Konzentrationsprofile wurden hierzu standardisierte Poolgeschwindigkeiten innerhalb der Stimulusphasen (0-20 min) von SRE I-III in den entsprechenden Probennahmeintervalle (Δt 2 min) bestimmt. Als Referenzzustand wurden die unmittelbar vor Stimuluszugabe ermittelten Gleichgewichtskonzentrationen der jeweiligen Metabolitpools verwendet. Die zeitlichen Verläufe standardisierter Poolgeschwindigkeiten untersuchter Metabolitpools innerhalb der Perturbationsphasen von SRE I-III wurden in Abbildung 9.21 zusammengefasst. Die aufgezeigten dynamischen Geschwindigkeitsverläufe basieren in direkter Folge auf der adaptierten Perturbationsstrategie. Innerhalb der initialen Stimulusphase wurden hierbei größtenteils positive standardisierte Poolgeschwindigkeiten ermittelt, die auf schnelle Poolzunahmen entsprechender Metabolite verweisen und im direkten Zusammenhang zur angestrebten Überladung des gesamten Netzwerksystems stehen (Influxphase). In Folge verschieben sich die stark oszillierenden Geschwindigkeitsverläufe in Richtung negativer Werte und verweisen auf schnelle Poolabnahmen entsprechender Metabolite (Effluxphase) (s. Abb. 7.15). In diesem Zusammenhang wurden insbesondere innerhalb der *O*-Acetyl-L-Serin- und der L-Cystein-Pools die ausgeprägtesten Perturbationen in den Poolgeschwindigkeiten ermittelt. Durch den Vergleich der Beträge maximaler Netto-Ausflussraten (PEC) entsprechender Metabolitpools innerhalb der betrachteten Reaktionskaskade konnte der Grad der Flusskontrolle nachgeschalteter Enzyme bestimmt werden.

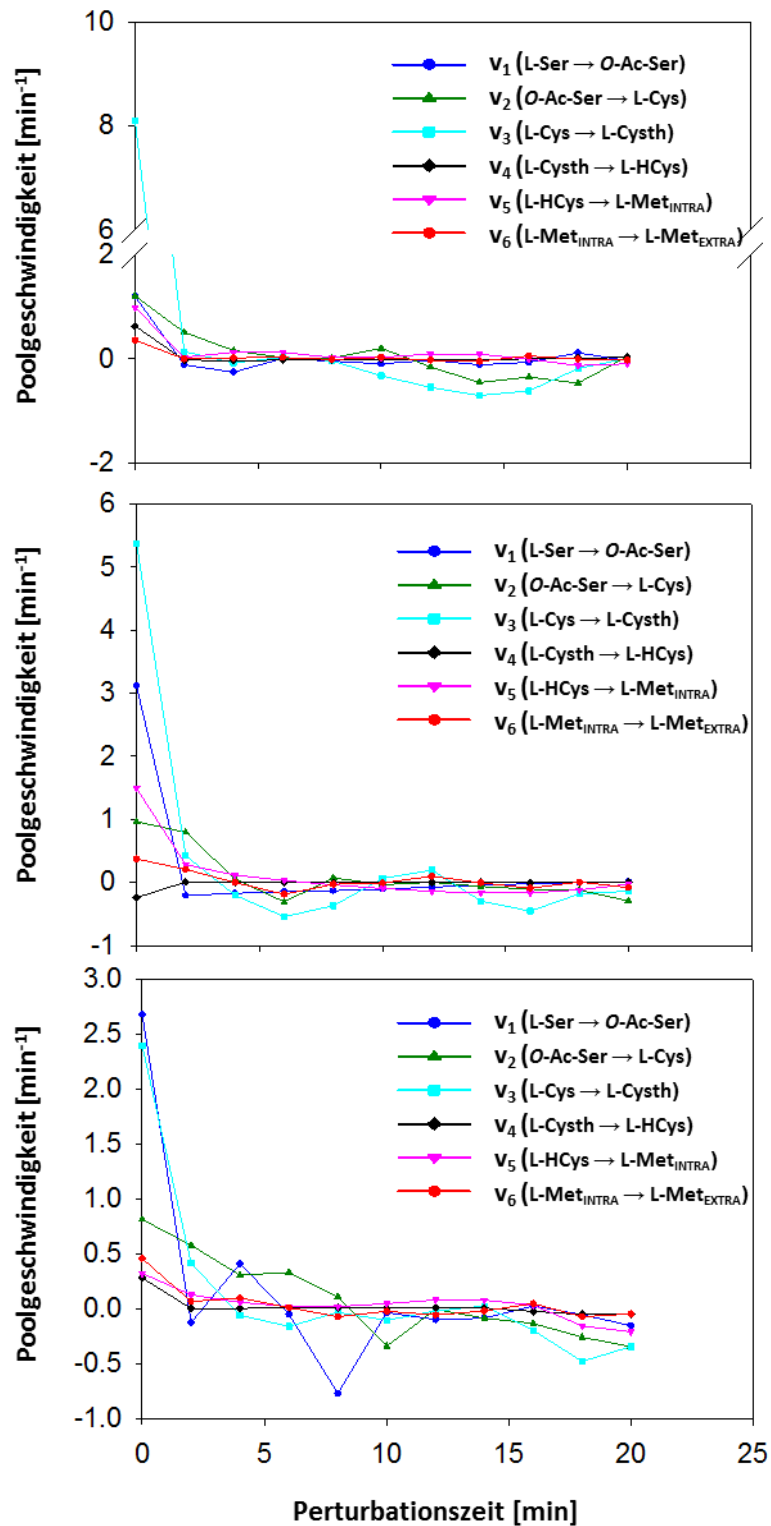


Abbildung 9.21 Standardisierte Poolgeschwindigkeiten innerhalb der Perturbationsphasen von SRE I-III.

Das PEC-Kriterium ermöglicht zwar im Gegensatz zu modellbasierten Ansätzen einen direkten Zugang zu Kontrolleigenschaften untersuchter Enzyme, ist aber stark fehleranfällig gegenüber Messwert-Ausreißern ermittelter instationärer Metabolitkonzentrationen. In diesem

Zusammenhang wurde resultierende Perturbationsprofile basierend auf Quadruplikaten (n=4) untereinander verglichen und hinsichtlich möglicher „Ausreißer“ gefiltert. Eingesetzte gemittelte Konzentrationsprofile basierten auf mindestens drei Replikaten pro Zeitpunkt (n=3) und wiesen eine adäquate Reproduzierbarkeit auf. Mit Ausnahme des hoch-volatilen L-Serin-Pools (Signaleingang) konnten hierbei Standardabweichungen unterhalb von 20% erzielt werden. Die innerhalb SRE I-III ermittelten PEC-Werte für sechs intrazelluläre Pools wurden in Abbildung 9.22 zusammengefasst. Mit Ausnahme von L-Serin werden die betrachteten Analyten hauptsächlich durch ein bestimmtes nachgeschaltetes Enzym umgesetzt. Im Falle von intrazellulärem L-Serin ist von einer zusätzlichen Umsetzung des Pools durch die Hydroxymethyl-Transferase (GlyA) und der Serin-Dehydratase (SdaA) auszugehen (s. Abb. 9.30). In Folge können die tatsächlichen PEC-Werte für die Serin-Acetyltransferase (CysE) signifikant von den ermittelten PEC-Werten abweichen. Die Kondensationsreaktion zwischen O-Succinyl-L-Homoserin und L-Cystein durch die Cystathionin- γ -Synthase (MetB) erfolgt in diesem Zusammenhang weitgehend irreversibel, so dass die Abzweigung weitestgehend vernachlässigt werden kann. Der konstante Konzentrationsabfall innerhalb des O-Succinyl-L-Homoserin-Pools während der Perturbationsphasen bestätigt diese Annahme zusätzlich (s. Abb. 9.16-18).

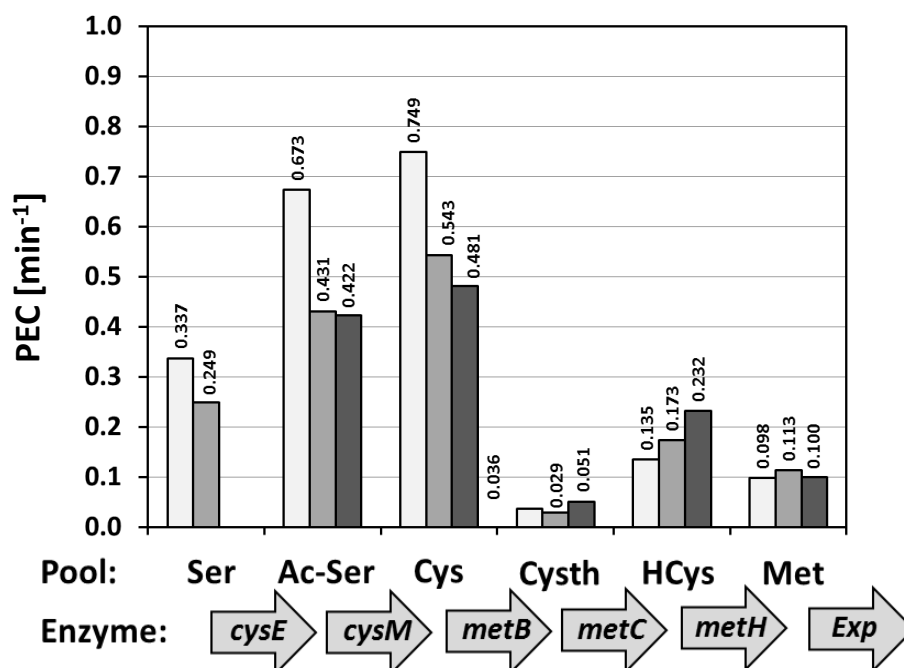


Abbildung 9.22 Ermittelte PEC-Werte (maximale Netto-Ausflussraten) innerhalb von SRE I-III perturbierter intrazellulärer Metabolitpools unter Aufführung nachgeschalteter beteiligter Enzyme in Form genetischer Notationen (Targets für zielgerichtete Stammoptimierungen).

Innerhalb der Perturbationsphasen der durchgeführten SRE konnte eine gute Übereinstimmung bezüglich der ermittelten PEC-Werte nachgeschalteter Enzyme erzielt werden. Für SRE III konnten allerdings für den L-Serin-Pool Ausreißer nicht zweifelsfrei entfernt werden, so dass in diesem Fall für die Serin-Acetyltransferase (CysE) keine valide Angabe erfolgen konnte. Im direkten Vergleich sind niedrige PEC-Werte mit geringen enzymatischen Elastizitäten gekoppelt und deuten auf Enzyme mit hoher Flusskontrolle hin (Oldiges et al. 2004). Durch die PEC-Analyse konnten innerhalb der untersuchten Reaktionssequenz drei Enzyme mit vergleichsweise hoher Flusskontrolle identifiziert werden. Für die Cystathionin- β -Lyase (MetC) konnte der vergleichsweise geringste PEC-Wert mit durchschnittlich $0,04 \text{ min}^{-1}$ ermittelt werden. Die geringe Effluxrate ist hierbei mit hoher Wahrscheinlichkeit eine direkte Folge der ausgeprägten Akkumulation innerhalb des direkt nachgeschalteten L-Homocystein-Pools (s. Kap. 9.3.2.1). Auch für die Methioninsynthase (MetH) und für das L-Methionin-Exportersystem (YjeH) konnten übereinstimmend geringe PEC-Werte mit durchschnittlich $0,18 \text{ min}^{-1}$ bzw. $0,10 \text{ min}^{-1}$ festgestellt werden. Beim noch nicht näher charakterisierten Exportersystem wird von einer Induktion in Abhängigkeit hoher intrazellulärer L-Methionin-Konzentrationen ausgegangen (Liu et al. 2015), so dass das Ergebnis als methodische Konsequenz der eingesetzten Perturbationsstrategie gewertet wird. Die hohe Flusskontrolle durch die Methioninsynthase basiert entweder auf deren kinetischen Eigenschaften oder einer limitierenden Transmethylierungskapazität. In Verbindung mit der globalen metabolischen Situation (Akkumulationszyklus L-Homocystein/LL-Homolanthionin) war eine präzisere Aufklärung des finalen Transmethylierungsschritts von L-Homocystein zu L-Methionin von besonderem Interesse. Im Gegensatz hierzu zeigten insbesondere die Cystein-Synthase (CysM) und Cystathionin- γ -Synthase (MetB) mit durchschnittlich $0,5 \text{ min}^{-1}$ bzw. $0,6 \text{ min}^{-1}$ hohe PEC-Werte und stellen somit flexible Knotenpunkte mit vergleichsweise geringer Flusskontrolle dar.

9.4.3 Metabolische Kontrollanalyse (MCA) für die rationale Stammentwicklung

Ein übergeordnetes Ziel dieser Arbeit lag in der Ergänzung der bisherigen qualitativ-mechanistischen Erkenntnisse der L-Methionin-Synthese in *E. coli* durch dynamisch-quantitative Analysen auf Basis der Metabolischen Kontrollanalyse (MCA). Innerhalb eines voroptimierten Produzenten (*E. coli* SPOT01) konnten unter produktionsnahen Bedingungen adaptierte Stimulusstrategien entwickelt werden, die eine signifikante und aussagekräftige

Perturbation des hochverzweigten anabolen Netzwerks ermöglichen. Die reproduzierbaren instationären Datensätze konnten hierbei vergleichend unter Verwendung eines LinLog-basierten Modells oder der PEC-Analyse ausgewertet werden. Die derzeit allgemein anerkannte Methode zur Identifizierung von intrazellulären Stoffwechsellimitierungen hinsichtlich eines Zielprodukts ist die metabolische Kontrollanalyse (MCA) (Stephanopoulos et al. 1999). Sie ist eine Berechnungsmethode, die modellgestützt Kontrolleinflüsse (Koeffizienten) beteiligter Enzyme auf die zu optimierenden Zielflüsse auf systemischer Ebene quantifiziert (Bowden et al. 1999). In Kombination mit der molekularbiologischen Modifikation limitierender Enzyme (*Targets*) stellt sie somit ein wichtiges Werkzeug für zielgerichtete Stammoptimierungen dar (*Systems Metabolic Engineering*) (Schuster et al. 1999). Kinetische Modellansätze basieren in diesem Zusammenhang derzeit oftmals auf nicht-mechanistischen LinLog-Kinetiken. Die aus der Nichtgleichgewichtsthermodynamik abgeleitete Modellierungsform, stellt einen approximativen Ansatz zur Beschreibung von enzymatischen Reaktionsraten innerhalb eines dynamischen metabolischen Netzwerks dar (Visser et al. 2004). Die Aufstellung einer linearen Abhängigkeit zwischen den logarithmierten Konzentrationen beteiligter Metabolite und entsprechenden Reaktionsraten (LinLog) ermöglicht die Ableitung valider kinetischer Parameter über weite Konzentrationsbereiche (s. Gl. [8.29]). Unter Einführung des metabolischen Gleichgewichts als Referenzzustand innerhalb von Perturbationsexperimenten, können zugehörige kinetische Parameter in Form enzymatischer Elastizitäten auf Basis von instationären Konzentrationsverläufen intrazellulärer Metabolite abgeleitet werden (s. Gl. [8.30]). Derartige Elastizitätskoeffizienten ermöglichen die vollständige Beschreibung eines dynamischen kinetischen Modells betrachteter Reaktionsnetzwerke und die Ableitung globaler Flusskontrollkoeffizienten (FCC) beteiligter Enzyme (Kresnowati et al. 2005). Unter Anwendung eines LinLog-basierten Modells eines vereinfachten Reaktionsnetzwerks des Methionin-Synthesewegs, konnte insbesondere für SRE I und III eine zufriedenstellende Approximation resultierender Perturbationsverläufe anhand ermittelter Elastizitätskoeffizienten erzielt werden. Abgeleitete globale FCC beschreiben allerdings im Vergleich verschiedener Prozessphasen ein signifikant abweichendes Enzymverhalten. Die Konditionszahlen des Modells verweisen hierbei auf eine schlechte Identifizierbarkeit einiger zugrundeliegender lokaler Parameter (Elastizitäten).

Die möglichen Ursachen für die schlechte Konditionierung können primär in einer zu geringen Tiefe des stöchiometrischen Modells und der zugrunde liegenden Kinetik gesehen werden.

