Auswirkung erhöhter CO_2- und HCO_3^--Gehalte auf Metabolismus und Energiehaushalt von *Saccharomyces cerevisiae*

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

Gerhard Eigenstetter

aus Straubing

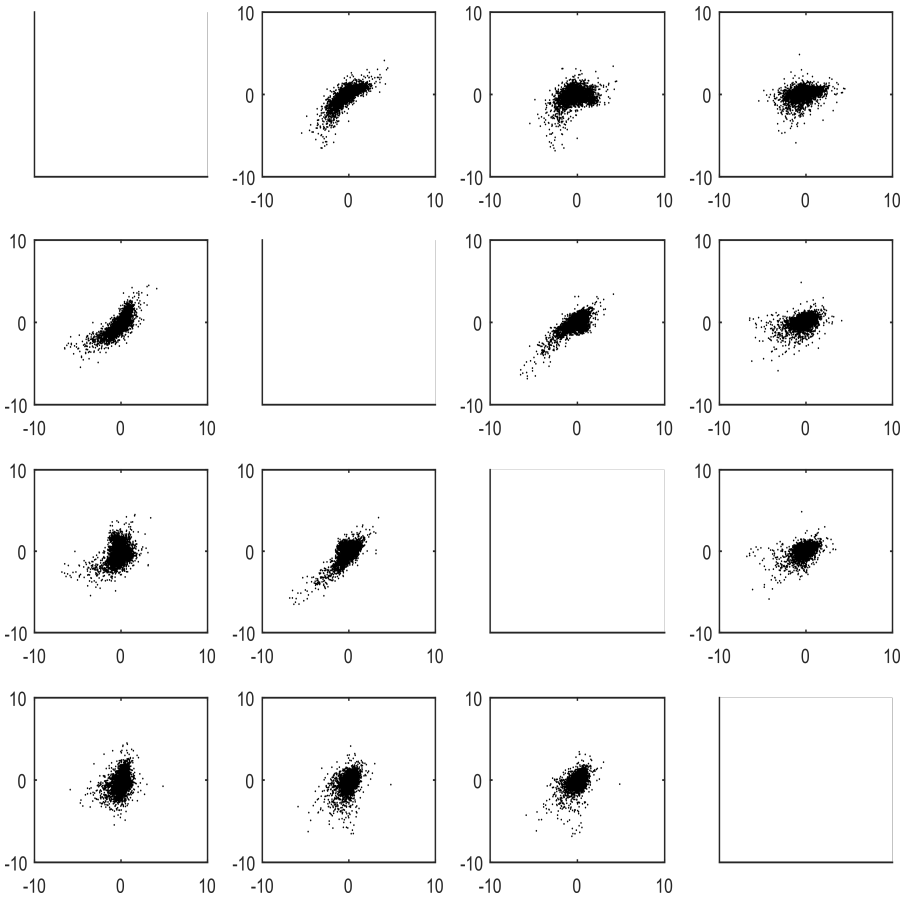
Hauptberichter:	Prof. Dr.-Ing. Ralf TAKORS
Mitberichter:	Prof. Dr. Bernhard EIKMANNS
Vorsitz:	Prof. Dr. Bernhard Hauer

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Oktober 2018

Institut für Bioverfahrenstechnik
Universität Stuttgart

2019

für Anne und Laura



„*Die Zeit...*

... ist das, was verhindert, dass alles auf einmal gegeben ist.

... ist nur die verworrene Form des Rationellen. Was wir als eine Folge von Zuständen wahrnehmen, begreift unsere Intelligenz ... als ein Bezugssystem.

... muss also gleichsam innere Reifung bedeuten. “

Henri Bergson, *Denken und schöpferisches Werden.* (1935)

Effects of increased CO_2 and HCO_3^- contents on metabolism and energy managment of *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

This thesis uses tools of systems biology to analyze cellular reaction dynamics to a CO_2 and HCO_3^- increase in *Saccharomyces cerevisiae*. It investigates cellular processes at the regulatory states of the metabolome and transcriptome. The initial point and the change of state are described by the principles of control and process engineering in data-driven mathematical models. Cellular components involved were identified and their regulatory relevance rated in the context of cellular control. The applied methods provide important tools for the investigation of the signal effects of naturally ubiquitary and variably concentrated molecules like CO_2 and HCO_3^-.

In summary, the results indicate the induction of a cellular pH stress signal triggered by increased CO_2 and the acid character of related H_2CO_3. The cells raise their proton export rate and increase the transcription of relevant genes permanently. The required CO_2 amount is probably rarely reached in natural habitats except for the deep sea. In bioreactors with heights of several meters, fluid dynamics descibe the development of horizontal fluid-layers with poor vertical mixing. Hydrostatic pressure increases the CO_2 concentration at the lower fluid layers. Vertical movement of cells along the gradient causes membrane depolarisation by the diffusion of CO_2 into these cells. Membrane voltage is known as a biosignal to transporters and channels in the plasma membrane.

Rapid degradation of cellular carbohydrate storage polymeres is proof of the induction of a cAMP signal in *S. cerevisiae* as a response to increased CO_2 levels, which deliver glucose in carbon-restricted conditions. The cell temporarily replaces the oxidative phosphorylation in the mitochondria by cytosolic substrate-level phosphorylation. The transcription of many carboxylic acid transporters in the inner mitochondrial membrane, even pyruvate import, are repressed while genes coding proteins for the tricarboxylic acid cycle and the respiration chain are induced. The oxidation of fatty acids is transcriptionally repressed while biochemical syntheses of amino acids (methionine, leucine, isoleucine, valine, histidine) and nucleobases (purine, pyrimidine) are induced.

The differential expression of up to 1763 genes verifies the participation of 790 annotations listed in the gene ontology (GO) database. To put it in a nutshell, CO_2 promotes the synthesis, processing and transport of RNA, the synthesis of ribosomes, tRNA and induces the sulfur metabolism probably for posttranslational modification of the elongation factor II. CO_2 suppresses mitophagy, autophagy, vacuolar and peroxisomal functions like proteolysis, synthesis of polysaccharides and β-oxidation. The synthesis of alcohols, gluconeogenesis and sterol synthesis in the cytosol and the endoplasmatic reticulum are repressed at these terms. This transcriptional response is maintained for over 30 minutes. After a period of ten generations at a permanent

pressure of CO_2, fewer than 100 genes stay differentially expressed. The transcription profile probably raises the catalytical activity of limiting steps in purine and ribonucleotide synthesis. The cells maintain adaptations in the mitochondrial electron transport chain and oxidative phosphorylation, which are the main functions of the cellular energy supply at aerobic conditions. Hence, CO_2-enriched conditions interfere with the mitochondrial energy supply which intensifies the perturbed mitochondrial metabolisms. The provisions stabilize essential key functions to cell compartments (e.g. pH homeostasis) and suppress stress-response mechanisms.
This thesis provides a basic model to calculate the CO_2 concentration in ideal mixed cultivation systems. Some physiologically relevant boundaries were derived from this model. Recently published literature reports energy deprivation in *S. cerevisiae* already at a 2 mM concentration increase to the medium. This thesis demonstrates i) when and how cells adapt their transcriptional profile and shows ii) cells compensating a CO_2-limited energy supply. A 15 mM CO_2 environment is tolerated but not fully compensated. However, a 15% loss in growth rate and biomass substrate yield is caused by 25 mM CO_2. Hence, the carbon dioxide concentration of the medium is a significant parameter to prevent performance loss in process scale-up.

Zusammenfassung

Diese Arbeit verwendet systembiologische Ansätze zur Analyse zellulärer Reaktionsdynamiken als Folge des CO_2 und HCO_3^--Anstiegs in *Saccharomyces cerevisiae*. Sie untersucht zelluläre Prozesse auf der metabolischen und der transkriptionellen Regulationsebene. Die Ausgangsbedingung und die Zustandsänderung werden durch die Prinzipien der Steuer- und Regelungstechnik in datengestützten mathematischen Modellen beschrieben. Beteiligte zelluläre Komponenten werden identifiziert und ihr regulatorischer Einfluss auf die zelluläre Kontrolle beurteilt. Die angewandten Methoden bieten nützliche Verfahren zur Untersuchung der Signalwirkung von natürlicherweise ubiquitär aber variabel konzentrierten Molekülen wie CO_2 und HCO_3^-.
Zusammengefasst zeigen die Resultate die Induktion eines zellulären Signals für pH-Stress, ausgelöst durch steigendes CO_2 und den Säurecharakter des damit im Zusammenhang stehenden H_2CO_3. Die Zellen erhöhen ihre Protonenexportrate und erhöhen dauerhaft die Transkription relevanter Gene. In natürlichen Habitaten wird die notwendige CO_2-Menge, abgesehen von Regionen der Tiefsee, wahrscheinlich kaum erreicht. In Bioreaktoren mit mehreren Metern Höhe hingegen beschreiben Fluiddynamiken die Ausbildung horizontaler Flüssigkeitsschichten mit geringer vertikaler Durchmischung. Der hydrostatische Druck erhöht die CO_2-Konzentration in den unteren Schichten. Die vertikale Verschiebung von Zellen entlang dieses Gradienten verursacht die Depolarisation der Zellmembran durch die Diffusion von CO_2 in diese Zellen. Die Membranspannung ist als Biosignal für Transporter und Kanäle in der Plasmamembran bekannt. Der schnelle Abbau zellulärer Kohlenhydratspeicher beweist die Induktion eines cAMP-Signals in *S. cerevisiae* als Antwort auf steigende CO_2-Niveaus und setzt unter kohlenstofflimitierten Bedingungen Glukose frei. Zeitweise kann so in betroffenen Zellen die

oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien durch cytosolische Substratkettenphosphorylierung ersetzt werden. Die Transkription von Transportern zur Aufnahme von Carbonsäure durch die innere Mitochondrienmembran, auch die von Pyruvat, sind reprimiert, während Gene, die für Proteine des Citratzyklus und der Atmungskette kodieren, induziert werden. Die Oxidation von Fettsäuren ist transkriptionell reprimiert, während die biochemische Synthese von Aminosäuren (Methionin, Leucin, Isoleucin, Valin, Histidin) und Nukleobasen (Purine, Pyrimidine) induziert wird.
Die differentielle Expression von bis zu 1763 Genen bestätigt die Beteiligung von 790 Annotationen, welche in der Gen-Ontologie (GO)-Datenbank geführt werden. Das Wesentliche ist, dass CO_2 die Synthese, Prozessierung und den Transport von RNA, die Synthese von Ribosomen sowie tRNA fördert und den Sulfatmetabolismus induziert, um wahrscheinlich die posttranslationale Modifikation des Elongationsfaktors II zu erhöhen. CO_2 unterdrückt Mitophagie, Autophagie, vakuoläre und peroxisomale Funktionen wie die Proteolyse, Synthese von Polysacchariden und die β-Oxidation. Die Synthese von Alkoholen, die Gluconeogenese und die Sterolsynthese im Cytosol und dem Endoplasmatischen Reticulum sind unter diesen Bedingungen reprimiert. Diese transkriptionelle Antwort wird über 30 Minuten aufrechterhalten. Nach zehn Generationen bei permanenter CO_2-Belastung verbleiben weniger als 100 Gene differentiell exprimiert. Das Transkriptionsprofil erhöht wahrscheinlich die katalytische Aktivität von limitierenden Reaktionen bei der Purin- und Ribonukleotidsynthese. Die Zellen unterhalten Anpassungen in der mitochondriellen Elektronentransportkette und der oxidativen Phosphorylierung, welche die Hauptfunktionen der zellulären Energiebereitstellung unter aeroben Bedingungen darstellen. Die CO_2-Anreicherung beeinträchtigt daher die mitochondrielle Energiebereitstellung, welche nach Pertubation intensiviert wird. Die Maßnahmen stabilisieren essentielle Schlüsselfunktionen für zelluläre Kompartimente (z.B. pH Homöostase) und unterdrücken Mechanismen der Stressantwort.
Die vorliegende Arbeit liefert ein Basismodell zur Berechnung der CO_2-Konzentration in ideal durchmischten Kultivierungsumgebungen. Einige physiologisch relevante Grenzwerte werden aus diesem Modell abgeleitet. Aktuelle Literatur berichtet bei *S. cerevisiae* von Energieverlusten, welche bereits durch eine Konzentrationserhöhung um 2 mM CO_2 im Medium auftreten. Die vorliegende Arbeit demonstriert i) wann und wie Zellen ihr Transkriptionsprofil anpassen und zeigt ii) wie Zellen eine durch CO_2 limitierte Energiebereitstellung kompensieren. Dabei wird eine CO_2-Umgebung mit 15 mM zwar toleriert, nicht aber vollständig kompensiert. Indessen verursachen 25 mM CO_2 einen 15%igen Rückgang der Wachstumsrate und der Biomasse-Substrat-Ausbeute. Die Kohlendioxidkonzentration des Mediums ist daher ein signifikanter Parameter, um Leistungsverluste beim scale-up zu verhindern.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

1.1 Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* . . . 1

1.2 Ziele . . . 2

2 Stand des Wissens **4**

2.1 Allgemeiner Überblick . . . 4

2.2 CO_2/HCO_3^- — Gleichgewicht mit Wirkung und Funktion . . . 5

2.2.1 CO_2/HCO_3^- — zwei zelluläre Effektoren . . . 5

2.2.2 CO_2 — Einfluss eines Prozessparameters . . . 6

2.2.3 CO_2 — beherrschbar aber nicht vermeidbar . . . 8

2.3 Zellstress . . . 9

2.3.1 Stress durch schwache organische Säuren - WOA-Stress . . . 10

2.3.2 Osmotischer Stress . . . 11

2.3.3 Ionen-Homöostase . . . 12

2.3.4 Zelluläre pH-Homöostase . . . 13

2.3.5 Modelle des zellulären Ionentransports . . . 14

2.4 Signal-Transduktion von CO_2 . . . 16

2.4.1 Transkriptionsfaktor CST6 in *S. cerevisiae* . . . 16

2.4.2 Norm-, hyp- und anoxische Regulation . . . 17

2.4.3 cAMP-PKA-Regulation . . . 19

2.5 Signalverarbeitung lebender Systeme . . . 21

2.5.1 Circadiane Rhythmik . . . 22

2.5.2 Mitotischer Zellzyklus . . . 22

2.5.3 Respiratorischer/reduktiver Zyklus . . . 23

2.5.4 Der Zellkern . . . 24

3 Material and Methoden **29**

3.1 Genotyp . . . 29

3.2 Medien . . . 29

3.2.1 *Yeast-Peptone-Glucose*-Agar . . . 30

3.2.2 Synthetisches Mineralmedium . . . 30

3.3 Reaktoraufbau . . . 30

3.4 Kryo-Kultur . . . 32

3.5 *batch*-Modus . . . 32

3.6 Kontinuierlicher Modus . . . 33

3.7 Biomasse-Konzentration c_X und Zellzahl n_c . . . 34

3.7.1 Spektrometrische Bestimmung . . . 34
3.7.2 Gravimetrische Bestimmung . . . 34
3.7.3 Zellzahl-Bestimmung . . . 35
3.8 Filtration extrazellulärer Metaboliten . . . 35
3.9 Separation intrazellulärer Metaboliten . . . 35
3.9.1 Probenahme mit kaltem Quenching . . . 36
3.9.2 Bestimmung zellulärer Verluste . . . 37
3.9.3 Enzymatische Analyse . . . 37
3.10 Analytische Quantifizierung von Metaboliten . . . 38
3.10.1 Elementaranalyse . . . 38
Anorganischer Kohlenstoff (TIC_{GC}) . . . 38
Bestimmung von Kohlenstoff (TC) und Stickstoff (TN_b) . . . 39
3.10.2 Energieladung EC . . . 39
3.10.3 *High Performance Liquid Chromatography* . . . 39
3.11 *Next Generation Sequencing* und Expressionsanalyse . . . 42
3.11.1 Isolierung – Sequenzierung – Quantifizierung . . . 42
3.11.2 Expressionsanalyse . . . 44
k-means clustering . . . 44
Datenbankabgleich . . . 46
3.12 Aufnahme- und Exkretionsraten im Prozess . . . 47
3.12.1 Berechnung von Raten und Parametern . . . 47
3.12.2 Fehlerfortpflanzung . . . 49
3.12.3 Varianzanalyse . . . 49
3.13 Metabolische Netzwerke . . . 50
3.13.1 Metabolische Flussanalyse **MFA** . . . 51
3.13.2 Gewöhnliche Differentialgleichungen . . . 52
3.13.3 Sensitivitätsanalyse . . . 53

4 Inhibition von Wachstum durch CO_2 54
4.1 Einführung . . . 54
4.2 Einfluss von CO_2 im *batch*-Prozess . . . 54

5 Transduktion eines (physiologischen) Signals durch CO_2-Gas 59
5.1 Einleitung . . . 59
5.2 Modellvalidierung . . . 59
5.2.1 Dynamik der Transportbilanz zwischen Gas- und Flüssigphase . . . 60
5.2.2 Phänotyp bei hohem CO_2-Gehalt im *chemostat* . . . 63
5.2.3 Stationäre Bilanzierung des TIC . . . 64
5.2.4 Dynamische Ionengleichgewichte bei selektivem Membrantransport . . . 64
5.3 Signaltransduktion von CO_2 auf pH, Membranpotential und K^+-Transport . . . 66
5.4 Sensitivitätsanalyse des Modells . . . 67
5.5 Transkriptionelle Regulation von Transportern und Kanälen . . . 69
5.6 Transkriptionelle Regulation dosissensitiver Gene . . . 74

6 CO_2-induzierter respiro-fermentativer Metabolismus **79**
6.1 Einleitung . . . 79
6.2 Durchflussraten und Prozessphasen . . . 79
6.2.1 Phase i) . . . 82
6.2.2 Phase ii) . . . 84
6.2.3 Phase iii) und iv) . . . 84
6.3 Stickstoffverteilung und -Metabolismus . . . 88
6.4 Metabolische Flussanalysen der Prozessphasen i-iii) . . . 92
6.5 Korrelation von Reaktionsrate und differentieller Genexpression . . . 92
6.5.1 Speicherstoffmetabolismus . . . 94
6.5.2 Pyruvatknoten . . . 95
6.5.3 Citratzyklus in Mitochondrien . . . 98
6.5.4 Atmungskette und oxidative Phosphorylierung . . . 98