Der LinLog-Ansatz besitzt eine vorteilhafte Validität innerhalb ausgedehnter Konzentrationsdynamiken, welche aus experimenteller Sicht nur schwer durch externe metabolische Stimuli innerhalb hochverzweigter Netzwerksysteme einstellbar sind (Visser et al. 2004). Allerdings können unter partieller Betrachtung des entsprechenden Netzwerksegments mit einer überschaubaren Anzahl an kinetischen Parametern netzwerk-inhärente oszillierende Konzentrationsverläufe nur schwer simuliert werden. Die für das Modell angenommene lineare Reaktionssequenz innerhalb des EMP-basierten Syntheszweigs (L-Serin) vernachlässigt insbesondere den detoxifizierenden Akkumulationszyklus zwischen L-Homocystein und LL-Homo-Lanthionin, dessen instationäres Konzentrationsprofil während der SRE signifikant perturbiert wurde (s. Kap. 9.3.2.2). Eine absolute Quantifizierung des symmetrischen Thioethers LL-Homo-Lanthionin war in diesem Zusammenhang aufgrund fehlender kommerzieller Referenzstandards nicht möglich. Weiter wurde der SAM-Zyklus nicht berücksichtigt, da S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) und S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) innerhalb der Probenmatrix resultierender Metabolom-extrakte, unter den alkalischen Bedingungen der LC-MS-basierten Analytik, nur unzureichende Stabilität aufwiesen. Zusätzlich ist eine unvorteilhafte Umsetzung des intrazellulären L-Serin-Pools zu Pyruvat durch die Serin-Dehydratase (SdaA) nicht auszuschließen. Diesbezüglich konnte für underivatisiertes Pyruvat unter den etablierten chromatographischen Bedingungen (ZIC-pHILIC) innerhalb der Elektrospray-Ionisierung keine hinreichende Stabilität erzielt werden. Die schlechte Identifizierbarkeit einiger Parameter könnte zudem auf der implementierten Probennahmestrategie basieren. Die vergleichsweise langsame Beprobungsfrequenz von $\Delta t = 2 \text{ min}$ ermöglicht keine vollständige Erfassung der Konzentrationsdynamiken insbesondere in den frühen Perturbationsphasen ($\leq 6 \text{ min}$). Berechnete Umsatzzahlen intrazellulärer Pools lagen hierbei unterhalb der realisierbaren Messintervalle, was sich insbesondere in der hohen Volatilität des stark beanspruchten L-Serinpools (Signaleingang) zeigt. Trotz der adaptierten Perturbationsstrategie, die eine Erfassung der Konzentrationsprofile mit hinreichender Reproduzierbarkeit ermöglichte, ist aufgrund der zeitverzögerten Inaktivierung des zellulären Stoffwechsels ($< 1 \text{ min}$) eine systematische Verzerrung der Messwerte durch eine unerwünschte enzymatische Umsetzung während der Probenaufarbeitung nicht auszuschließen.

Im Vergleich zum klassisch verwendeten LinLog-Ansatz bietet die Verwendung des PEC-Kriteriums (*Pool Efflux Capacity*) einen alternativen Weg. Im Kern besteht der Ansatz darin,

die aufwändigen LinLog-Modelle durch einfachere, ähnlich aussagekräftige und rein datengetrieben abzuleitende Kriterien zu ersetzen (Magnus et al. 2006). Das PEC-Kriterium (Gl. [8.38] bzw. [8.39]) basiert auf einer alternativen Formulierung der Elastizitätsdefinition (Gl. [8.24]), wobei vereinfachend lediglich die maximale Reaktionseffluxrate aus einem betrachteten intrazellulären Metabolitpool berücksichtigt wird. Dabei bleibt der Grundgedanke der Metabolischen Kontrollanalyse nach wie vor erhalten. Wird dieses Kriterium für alle Enzymreaktionen innerhalb eines Biosynthesewegs bestimmt, ist es somit möglich, vereinfachend eine Rangfolge aufzustellen, an deren Spitze eine maximale Reaktionseffluxrate einer hohen Elastizität gleicht. Umgekehrt ist eine minimale Reaktionseffluxrate mit einer niedrigen Elastizität verbunden (Oldiges 2004). Somit stehen genau diese Reaktionsschritte bzw. Enzyme im Mittelpunkt einer Stammoptimierung, die einen vergleichsweise kleinen PEC-Wert aufweisen (Magnus et al. 2009).

In diesem Zusammenhang konnte anhand der durchgeführten SRE eine gute Reproduzierbarkeit ermittelter PEC-Werte nachgeschalteter Enzyme erzielt werden. Hierbei konnten insbesondere die Cystathionin- β -Lyase (MetC), die Methioninsynthase (MetH) sowie das Methionin-Exportsystem (YjeH) als Knotenpunkte hoher Flusskontrolle identifiziert werden. Die enzymatischen Targets zeigen darüberhinaus eine hohe Konsistenz mit der ermittelten globalen metabolischen Situation (s. Kap. 9.3.2.1). Bei der PEC-Analyse handelt es sich allerdings um einen approximativen Ansatz, so dass lediglich signifikante Unterschiede ermittelter absoluter PEC-Werte in Betracht gezogen werden sollten. Ein weiterer Nachteil ist, dass ermittelte maximale Effluxraten stark fehleranfällig gegenüber Messwert-Ausreißern sind, welche vorab zuverlässig identifiziert werden müssen. Im Vergleich zu einem modellbasierten Ansatz besitzt die PEC-Analyse darüberhinaus einen geringeren Informationsgehalt, da keine Aussagen zu Regulationsmechanismen wie Rückkopplungs- und Substratinhibierungen getroffen werden können (Magnus et al. 2009). Eindeutige Aussagen sind zudem nur bei einer ausschließlichen Umsetzung des betrachteten Metabolitpools durch ein bestimmtes nachgeschaltetes Enzym möglich (Oldiges et al. 2004). So konnte die Methionin-Synthase (MetH) zwar zuverlässig als Knotenpunkt hoher Flusskontrolle identifiziert werden, allerdings waren keine weiterführenden Ableitungen möglich. In diesem Zusammenhang rückt insbesondere eine mögliche Limitierung des finalen Reaktionsschritts durch eine eingeschränkte Transmethylierungskapazität in den Vordergrund.

9.5 Alternative Stimulus-Response-Experimente in Batch Kultivierungen

Unter Einsatz des nichtmarkierten Stimulussubstrats [$U^{12}C$]-L-Serin innerhalb von Stimulus-Response-Experimenten (SRE I-III) konnten reproduzierbare und signifikante Perturbationsinformationen des L-Methionin-Stoffwechsels erzielt werden. Anhand des datenbetriebenen PEC-Ansatzes wurden übereinstimmend drei enzymatische Targets (MetC, MetH und MetExp) mit vergleichsweise hoher Flusskontrolle identifiziert. Um den Informationsgehalt resultierender Konzentrationsdynamiken zu steigern, wurde die Perturbationsstrategie unter Verwendung von vollmarkiertem [$U^{13}C$]-L-Serin weiter adaptiert. Der Versuch erfolgte analog zu SRE in Fed-Batch-Fermentationen in Zusammenarbeit mit **Frau Maria Rahnert**. Der produktionsnahe Batch-Prozess wurde durch Frau Rahnert etabliert und optimiert.

9.5.1 Stimulus-Response-Experimente im 2,5-L-Rührkesselreaktor

Ein Stimulus-Response-Experiment wurde unter Einsatz des vollmarkierten Stimulussubstrats [$U^{13}C$]-L-Serin innerhalb unlimitierter Wachstumsbedingungen einer etablierten Batch-Fermentation von *E. coli* SPOT01 durchgeführt. Ausgehend von einer Gefrierkultur erfolgte die Kultivierung im verkleinerten Maßstab in einem 2,5-L-Rührkessel-Glasreaktor. Der Stimulus erfolgte anhand einer Sprungfunktion unter Zugabe von 150 mM [$U^{13}C$]-L-Serin nach einer Anzuchtphase von 17,9 h (SRE IV). Anhand der Zugabemenge wurde die Stimulusphase auf 6 min ausgelegt. Unter Einsatz der semi-automatisierten Probennahmeverrichtung wurden die intrazellulären Probennahmen ($n=4$) innerhalb der verkürzten Perturbationsphase mit Messintervallen von $\Delta t=1$ min nochmals beschleunigt. Zur Bestimmung intrazellulärer Gleichgewichtskonzentrationen erfolgten analog zu SRE I-III zusätzlich Probennahmen unmittelbar vor Zugabe des Stimulussubstrats (Prä-Stimulusphase). In Abbildung 9.23 wurde der Kultivierungsverlauf sowie relevante extrazelluläre Substrat- und Produkttiter aufgeführt. Die ermittelten Kultivierungsparameter zeigten eine weitgehende Übereinstimmung mit bereits erfolgten Kultivierungen (SRE I-III) unter unlimitierten Bedingungen (s. Abb. 9.26/C, Batch-Phase). Die durchschnittlichen biomassespezifischen L-Methionin- und D-Glucose-Ausbeuten waren mit ca. 3,01 [mmol/ g_{BTM}] bzw. ca. 0,21 [g_{GIC}/g_{BTM}] über den gesamten Prozessverlauf (21 h) annähernd konstant.

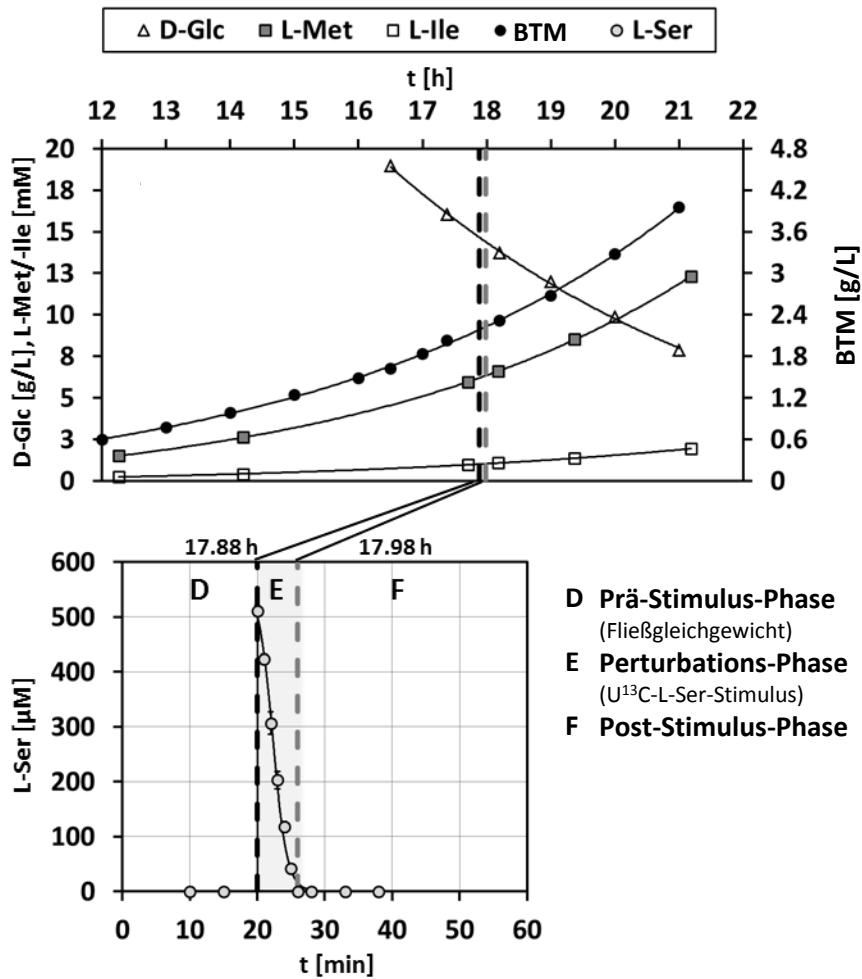


Abbildung 9.23 Kultivierungsverlauf sowie extrazelluläre Substrat- und Produkttiters des durchgeführten Stimulus-Response-Experiments (SRE IV) innerhalb einer Batch-Fermentation von *E. coli* SPOT01 unter unlimitierten Kultivierungsbedingungen.

Tabelle 9.11 Wachstumsparameter und spezifische Produkt- und Nebenprodukt-Ausbeuten sowie analoge Bildungsraten innerhalb eines SRE-Batch-Prozess (SRE IV) von *E. coli* SPOT01

Wachstumsparameter (12-21h)		D-Glucose	L-Methionin	L-Isoleucin	O-Succinyl-L-Homoserin	
Prozess	μ [h ⁻¹]	Bereich BTM [g L ⁻¹]	$Y_{X/Glc}$ [g _{BTM} /g _{Glc}]	$Y_{L-Met/X}$ [mmol/g _{BTM}]	$Y_{L-Ile/X}$ [mmol/g _{BTM}]	$Y_{OSH_5/X}$ [mmol/g _{BTM}]
Batch	0,216±0,04	0,60-3,95	0,212±0,031	3,008±0,124	0,600±0,022	0,020±0,001
Prozess	μ [h ⁻¹]	Bereich BTM [g L ⁻¹]	$q_{Glc/X}$ [g _{Glc} /g _{BTM} ·h]	$q_{L-Met/X}$ [mmol/g _{BTM} ·h]	$q_{L-Ile/X}$ [mmol/g _{BTM} ·h]	$q_{OSH_5/X}$ [mmol/g _{BTM} ·h]
Batch	0,216±0,04	0,60-3,95	1,013±0,147	0,647±0,027	0,129±0,005	0,004±0,0002

Auch die zugehörigen Nebenprodukt-Ausbeuten für L-Isoleucin und O-Succinyl-L-Homoserin wiesen mit ca. 0,60 [mmol/g_{BTM}] bzw. 0,02 [mmol/g_{BTM}] nur eine geringe Variabilität auf. Aufgrund der konstanten Wachstumsrate konnte eine reproduzierbare spezifische Methionin-

Bildungsrate von ca. 650 [$\mu\text{mol}/\text{g}_{\text{BTM}}\cdot\text{h}$] ermittelt werden. Wachstumsparameter, biomasse-spezifische Produkt- und Nebenprodukt-Ausbeuten sowie analoge Bildungs- und Aufnahme-raten wurden in Tabelle 9.11 zusammengefasst. Während der Perturbationsphase von SRE IV konnten für das vollmarkierte Stimulus-Substrat [U^{13}C]-L-Serin eine spezifische Aufnahme-rate von ca. 3,45 [$\text{mmol}/\text{g}_{\text{BTM}}\cdot\text{h}$] ermittelt werden. Zugehörige L-Serin-Stimulusparameter während der jeweiligen SRE-Phasen wurden in Tabelle 9.12 zusammengefasst.

Tabelle 9.12 Spezifische L-Serin-Substratausbeuten und Aufnahme-raten von SRE IV innerhalb eines Batch-Prozess von *E. coli* SPOT01

SRE-Parameter		Prä-Stimulus (Δt 10 min)	Stimulus-Phase (Δt 6 min)		Post-Stimulus (Δt 12 min)	Stimulussubstrat	
Prozess	Zeitraum [h]	BTM [gL^{-1}]	L-Ser-Puls [mM]	BTM [gL^{-1}]	BTM [gL^{-1}]	$q_{\text{L-Ser}}$ [$\text{mmol}/\text{g}_{\text{BTM}}\cdot\text{h}$]	$Y_{\text{L-Ser/X}}$ [$\text{mmol}/\text{g}_{\text{BTM}}$]
SRE IV (Batch)	17,71-18,18	2,14-2,20	0,66	2,20-2,23	2,23-2,31	3,451 \pm 0,048	15,977 \pm 0,222

9.5.2 LC-MS-basierte Messung intrazellulärer Konzentrationen (Massenisotopomere)

Resultierende intrazelluläre Proben wurden nach der alkalischen HILIC-ESI-MS/MS-Methode (s. Kap. 8.9.5.1) hinsichtlich aller Massenisotopomer-Frak-tionen relevanter Metabolite des L-Methionin-Reaktionsnetzwerks (22 Analyten) vermessen. Absolute Quantifizierungen erfolgten unter Verwendung einer internen Kalibrierung nach der Methode der Standardaddition unter Aufstockung nicht-markierter [U^{12}C]-Metabolitfraktionen und einer zusätzlichen Verwendung von L-Norvalin als Internstandard (s. Kap. 8.10.4). Konzentrations-werte analoger Massenisotopomer-Frak-tionen wurden aufgrund des identischen Responsivitätsverhaltens durch Übertragung der entsprechenden internen Kalibrier-funktionen abgeleitet. Intrazelluläre Konzentrationen wurden auf die innerhalb der Extraktion eingesetzten Biotrockenmassen (15 gL^{-1}) normiert [$\mu\text{mol}/\text{g}_{\text{BTM}}$].

9.5.2.1 Verteilung des ^{13}C -Markierungssignals innerhalb des L-Met-Synthesenetzwerks

^{13}C -Isotopomeranalysen ermöglichen die vorteilhafte Erfassung der Verteilung eines Markierungssignals innerhalb hochverzweigter intrazellulärer Reaktionsnetzwerke unter Verwendung entsprechend markierter Substrate (Nöh et al. 2014). Im Gegensatz zu NMR-Analysen ermöglichen LC-MS/MS-basierte Messungen prinzipiell nur die Erfassung resultierender Massenisotopomer-Spezies. Unter Berücksichtigung des Fragmentierungs-

verhaltens können allerdings potentielle ^{13}C -Markierungspositionen der jeweiligen Analyten weiter eingengt werden (s. Kap. 8.9.5.3) (Choi et al. 2011). Anhand einer weiterentwickelten Perturbationsstrategie unter Einsatz von $[\text{U}^{13}\text{C}]$ -L-Serin als instationäres Markierungssubstrat, konnten aufgrund der vollständig bekannten Reaktionsstöchiometrie des Synthesenetzwerks resultierende MRM-Übergänge eindeutig auf entsprechende Positionsisotopomere zurückgeführt werden. In Abbildung 9.24 wurde die Verteilung des vollmarkierten Stimulussubstrats innerhalb des L-Methionin-Reaktionsnetzwerks aufgezeigt. Resultierende Markierungsflüsse (rote, dicke Pfeile) sowie instationäre Positionsisotopomere wurden entsprechend markiert.

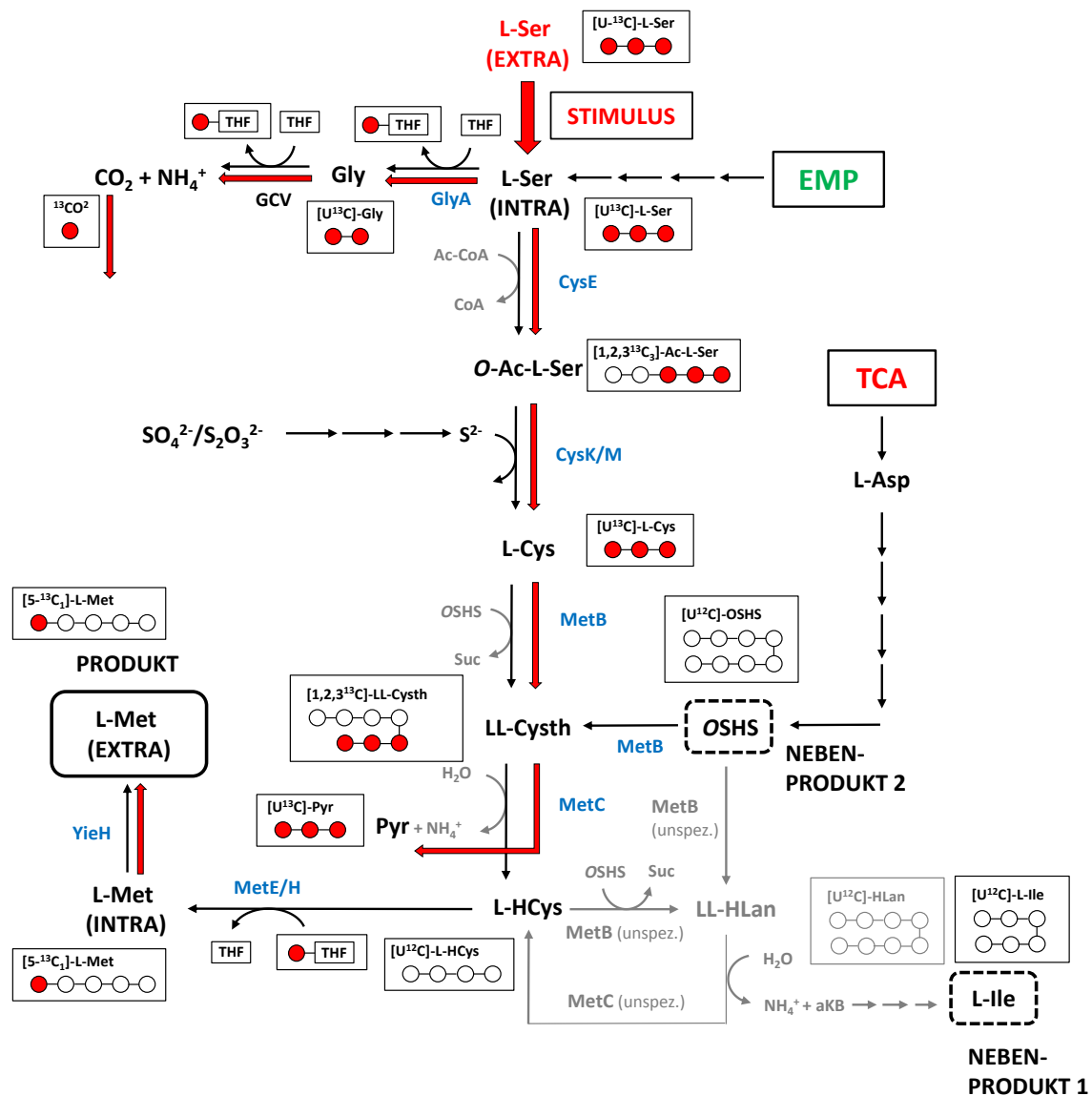


Abbildung 9.24 Schematische Darstellung des L-Methionin-Synthese-Netzwerks in *E. coli* SPOT01 unter Berücksichtigung der Signalverteilung des vollmarkierten Stimulussubstrats $[\text{U}^{13}\text{C}]$ -L-Serin. (Quelle: eigene Darstellung, in Anlehnung an Neidhardt et al. 1996)

Die Verwendung des alternativen Stimulussubstrats ermöglicht die instationäre Markierung von Metaboliten entlang des EMP-Synthesewegs. Aufgrund einer netzwerk-inhärenten Signalabspaltung durch die Cystathionin- β -Lyase (MetC) in Form von Pyruvat, erfolgte allerdings keine Markierung des L-Homocystein-Pools (L-HCys). In Folge war eine Untersuchung der Markierungsverteilung innerhalb des abgeleiteten LL-Homolanthionin-Akkumulationszyklus (HLan) nicht möglich. Beide Nebenprodukte (L-Ile und OSHS) bleiben hierbei unmarkiert. Darüberhinaus war Pyruvat mit der entwickelten HILIC-ESI-MS/MS-Methode analytisch nicht zugänglich. Aufgrund des vergleichsweise kurzen Markierungszeitraums ist in diesem Zusammenhang von einer starken Signalverdünnung innerhalb des Zentralstoffwechsels auszugehen. Andererseits erfolgt ausgehend von intrazellulärem L-Serin eine Markierung des C₁-Stoffwechsels.

Tabelle 9.13 MRM-Übergänge unmarkierter sowie teil- bis vollmarkierter Metabolite des L-Methionin-Synthesenetzwerks unter Berücksichtigung der Umsetzung von vollmarkiertem [$U^{13}C$]-L-Serin

Metabolit nicht-markierte [$U^{12}C$] Isotopomerpools markierte [$U^{13}C$] Isotopomerpools ^a	Vorläufer Spezies	Vorläufer (m/z)	Fragment Spezies	Fragment (m/z)
[1,2- $^{12}C_2$] Glycin	[M+H] ⁺	76	[M] ⁺	30
[1,2- $^{13}C_2$] Glycin	[M+H] ⁺	78	[M] ⁺	31
[1,2,3- $^{12}C_3$] L-Serin	[M+H] ⁺	106	[M] ⁺	60
[1,2,3- $^{13}C_3$] L-Serin	[M+H] ⁺	109	[M] ⁺	62
[1,2,3,4,5- $^{12}C_5$] O-Acetyl-L-Serin	[M+H] ⁺	148	[M] ⁺	60
[1,2,3- $^{13}C_3$ -4,5- $^{12}C_2$] O-Acetyl-L-Serin	[M+H] ⁺	151	[M] ⁺	62
[1,2,3,4,5- $^{12}C_5$] S-Carboxymethyl-L-Cystein ^b	[M+H] ⁺	180	[M] ⁺	89
[1,2,3- $^{13}C_3$ -4,5- $^{12}C_2$] S-Carboxymethyl-L-Cystein ^b	[M+H] ⁺	183	[M] ⁺	91
[1,2,3,4,5,6,7,8- $^{12}C_8$] O-Succinyl-L-Homoserin	[M+H] ⁺	220	[M-H+2H] ⁺	102
[1,2,3,4,5,6,7- $^{12}C_7$] LL-Cystathionin	[M+H] ⁺	223	[M-H+2H] ⁺	88
[1,2,3- $^{13}C_3$ -4,5,6,7- $^{12}C_4$] LL-Cystathionin	[M+H] ⁺	226	[M-H+2H] ⁺	88
[1,2,3,4,5,6- $^{12}C_6$] S-Carboxymethyl-L-Homocystein ^b	[M+H] ⁺	194	[M] ⁺	56
[1,2,3,4,5,6,7,8- $^{12}C_8$] LL-Homolanthionin	[M+H] ⁺	237	[M] ⁺	56
[1,2,3,4,5,6- $^{12}C_6$] L-Isoleucin	[M+H] ⁺	132	[M] ⁺	86
[1,2,3,4,5- $^{12}C_5$] L-Methionin	[M+H] ⁺	150	[M] ⁺	56
[5- $^{13}C_1$ -1,2,3,4- $^{12}C_4$] L-Methionin	[M+H] ⁺	151	[M] ⁺	56

^aMRM-Übergänge ^{13}C markierter Positionsisotopomere basieren auf der Umsetzung von vollmarkiertem L-Serin unter Berücksichtigung der Reaktionsstöchiometrie des L-Methionin-Synthesenetzwerks

^bQuantifizierungen von S-Carboxymethyl-Analoga basieren auf einer vorhergehenden Derivatisierung von L-Cystein und L-Homocystein mit Iodessigsäure (Carducci et al. 1999)

Die finale Transmethylierungsreaktion durch die Methioninsynthase (MetH) erlaubt somit eine Markierung von intra- und extrazellulärem L-Methionin unabhängig vom vorgeschalteten

L-Homocystein-Pool. Zur LC-MS-basierten Erfassung der resultierenden instationären Positionsisotopomere wurden MS/MS-Parameter der jeweiligen Metaboliten entsprechend adaptiert. Anhand des vollständig bekannten CID-Fragmentierungsverhaltens der Analyten konnten MRM-Massenübergänge markierter Analoga abgeleitet werden. Zugehörige bereits optimierte Kollisionsenergien (CE) und Fragmentorspannungen (F) wurden aufgrund des identischen Responsivitätsverhaltens der Analoga übernommen (s. Tab. 8.12). In Tabelle 9.13 wurde das Messprogramm für unmarkierte sowie teil- bis vollmarkierte Metaboliten des L-Methionin-Synthesenetzwerks zusammengefasst.

9.5.2.2 Stimulus-induzierte instationäre Positionsisotopomere

Innerhalb des weiterentwickelten Stimulus-Response-Experiments (SRE IV) konnten reproduzierbare und aussagekräftige Konzentrationsdynamiken fokussierter Isotopomer-Fractionen abgeleitet werden. Der Einsatz eines vollmarkierten netzwerk-inhärenten Schlüsselmetabolits der L-Methionin-Synthese steigert den Informationsgehalt resultierender Konzentrationsdynamiken signifikant. Einerseits ermöglicht die Perturbationsstrategie den analytischen Zugang zu instationären Positionsisotopomer-Pools, die ausschließlich aus $[U^{13}C]$ -L-Serin synthetisiert worden sind. Andererseits kann der Einfluss markierter Perturbationsdynamiken auf die vorab nicht-markierten Gleichgewichtskonzentrationen der jeweiligen Metabolitpools unabhängig analysiert werden. Anhand der bekannten Reaktionsstöchiometrie des Reaktionsnetzwerks können somit zusätzliche Informationen abgeleitet werden. In der Abbildung 9.25 wurden Konzentrationsdynamiken nicht-markierter und markierter intrazellulärer Pools innerhalb der Perturbationsphase von SRE IV für 10 exemplarische Metabolite des EMP-Synthesewegs sowie direkt abzweigender Routen aufgezeigt. Der L-Serin-Puls erfolgte bei $t = 10$ min mit einer ausgelegten Stimulusphase von 6 min, die entsprechend markiert wurde (rot gestrichelte Linien). Die Bestimmung instationärer Konzentrationsdynamiken basierte auf vier intrazellulären Probenahmen ($n=4$) pro Zeitpunkt in Abständen von $\Delta t = 1$ min. Mit Ausnahme des intrazellulären L-Serin- und L-Cystein-Pools konnten relative Standardabweichungen unterhalb von 20% erzielt werden. Aufgrund der verkürzten Perturbationsperiode waren resultierende Konzentrationsdynamiken signifikant reduziert. Unter Aufsummierung nicht-markierter und markierter Poolkonzentrationen konnte für den innerhalb SRE I-III am stärksten perturbierten L-Cystein-Pool (L-Cys) in SRE IV eine Konzentrationsanreicherung von 220% erzielt werden. Eine große

Ausnahme stellte *O*-Acetyl-L-Serin (*O*-Ac-Ser) dar, das eine maximale Poolzunahme um den Faktor 35 aufwies. Vergleichbare Werte konnten bereits innerhalb der initialen Stimulus-Response-Studien ermittelt werden (s. Abb. 9.11) und unterstreichen zusätzlich die hohe kinetische Flexibilität der nachgeschalteten Serin-Acetyltransferase (CysE). Im Kontext einer kurzzeitig gesteigerten L-Cystein-Verfügbarkeit konnte für das nicht-markierte *O*-Succinyl-L-Homoserin (OSHS) erneut eine stimulus-induzierte Poolabnahme um ca. 70% beobachtet werden. Mit Ausnahme des L-Serin-Pools konnte für die nicht-markierten Gleichgewichtskonzentrationen der jeweiligen Metabolite ein signifikanter Rückgang festgestellt werden. Dieser erfolgte weitgehend analog zur Konzentrationsanreicherung der zugehörigen markierten Metabolitpools. Unter Berücksichtigung der Reaktionsstöchiometrie war ein derartiges Verhalten für den intrazellulären L-Methionin-Pool (L-Met_{INTRA}) besonders aufschlussreich. In Folge der Signalabspaltung durch die Cystathionin- β -Lyase (MetC) liegt der L-Homocystein-Pool vollständig unmarkiert vor (s. Kap. 9.5.2.1). Der resultierende markierte L-Methionin-Pool kann aufgrund der finalen Transmethylierung (5-¹³C₁-L-Methionin) somit ausschließlich auf den kurzzeitig perturbierten C₁-Stoffwechsel zurückgeführt werden (s. Abb. 9.24). Aufgrund der Markierungsinformation waren darüberhinaus auch extrazelluläre L-Methionin-Konzentrationen analytisch zugänglich, die ausschließlich unter Umsetzung des Stimulussubstrats synthetisiert wurden. Angesichts der geringen intrazellulären Konzentrationen konnte der natürliche isotopische Hintergrund (¹³C-Isotop ca. 1,11% aller Kohlenstoffatome) bestehender nicht-markierter Metabolitpools weitgehend vernachlässigt werden (Crown et al. 2013). Eine Ausnahme bildete die vergleichsweise höhere extrazelluläre L-Methioninkonzentration. Hinsichtlich einer durchschnittlichen Einbauwahrscheinlichkeit von 1,108% für das ¹³C-Isotop ergibt sich für einen einfach markierten C₅-Körper (L-Methionin) eine Eintrittswahrscheinlichkeit von 5,299% (s. Kap. 8.9.5.3). Unter Berücksichtigung des MRM-Übergangs für ein einfach markiertes Massenisotopomer (Fragment = C₂-Körper, s. Tab. 9.13) ergibt sich somit eine messbare Eintrittswahrscheinlichkeit von 2,120%. Messungen innerhalb der Prä-Stimulusphase ergaben einen nur unwesentlich höheren Hintergrund von durchschnittlich 2,3%. Aufgrund der einfachen Markierung (m+1) konnten die resultierenden Konzentrationswerte durch eine einfache Subtraktion korrigiert werden (Bequette et al. 2006). In Abbildung 9.25 wurden zusätzlich die zeitlichen Titerverläufe von nicht-markiertem und markiertem L-Methionin während des Perturbationszeitraums aufgezeigt.