7 CO_2-induzierte transkriptionelle Stressantwort **100**
7.1 Analyse des Transkriptoms bei CO_2-induziertem Stress . . . 100
7.1.1 Statistisch identifizierte Prozesse, Komponenten und Funktionen . . . 101
Stoffwechselwege in Gen-*clustern* . . . 101
GOs in Gen-*clustern* . . . 102
7.1.2 Biosynthese von Aminosäuren . . . 105
7.1.3 Mitochondrielle Transporter . . . 107
7.1.4 Biosynthese von Methionin und Elongationsfaktor 2 . . . 108
7.1.5 Eisen-Regulon zur Biogenese von Eisen-Schwefel-*clustern* . . . 109
7.1.6 C_1-Regulon und Purin-Synthese . . . 111
7.1.7 Regulation der MRC durch das CO_2/sAC/cAMP/PKA-Signal . . . 113
7.2 DGE bei CO_2-Langzeitbelastung . . . 114
7.2.1 Transkriptionelle Regulation von Komplex IV der MRC . . . 121
7.2.2 Transkriptionelle Regulation von NDE1/2 und GUT2 der MRC . . . 122
7.2.3 Transkriptionelle Regulation von Komplex II der MRC . . . 123

8 Diskussion **126**
8.1 Bilanzierung von CO_2 und HCO_3^- innerhalb des Reaktors . . . 126
8.2 CO_2 und HCO_3^- an sensitiven Enyzmen . . . 127
8.3 Zelluläre Homöostasen bei transienter CO_2-Belastung . . . 128
8.3.1 Auslenkung des Systems durch CO_2 . . . 128
8.3.2 Abgleich der Modellannahmen zum Transport von Ionen . . . 129
8.3.3 ATP-Bedarf für die pH-Homöostase . . . 130
8.3.4 Genetische Regulation von Transportvorgängen zur Ionenhomöostase . . . 131
8.4 CO_2-induzierter Phänotyp . . . 133
8.4.1 Genetische Regulation von Membran- und Zellwandkomponenten . . . 135
8.4.2 Zusammensetzung der Biomasse . . . 136
8.4.3 Mitochondrielle Aktivität . . . 137

8.4.4 Energieausbeute des respiro-fermentativen Metabolismus 140
8.5 Transduktion eines (physiologischen) Signals durch CO_2-Gas 140
8.6 cAMP-abhängiges globales Stresssignal 141
8.7 CO_2-Adaption in *S. cerevisiae* 143

9 Zusammenfassung und Ausblick 146
9.1 Regulation des Glukose-Metabolismus im CO_2-Gradienten 146
9.2 Stressantwort und Adaption an CO_2 147
9.3 Ausblick 148

A Abkürzungen, Übersichten und Parameter 151
A.1 Organisation des Appendix 151
A.2 Physikalische Konstanten 152
A.3 Abkürzungen und Variablen 152

B ODE-Modell zur Transduktion eines CO_2-Signals 160
B.1 Physiko-chemische Reaktorumgebung 161
B.1.1 Gasphase **G** 161
B.1.2 Phasenübergang – Gasphase **G** und Flüssigphase **L** 161
B.1.3 CO_2/HCO_3^- Gleichgewicht in **L** und **C** 162
B.1.4 Phasenübergang – Flüssigphase L und Zellphase C 164
B.2 Ionen-Transporter und Ionen-Kanäle 166
B.2.1 Protonen-Transport 166
Plasmamembran ATPase – Pma1 166
Spezifische Protonensymporter – ST 167
Kation/Proton-Antiporter – Nha1 168
B.2.2 Kaliumtransport 168
Kaliumimporter – Trk1/2 169
Nicht-spezifische Kaliumkanäle – NSC 169
Kaliumkanal – Tok1 170

C Stöchiometrische Reaktionsnetzwerke 175
C.1 Liste der Metabolite mit Summenformel und Ladung 175
C.2 Liste der Reaktionen mit EC-Nummer und Genen 179
C.3 Fließgleichgewichte 184

D Differentielle Genexpression 187
D.1 Identifizierte *Genome Ontology*-Termini bei CO_2-Belastung 187

E Gene 193
E.1 Liste der Gene 193
E.1.1 Chromosom I 193
E.1.2 Chromosom II 194

E.1.3 Chromosom III 195
E.1.4 Chromosom IV 195
E.1.5 Chromosom V 198
E.1.6 Chromosom VI 199
E.1.7 Chromosom VII 199
E.1.8 Chromosom VIII 201
E.1.9 Chromosom IX 202
E.1.10 Chromosom X 203
E.1.11 Chromosom XI 204
E.1.12 Chromosom XII 205
E.1.13 Chromosom XIII 207
E.1.14 Chromosom XIV 208
E.1.15 Chromosom XV 210
E.1.16 Chromosom XVI 211
E.1.17 Mitochondrielle DNA 212

Literatur **213**

Abbildungsverzeichnis

2.1 CO_2 Signal 18
2.2 cAMP/PKA-Signal 20
2.3 Stress/Substrat-Signal 25
2.4 PKA-Signal 27

3.1 Verfahrensschema Bioreaktor 33
3.2 NGS – CPMs der Proben 42
3.3 Spearman Rangkorrelation 43
3.4 GO Terms 46

4.1 Biomasse - *batch* 55
4.2 Produktsynthese des respiro-fermentaiven Metabolismus 57
4.3 C-Bilanz des respiro-fermentaiven Metabolismus 57

5.1 Bilanzraum Reaktor 60
5.2 Bilanzsystem Zelle 61
5.3 Modell A und B 62
5.4 Korrelation von Ionen-, pH-Gleichgewicht mit ATP-Bedarf in CO_2-Gradienten . . 67

6.1 Produkt Konzentration 81
6.2 Speicherstoff-*pools* 83
6.3 Speicherstoff-Abbau 85
6.4 Syntheserate organischer Säuren und Alkohole D=0,1 86
6.5 Syntheserate organischer Säuren und Alkohole D=0,05 87
6.6 Intrazelluläre Aminosäure-*pools* D=0,1 89
6.7 Intrazelluläre Aminosäure-*pools* D=0,05 90
6.8 Glykolyse CO_2-*shift* 95
6.9 TCC CO_2-*shift* 97

7.1 Gen-*cluster* 102
7.2 Aminosäure- und Schwefel-Metabolismus 106
7.3 C_1-Regulon 112
7.4 Phosphonukleotide und Energieladung der Zelle 115
7.5 Redutions Äquivalente 122

8.1 HOG-Signal 134

D.1 Legende (GO-Termini) 187

D.2 Biologische Prozesse I (GO-Termini) 188
D.3 Biologische Prozesse II (GO-Termini) 189
D.4 Biologische Prozesse III (GO-Termini) 190
D.5 Zelluläre Komponente (GO-Termini) 191
D.6 Molekulare Funktion (GO-Termini) 192

Tabellenverzeichnis

2.1 CO2/HCO_3^- sensitive enzymatische Katalysen . . . 7
2.2 ATF/CREB-Elemente . . . 17

3.1 Genotyp CEN.PK 113-7D . . . 29
3.2 Festmedium . . . 30
3.3 Salzmedium . . . 30
3.4 Supplemente I . . . 31
3.5 Supplemente II . . . 31
3.6 Medium II . . . 32
3.7 Kultivierungsparameter . . . 32
3.8 Quantifizierung von Kohlenhydraten, Alkoholen und Carbonsäuren . . . 40
3.9 Quantifizierung von Nukleotiden . . . 40
3.10 Quantifizierung von Aminosäuren . . . 41
3.11 DGE bei $|\log_2 FC| \geq 1$ . . . 45

4.1 Wachstum und Ausbeute (unlimitiert) . . . 56

5.1 TIC_{GC} vs. TIC_{model} . . . 65
5.2 K^+ und H^+ Transport . . . 65
5.3 Sensitivität des *steady state* . . . 69
5.4 Ionentransportern $\log_2 FC$ . . . 71
5.5 Ionengekoppelte Transporter $\log_2 FC$ . . . 72
5.6 Ionenkanäle $\log_2 FC$ . . . 73
5.7 DSGs $\log_2 FC$ . . . 74

6.1 Produktionsleistung im *steady state* . . . 81
6.2 Metabolische Flussanalyse (MFA) . . . 93

7.1 Differentielle Genexpression . . . 101
7.2 Identifikation von Stoffwechselwegen . . . 103
7.3 Identifikation von Gen Ontologie in Gen-*clustern* . . . 104
7.4 ATP Synthase . . . 114
7.5 Permanente Adaptation an CO_2 $|\log_2 FC| \geq 1$ . . . 117
7.6 Mitochondrieller Elektronentransport . . . 124

8.1 Gene Ontology mit CO_2/HCO_3^- . . . 144

A.1 Physikalische Konstanten . . . 152

A.2 Prozessgrößen . . . 152
A.3 Abkürzungen der instrumentellen Analytik . . . 154
A.4 Variablen, Vektoren und Matrizen in DGE-, MF- und S-Analyse . . . 156
A.5 Abkürzungsverzeichnis . . . 157

B.1 Modellentwicklung . . . 160
B.2 Ionenkonzentration Phase L . . . 164
B.3 Startwerte des ODE-Modells . . . 171
B.4 Parameter des Reaktormodells . . . 173
B.5 Parameter des Membrantransports . . . 174

C.1 Stöchiometrisches Netzwerk . . . 179
C.2 Prozessbilanz von CEN.PK113-7D . . . 185
C.3 Elementare Komposition von CEN.PK113-7D . . . 185