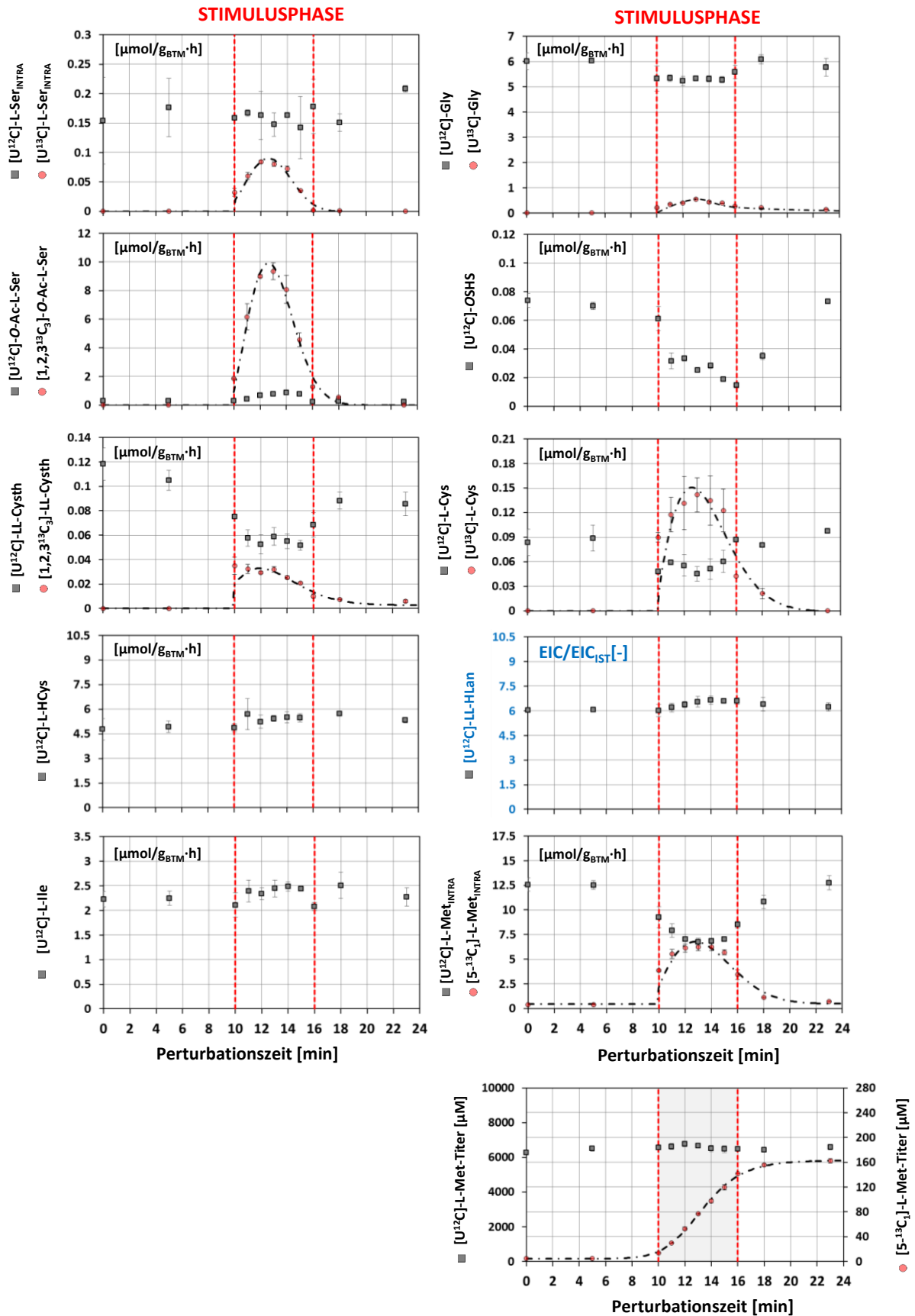


Abbildung 9.25 Perturbationsprofile nicht-markierter sowie markierter Metabolitpools des L-Methionin-Synthesenetzwerks aus SRE IV innerhalb einer Batch-Fermentation von *E. coli* SPOT01.

Trotz der enormen Konzentrationsunterschiede zwischen den beiden Isotopomer-Spezies ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ca. 1:40 innerhalb der Post-Stimulusphase), konnte aufgrund der LC-MS-basierten Signaltrennung eine stimulus-induzierte biomassespezifische Bildungsrate innerhalb des Perturbationszeitraums abgeleitet werden.

9.5.2.3 Bilanzierung der initialen Verteilung des vollmarkierten Stimulussubstrats

Der Einsatz von $[\text{U}^{13}\text{C}]$ -L-Serin als vollmarkiertes Stimulussubstrat ermöglicht den direkten Zugang zu der biomassespezifischen L-Methionin-Bildungsrate innerhalb des Perturbationszeitraums des durchgeführten SRE. Der markierte extrazelluläre Konzentrationsverlauf ($5\text{-}^{13}\text{C}_1$ -L-Methionin) basiert auf der direkten Umsetzung des vollmarkierten netzwerk-inhärenten Stimulussubstrats innerhalb des hochverzweigten Synthesestoffwechsels. Anhand der zugrundeliegenden Reaktionsstöchiometrien und der damit einhergehenden Signalverteilung (s. Kap. 9.5.2.1) stellt die ermittelte Rate somit eine direkte Folge der kurzfristig gesteigerten Transmethylierungskapazität unter der adaptierten Perturbationsstrategie dar.

In Abbildung 9.26 wurden die biomassespezifische Aufnahmerate des Stimulussubstrats $[\text{U}^{13}\text{C}]$ -L-Serin (A) und die hieraus resultierende Bildungsrate von $[\text{5-}^{13}\text{C}_1]$ -L-Methionin (B) innerhalb des Perturbationszeitraums von SRE IV direkt gegenübergestellt. Gleichzeitig wird die langfristige und weitgehend konstante L-Methionin-Syntheserate innerhalb des gesamten Batch-Prozess (SRE IV, D) bzw. der Batch-Phase des Fed-Batch-Prozess (SRE I, C) unter unlimitierten Kultivierungsbedingungen aufgezeigt. Aufgeführte Konzentrationen basieren auf der LC-MS-basierten Messung von vier Replikaten pro Zeitpunkt ($n=4$), wobei innerhalb der weniger komplexen extrazellulären Probenmatrizen eine vergleichsweise höhere Präzision mit Standardabweichungen unterhalb von 5% erzielt werden konnte.

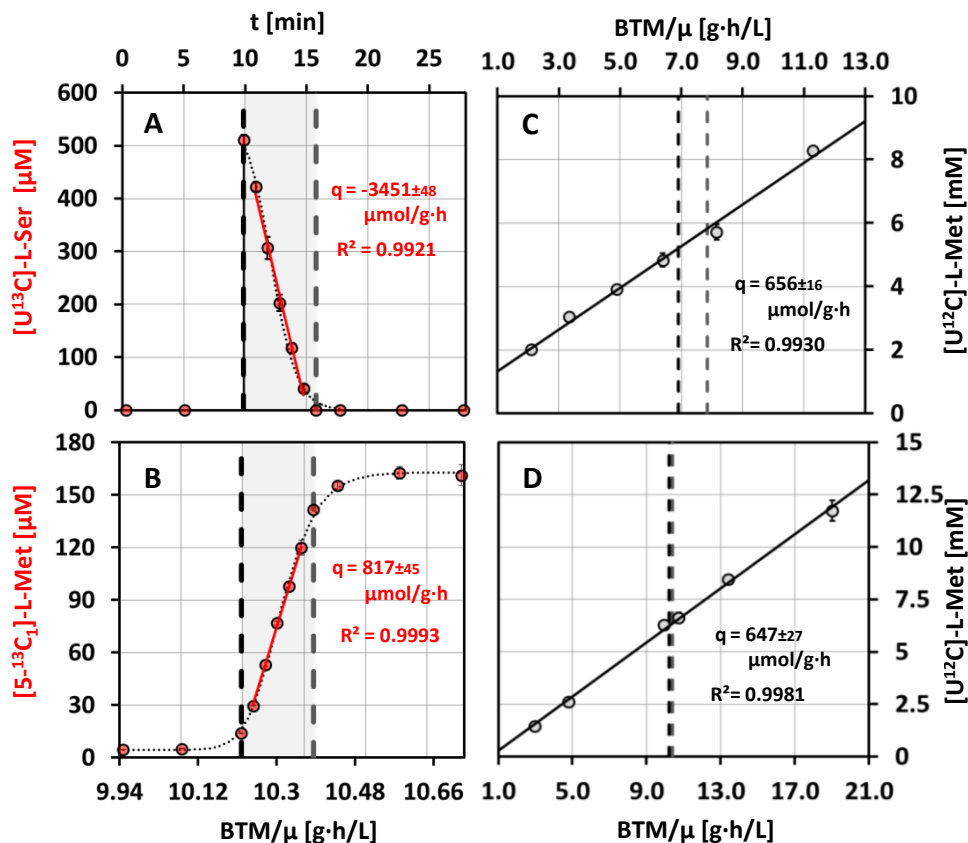


Abbildung 9.26 Biomassespezifische Aufnahmerate von $[U^{13}C]$ -L-Serin (A) und Bildungsrate von $[5-^{13}C_1]$ -L-Methionin (B) innerhalb der Perturbationsphase von SRE IV. Zusätzlich wurden die langfristigen biomassespezifischen $[U^{12}C]$ -L-Methionin-Bildungsraten innerhalb des gesamten Batch-Prozess (SRE IV) (D) sowie der Batch-Phase des Fed-Batch-Prozess (SRE I) (C) von *E. coli* SPOT01 aufgezeigt.

Die ermittelte Importrate des vollmarkierten Stimulussubstrat (A, 3451 ± 48 [μmol/g_{BTM}·h]) zeigt einen linearen Verlauf und korreliert mit einer konstanten Bildungsrate von $[5-^{13}C_1]$ -L-Methionin (B, 817 ± 45 [μmol/g_{BTM}·h]) innerhalb der Perturbationsphase von SRE IV (17,71-18,18 h). Im direkten Vergleich mit der langfristigen $[U^{12}C]$ -L-Methionin-Bildungsrate (D, 647 ± 27 [μmol/g_{BTM}·h]) über den gesamten Batch-Prozess (12-21 h) ergibt sich somit eine kurzfristige Steigerung der stimulus-induzierten Bildungsrate um ca. 26%. Um einen systematischen Fehler auszuschließen wurden extrazelluläre unmarkierte L-Methioninkonzentrationen unabhängig unter Verwendung der OPA-RP-HPLC-Methode quantifiziert. Die resultierende $[U^{12}C]$ -L-Methionin-Bildungsrate zeigte hierbei mit 669 ± 20 [μmol/g_{BTM}·h] eine zufriedenstellende Wiederfindung. Die ermittelte konstante Produktbildungsrate ist

charakteristisch für unlimitierte Kultivierungsbedingungen von *E. coli* SPOT01. Innerhalb der Batch-Phase (0-8 h) des unabhängigen Fed-Batch-Prozess (SRE I-III) konnte bereits eine vergleichbare Produktbildungsrate mit (C, 656 ± 16 [$\mu\text{mol}/\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h}$]) ermittelt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine kurzfristige Steigerung der L-Serin-Verfügbarkeit, die Limitierung der finalen Transmethylierungsreaktion temporär aufhebt und zu einer signifikant gesteigerten Rate führt. Dies bestätigt die Resultate aus der PEC-Analyse von SRE I-III in der die Methionin-Synthase (MetE/H) übereinstimmend als Knotenpunkt hoher Flusskontrolle identifiziert wurde. Um den kurzfristig regulativen Einfluss von L-Serin näher zu untersuchen, wurde die initiale Verteilung des vollmarkierten Stimulussubstrats innerhalb des Reaktionsnetzwerks bilanziert. Die Bilanzierung basierte auf die ermittelten spezifischen Import- und Exportraten von [^{13}C]-L-Serin und [$5\text{-}^{13}\text{C}_1$]-L-Methionin sowie den markierten Positionsisotopomer-Konzentrationen zum ersten Probennahmezeitpunkt der Stimulusphase ($t=10$ min, s. Abb. 9.25). Anhand der semi-automatisierten Probennahme wurde hierbei ein Zeitintervall von $\Delta t=25$ s angenommen. Unter Berücksichtigung der Reaktionsstöchiometrie des Netzwerks ergab sich folgenden Bilanzgleichung:

$$\begin{array}{ccc}
 \text{IMPORT} & \text{EXPORT} & \text{AKKUMULATION} \\
 \hline
 \underbrace{\quad} & \underbrace{\quad} & \underbrace{\quad} \\
 q_{[^{13}\text{C}]\text{Ser}} \cdot \Delta t = 2 \cdot q_{[^{13}\text{C}]\text{Met}} \cdot \Delta t + \sum ([^{13}\text{C}]_{c_{i,0}} - [^{13}\text{C}]_{c_{i,0+\Delta t}}) & & [9.2]
 \end{array}$$

In Abbildung 9.27 wurde die initiale Verteilung von [^{13}C]-L-Serin zum Stimuluszeitpunkt aufgezeigt. Abgesehen von Pyruvat waren alle markierten Isotopomerpools analytisch zugänglich, so dass die Bilanz bis auf einen Anteil von 14,6% vollständig geschlossen werden konnte. Der unbekannte Anteil ist mit einer netzwerk-inhärenten Signalabspaltung durch die Cystathionin- β -Lyase (MetC) und einer nicht auszuschließenden direkten Umsetzung von L-Serin durch die Serindehydratase (SdaA) erklärbar. In diesem Zusammenhang sind α -Ketosäuren wie Pyruvat hochreaktiv und unterliegen innerhalb der Probenaufarbeitung und anschließenden LC-MS-Analytik einer hohen Degradation. Akkurate absolute Quantifizierungen erfordern aufwendige Derivatisierungsprotokolle, die innerhalb dieser Arbeit noch nicht etabliert worden sind (Zimmermann et al. 2014).

In Folge der vergleichsweise langsamen Beprobungsstrategie war ein Großteil der ^{13}C -Markierungsinformation (ca. 75%) bereits zum Stimuluszeitpunkt innerhalb der intra- und extrazellulären L-Methionin-pools aufzufinden. Angesichts der Tatsache, dass die Synthese von markiertem L-Methionin auf einer Signalverteilung entlang des C_1 -Stoffwechsles beruht, war der fast vier mal höhere Markierungsanteil für intrazelluläres L-Methionin (ca. 28,8%) gegenüber seinem Vorläufermetabolit O-Acetyl-L-Serin (ca. 7,7%) innerhalb des EMP-Synthesewegs besonders hervorzuheben. Auch wenn das für die Berechnung verwendete Zeitintervall ($\Delta t=25\text{ s}$) auf einer Annahme beruht, wird hierdurch letztlich lediglich der unbekannt Markierungsanteil beeinflusst. Die Verhältnisse der Markierungsanteile analytisch zugänglicher Poolkonzentrationen bleiben hiervon unberührt. Hinsichtlich einer ausgeprägten Akkumulationssituation mit intrazellulären L-Homocystein-Konzentrationen von ca. $5\text{ }\mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}\cdot\text{h}$ bestätigen die Daten somit eine stimulus-induzierte Erhöhung der Transmethylierungskapazität, die zu einer kurzfristigen Erhöhung der L-Methionin-syntheserate führt.

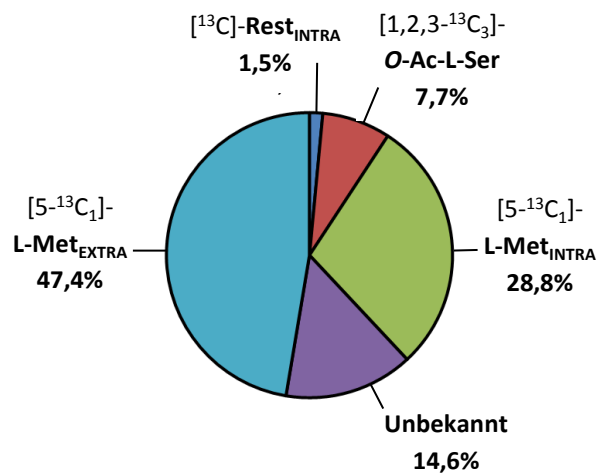


Abbildung 9.27 Initiale Verteilung des vollmarkierten Stimulussubstrats [$U^{13}\text{C}$]-L-Serin innerhalb des L-Methionin-Reaktionsnetzwerks zum Perturbationszeitpunkt ($\Delta t=25\text{ s}$).

9.6 Datenanalyse von SRE unter Verwendung [U¹³C]-L-Serin

Die aus den Stimulus-Response-Experiment (SRE IV) resultierenden markierten und nicht-markierten Konzentrationsdynamiken wurden für eine alternative PEC-Analyse (s. Kap. 8.12.3) im Rahmen der Metabolischen Kontrollanalyse (MCA) verwendet. Die Analyse maximaler enzymatischer Netto-Ausflussraten (*Pool Efflux Capacities, PEC*) innerhalb des perturbierten Reaktionsnetzwerkes erfolgte zunächst unter analoger Vorgehensweise wie bei SRE I-III (s. Kap. 9.4.2). Ausgangspunkt bildete erneut eine lineare Reaktionssequenz entlang des EMP-Synthesewegs mit dem intrazellulären L-Serinpool als Signaleingang und dem extrazellulären L-Methionin-Titer als Signalausgang (s. Abb. 9.19). Um eine Vergleichbarkeit der ¹³C-markierten und nicht-markierten Perturbationsstrategie zu gewährleisten, wurden standardisierte Poolgeschwindigkeiten innerhalb der Stimulusphase (10-16 min) in den entsprechenden Probenahmeintervallen (Δt 1 min) unter Aufsummierung nicht-markierter und analoger markierter Poolkonzentrationen bestimmt. Die innerhalb SRE IV ermittelten PEC-Werte für sechs intrazelluläre Pools wurden in Abbildung 9.28 zusammengefasst.

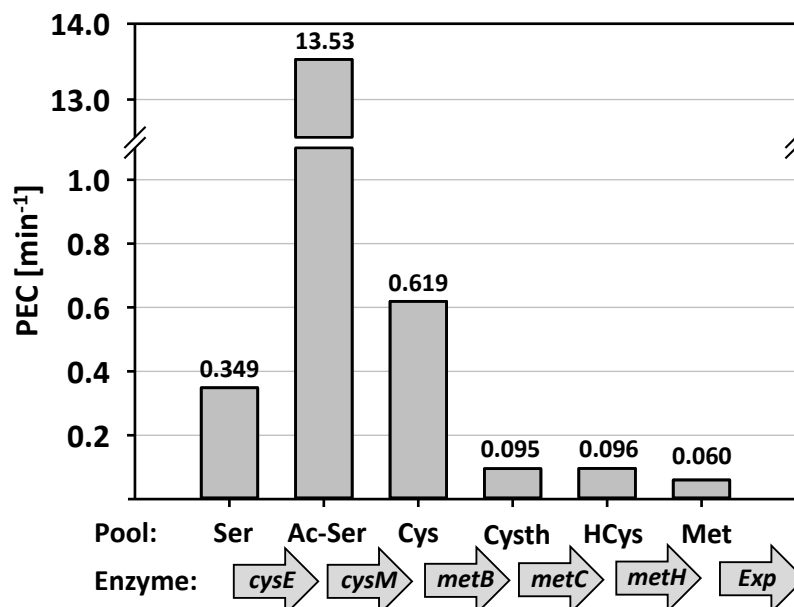


Abbildung 9.28 Ermittelte PEC-Werte innerhalb SRE IV perturbierter und aufsummierter markierter und nicht-markierter Metabolitpools unter Aufführung nachgeschalteter beteiligter Enzyme in Form genetischer Notationen (Targets für zielgerichtete Stammoptimierungen).

Obwohl die Stimulusfunktion hinsichtlich der Bedingungen einer instationären Markierungsstrategie modifiziert wurde und die metabolische Situation des Produktionsstamms zwar übertragbar aber nicht identisch war, führte die PEC-Analyse zu denselben enzymatischen Targets. Hierbei wiesen erneut die Cystathionin- β -Lyase (MetC), die

Methionin-Synthase (MetH) sowie das L-Methionin-Exportersystem (YjeH) eine vergleichsweise hohe Flusskontrolle auf. Für eine rationale Stammentwicklung sind letztlich nur die relativen Unterschiede enzymatischer Netto-Ausflussraten ausschlaggebend (Magnus et al. 2009). In diesem Kontext ist auch der vergleichsweise viel höhere PEC-Wert der Serin-Acetyltransferase (CysM) zu werten. Das ausgeprägte aber auch variable Perturbationsverhalten des O-Acetyl-L-Serin-Pools (O-Ac-Ser) unterstreicht lediglich die hohe enzymatische Flexibilität der nachgeschalteten Cystein-Synthase (CysM). Der Einsatz eines vollmarkierten Stimulussubstrats unter simultaner Messung nicht-markierter und markierter Perturbationsverläufe ermöglicht allerdings auch alternative Anwendungen der PEC-Analyse. In einem derartigen Ansatz werden lediglich die Effluxraten der markierten [¹³C]-Isotopomerpools berücksichtigt. Gleichzeitig werden die Raten abweichend mit den nicht-markierten transienten [U¹²C]-Poolkonzentrationen zu jedem Zeitpunkt normalisiert. Hieraus ergibt sich folgender Ansatz:

$$v_i^{x0} = \frac{1}{[^{12}\text{C}]x_i(t)} \cdot \left(\frac{[^{13}\text{C}]dx_i(t)}{dt} \right) \quad [9.3]$$

In Abbildung 9.29 wurden die hieraus resultierenden alternativen PEC-Werte für die lineare Reaktionssequenz zusammengefasst.

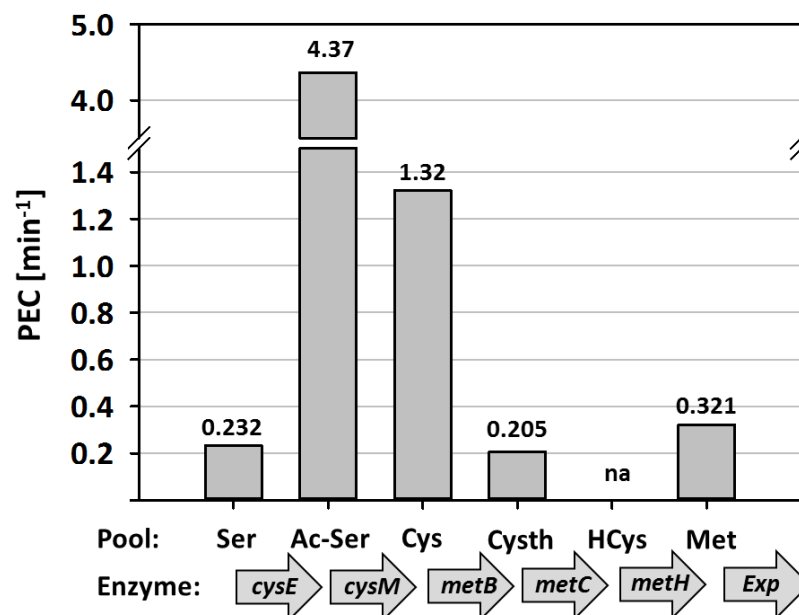


Abbildung 9.29 Ermittelte PEC-Werte innerhalb SRE IV perturbierter ¹³C-markierter Metabolitpools unter Normalisierung mit analogen nicht-markierten U¹²C-Poolkonzentrationen unter Aufführung nachgeschalteter beteiligter Enzyme in Form genetischer Notationen (Targets für zielgerichtete Stammoptimierungen). Aufgrund der netzwerk-inhärenten Abspaltung des ¹³C-Markierungssignals durch MetC war die Angabe eines alternativen PEC-Werts für den HCys-Pool nicht möglich (na).

Auch wenn die nicht-markierten [^{12}C]-Poolkonzentrationen in Folge der adaptierte Stimulusstrategie innerhalb des Perturbationszeitraums stark beeinflusst wurden sind, konnten bezüglich der relativen Verlaufs alternativer PEC-Werte eine hohe Übereinstimmung erzielt werden. Da der L-Homocysteinpool (HCys) aufgrund der netzwerk-inhärenten Signalverteilung vollständig unmarkiert vorlag, konnte allerdings für die Methioninsynthase (MetH/E) kein alternativer PEC-Wert angegeben werden. Im Rahmen metabolischer Kontrollanalysen (MCA) weist ein derart erweitertes PEC Kriterium viele Vorteile auf. Unter Anpassung der jeweiligen Stimulusstrategien könnten aufgrund der Signaltrennung auch verhältnismäßig kleine Perturbationsverläufe analysiert werden. Dies ermöglicht auch Perturbationsstudien innerhalb hochverzweigter Reaktionsnetzwerke, die einer ausgeprägten Signalverdünnung unterliegen (s. Kap. 9.2.2). In diesem Zusammenhang beeinflussen instationäre Markierungsverläufe bestehende Gleichgewichtskonzentrationen der jeweiligen Metabolitpools nur geringfügig. Da der alternative PEC-Ansatz letztlich auf den $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnissen basiert, könnte der analytische Aufwand durch eine relative Quantifizierung entsprechender Isotopomerfraktionen beträchtlich gemindert werden. Darüberhinaus könnte die Leakage-Problematik durch ein kältebasiertes methanolisches Quenching zur möglichst unmittelbaren Inaktivierung des zellulären Stoffwechsels umgangen werden.

9.7 Metabolische Situation in *E. coli* SPOT01

In unterschiedlichen Stimulus-Response-Experimenten (SRE I-IV) und anschließenden PEC-Analysen konnten übereinstimmend die **Cystathionin- β -Lyase** (MetC), die **Methionin-synthase** (MetH) und das **Methionin-Exportsystem** (YjeH) als Enzyme mit hoher Flusskontrolle identifiziert werden. Unter Berücksichtigung der Bildung und Akkumulation von Nebenprodukten konnte hierbei ein umfassendes Bild der metabolischen Gesamtsituation innerhalb der L-Methionin-Synthese des Produzenten *E. coli* SPOT01 unter produktionsrelevanten Kultivierungsbedingungen abgeleitet werden.

Die hohe Flusskontrolle durch **MetC** ist im Kontext einer langfristigen Akkumulation seines Folgemetabolits L-Homocystein konsistent. Die limitierte reduktive Assimilation von Thiosulfat führt gleichzeitig zu einer stöchiometrischen Unterversorgung an L-Cystein. In Folge wird cytotoxisches L-Homocystein unspezifisch durch die **Cystathionin- γ -Synthase** (MetB) zum Akkumulationsprodukt LL-Homolanthionin detoxifiziert. Der unspezifische Abbau von LL-Homolanthionin durch **MetC** führt zu einer erneuten Bildung von L-Homocystein und zu einem sich langfristig verstärkenden Akkumulationszyklus (L-HCys \leftrightarrow LL-HLan) (Krömer et al. 2006). Das zusätzlich anfallende α -Ketobutyrat stellt den Ausgangspunkt für eine alternative Syntheseroute von L-Isoleucin (1. Nebenprodukt) dar, wobei der konventionelle Syntheseweg durch eine Inhibierung des L-Threoninabbaus aufgrund hoher intrazellulärer Konzentration an L-Homocystein zusätzlich inhibiert ist (Tuite et al. 2005). Dieses für die L-Methionin-Synthese höchst unvorteilhafte Akkumulationsszenario (Kohlenstoff- und Energieverlust) konnte letztlich auf ein Ungleichgewicht in der Bereitstellung von L-Aspartat (TCA-Syntheseweg) und L-Serin (EMP-Syntheseweg) zurückgeführt werden, die zu einer zusätzlichen Ausschleusung von *O*-Succinyl-L-Homoserin (OSHS) (2. Nebenprodukt) führt. Die hohe Flusskontrolle durch **MetH** konnte eindeutig auf eine limitierte Transmethylierungskapazität (C_1 -Stoffwechsel) zurückgeführt werden. Eine kurzfristige Steigerung der L-Serin-Vefübarkeit innerhalb der adaptierten Perturbationsexperimente führte zu einem kurzfristigen Anstieg der intrazellulären L-Methioninkonzentration (SRE I-III 35-59%). Unter Verwendung von vollmarkiertem [$U^{13}C$]-L-Serin konnte gleichzeitig ein kurzfristiger Anstieg der biomasse-spezifischen L-Methionin-Bildungsrate um 26% innerhalb des Perturbationszeitraums nachgewiesen werden. Ein Schlüsselenzyme in diesem Zusammenhang stellt die **Hydroxymethyltransferase** (GlyA) dar, welche die Umsetzung von L-Serin (zentraler

Methylgruppendonor) zu Glycin katalysiert und Methylgruppen für die finale Transmethylierung bereitstellt. Im Vergleich zu der **Serin-Acetyltransferase** (CysE) (K_m 110 μM) besitzt GlyA (K_m 300 μM) eine geringere Affinität zu L-Serin (Kredich et al. 1966, Fu et al. 2003). Gleichzeitig unterstreichen die Perturbationsexperimente eine hohe enzymatische Flexibilität von CysE (sehr starke Perturbation des Folgemetabolits O-Acetyl-L-Serin) unter einer vergleichsweise geringeren Flexibilität von GlyA (mäßige Perturbation des Folgemetabolits Glycin). Als Knotenpunkt des anabolen Netzwerksystems unterliegt der L-Serin-Pool hohen Umsatzraten nachgeschalteter Enzyme und weist unter Umrechnung (Wang et al. 2013) eine vergleichsweise geringe intrazelluläre Gleichgewichtskonzentration auf (ca. 60 μM).

In diesem Zusammenhang kann somit eine Kompensation des TCA/EMP-Ungleichgewichts durch eine gezielte Affinitätssteigerung von **GlyA** bzw. Affinitätsabschwächung von **CysE** erreicht werden. Insbesondere GlyA ist in *E. coli* umfassend strukturell untersucht worden. Hierbei konnte durch gezielte Aminosäuresubstitutionen innerhalb des katalytischen Zentrums die Affinität des Enzyms zu L-Serin stark erhöht werden (K_m ca. 130 μM) (Fu et al. 2003). Die Umsatzrate (k_{cat}) blieb im Vergleich zum Wildtypenzym hierbei weitgehend erhalten, wodurch die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) signifikant gesteigert werden konnte. Eine entsprechende Modifikation könnte somit aufgrund einer erhöhten Methylbereitstellung zu einer Freischaltung der Methioninsynthese und einer verstärkten Umsetzung des L-Homocysteinpools führen. In Folge kann das Ungleichgewicht zwischen L-HCys/L-Cys reduziert werden, wodurch der detoxifizierende Akkumulationszyklus aufgehoben werden könnte. Der kurzfristige Anstieg der L-Methionin-Bildungsrate verweist somit auf eine potentielle Ausbeutesteigerung von 20-30%. Allerdings konnte auch das Methionin-Exportsystem als Knotenpunkt hoher Flusskontrolle identifiziert werden. Der in *E. coli* erst kürzlich identifizierte Exporter konnte aber noch nicht ausreichend charakterisiert werden, wobei von einer Induktion in Abhängigkeit hoher intrazellulärer L-Methioninkonzentrationen ausgegangen wird (Liu et al. 2015). Das metabolische Szenario der L-Methionin-Synthese in *E. coli* SPOT01 sowie anhand der Metabolischen Kontrollanalyse abgeleitete enzymatische Targets wurden in Abbildung 9.30 zusammengefasst.

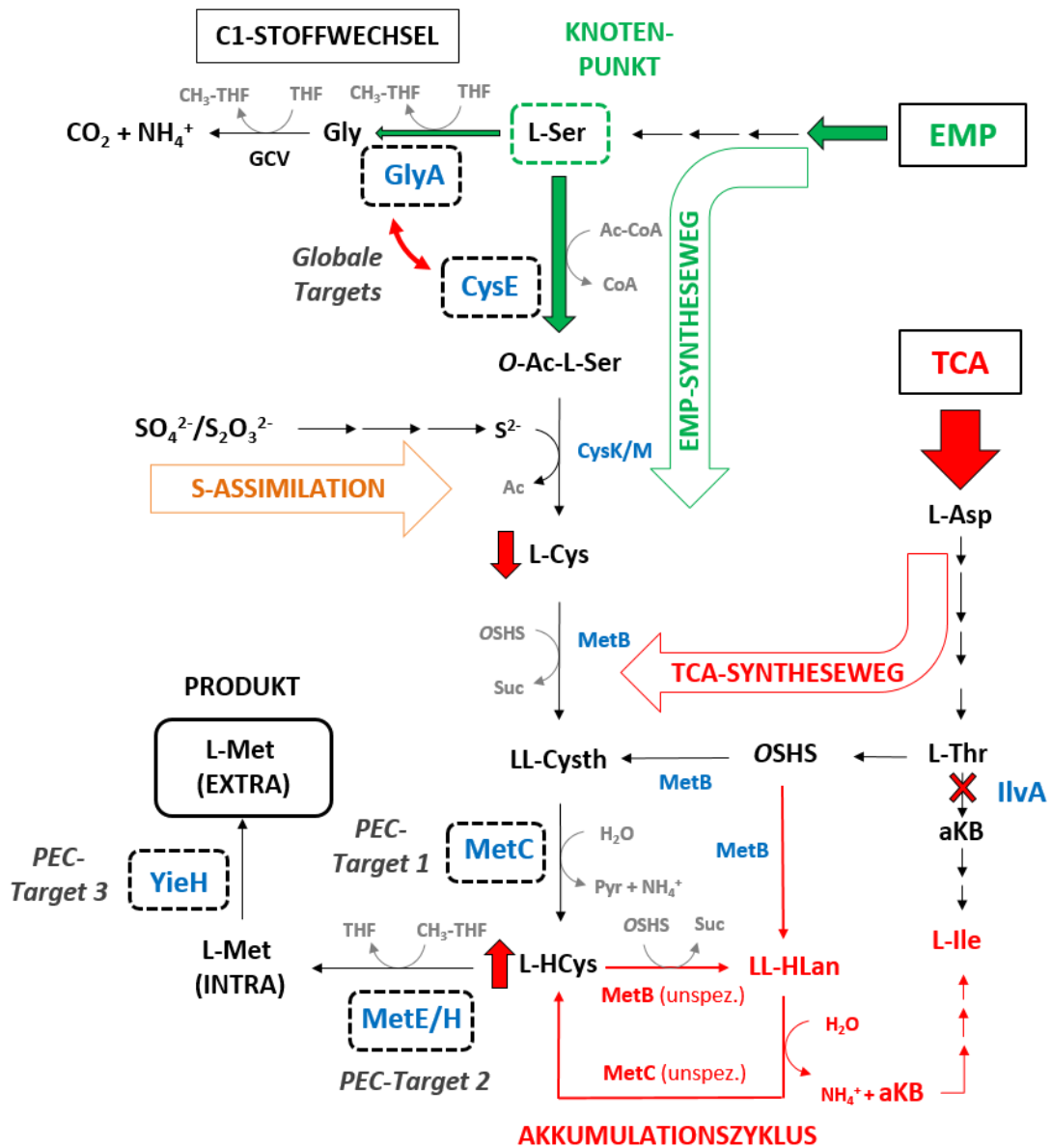


Abbildung 9.30 Metabolisches Szenario innerhalb des L-Methionin-Synthesenetzwerks in *E. coli* SPOT01 unter produktionsnahen unlimitierten Kultivierungsbedingungen. Berücksichtigt wurde der L-HCys/LL-HLan-Akkumulationszyklus unter alternativer Synthese von L-Isoleucin. Zusätzlich wurden enzymatische PEC-Targets (MetC, MetE und YieH) sowie hiervon abgeleitete globale Targets (GlyA und CysE) aufgeführt.