E.1 Chromosom I . . . 193
E.2 Chromosom II . . . 194
E.3 Chromosom III . . . 195
E.4 Chromosom IV . . . 195
E.5 Chromosom V . . . 198
E.6 Chromosom VI . . . 199
E.7 Chromosom VII . . . 199
E.8 Chromosom VIII . . . 201
E.9 Chromosom IX . . . 202
E.10 Chromosom X . . . 203
E.11 Chromosom XI . . . 204
E.12 Chromosom XII . . . 205
E.13 Chromosom XIII . . . 207
E.14 Chromosom XIV . . . 208
E.15 Chromosom XV . . . 210
E.16 Chromosom XVI . . . 211
E.17 Mitochondrielle DNA . . . 212

Abkürzungsverzeichnis

Nomenklatur chemischer Elemente	Periodensystem der Elemente (PSE)[1]
Nomenklatur von Enzymen	Empfehlung der IUBMB (EC-Nummer)[2]
Nomenklatur von Genen	*Saccharomyces cerevisiae* S288C (SGD)[3]
Nomenklatur von Gen Ontologien	GO-Termini[4]
Nomenklatur im Formelsatz	DIN 1338
Nomenklatur mathematischer Symbole	DIN 1302, DIN 1303
Nomenklatur von Größen und Einheiten	ISO/IEC 80000
Nomenklatur der SI-Präfixe	BIPM (SI-Broschüre[5])
Dissertationsspezifische Abkürzungen	Appendix A

[1] http://periodensystem.com/pse.pdf
[2] https://enzyme.expasy.org/
[3] http://www.yeastgenome.org/
[4] http://www.geneontology.org/
[5] BIPM: http://www.bipm.org/en/publications/si-brochure/

Kapitel 1

Einleitung

Biotechnologie-basierte Verfahren kommen in zahlreichen Branchen zur Anwendung. Ihre Innovationskraft bietet die Möglichkeit zu ressourcenschonender Entwicklung, was langfristige Wettbewerbsvorteile verspricht. Die Biotechnologie hat damit das Potential zukunftsweisende Konzepte für die Medizin, die Pharmazie, die Nahrungsmittelproduktion, die chemische Industrie und zahlreiche weitere Branchen zu liefern. Ehrgeizige Ziele wie die Ernährung einer rasant wachsenden Weltbevölkerung, die Verbesserung ihrer Gesundheit und die Bindung von Rohstoffen in Recyclingkreisläufen zur Verbesserung der Ökobilanz von Produkten erfordern umfassendes Wissen über die Funktionsweise biochemischer Systeme und die Wechselwirkungen mit ihrer Umwelt.
Bei der Produktion von Feinchemikalien und Pharmazeutika arbeitet die Biotechnologie mit Kulturvolumen von wenigen Litern bis zu mehreren hundert Kubikmetern in Reaktoren, die künstliche Umweltbedingungen für zelluläre Produktionssysteme erzeugen. Die biochemischen Bedürfnisse der Produktionsorganismen stellen vielfältige Anforderungen an die Umgebung und verursachen dadurch einen erheblichen Teil der Produktionskosten. Der technische Aufwand produktionsrelevante Grenzwerte einzuhalten, ist mitentscheidend für die Rentabilität eines Produktionsverfahrens.
Kohlendioxid ist ein essentieller Bestandteil der Produktionsumgebung tierischer Zellen und notwendiges Nebenprodukt bei der Energiegewinnung in zahlreichen Mikroorganismen. Das gelöste Gas wird als CO_2 und HCO_3^- von Zellen wahrgenommen, ist Stimulus zellulärer Signalkaskaden und fester Bestandteil der Ionenhomöostase. In hohen Konzentrationen kann es Zellstress auslösen und wirkt wachstumshemmend. Zu wissen welche zellulären Prozesse durch CO_2 ausgelöst, verändert oder gestört werden ist daher auch von wirtschaftlichem Interesse.

1.1 Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*

Hefen sind eukaryotische Mikroorganismen aus dem Reich der Pilze. Es wird vermutet, dass es sich bei den bisher beschriebenen 1500 Arten um einen kleinen Teil aller Hefe-Arten handelt [209]. Die Arten formen keine einzelne phylogenetische Gruppe, sondern werden in zwei Phyla, Ascomyceten und Basidomyceten, unterteilt. Der Begriff 'Hefe' wird oft synonym für die Art *Saccharomyces cerevisiae* verwendet. Es gibt vielfältige Gründe *S. cerevisiae* für systembiologische Studien zu verwenden.
In dem Modellorganismus vereinen sich ein kompartimentierter zellulärer Aufbau, wie ihn auch

Pflanzen und Tiere haben, mit schnellem Wachstum. Es steht eine breite Palette gentechnischer Werkzeuge zur Integration neuer oder der Deletion vorhandener Gene zur Verfügung. Das Genom ist sequenziert und war als erstes eukaryotisches Genom vollständig annotiert [122]. Ein beinahe genomweiter Satz *Barcode*-markierter Einzelmutanten [120, 119] führte zu einem breiten Spektrum an Hochdurchsatzverfahren zur Untersuchung von Transkripten [80, 390], Protein-Mengen [117, 118], deren Verortung [169] und Wechselwirkung in der Zelle [415, 114, 160]. Die vernetzte Information katalytischer Eigenschaften und biochemischer Stoffwechselwege zeigt das Potential bei chemischen Produktionsprozessen. Die wissenschaftliche Forschung an Hefezellen resultiert nicht zuletzt aus der wachsenden Bedeutung ihrer biotechnologischen Anwendung. Das macht
S. cerevisiae zum idealen Forschungsorganismus von zellulären Regulationsmechanismen.

1.2 Ziele

In Produktionsprozessen können die im Reaktor herrschenden Bedingungen Zellstress verursachen und die Produktivität beeinträchtigen. Unter den entsprechenden Bedingungen kann CO_2 einer der Auslöser für Zellstress sein. Ziel dieser Arbeit war es nun die Auswirkung von CO_2 und HCO_3^- auf den Metabolismus von *S. cerevisiae* zu untersuchen. Die Thematik sollte in i) einem systembiologischen Ansatz mit ii) der Korrelation transienter Zustände in Transkriptom- und Metabolom-Daten zur iii) Bilanzierung des zellulären Energieaufwands in pseudo-*steadystates* einhergehen. Publizierte Informationen und eigens erhobene Prozessdaten sollen zur Systembeschreibung in mathematischen Modellen kombiniert werden.
Das Konzept sieht CO_2 als Signalmolekül für die Zelle. Dieses konvertiert ein chemisch definiertes zelluläres Milieu und reizt den Organismus zur Deregulation des etablierten Zustands. Theoretisch stabilisiert sich das System im neuen Gleichgewicht oder kehrt in den Ausgangszustand zurück. Dabei ist die transkriptionelle Regulation stimulus-spezifisch und wurde für CO_2 bisher nicht untersucht. Das verspricht neue Einblicke in die Mechanismen der transkriptionellen Stressregulation und den Unterhaltskosten der zellulären Ionenhomöostase.
Das Arbeitsfeld des Ansatzes ist notwendigerweise umfassend und integriert ein breites Spektrum biologisch- und biochemisch-technischer Forschung. Es werden die Bereiche des zentralen Kohlenstoffmetabolismus, der zellulären Ionenhomöostase und der Stressregulation der Hefe behandelt. Die Bereiche werden von unterschiedlichen Forschungsgemeinschaften behandelt, Informationen zu den einzelnen Themen sind daher über einen weiten Bereich unterschiedlicher Literatur verteilt. Viele der Leser werden nicht mit allen Fachrichtungen im Detail vertraut sein. In Kapitel 2 wird ein Überblick relevanter Literatur zum chemischen Charakter von CO_2 und Beobachtungen zur Auswirkung von CO_2 in Produktionsumgebungen gegeben. Es werden unterschiedliche Stressfaktoren verglichen und die durch sie angesprochenen Regulationskaskaden und Kompensationsmuster vorgestellt um einen Rahmen für die spätere Charakterisierung von CO_2 als Stressfaktor zu geben. Dem Leser sollte bewusst sein, dass eine lebende Zelle in ihrer Regulation hierarchischen Zyklen folgt. Jedes nicht-schwingende System ist daher verglichen mit dem realen Zustand stark vereinfacht.

Die verwendeten Materialien, experimentellen Methoden und mathematischen Modelle zur stationären und dynamischen Bilanzanalyse werden in Kapitel 3 beschrieben. Mathematische Modelle sind zunächst Werkzeug in der experimentellen Planung. Als Kriterium für die Qualität von Messdaten oder zur Überbrückung von Wissenslücken können sie Teil des wissenschaftlichen Erkenntnisgewinns sein. Kapitel 4 bis 7 gliedern die experimentellen Befunde in die Bereiche der Ionen-Homöostase, des zellulären Energiemanagements von Anabolismus und Katabolismus und die Regulation der Stressantwort im Zusammenhang mit CO_2 und HCO_3^-. Im Idealfall lassen sich Aussagen aus den Experimentaldaten des Metaboloms, des Transkriptoms und aus den Bilanzanalysen ableiten (Kapitel 8). Im Rahmen dieser Arbeit erscheinen die Ergebnisse hinreichend ausgearbeitet, was künftige Forscher nicht hindern soll die erhobenen Datensätze in ihre Überlegungen einzubeziehen (siehe Kapitel 9 und Anhang B-D).