10 Literatur

Agilent Technologies (2007) Agilent 6410 Triple Quad LC/MS System - Concepts Guide - , 4th edn, Germany

Aitken SM, Lodha PH, Morneau DJ (2011) The enzymes of the transsulfuration pathways: active-site characterizations. *Biochim Biophys Acta* 1814(11):1511-7

Alpert AJ (1990) Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr* 499:177-96

Annesley TM (2003) Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical Chem* 49(7):1041-1044

Asakawa Y, Tokida N, Ozawa C, Ishiba M, Tagaya O, Asakawa N (2008) Suppression effects of carbonate on the interaction between stainless steel and phosphate groups of phosphate compounds in high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1198-1199:80-6

Bäßler KH, Fekl WL, Lang K (1987) Grundbegriffe der Ernährungslehre, 4th edn, Springer, Berlin

Beck A, Deeg M, Moeschel K, Schmidt EK, Schleicher ED, Voelter W, Häring HU, Lehmann R (2001) Alkaline liquid chromatography/electrospray ionization skimmer collision-induced dissociation mass spectrometry for phosphopeptide screening. *Rapid Commun Mass Spectrom* 15:2324-2333

Bennett BD, Kimball EH, Gao M, Osterhout R, van Dien SJ, Rabinowitz JD (2009) Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol* 5:593-599

Bequette BJ, Sunny NE, El-Kadi SW, Owens SL (2006) Application of stable isotopes and mass isotopomer distribution analysis to the study of intermediary metabolism of nutrients. *J Anim Sci* 84 (E Suppl):E50-9

Bergmeyer HU (1984) Methods of enzymatic analysis. Vol 7, 3rd edn Wiley-VCH, Weinheim, Germany

Bolten CJ, Kiefer P, Letisse F, Portais JC, Wittmann C (2007) Sampling for metabolome analysis of microorganisms. *Anal Chem* 79:3843-9

Born TL, Blanchard JS (1999) Enzyme-catalyzed acylation of homoserine: mechanistic characterization of the Escherichia coli metA-encoded homoserine transsuccinylase. *Biochemistry*. 38(43):14416-23

Brosnan JT, Brosnan ME (2006) The sulfur-containing amino acids: an overview. *J Nutr* 136(6):1636-1640

Bruins AP (1998) Mechanistic aspects of electrospray ionization. *J Chrom A* 794:345-357

Buchholz A, Hurlebaus J, Wandrey C, Takors R (2002) Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics. *Biomol Eng* 19(1):5-15

Buchholz A, Takors R, Wandrey C (2001) Quantification of intracellular metabolites in Escherichia coli K12 using liquid chromatographic-electrospray ionization tandem mass spectrometric techniques. *Anal Biochem* 295:129-137

Budzikiewicz H, Schäfer M (2005) *Massenspektrometrie - Eine Einführung*. 5th edn, Wiley-VCH, Weinheim, Germany

Buescher JM, Antoniewicz MR, Boros LG, Burgess SC, Brunengraber H, Clish CB, DeBerardinis RJ, Feron O, Frezza C, Ghesquiere B, Gottlieb E, Hiller K, Jones RG, Kamphorst JJ, Kibbey RG, Kimmelman AC, Locasale JW, Lunt SY, Maddocks OD, Malloy C, Metallo CM, Meuwillet EJ, Munger J, Nöh K, Rabinowitz JD, Ralser M, Sauer U, Stephanopoulos G, St-Pierre J, Tennant DA, Wittmann C, Vander Heiden MG, Vazquez A, Vousden K, Young JD, Zamboni N, Fendt SM (2015) A roadmap for interpreting (13)C metabolite labeling patterns from cells. *Curr Opin Biotechnol* 34:189-201

Buszewski B, Noga S (2012) Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)--a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem* 402:231-47

Cai XY, Maxon ME, Redfield B, Glass R, Brot N, Weissbach H (1989) Methionine synthesis in Escherichia coli: effect of the MetR protein on metE and metH expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (12):4407-4411

Canelas AB, ten Pierick A, Ras C, Seifar RM, van Dam JC, van Gulik WM, Heijnen JJ (2009) Quantitative evaluation of intracellular metabolite extraction techniques for yeast metabolomics. *Anal Chem* 81(17):7379-89

Chapman AG, Fall L, Atkinson DE (1971) Adenylate energy charge in Escherichia coli during growth and starvation. J Bacteriol 1971 108(3):1072-86

Cheng Y, Lu Z, Neue U (2001) Ultrafast liquid chromatography/ultraviolet and liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis. Rapid Commun Mass Spectrom 15:141-151

Choi J, Antoniewicz MR (2011) Tandem mass spectrometry: a novel approach for metabolic flux analysis. Metab Eng 13(2):225-33

Clarke S, Banfield K (2001) S-Adenosylmethionine-dependent methyltransferases in Carmel R, Jacobsen DW: Homocysteine in health and disease. 63–78, Cambridge University Press, Cambridge

Cohen GN (1985) Aspartate-semialdehyde dehydrogenase from Escherichia coli. Methods Enzymol 113:600-2

Crown SB, Antoniewicz MR (2013) Publishing 13C metabolic flux analysis studies: a review and future perspectives. Metab Eng 20:42-8

da Luz JA, Hans E, Zeng AP (2013) Automated fast filtration and on-filter quenching improve the intracellular metabolite analysis of microorganisms. Eng Life Sci 14(2):135-142

de Koning W, van Dam K (1992) A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. Analytical biochem 204(1):118-123

Dell'mour M, Jaitz L, Oburger E, Puschenreiter M, Koellensperger G, Hann S (2010) Hydrophilic interaction LC combined with electrospray MS for highly sensitive analysis of underivatized amino acids in rhizosphere research. J Sep Sci 33:911-922

Dunn WB, Bailey NJ (2005a) Measuring the metabolome: current analytical technologies. The Analyst 130(5):606-625

Dunn WB, Ellis DI (2005b) Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. Trends in Anal. Chem. 24:285-294

Dwivedi CM, Ragin RC, Uren JR (1982) Cloning, purification, and characterization of beta-cystathionase from Escherichia coli. Biochemistry 21: 3064-3069

Edwards JL, Chisolm CN, Shackman JG, Kennedy RT (2006) Negative mode sheathless capillary electrophoresis electrospray ionization-mass spectrometry for metabolite analysis of prokaryotes. *J Chromatogr A* 1106:80-88

Farkhoy M, Modirsanei M, Ghavidel O, Sadegh M, Jafarnejad S (2012) Evaluation of protein concentration and limiting amino acids including lysine and met + cys in prestarter diet on performance of broilers. *Vet Med Int* 2012:394189

Fei F, Bowdish DM, McCarry BE (2014) Comprehensive and simultaneous coverage of lipid and polar metabolites for endogenous cellular metabolomics using HILIC-TOF-MS. *Anal Bioanal Chem* 406:3723-3733

Fell DA (1992) Metabolic Control Analysis: A survey of its theoretical and experimental development. *Biochem J* 286:313-330

Ferretti G, Bacchetti T, Moroni C, Vignini A, Nanetti L, Curatola G (2004) Effect of homocysteinylation of low density lipoproteins on lipid peroxidation of human endothelial cells. *J Cell Biochem* 92: 351-360

Fontecave M, Atta M, Mulliez E (2004) S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem Sci* 29(5):243-9

Foster MA, Tejerina G, Guest JR, Woods DD (1964) Two enzymic mechanisms for the methylation of homocysteine by extracts of *Escherichia coli*. *Biochem J* 92(3):476-88

Friedman M (1999) Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids. *J Agric Food Chem* 47:3457-3479

Fries M, Jung HI, Perham RN (2003) Reaction mechanism of the heterotetrameric ($\alpha_2\beta_2$) E1 component of 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes. *Biochemistry* 42(23):6996-7002

Fu TF, Boja ES, Safo MK, Schirch V (2003) Role of proline residues in the folding of serine hydroxymethyltransferase. *J Biol Chem*. 278(33):31088-94

Fukagawa NK, (2006) Sparing of Methionine Requirements: Evaluation of Human Data Takes Sulfur Amino Acids Beyond Protein. *The Journal of Nutrition* 136 (6):1676-1681

Gelfand DH, Steinberg RA (1977) Escherichia coli mutants deficient in the aspartate and aromatic amino acid aminotransferases. J Bacteriol 130(1):429-40

Gika HG, Theodoridis GA, Vrhovsek U, Mattivi F (2012) Quantitative profiling of polar primary metabolites using hydrophilic interaction ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr A 1259:121-127

González JC, Banerjee RV, Huang S, Sumner JS, Matthews RG (1992) Comparison of cobalamin-independent and cobalamin-dependent methionine synthases from Escherichia coli: two solutions to the same chemical problem. Biochemistry 31(26):6045-56

<http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/methionine-market> (Stand Februar 2016)

Grant GA (2012) Contrasting catalytic and allosteric mechanisms for phosphoglycerate dehydrogenases. Arch Biochem Biophys. 519(2):175-85

Griffin JL, Williams HJ, Sang E, Clarke K, Rae C, Nicholson JK (2001) Metabolic profiling of genetic disorders: a multitissue H-1 nuclear magnetic resonance spectroscopic and pattern recognition study into dystrophic tissue. Anal Biochem 293, 16-21

Gross JH (2011) Mass Spectrometry - A Textbook, 2nd edn, Springer, Berlin

Guillon JM, Mechulam Y, Schmitter JM, Blanquet S, Fayat G (1992) Disruption of the gene for Met-tRNA(fMet) formyltransferase severely impairs growth of Escherichia coli. J Bacteriol 174(13):4294-301

Halliday NM, Hardie KR, Williams P, Winzer K, Barrett DA (2010) Quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometry profiling of activated methyl cycle metabolites involved in LuxS-dependent quorum sensing in Escherichia coli. Anal Biochem 403(1-2):20-9

Hama H, Shimamoto T, Tsuda M, Tsuchiya T (1988) Characterization of a novel L-serine transport system in Escherichia coli. J Bacteriol 170(5):2236-2239

Hauer B, Breuer M, Ditrich K, Habicher T, Keßeler M, Stürmer R, Zelinski T (2004) Industrielle Chemie: Aufsätze - Industrielle Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Zwischenprodukten. Angew Chemie 116: 806-843

Hiller J, Franco-Lara E, Weuster-Botz D (2007) Metabolic profiling of Escherichia coli cultivations: evaluation of extraction and metabolite analysis procedures. *Biotechnol. Lett.* 29:1169-1178

Hindson VJ, Shaw WV (2003) Random-order ternary complex reaction mechanism of serine acetyltransferase from Escherichia coli. *Biochemistry* 42(10):3113-9

Holbrook EL, Greene RC, Krueger JH (1990) Purification and properties of cystathionine gamma-synthase from overproducing strains of Escherichia coli. *Biochemistry.* 29(2):435-42

Holms H (1996) Flux analysis and control of the central metabolic pathways in Escherichia coli. *FEMS Microbiol* 19(2):85-116

Hoppe B, Martens J (1984) Aminosäuren – Herstellung und Gewinnung. *Chemie in unserer Zeit* 18: 73–86

Huang HT (1963) Accumulation of 1-homolanthionine by an Escherichia coli mutant. *Biochemistry* 2:296-8

Hurlebaus J, Buchholz A, Alt W, Wiechert W, Takors R (2002) MMT--a pathway modeling tool for data from rapid sampling experiments. *In Silico Biol* 2(4):467-84

Jakubowski H (1990) Proofreading in vivo: editing of homocysteine by methionyl-tRNA synthetase in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci* 87:4504–4508

Jakubowski H (1999) Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *Faseb J* 13: 2277-2283

Jakubowski H (2000) Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *J Nutr* 130(2):377-381

Jeon BR, Lee SM (2001) S-adenosylmethionine protects post ischemic mitochondrial injury in rat liver. *J Hepatol* 34(3):395-401

Kaletka C, Schäuble S, Rinas U, Schuster S (2013) Metabolic costs of amino acid and protein production in Escherichia coli. *Biotechnol J* 8(9):1105-14

Kitajima T, Chiba Y (2013) Selenomethionine metabolism and its toxicity in yeast. *Biomol Concepts* 4(6):611-6

Kiefer P, Portais JC, Vorholt JA (2008) Quantitative metabolome analysis using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Anal Biochem* 382:94-100

Kim YM, Ogawa W, Tamai E, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T (2002) Purification, reconstitution, and characterization of Na(+)/serine symporter, SstT, of *Escherichia coli*. *J Biochem* 132:71-76

Kredich NM, Tomkins GM (1966) The enzymic synthesis of L-cysteine in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 241(21):4955-65

Kredich NM (2008) Biosynthesis of Cysteine. *EcoSal Plus*. 3(1)

Kresnowati MT, van Winden WA, Heijnen JJ (2005) Determination of elasticities, concentration and flux control coefficients from transient metabolite data using linlog kinetics. *Metabolic Engineering* 7(2):142–153

Krömer JO, Sorgenfrei O, Klopprogge K, Heinzle E, Wittmann C (2004) In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome, and fluxome. *J Bacteriol* 186:1769–1784

Krömer JO, Wittmann C, Schröder H, Heinzle E (2006) Metabolic pathway analysis for rational design of L-methionine production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng* 8(4):353-69

Kumar D, Subramanian K, Bisaria VS, Sreekrishnan TR, Gomes J (2005) Effect of cysteine on methionine production by a regulatory mutant of *Corynebacterium lilium*. *Bioresour Technol* 96(3):287-94

Kuznetsova E, Proudfoot M, Gonzalez CF, Brown G, Omelchenko MV, Borozan I, Carmel L, Wolf YI, Mori H, Savchenko AV, Arrowsmith CH, Koonin EV, Edwards AM, Yakunin AF (2006) Genome-wide analysis of substrate spec of the *Escherichia coli* haloacid dehalogenase-like phosphatase family. *J Biol Chem* 281(47):36149-61

Kvitvang HF, Andreassen T, Adam T, Villas-Bôas SG, Bruheim P (2011) Highly sensitive GC/MS/MS method for quantitation of amino and nonamino organic acids. *Anal Chem* 83:2705-11

Laber B, Clausen T, Huber R, Messerschmidt A, Egner U, Müller-Fahrnow A, Pohlenz HD (1996) Cloning, purification, and crystallization of Escherichia coli cystathionine beta-lyase. FEBS Lett 379(1):94-6

Lam HM, Winkler ME (1990) Metabolic relationships between pyridoxine (vitamin B6) and serine biosynthesis in Escherichia coli K-12. J Bacteriol 172(11):6518-28

Lane AN, Fan TW, Higashi RM (2008) Isotopomer-based metabolomic analysis by NMR and mass spectrometry. Methods Cell Biol 84:541-88

Leclercq AM, Chaqneau T, Cochard S, Hamaoui M, Larbiere (1993) Comparative utilisation of sulphur-containing amino acids by genetically lean or fat chickens. Brit. Poultry Sci 34:383-391

Lee LW, Ravel JM, Shive W (1966) Multimetabolite control of a biosynthetic pathway by sequential metabolites. J Biol Chem 241(22):5479-80

Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K (2005) Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. Appl Microbiol Biotechnol 69(1):1-8

Lieber CS (1999) Role of S-adenosyl-L-methionine in the treatment of liver diseases. J Hepatol 30(6):1155-9

Linton KJ, Higgins CF (1998) The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins. Mol Microbiol 28(1):5-13

Liu H, Wang Y, Tang Q, Kong W, Chung WJ, Lu T (2014) MEP pathway-mediated isopentenol production in metabolically engineered Escherichia coli. Microb Cell Fact 13:135

Liu Q, Liang Y, Zhang Y, Shang X, Liu S, Wen J, Wen T (2015) YjeH Is a Novel Exporter of L-Methionine and Branched-Chain Amino Acids in Escherichia coli. Appl Environ Microbiol 81(22):7753-66

Lo TC (1977) The molecular mechanism of dicarboxylic acid transport in Escherichia coli K 12. J Supramol Struct 7(3-4):463-80

Lodha PH, Jaworski AF, Aitken SM (2010) Characterization of site-directed mutants of residues R58, R59, D116, W340 and R372 in the active site of E. coli cystathionine beta-lyase. Protein Sci 19(3):383-391

Lu W, Kimball E, Rabinowitz JD (2006) A high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitation of nitrogen-containing intracellular metabolites. *J Am Soc Mass Spectrom* 17:37-50

Luo B, Groenke K, Takors R, Wandrey C, Oldiges M (2007) Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1147:153–164