Kapitel 2

Stand des Wissens

2.1 Allgemeiner Überblick

Mikroorganismen passen sich ihrer Umgebung an und können daher aus dem Blickwinkel der Systemtheorie als komplexe adaptive Systeme aufgefasst werden. Lebende Systeme gelten als komplex, weil sie emergent sind. Das bedeutet, die Systemeigenschaften lassen sich nicht vollständig aus einer Analyse der Komponenten ableiten. In komplexen Systemen führen die Eigenschaften der Selbstorganisation und der Selbstregulation zu einer Vermeidung des thermodynamischen Gleichgewichts. Ihr Verhalten wird von ihrer Vorgeschichte beeinflusst, ist aber gleichzeitig bestrebt wiederkehrende Zustände oder Zustandsabfolgen einzunehmen. Die Summe der Zustände eines dynamischen Systems wird in mathematischen Modellen als Phasenraum beschrieben. Ein asymptotisch stabiles Verhalten drückt sich dabei im Grenzzyklus einer zeitlich wiederkehrenden Abfolge von Zuständen, einem sogenannten Attraktor aus.
Die Systembiologie ist ein Zweig innerhalb der Biowissenschaften. Sie führt die Zeit als vermittelnden Faktor zwischen der statischen Information des Genoms und dem adaptiven Verhalten biologischer Systeme ein. Die Systembiologie ist dabei ein interdisziplinäres Feld, das sich Methoden und Inhalte aus den Disziplinen der Physiologie, der Biochemie, der Bioinformatik und der Kybernetik bedient. Je nach Autor kommt es zu wechselnden Gewichtungen der Teilbereiche „System“und „Biologie“.
Wolkenhauer u. a. (2002) sehen die Systembiologie als Anwendung von System- und Kontrolltheorie auf biologische Systeme, welche durch genomweite Datenerfassung motiviert ist [448]. Die iterative Natur des repetitiven Wechsels von praktischer Bestimmung und hypothesengetriebener Wissenschaft wurde von Ideker u. a. (2001) geprägt [171]. Hier wurde die Notwendigkeit quantitativer, prediktiver mathematischer Modelle als notwendigem Bestandteil des wissenschaftlichen Prozesses propagiert. Während die daten-getriebene Strategie versucht biologische Strukturen aus Messdaten abzuleiten, interpretiert ein hypo-thesen-getriebener Ansatz Messdaten in einem formellen System mit Blick auf eine im Vorfeld formulierte Hypothese. Das untersuchte System als mathematisches Modell zu formulieren, birgt den Anspruch valide Schlussfolgerungen auf Basis einer wahren Prämisse zu ziehen, die auf experimenteller Beobachtung fußt. Umgekehrt muss das Modell selbst aus Beobachtungen des natürlichen Systems abgeleitet werden (Induktion). Per Definition kann diese Begründungsstrategie die Wahrheit der Schlussfolgerung auf Basis wahrer Annahmen nicht garantieren, sondern definiert den Wahrheitscharakter der Schlussfolgerung mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit [67]. Die

wechselnde Anwendung von Induktion und Deduktion (Schlussfolgerung) innerhalb des systembiologischen Ansatzes verfolgt zwei Absichten: i) schrittweise Einbindung von Messdaten führt zur weiteren Verfeinerung des Modells und zum Verständnis des biologischen Systems durch andauernde Nutzung weiterer Vorgaben, und ii) modellbasierte Rückschlüsse helfen valide Schlüsse auf Basis (wahrer) Annahmen zu ziehen.

2.2 CO_2/HCO_3^- — Gleichgewicht mit Wirkung und Funktion

Kohlendioxid (CO_2) ist das energiearme Hauptprodukt des respirativen und ein Nebenprodukt des fermentativen Metabolismus. Das unter physikalischen Normbedingungen (T_N=273 K und p_N=101,325 Pa) gasförmige Molekül ist amphiphil. In wässriger Lösung steht es im chemischen Gleichgewicht (Gl. 2.1) mit Kohlensäure (H_2CO_3) und dessen deprotonierten Formen Bicarbonat (HCO_3^-) und Carbonat (CO_3^{2-}) [31]. HCO_3^- puffert in neutralen (pK_s=6,3 [149]) und CO_3^{2-} (pK_s=10,3 [295]) in basischen pH-Bereich. Bicarbonat ist das Substrat meist Biotin-abhängiger Carboxylasen (EC 6.4.1.-) [444]. In *S. cerevisiae* wird bei geringer HCO_3^--Konzentration die Hydratisierung von CO_2 zu H_2CO_3 durch die Carboanhydrase Nce103p beschleunigt [14].

$$CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \overset{\text{schnell}}{\longleftrightarrow} H^+ + HCO_3^- \overset{\text{schnell}}{\longleftrightarrow} 2H^+ + CO_3^{2-} \tag{2.1}$$

CO_2 nimmt daher bereits bei geringen Anteilen (0-5%$_{V/V}$) in der Gasphase von Bioreaktoren Einfluss auf die Regulation zellulärer Prozesse [14, 328], kann bei höheren Anteilen (5-80%$_{V/V}$) physiologische Stressreaktionen auslösen [9, 347, 91] und senkt die Viabilität durch einen *anaestesierenden Effekt* in Abhängigkeit von Temperatur und Druck [180, 172]. Der hydrostatische Druck unter Wassersäulen in industriellen Reaktoranlagen, hohe Zelldichten und die CO_2-Synthese durch metabolische Aktivität führen daher zu physiologischen Beeinträchtigungen durch gelöstes CO_2-Gas [31]. Die physiologisch wirksame Konzentration von CO_2 ergibt sich nach Henry aus dem Partialdruck des Gases und einem temperaturabhängigen Koeffizienten [31]. Die Konzentrationen der hydratisierten Molekülspezies H_2CO_3, HCO_3^- und CO_3^{2-} im oben genannten Gleichgewicht sind von der CO_2-Konzentration, dem pH-Wert und dem Salzgehalt des Mediums abhängig [295]. Das Gleichgewicht zwischen CO_2 und H_2CO_3 liegt stark auf der Seite von CO_2. Die betrachteten CO_2-Belastungen lassen im pH-Bereich zwischen 5 und 8 millimolare Konzentrationen daher nur für CO_2 und HCO_3^- entstehen [31]. In dieser Arbeit wird daher H_2CO_3 und CO_3^{2-} eine untergeordnete physiologische Relevanz zugeschrieben.

2.2.1 CO_2/HCO_3^- — zwei zelluläre Effektoren

Seit mehr als 100 Jahren ist bekannt, dass CO_2 einen inhibitorischen Effekt auf mikrobielles Wachstum ausüben kann [420]. Chen und Gutmanis (1976) berichten von einer *leichten Inhibition des Wachstums* bei Hefe (p_{CO2}=0,3 bar) und einer Halbierung der Effizienz (Y_{XS}) im

fed-Batch-Prozess [53]. Jones und Greenfield gaben 1982 einen ersten Überblick der Wechselwirkungen zwischen CO_2 und Hefezellen [180]. Die zahlreichen Wechselwirkungen, beispielsweise mit zellulären Membranen oder Enzymen verhinderten 1982 die Benennung einer konkreten Ursache. CO_2 und HCO_3^- werden seither als Effektoren enzymatischer Aktivität betrachtet (siehe KEGG Datenbank[1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12] am 7. März 2019) [15]. Ein Auszug von CO_2- und HCO_3^--sensitiven Enzymen in *S. cerevisiae* ist in Tabelle 2.1 gezeigt.
Mittlerweile ist HPCD (*High-Pressure Carbon Dioxide*) als Alternative zur thermalen Pasteurisation bekannt [113]. Die molekularen Mechanismen, wie der Anstieg des externen CO_2-Gehalts zur Inaktivierung des Metabolismus führen kann, wurde 2007 von Garzia-Gonzalez u. a. zusammengefasst: i) Modifikation der Zellmembran; ii) Senkung des zellulären pHs; iii) Inaktivierung des Metabolismus an Schlüsselenzymen durch niedrigen pH oder iv) durch CO_2 und/oder HCO_3^-; v) Störung des zellulären Elektrolyt-Haushalts; vi) Verlust vitaler Funktionen an zellulären Membranen [113].

2.2.2 CO_2 — Einfluss eines Prozessparameters

Bereits die Produktion in Bioreaktoren kann, abhängig von Reaktorgröße, Begasungsrate und metabolischer Aktivität, lokale CO_2-Partialdrücke von 0,1 bis 0,6 bar hervorrufen, die sich auf das biologische Produktionssystem auswirken [31]. Die messbare CO_2-Belastung in Medien übersteigt oft die Prognosen nach dem Gesetz von Henry, wenn die lokalen Bedingungen der Viskosität und der Ionenstärke nicht hinreichend berücksichtigt werden [72, 466, 295].
Gerührte Zellsuspensionen oder Pilzmyzelien erhöhen ihre Viskosität aufgrund der Wechselwirkungen zwischen den Zellen bzw. verzweigten Myzelketten und verhalten sich daher wie nicht-newtonsche Flüssigkeiten [377]. Die Durchmischung in Bereichen unterschiedlicher Scherung erzeugt rheologische Unterschiede und verstärkt Inhomogenitäten [121]. Fermenterkulturen von Pilzmyzelien bieten ein Beispiel wie die Morphologie des Organismus den lokalen Partialdruck von O_2 und CO_2 beeinflusst [254]. Auswirkungen auf die Morphologie des Organismus wurden durch bildgebende Verfahren häufig dokumentiert [342, 35, 407].
batch-Kulturen von *Penicillium chrysogenum* bei pH 6,5 zeigen bereits ab 3-5% CO_2-Anteil in der Zuluft eine erhöhte Verzweigung des Myzels. Ein weiterer Anstieg von p_{CO2} (15-20%) erzeugt aufgequollenes und verkrüppeltes Myzel [158]. McIntyre und McNeil (1997) dokumentierten ähnliche morphologische Änderungen mit p_{CO2} über 7,5% bei *Aspergillus niger* in Batch- [252] und Chemostat-Kulturen mit unterschiedlichen Ausprägungen auf Wachstum und die Produktion von Citrat [253, 254]. Für *Penicillium chrysogenum* und *Acremonium chrysogenum* sind

[1] http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:3.6.1.3
[2] http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:1.9.3.1
[3] http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:1.2.1.2
[4] http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:1.1.1.49
[5] http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:1.4.1.3
[6] http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:3.5.1.2
[7] http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:1.1.1.42
[8] http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:1.1.1.39
[9] http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:1.1.1.37
[10] http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:2.7.1.40
[11] http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:1.6.99.3
[12] http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:1.3.5.1

TABELLE 2.1: CO_2/HCO_3^--sensitive enzymatische Katalysen nach Jones und Greenfield (1982) [180]. Die EC-Nummer (*Enzyme Commission Number*), die Effekte der Inhibierung und der Aktivierung im angegebenen Konzentrationsbereich sind mit einem Namenskürzel angegeben. ATPase (V-Typ): membranständige Protonenpumpen, Cyt-c-Ox: Cytochrom-c-Oxidase, Format DH: Formate-Dehydrogenase, Glu6P-DH: Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase, Glu-DH: Glutamat-Dehydrogenase, Gln-Ah: Glutamin-Amidohydrolase, IDH: Isocitrat-Dehydrogenase, MDH: Malat-Dehydrogenase, PyK: Pyruvat-Kinase, Cyt-c-Red: Cytochrom-c-Reduktase, SDH: Succinat-Dehydrogenase

Enzym	EC	Inhibition	Aktivierung
ATPase (V-Typ)	3.6.1.3		10-100mM HCO_3^-
Cyt-c-Ox	1.9.3.1	>200mM HCO_3^-	<100mM HCO_3^-
Format DH	1.2.1.2	nicht-kompetitiv	
Glu6P-DH	1.1.1.49	>20mM HCO_3^-	<20mM HCO_3^-
Glu-DH (NAD^+)	1.4.1.3	>10mM HCO_3^-	
Gln-Ah	3.5.1.2		10-50mM HCO_3^-
IDH	1.1.1.42	40mM HCO_3^- $\widehat{=}$20% 100mM HCO_3^- $\widehat{=}$60%	
MDH (NAD^+)	1.1.1.39	10mM HCO_3^-	
PyK	2.7.1.40	30mM HCO_3^- $\widehat{=}$50% 70mM HCO_3^- $\widehat{=}$70%	
Cyt-c-Red	1.6.99.3	0,2 atm $p_{CO2}\widehat{=}$80% 0,8 atm $p_{CO2}\widehat{=}$100%	
SDH	1.3.5.1	>16,6 mM [438] >0,17 mM [124] K_i=12 mM [467]	HCO_3^-

bei 10-20% CO_2 ebenfalls Änderungen im Wachstumsverhalten und der metabolischen Leistung dokumentiert, wobei erhöhter p_{CO2} zu Einbußen bei den Ausbeuten der Antibiotika Penizillin und Cephalosporin C führt [159, 456, 93, 92].

Bei der Produktion rekombinanter Proteine mithilfe von Säugerzellen ist neben pH, Temperatur und Osmolarität auch p_{CO2} ein Einflussfaktor [31]. Beim *scale-up* vom Labor- in den Produktionsmaßstab werden geschätzte physiologische p_{CO2} Werte (41–72 mbar) im Medium leicht um ein Vielfaches überschritten [82, 278, 31]. Dabei wurde ein Verlust von 40% der spezifischen Produktivität für ein nicht näher bezeichnetes Glykoprotein bei 240 mbar CO_2 beobachtet [278]. Die Prozessführung nimmt bei Begasung, Durchmischung und Zellrückhaltung auf die zellwandlose Physiologie von Säugerzellen Rücksicht, was in 1800-2500 L Bioreaktoren bei Hochzelldichte zu 150-200 mbar p_{CO2} führt [128, 82]. Die Bedingungen wirken sich nachteilig auf das Wachstum und die Produktivität rekombinanter Myeloma- [177], Hybridoma-, NSO-, BHK- [82] und CHO-Zelllinien aus [128, 278, 194, 307, 463, 470, 399]. Die vermehrte Entstehung von Bicarbonat durch erhöhten p_{CO2} führt zur pH-Senkung, was bei Titration die Osmolarität des Mediums erhöht [210, 19]. Die Auswirkungen von erhöhter Osmolarität gekoppelt mit erhöhtem p_{CO2} wurde im Rahmen von *scale-up*-Studien an CHO-Zellen untersucht [194, 463, 82, 175, 470]. Laut de Zengotita u. a. (2002) wirkte sich eine CO_2-Erhöhung (Δp_{CO2}=210 mbar), mit Inhibition der Glykolyse und einer Senkung des zellulären pH aus (ΔpH_c=0,2), während eine Erhöhung der Osmolarität (Δc_{osm}=115 mOsm/kg) zu Apoptose und der Erhöhung der

spezifischen Antikörperproduktion und des Glutamin-Metabolismus führte [82]. Die metabolische Reaktion dieser Produktionssysteme auf Änderung der Reaktorbedingungen (Δc_{osm} und Δp_{CO2}) sind je nach Zelllinie und Produkt verschieden.
Die Entstehung von HCO_3^- ist Teil der CO_2-Belastung im zellulären Millieu. Durch seinen hydrophoben Charakter diffundiert CO_2 fast ungehindert über zelluläre Membranen [142]. Das Verhältnis von CO_2 zu HCO_3^- ist abhängig vom pH-Wert und unterliegt im zellulären Milieu damit dessen strenger Regulation [300]. In tierischen Zellen trägt HCO_3^- mit 50-66% [33], in Hefen mit etwa 30% zur Pufferkapazität (β) des Milieus bei [335, 301]. Verglichen mit Hefe besitzen tierische Zellen durch ihre vielfältigen Carboanhydrasen (EC 4.2.1.1) mehr Möglichkeit die Balance zwischen CO_2 zu HCO_3^- zu regulieren [135].
Die verbleibenden 70% der Pufferkapazität setzen sich in Hefe aus der Summe aller schwachen Säuren und Basen (z.B. $H_2PO_4^-$ pKs=6,45 [277] und Histidin pKs=6,5 [301]) zum komplexen Puffersystem des Cytosols zusammen. βdefiniert die Menge an Protonen oder Hydroxidionen, die für eine pH-Änderung von 1 notwendig sind. βist pH-abhängig und im pKs-Wert einer funktionalen Gruppe maximal. *S. cerevisiae* ist mit einer Kapazität von 30 bis 60 mM gepuffert [183, 204].
Tierische Zellen sind an die CO_2- und HCO_3^--Mengen im Gewebe und dem Blutkreislauf angepasst [33]. Auch Pilzkulturen reagieren bis etwa 5% CO_2 (50 mbar) in ihrem Wachstumsverhalten tendentiell positiv [158, 252]. Die Anpassung an höhere CO_2-Belastung führt aber zu Wachstumseinbußen und einem höheren Energiebedarf [180, 347]. Die Veränderung des zellulären Milieus durch die CO_2-Belastung der Zelle soll daher Ausgangspunkt dieser Studie sein.