Lüssling T, Müller KP, Schreyer G and Theissen F (1975) Verfahren zur Wiedergewinnung von Methionin und Kalium aus den im Kreislauf geführten Lösungen des Kaliumcarbonat-Methioninverf. German Patent 24 21 167

Magnus JB, Hollwedel D, Oldiges M, Takors R (2006) Monitoring and modelling of the reaction dynamics in the valine/leucine synthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Prog* 22(4):1071-83

Magnus JB, Oldiges M, Takors R (2009) The identification of Enzyme Targets for the Optimization of a Valine Producing *Corynebacterium glutamicum* Strain Using a Kinetic Model. *Biotechnol Prog* 25(3):754-762

Maier TH (2003) Semisynthetic production of unnatural L-alpha-amino acids by metabolic engineering of the cysteine-biosynthetic pathway. *Nat Biotechnol* 21(4):422-7

Mansoori BA, Volmer DA, Boyd RK (1997) “Wrong-way-round” Electrospray Ionization of Amino Acids. *Rapid Commun Mass Spectrom* 11:1120–1130

Mauch K, Vaseghi S, Reuss M (2000) Quantitative Analysis of Metabolic and Signaling Pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Schügerl K, Bellgardt K-H (2000) *Bioreaction Engineering - Modeling and Control*. Chapter 14:435–477, 1st edn Heidelberg, Germany

Mashego MR, Rumbold K (2007) Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. *Biotechnology Letters* 29(1):1-16

Mashego MR, Wu L, Van Dam JC, Ras C, Vinke JL, Van Winden WA, Van Gulik WM, Heijnen JJ (2004) MIRACLE: mass isotopomer ratio analysis of U-13C-labeled extracts. A new method for accurate quantification of changes in concentrations of intracellular metabolites. *Biotechnol Bioeng* 85(6):620-8

Membrillo-Hernández J, Coopamah MD, Channa A, Hughes MN, Poole RK (1998) A novel mechanism for upregulation of the Escherichia coli K-12 hmp (flavo-haemoglobin) gene by the 'NO releaser', S-nitrosoglutathione: nitrosation of homocysteine and modulation of MetR binding to the glyA-hmp intergenic region. *Mol Microbiol* 29(4):1101-12

Merck-Sequant (2008) A Practical Guide to HILIC – including ZIC®-HILIC applications, 5th edn Umea, Sweden

Michopoulos F, Whalley N, Theodoridis G, Wilson ID, Dunkley TP, Critchlow SE (2014) Targeted profiling of polar intracellular metabolites using ion-pair-high performance liquid chromatography and -ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: applications to serum, urine and tissue extracts. *J Chromatogr A* 1349:60-68

Mischoulon D, Fava M (2002) Role of S-adenosyl-L-Methionine in the treatment of depression: a review of the evidence. *Am J Clin Nutr* 76(5):1158S-61

Mitsuhashi S (2014) Current topics in the biotechnological production of essential amino acids, functional amino acids, and dipeptides. *Curr Opin Biotechnol* 26:38-44

Moskovitz J (2005) Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. *Biochim Biophys Acta* 1703(2):213-9

Nakatani T, Ohtsu I, Nonaka G, Wiriyanawudhiwong N, Morigasaki S, Takagi H (2012) Enhancement of thioredoxin/glutaredoxin-mediated L-cysteine synthesis from S-sulfocysteine increases L-cysteine production in Escherichia coli. *Microb Cell Fact* 11:62

National Research Council (NRC) (1994) Nutrient requirement of poultry. 9th edn, National Academy Press, Washington D.C.

Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low Jr KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE (1996) Escherichia coli and Salmonella - Cellular and Molecular Biology. Vol 1-2, 2nd edn, American Society for Microbiology, Washington D.C.

Niefenführ S, Wiechert W, Nöh K (2015) How to measure metabolic fluxes: a taxonomic guide for (13)C fluxomics. *Curr Opin Biotechnol.* 34:82-90

Nguyen HP, Schug KA (2008) The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications. *J Sep Sci* 31(9):1465-80

Nguyen HP, Yang SH, Wigginton JG, Simpkins JW, Schug KA (2010) Retention behavior of estrogen metabolites on hydrophilic interaction chromatography stationary phases. *J Sep Sci* 33(6-7):793-802

Nicolas C, Kiefer P, Letisse F, Krömer J, Massou S, Soucaille P, Wittmann C, Lindley ND, Portais JC (2007) Response of the central metabolism of *Escherichia coli* to modified expression of the gene encoding the glucose-6-phosphate dehydrogenase. *581(20):3771-6*

Nielsen J (1998) Metabolic engineering: Techniques for analysis of targets for genetic manipulations. *Biotechnol. Bioeng.* 58(2):125-132

Nöh K, Droste P, Wiechert W (2014) Visual workflows for ¹³C-metabolic flux analysis. *Bioinform* 31(3):346-54

Ogawa W, Kim YM, Mizushima T, Tsuchiya T (1998) Cloning and expression of the gene for the Na⁺-coupled serine transporter from *Escherichia coli* and characteristics of the transporter. *J Bacteriol* 180(24):6749–6752

Okamura-Ikeda K, Ohmura Y, Fujiwara K, Motokawa Y (1993) Cloning and nucleotide sequence of the *gcv* operon encoding the *Escherichia coli* glycine-cleavage system. *Eur J Biochem* 216(2):539-48

Oldiges M, Kunze M, Degenring D, Sprenger GA, Takors R (2004) Stimulation, monitoring, and analysis of pathway dynamics by metabolic profiling in the aromatic amino acid pathway. *Biotechnol Prog* 20:1623-1633

Oldiges M, Lütz S, Pflug S, Schroer K, Stein N, Wiendahl C (2007) Metabolomics: current state and evolving methodologies and tools. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:495-511

Oldiges M, Takors R (2005) Applying metabolic profiling techniques for stimulus-response experiments: chances and pitfalls. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 92:173-96

Park JW, Jung WS, Park SR, Park BC, Yoon YJ (2007) Analysis of intracellular short organic acid-coenzyme A esters from actinomycetes using liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 42(9):1136-47

Peng L, Farkas T (2008) Analysis of basic compounds by reversed-phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry in high-pH mobile phases. *J Chromatogr A* 1179:131-144

Persicke M, Plassmeier J (2011) Size exclusion chromatography-An improved method to harvest *Corynebacterium glutamicum* cells for the analysis of cytosolic metabolites. *J of Biotech* 154(2-3):171-178

Pesek JJ, Matyska MT, Fischer SM (2011) Improvement of peak shape in aqueous normal phase analysis of anionic metabolites. *J Sep Sci* 34(24):3509-16

Piraud M, Vianey-Saban C, Petritis K, Elfakir C, Steghens JP, Morla A, Bouchu D (2003) ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionisation mode. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17:1297-1311

Plassmeier J, Barsch A (2007) Investigation of central carbon metabolism and the 2-methylcitrate cycle in *Corynebacterium glutamicum* by metabolic profiling using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of biotech.* 130(4):354-363

Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* 57(3):543-94.

Preinerstorfer B, Schiesel S, Lämmerhofer M, Lindner W (2010) Metabolic profiling of intracellular metabolites in fermentation broths from beta-lactam antibiotics production by liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. *J Chromatogr. A* 1217:312-28

Qu J, Wang Y, Luo G, Wu Z, Yang C (2002) Validated quantitation of underivatized amino acids in human blood samples by volatile ion-pair reversed-phase liquid chromatography coupled to isotope dilution tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 74:2034-2040

Ramautar R, Somsen GW, de Jong GJ (2013) CE-MS for metabolomics: developments and applications in the period 2010-2012. *Electrophoresis* 34:86-98

Rappold BA, Grant RP (2011) HILIC-MS/MS method development for targeted quantitation of metabolites: practical considerations from a clinical diagnostic perspective. *J Sep Sci* 34:3527-3537

Ritter JB, Genzel Y, Reichl U (2006) High-performance anion-exchange chromatography using on-line electrolytic eluent generation for the determination of more than 25 intermediates

from energy metabolism of mammalian cells in culture. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 843(2):216-26

Roels JA (1983) Energetics and kinetics in biotechnology. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford

Rohlman CE, Matthews RG (1990) Role of purine biosynthetic intermediates in response to folate stress in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172(12):7200-10

Saint-Girons I, Duchange N, Zakin MM, Park I, Margarita D, Ferrara P, Cohen GN (1983) Nucleotide sequence of *metF*, the *E. coli* structural gene for 5-10 methylene tetrahydrofolate reductase and of its control region. *Nucleic Acids Res* 11(19):6723-32

Sauer U, Canonaco F, Heri S, Perrenoud A, Fischer E (2004) The soluble and membrane-bound transhydrogenases *UdhA* and *PntAB* have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 279(8):6613-9

Sauer U, Eikmanns BJ (2005) The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol* 29(4):765-94

Sauter M, Moffatt B, Saechao MC, Hell R, Wirtz M (2013) Methionine salvage and S-adenosylmethionine: essential links between sulfur, ethylene and polyamine biosynthesis. *Biochem J* 451(2):145-54

Schaub J, Schiesling C (2006) Integrated sampling procedure for metabolome analysis. *Biotech progress* 22(5):1434-1442

Schellenberg GD, Furlong CE (1977) Resolution of the multiplicity of the glutamate and aspartate transport systems of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 252(24):9055-64

Schiesel S, Lämmerhofer M, Lindner W (2010) Multitarget quantitative metabolic profiling of hydrophilic metabolites in fermentation broths of β -lactam antibiotics production by HILIC-ESI-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 396(5):1655-79

Schlegel HG (1992) Allgemeine Mikrobiologie. 7th edn, Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Schmitz M, Hirsch E, Bongaerts J, Takors R (2002) Pulse Experiments as a Prerequisite for the Quantification of In Vivo Enzyme Kinetics in Aromatic Amino Acid Pathway of *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 18, 935-941

Seifar RM, Ras C, Deshmukh AT, Bekers KM, Suarez-Mendez CA, da Cruz AL, van Gulik WM, Heijnen JJ (2013) Quantitative analysis of intracellular coenzymes in *Saccharomyces cerevisiae* using ion pair reversed phase ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1311:115-120

Shao Z, Lin RT, Newman EB (1994) Sequencing and characterization of the *sdaC* gene and identification of the *sdaCB* operon in *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem* 222(3):901-7

Sherman F, Stewart JW, Tsunasawa S (1985) Methionine or Not Methionine at the Beginning of a Protein. *BioEssays* 3(1):27-31

Silvester S (2013) Mobile phase pH and organic modifier in reversed-phase LC-ESI-MS bioanalytical methods: assessment of sensitivity, chromatography and correlation of retention time with in silico logD predictions. *Bioanalysis* 5(22):2753-70

Sirko A, Hryniewicz M, Hulanicka D, Böck A (1990) Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence and expression of the *cysTWAM* gene cluster. *J Bacteriol* 172(6):3351-7

Sirko A, Zatyka M, Sadowy E, Hulanicka D (1995) Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: evidence for a functional overlapping of sulfate- and thiosulfate-binding proteins. *J Bacteriol* 177(14):4134-6

Six S, Andrews SC, Uden G, Guest JR (1994) *Escherichia coli* possesses two homologous anaerobic C4-dicarboxylate membrane transporters (*DcuA* and *DcuB*) distinct from the aerobic dicarboxylate transport system (*Dct*). *J Bacteriol* 176(21):6470-8

Smallbone K, Stanford NJ (2013) Kinetic modeling of metabolic pathways: application to serine biosynthesis. *Methods Mol Biol* 985:113-21

Soeken KL, Lee WL, Bausell RB, Agelli M, Berman BM (2002) Safety and efficacy of S-adenosylmethionine (SAMe) for osteoarthritis. *J Fam Pract* 51(5):425-30

Stephanopoulos G (1999) Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metab Eng* 1(1):1-11

Sumantran VN, Schweizer HP, Datta P (1990) A novel membrane-associated threonine permease encoded by the *tdcC* gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 172(8):4288-94

Takors R, Bathe B, Rieping M, Hans S, Kelle R, Huthmacher K (2007) Systems biology for industrial strains and fermentation processes—example: amino acids. *J Biotechnol* 129:181-190

Tang DQ, Zou L, Yin XX, Ong CN (2014) HILIC-MS for metabolomics: An attractive and complementary approach to RPLC-MS. *Mass Spectrom* doi:10.1002/mas.21445

Teleki A, Sánchez-Kopper A, Takors R (2015) Alkaline conditions in hydrophilic interaction liquid chromatography for intracellular metabolite quantification using tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 15;475:4-13

Templeton BA, Savageau MA (1974) Transport of biosynthetic intermediates: homoserine and threonine uptake in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 117(3):1002-9

Theobald U, Mailinger W, Reuss M, Rizzi M (1993) In vivo analysis of glucose-induced fast changes in yeast adenine nucleotide pool applying a rapid sampling technique. *Analytical Biochem* 214(1):31-7

Thomson BA, Iribane JV (1979) Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *J Chem Phys* 71:4451-4463

Tomlinson AJ, Chicz RM (2003) Microcapillary liquid chromatography/tandem mass spectrometry using alkaline pH mobile phases and positive ion detection. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17(9):909-16

Townsend DM, Tew KD, Tapiero H (2004) Sulfur containing amino acids and human disease. *Biomed Pharmacother* 58(1):47-55

Tso J, Aga DS (2011) Wrong-way-round ionization of sulfonamides and tetracyclines enables simultaneous analysis with free and conjugated estrogens by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 83:269-277

Tuite NL, Fraser KR, O'byrne CP (2005) Homocysteine toxicity in *Escherichia coli* is caused by a perturbation of branched-chain amino acid biosynthesis. *J Bacteriol* 187 (13) 4362–4371

Tuytten R, Lemièrre F, Witters E, van Dongen W, Slegers H, Newton RP, van Onckelen H, Esmans EL (2005) Stainless steel electrospray probe: a dead end for phosphorylated organic compounds? *J Chromatogr A* 1104 (1-2):209-21

Tweeddale H, Notley-McRobb L, Ferenci T (1998) Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool (“metabolome”) analysis. *J Bacteriol* 180:5109-5116

Uren JR (1987) Cystathionine beta-lyase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 143:483-6

Usuda Y, Kurahashi O (2005) Effects of deregulation of methionine biosynthesis on methionine excretion in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 71 (6) 3228–3234

van Gulik WM (2010) Fast sampling for quantitative microbial metabolomics. *Curr Opin Biotechnol* 21(1):27-34

Visser D, Heijnen JJ (2002) The mathematics of metabolic control analysis revisited. *Metab Eng* 4: 114-123

Visser D, Heijnen JJ (2003) Dynamic simulation and metabolic re-design of a branched pathway using linlog kinetics. *Metab Eng* 5:164-176

Visser D, Schmid JW, Mauch K, Reuss M, Heijnen JJ (2004) Optimal re-design of primary metabolism in *Escherichia coli* using linlog kinetics. *Metab Eng* 6:378-390

Volmer M, Gettmann J, Scholz S, Büntemeyer H, Noll T (2011) A method for metabolomics sampling of suspended animal cells using fast filtration. *BMC Proc* 22;5 Suppl 8:P93

Wang QZ, Wu CY, Chen T, Chen X, Zhao XM (2006) Integrating metabolomics into a systems biology framework to exploit metabolic complexity: strategies and applications in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 70:151-161

Wang L, Zhou YJ, Ji D, Zhao ZK (2013) An accurate method for estimation of the intracellular aqueous volume of *Escherichia coli* cells. *J Microbiol Methods* 93(2):73-6

Weaver DS, Keseler IM, Mackie A, Paulsen IT, Karp PD (2014) A genome-scale metabolic flux model of *Escherichia coli* K-12 derived from the EcoCyc database. *BMC Syst Biol* 30;8:79

Weissbach H, Brot N (1991) Regulation of methionine synthesis in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 5(7): 1593–1597

Wells G, Prest H, Russ IV CW (2011) Technical Note: Signal, Noise, and Detection Limits in Mass Spectrometry. Agilent Technologies 5990-7651EN

Weuster-Botz D (1997) Sampling tube device for monitoring intracellular metabolite dynamics. *Anal Biochem* 246:225-33

Willke T (2014) Methionine production-a critical review. *Appl Microbiol Biotechnol* 98(24):9893-914

Wittmann C, Kromer JO (2004) Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria. *Analytical biochem.* 327(1):135-139

Wittmann C, Lee SY (2012) *Systems Metabolic Engineering*. 1st edn, Springer Netherlands, Dordrecht

WO 2007/012078 (PCT). Methionine producing recombinant microorganisms, BASF AG (DE)

WO 2007/077041A1 Process for the preparation of methionine and its precursors homoserine or succinyl-homoserine employing a microorganism with enhanced sulphate permease expr. *Metabolic Explorer* (FR)

WO 2009/043803A2 Increasing Methionine Yield, *Metabolic Explorer* (FR)

WO 2012/098042A1 Verfahren zur fermentativen Herstellung schwefelhaltiger Aminosäuren, Evonik Industries AG (DE)