2.2.3 CO_2 — beherrschbar aber nicht vermeidbar

Es ist unklar wieviel Produktionsleistung durch die Belastung mit CO_2 in biotechnologischen Prozessen aktuell eingebüßt wird. In vielen Produktionsprozessen ist es ein bekanntes Problem (Abs. 2.2.2), das sich auch in Kombination mit anderen Stressfaktoren wie dem pH-Wert, der Osmolarität, dem Ionengehalt und organische Säuren als relevante Belastung ergeben kann.
Eine geeignete technische Ausstattung des Reaktorsystems macht es einfach zu hohe CO_2-Belastung durch Ausgasen zu eliminieren. Sobald technische Grenzen erreicht werden, können in der Biotechnologie auch Kenntnisse über auftretende Stressfaktoren und ihre Auswirkung auf das Produktionssystem von Interesse sein. Als Endprodukt des zentralen Kohlenstoffmetabolismus sind zelluläre CO_2-Emissionen mit dem Energiestoffwechsel gekoppelt. Wachstum, wachstumsgekoppelte Produktsynthesen und energiegekoppelte Produktsynthesen erzeugen i.d.R. zelluläres CO_2. Die CO_2-Emission zu vermeiden würde sich ebenfalls negativ auf die Produktivität auswirken.
Kann die Beeinträchtigung zellulärer Funktionen nicht verhindert werden, limitiert das den Produktionsmaßstab und die Lukrativität [19]. Die genetische Anpassung des Produktionsorganismus an diese Art von Belastung kann eine Alternative sein um Produktionseinbußen zu vermeiden. Die Untersuchung der zellulären Anpassung an hohe CO_2- und HCO_3^--Belastung kann Antwort auf zwei Fragen geben: Warum kommt es zur funktionalen Beeinträchtigung durch

p_{CO2} und wie kann die Akzeptanz des Organismus verbessert werden?
Mit Transkriptomanalysen ist die Möglichkeit zur systematischen Untersuchung differentiell exprimierter Gene (DEG) in den komplexen eukaryotischen Regulationsmustern gegeben. Aguilera u. a. konnten 2005 mit einer Kombination von Transkriptomanalysen und physiologischer Beobachtung die Problematik hoher CO_2-Belastung für den Organismus *S. cerevisiae* unter anaeroben (33 DEG) und aeroben Prozessbedingungen (104 DEG) bei Kohlenstoff- und Stickstofflimitierung (34 DEG) näher spezifizieren [9]. Nur drei der identifizierten Gene (Carboanhydrase NCE103 (EC 4.2.1.1), Pyruvate-Carboxylase PYC1 (EC 6.4.1.1), Phosphoenolpyruvate-Carboxykinase PCK1 (EC 4.1.1.37) stehen im direkten Zusammenhang mit biochemischen Reaktionen von CO_2 oder HCO_3^- [14]. Rückläufige Biomasse-Substrat-Ausbeuten (ΔY_{XS}=-25%) unter aeroben glukoselimitierten Bedingungen bestätigen Expressionsmuster, die auf die Beeinträchtigung mitochondrieller Funktionen hinweisen [9]. Richard u. a. untersuchten 2014 die Veränderung der mitochondriellen Aktivität bei steigender CO_2-Belastung mit Zwei-Substrat-Kinetiken [347]. Ein Anstieg der Respiration um 37%, der Abbau zellulärer Polysaccharide und der zelluläre Import von Kationen wiesen auf akuten Zellstress durch CO_2 hin [347].

2.3 Zellstress

CO_2-induzierte Phänotypen wurden durch die Veränderung ihres Wachstumsverhaltens definiert [180, 9, 347]. Stress-induziertes Verhalten wird durch die Anwesenheit eines Stressfaktors induziert und löst eine Anpassung des Metabolismus aus. Nicht die Anpassung der Zelle, sondern sondern der Auslöser ist i.d.R. namensgebend. Für Hefe werden in der Literatur osmotischer Stress [162, 147], Salz-Stress [106, 189], Säure-Stress [274, 129], oxidativer Stress [60, 34] und weitere Arten von Stress beschrieben.
Osmotischer Stress wird als eine Störung des Turgordrucks durch hohe Osmolarität in der Umgebung der Zelle beschrieben [201]. Auslöser des Wasserverlustes können beispielsweise Sorbitol und NaCl sein [416, 189]. Der Wasserverlust löst eine Stressreaktion aus, die in der Zelle die Synthese von Glycerin induziert [201]. Dadurch steigt der zelluläre Turgordruck, der Differenzdruck zur Umgebung sinkt und weiterer Wasserverlust wird verhindert [454].
Löst NaCl (>0,2M) den osmotischen Stress aus, verändert das auch die zelluläre Ionen-Homöostase [189]. Die zelluläre Reaktion ist mit dem Substrat-, dem Kalzium-Gehalt und dem pH-Wert der Umgebung abgestimmt [434]. Identische Osmolarität in der Umgebung (1,6 Osmol), hervorgerufen durch Sorbitol, NaCl, KCl, $MgCl_2$, $MnCl_2$ und LiCl, führen zu 40-80% Inhibition des Wachstums und senken den zellulären pH-Wert (6,9-6,5) [416].
Natrium- und Kaliumacetat verursachen ebenfalls osmotischen Stress, der aber vom WOA-Effekt, welcher Säure-Stress verursacht, überlagert wird. 80% Wachstumsinhibition tritt bereits bei 0,1 Osmol ein [416]. Obwohl hohe zelluläre Natrium-Konzentrationen toxisch wirken, inhibiert Kaliumacetat das Wachstum stärker als Natriumacetat [241]. Nach Adaptation an hohe Actetat-Konzentrationen (50mM) senkt sich mit Kaliumacetat der zelluläre pH auf 5, während mit Natriumacetat pH 6 erreicht wird [416]. Die Anwesenheit von Kalium (K^+) verstärkt Acetat-Stress [416]. CO_2-Gradienten wirken ebenfalls auf den zellulären Ionenhaushalt [347] und pH-Änderungen verschieben das zelluläre Gleichgewicht zwischen CO_2 und HCO_3^- (Abs. 2.2). Wie

sich die zelluläre Stress-Antwort zu hoher CO_2-Belastung und CO_2-Gradienten verhält, ist unklar. Ein kurzer Überblick zu Säure-Stress (Abs. 2.3.1), osmotischem Stress (Abs. 2.3.2) und Ionen-Stress (Abs. 2.3.3) soll helfen sich an bekannten Regulationsmechanismen zu orientieren.

2.3.1 Stress durch schwache organische Säuren - WOA-Stress

In der Lebensmittelindustrie werden schwache Säuren als Konservierungsmittel zur Kontrolle mikrobiellen Wachstums eingesetzt. Ihr antimikrobielles Potential hängt von ihrer Hydrophobizität, Beständigkeit und pKs ab [265]. Bei niedrigem extrazellulärem pH diffundiert die protonierte Form über die Zellmembran, dissoziiert und stört die pH-Homöostase [265]. Es kommt zu reduzierter DNA- und RNA-Synthese und herabgesetzter metabolischer Aktivität [265]. Essigsäure (E260), Propionsäure (E280) und Sorbinsäure (E200) beeinflussen die Lipid-Zusammensetzung und Funktion der Zellmembranen, die Proteinfaltung und die Zellwandfunktion [265]. Der inhibitorische Effekt einerschwachen organischen Säure (d.h. WOA: *weak organic acid*) nimmt mit der Hydrophobizität ihrer Seitenkette zu [102, 325, 394]. Dabei erhöht der zunehmende Verlust der Membranintegrität die Permeabilität für Ionen und kleine Metabolite, was das elektrochemische Potential der Membran schwächt und den zellulären pH senkt [265]. In großen Bioreaktoren wird die Produktion schwacher Säuren durch die erreichten Titer limitiert [2]. Obwohl *S. cerevisiae* nur geringe Mengen organischer Säuren produziert, macht die vergleichsweise hohe Toleranz gegenüber organischen Säuren die Hefe zu einem geeigneten Produktionsorganismus [2]. Die *batch*-Kultivierung gentechnisch veränderter Produktionsstämme zur Herstellung der C_4-Dicarbonsäuren Malat und Succinat ist sensitiv für die Prozessparameter pH, p_{CO2} und Ca^{2+} [465, 464]. Während niedrige pH-Werte den Produktexport erleichtern, wirkt sich erhöhter p_{CO2} positiv bei der Carboxylierung von Pyruvat aus [464]. Die Präsenz von WOAs und p_{CO2} beeinflusst den zellulären pH und löst Stress-Reaktionen aus, die durch Ethanol noch verstärkt werden können [180, 215, 347]. Die erwarteten Symptome und die so weit bekannten molekularen Mechanismen zur Kompensation von WOAs und CO_2 werden in dieser Arbeit daher verglichen.

Als Reaktion auf WOAs — Sorbat und Benzoat (0,5-2,5 mM) — bricht *S. cerevisiae* seinen Zellzyklus ab und wechselt einige Stunden in ein Dauerstadium um in adaptierter Form erneut den Zellzyklus einzuleiten. Die folgenden Mechanismen werden als zentrale Elemente zur Adaptation beschrieben: i) Essig- und Propionsäure induzieren spezifische Transporter (Ape1p, Tpo2p, Tpo1p, Tpo4p, Pdr12p [265]) unter der Kontrolle der *Multi-Drug Resistance* (MDR); ii) durch Octan- [431], Sorbin- [165], Decan- [12], Essig- oder Bernsteinsäure [44] induziert H^+-ATPase-Aktivitäten über die Plasma- und die Vakuolen-Membran [44, 103, 246]; iii) Umbau der Zellwandstruktur [3, 153, 267, 265, 376, 352]; iv) Decansäure senkt das Verhältnis ungesättigter zu gesättigten Fettsäuren [12, 432], setzt die Δ^9 Desaturase-Aktivität in Sorbat und Artesunat gestressten Zellen herab [376, 352], was die Fluidität der Zellmembran verändert; v) Acetat [13, 266], Propion- [267] und Sorbinsäure [294] erhöhen die Aufnahme und Synthese von Aminosäuren; vi) Acetat [13, 266], Propion- [267] und Sorbinsäure [1, 294] erhören Glykolyse und Zitronensäure-Zyklus; vii) Citrat, Propionsäure, Acetat und Laktat induzieren die Expression von Genen zur Aufnahme von Kationen (K^+, Ca^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}) [3, 153, 215, 267].