Womersley C (1981) A micromethod for the extraction and quantitative analysis of "free" carbohydrates in nematode tissue. *Anal Biochem* 112(1):182-9

Wood A, Shilatifard A. (2004) Posttranslational modifications of histones by methylation. *Adv Protein Chem* 67:201-22

You J, Liu L, Zhao W, Zhao X, Suo Y, Wang H, Li Y (2007) Study of a new derivatizing reagent that improves the analysis of amino acids by HPLC with fluorescence detection: application to hydrolyzed rape bee pollen. *Anal Bioanal Chem* 387:2705-2718

Yuan J, Fowler WU, Kimball E, Lu W, Rabinowitz JD (2006) Kinetic flux profiling of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol* 2:529-530

Zimmermann M, Sauer U, Zamboni N (2014) Quantification and mass isotopomer profiling of α -keto acids in central carbon metabolism. *Anal Chem* 86(6):3232-7

11 Danksagung

Ich bedanke mich...

bei Herrn **Professor Dr.-Ing. Ralf Takors**, Leiter des Instituts für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart, für die sehr interessante Themenstellung, für die Übernahme des Hauptreferats, für die sehr gute Betreuung und die vielen motivierenden Fachgespräche, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

bei Herrn **Professor Dr. Georg Sprenger**, Leiter des Instituts für Mikrobiologie der Universität Stuttgart, für die Übernahme des Zweitgutachtens.

bei meinen Projektpartnern seitens der Evonik Industries AG **Dr. Brigitte Bathe, Dr. Horst Priefert, Dr. Ines Ochrombel** sowie **Dr. Andrea Hueser**, für die vorbildliche Kooperation, für die Bereitstellung rekombinanter mikrobieller Produzenten und die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen.

beim **Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)** für die finanzielle Unterstützung des Projekts.

bei meiner Doktorandenkollegin **Maria Rahnert** für die sehr gute Zusammenarbeit und die Etablierung und Optimierung produktionsnaher Fermentationsprozesse.

bei meinem Doktorandenkollegen **Andres Sánchez-Kopper** für die kompetente und tatkräftige Unterstützung bei der Entwicklung und Validierung einer LC-MS-basierten intrazellulären Analytik.

bei **Dr. Oliver Vielhauer** für die kompetente und intensive Einführung in die Geheimnisse der LC-MS-Analytik.

bei meinen Masteranden **Olga Bungart** und **Benjamin Gann**, die ihre Abschlussarbeit vorbildlich und mit viel Motivation und Einsatzbereitschaft im Rahmen meiner Promotion durchgeführt haben.

bei allen derzeitigen und ehemaligen Kollegen des Instituts für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart für die kollegiale und offene Arbeitsatmosphäre. Insbesondere möchte ich mich bei **Andreas Freund, Alexander Dietrich, Salaheddine Laghrami, Michael Löffler,**

Annette Michalowski, Gerhard Eigenstetter, Jurek Failmezger, Alexander Nieß, Johannes Wutz, Andrea Seipel, Mira Lenfers-Lücker, Max Becker und Lisa Junghans für die experimentelle Unterstützung bedanken.

bei **Michael Kraml** für seine kompetente, tatkräftige und engagierte experimentelle Unterstützung in beinahe allen Teilbereichen dieses Projektes.

bei allen die mich sonst noch lieb haben...

12 Anhang

12.1 MRM-Chromatogramme des untersuchten Spektrums (HILIC-ESI-MS/MS)

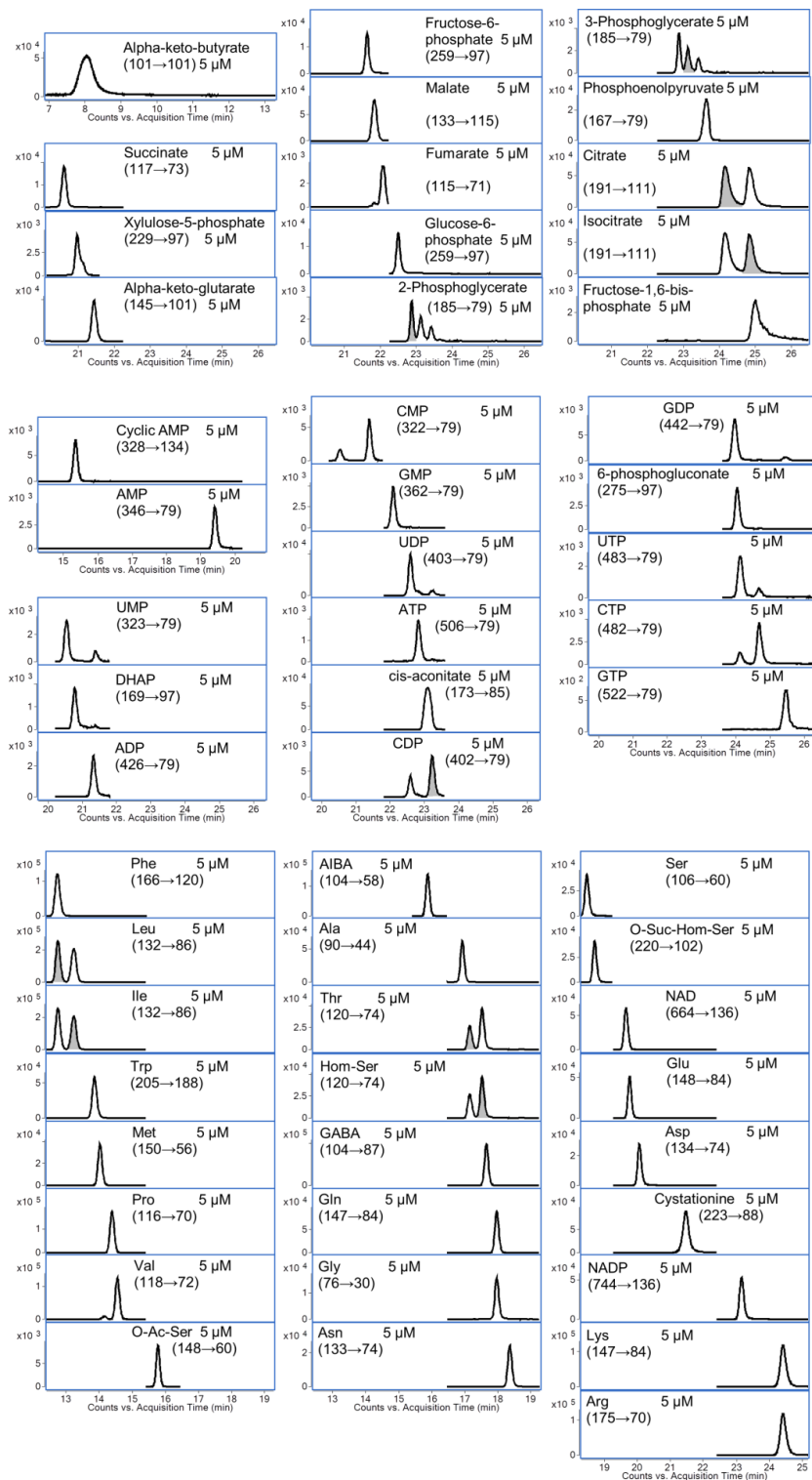


Abbildung 12.1 MRM-Chromatogramme des untersuchten Metabolitspektrums (Referenzstandard-Mischungen) anhand der entwickelten HILIC-ESI-MS/MS-Methode unter alkalischen Bedingungen (pH 9,2). Für die chromatographische Trennung isobarer Konstitutionsisomere wurden entsprechende Analyten grau unterlegt. (Teleki et al. 2015)

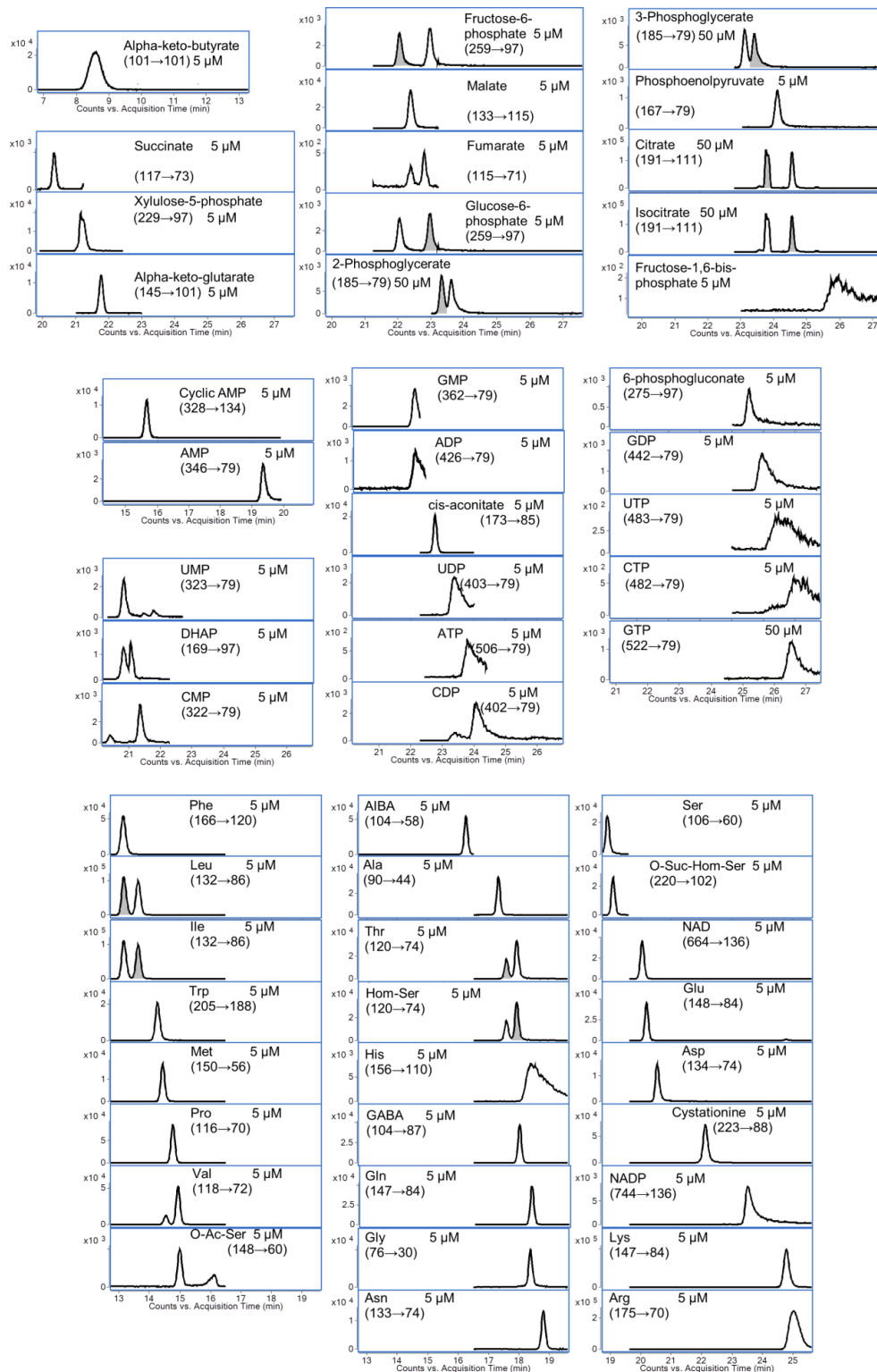


Abbildung 12.2 MRM-Chromatogramme des untersuchten Metabolitspektrums (Referenzstandard-Mischungen) anhand der entwickelten HILIC-ESI-MS/MS-Methode unter sauren Bedingungen (pH 5,6). Für die chromatographische Trennung isobarer Konstitutionsisomere wurden entsprechende Analyten grau unterlegt. (Teleki et al. 2015)

12.2 Stabilitätsanalysen des untersuchten Metabolitspektrums (HILIC-ESI-MS/MS)

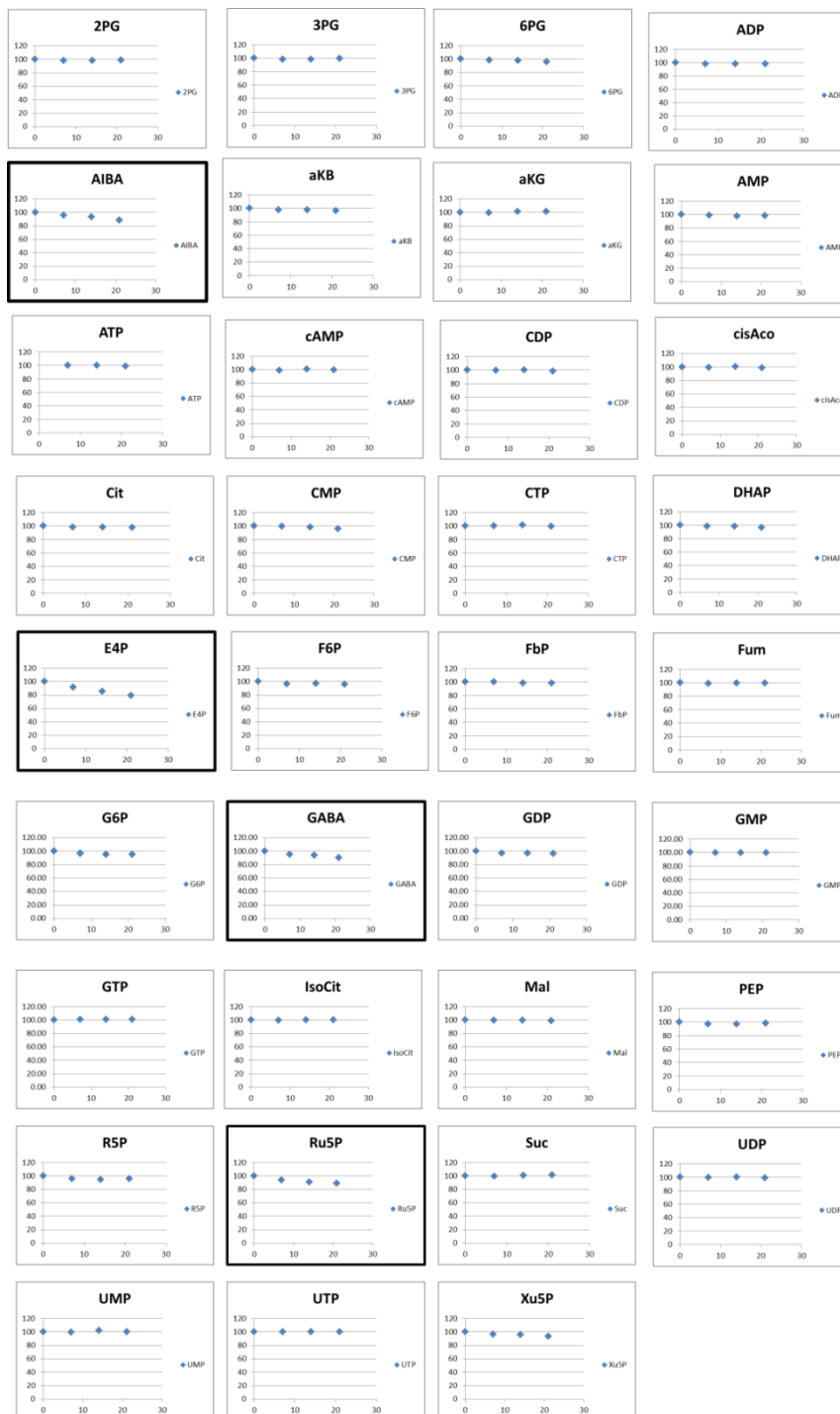


Abbildung 12.3 Messstabilität (0,7,14,21 h) untersuchter Metabolite (negativer Ionisierungsmodus, ESI-) anhand der entwickelten HILIC-ESI-MS/MS-Methode unter alkalischen Bedingungen. Einzel-Referenzstandards (5 μ M) wurden unter Bedingungen der analytischen Probenaufbereitung (60% ACN, 10 mM Ammoniumacetat, pH 9,2, 5°C) anhand periodischer Direktinjektionen isokratisch (50% ACN, 10 mM Ammoniumacetat, pH 9,2) relativ vermessen. Resultierende Peakflächen (n=4) wurden anhand resultierender Peakflächen der ersten Vermessung (0 h,100%) normalisiert. (Teleki et al. 2015)



Abbildung 12.4 Messstabilität (0,7,14,21 h) untersuchter Metabolite (positiver Ionisierungsmodus, ESI+) anhand der entwickelten HILIC-ESI-MS/MS-Methode unter alkalischen Bedingungen. Einzel-Referenzstandards (5µM) wurden unter Bedingungen der analytischen Probenaufbereitung (60% ACN, 10 mM Ammoniumacetat, pH 9,2, 5°C) anhand periodischer Direktinjektionen isokratisch (50% ACN, 10 mM Ammoniumacetat, pH 9,2) relativ vermessen. Resultierende Peakflächen (n=4) wurden anhand resultierender Peakflächen der ersten Vermessung (0 h, 100%) normalisiert. (Teleki et al. 2015)