Die Hefe adaptiert an die Konzentration der WOA, der sie ausgesetzt war [326].
In genomweiten chemischen Screenings an Kollektionen haploider und diploider Deletionsmutanten von *S. cerevisiae* wurden Phänotypen bei Präsenz der WOAs Propionat [267], Mycophenolsäure [81], Sorbat [273] und Acetat [188] charakterisiert. Eine allgemeine WOA-Toleranz basiert auf den Prozessen vakuolärer Ansäuerung, Vesikeltransport und Ergosterol Biosynthese [265]. Als WOA-spezifische Reaktionen kommt es durch Sorbat zu einer Störung der Tryptophan Biosynthese [229, 265] und Phosphoinositol-vermittelten Signaltransduktion [274, 265]. Die Reaktion auf Mycophenolsäure zeigt Einfluss auf die Purin-Biosynthese (IMD2), was sich auf die Threonin Biosynthese auswirkt [97, 367, 265]. Aguilera u. a. berichteten 2005 ebenfalls von einer Stimulation der Purin-Synthese durch erhöhte Expression von IMD-Genen bei erhöhtem CO_2-Level [9]. Gesteigerte Acetat-Toleranz erhöht den Kohlenhydrat-Metabolismus, die Ribosomen- und Mitochondrien-Biogenese [266]. Der erhöhte Abbau ribosomaler RNA ist bei WOA-Stress das Resultat apoptotischer Mechanismen [281]. Propionsäure induziert Gene der mitochondriellen Respiration und der oxidativen Phosphorylierung [265].
Die Antwort auf WOAs wird über vier Regulationswege vermittelt. i) Msn2/Msn4-Regulon: Es handelt sich dabei um die generelle Stress-Antwort von *S. cerevisiae*. Das Regulon umfasst etwa 200 Gene, deren Expression als Reaktion auf Hitze und osmotischen Schock, oxidativen Stress, niedrigen pH, Glukose-Mangel, Sorbinsäure und hohe Konzentrationen Ethanol durch die Bindung der Transkriptionsfaktoren (TF) Msn2p und Msn4p an das stressresponsive Element (STRE Element) — 5'-CCCCT-3' — der Promotoren dieser Gene verändert wird. ii) Haa1p-Regulon: Aktiviert durch Kupfer, Acetat oder Propionsäure reguliert der Transkriptionsfaktor die Expression von H^+-Antiportern [102], Zellwandproteinen [102] und Teilen des Histon-Deacetylase-Komplexes [125, 265]. iii) War1p-Regulon: War1 vermittelt die Expression des ABC-Transporters (ABC: *ATP binding cassette*) Pdr12p in der Plasmamembran (PM) als Antwort auf Acetat, Propionat und Sorbat [129, 202]. iv) Pdr1/Pdr3-Regulon: Die TF Pdr1p und Pdr3p der *Pleitropic Drug Resistance Elements* (PDRE) regulieren die Expression von Cytotoxin-Transportern für Wirkstoffresistenzen [139] und Transmembranproteinen für die Sphingolipid-Biosynthese und den Phospholipid-Transfer [317]. Sie binden an die PDRE-Consensus-Sequenz 5'-TCCGCGGA-3' und bilden Heterodimere mit den Transkriptionsfaktor Stb5p [55].
Schwache organische Säuren (WOA) werden auf vielfältige Weise eingesetzt um diese Abläufe zu beeinflussen. WOAs und CO_2 haben zwei Eigenschaften gemeinsam: i) ungeladen sind sie hydrophob und passieren die Zellmembran, ii) wurde CO_2 zu H_2CO_3 hydratisiert, dissoziiert es wie WOAs und verbleibt in der Zelle. Die Wirkung von WOAs ist vielseitig, weshalb sie Anwendung als Konservierungsmittel (z.B. Essigsäure, Zitronensäure), Herbizid (z.B. 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure), Arzneistoff (z.B. Artesunat) und Immunsuppressiva (z.B. Mycophenolsäure) finden [265].

2.3.2 Osmotischer Stress

Die Regulation zellulärer Antworten auf Umwelteinflüsse ist in Eukaryoten dicht vernetzt. In den letzten zwanzig Jahren konnten immense Fortschritte bei ihrer Aufklärung gemacht werden. Neben dem Transkriptionsnetzwerk zur strategischen Adaptation sind mitogenaktivierte

Protein-Kinase (MAPK) -Kaskaden ein wichtiger Signalmechanismus [343, 385]. Post-translationale Modifikation (z.B. Phosphorylierung) erlaubt taktische Anpassung innerhalb einer Minute bis eine strategische Adaptation sich im System durchsetzt [337, 163].
Plötzliche Änderungen bei hyperosmotischem Stress [37], Kälte [152], Schwermetallen [409] oder WOAs [272, 215] aktivieren den *High Osmolarity Glycerol* (HOG) -MAPK-Signalweg. Phosphoryliertes Hog1 akkumuliert im Zellkern [303, 331] und löst dort über TF eine strategische Antwort zur Stimulation der Glykolyse für die Bildung von Glycerol aus [83]. Die Regulation der Glycerol-Synthese erfolgt bei der Umsetzung von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) zu Glycerol-3-Phosphat durch NAD^+-abhängige Dehydrogenasen (GPD1 und GPD2) [303, 337]. Während unter anaeroben Bedingungen Glycerol-Synthese zum Ausgleich der redox-Bilanz über GPD2 reguliert wird [454], erfolgt bei osmotischem Stress eine Hog1p-abhängige Regulation der Glycerol-Synthese durch das Isoenzym GPD1 [303]. In diesem Fall kontrolliert Hog1p den Export von Glycerol über das Aquaporin Fps1p und ermöglicht die Einstellung der zellulären Glycerol-Konzentration [337, 416]. Zur Stabilisierung des zellulären Turgor-Drucks erhöht Hog1 die Verfügbarkeit von DHAP durch die transkriptionelle Kontrolle der 6-Phosphofructo-2-Kinase (Pfk27) und zweigt mithilfe des *second messengers* Fruktose-2,6-BisPhosphat (F26BP) Glykolyse-Intermediate zur Glycerol-Synthese ab [83, 320]. Simulationen zufolge könnte die Adaptation an osmotischen Stress mit Änderungen des Trehalose-Metabolismus einhergehen [404, 320], zur Verringerung der Translationsleistung [30] und der Unterbrechung des Zellzyklus führen [98].

2.3.3 Ionen-Homöostase

Eine Störung der zellulären Ionen-Hommöstase kann Auslöser oder Folge von osmotischem Stress [162], Salz-Stress [354], WOA-Stress [265] und pH-Stress [318] sein. Das Membranpotential, der pH-Wert oder das Verhältnis von Kalium zu Natrium (K^+/Na^+) in der Zelle sind kontrollierte Parameter, deren Veränderung im Sekundenbereich wahrgenommen wird [241]. Ein System von Transportern monovalenter Kationen erhält seine Signale durch das Membranpotential und regulatorische Enzyme, die durch das Signalnetzwerk der Zelle reguliert werden [17].
Pma1p, Tok1p, Nha1p, Ena1p und das Trk1/2p-System sind einige der wichtigsten Transporter für monovalente Ionen in der Plasmamembran von *S. cerevisiae*[434]. Die P-Typ H^+-ATPase Pma1p exportiert Protonen aus dem Cytosol [190, 183, 189]. Das erzeugt einen Protonen-Gradienten über die Plasmamembran, der als Energiequelle des zellulären Transports dient [434]. Kalium vermittelt diverse zelluläre Funktionen und wird hauptsächlich durch das Trk1/2p Transportsystem aufgenommen [21, 362, 150, 46, 355, 344, 208]. Aufgrund der molekularen Ähnlichkeit werden Natrium-Ionen ebenfalls durch Kalium-Transporter aufgenommen [189, 434]. Das in hohen Konzentrationen für die Zelle toxische Natrium wird bei Bedarf durch die Transporter Nha1p und Ena1p exportiert [189, 434]. Bei Nha1p handelt es sich um einen Na^+,K^+/H^+-Antiporter, der sowohl Na^+ als auch K^+ durch die Aufnahme von H^+ exportiert [189, 196, 299, 434]. Ena1p ist eine Na^+- und K^+-ATPase zum aktiven ATP-abhängigen Export der beiden Ionen [434]. Der spannungsabhängige Kalium-Kanal Tok1p ist selektiv für K^+ [240, 189].

Die Zelle nutzt ihr negatives Potential auch zur Aufnahme mehrwertiger Kationen [241]. Calcium (Ca^{2+}), Magnesium (Mg^{2+}), Kupfer (Cu^{2+}), Eisen (Fe^{2+}) und Mangan (Mn^{2+}) sind produktionsrelevante Nährstoffe [423, 29]. Zellstress in Produktionsprozessen kann die Ionenaufnahme stören oder zu erhöhtem zellulärem Bedarf führen [464, 230]. Eine genomweite Studie zur Beschreibung des Ionoms in *S. cerevisiae* befasst sich auch mit zweiwertigen Kationen. Das *Screening* der Hefe-Deletions-Kollektion zeigte, dass von 212 Stämmen mit verändertem Ionom in nur 4 Stämme eine einzelne Ionen-Konzentrationen betroffen war. Neben Genen mit unbekannter Funktion reduzieren insbesondere Gene mit vakuolären und mitochondriellen Funktionen den Ionengehalt (Mg^{2+}, Ni^{2+}, Se^{2+}). Eide u. a. (2005) definierten 3 Ionengruppen ([Mg,Ni,P,Co]; [Fe,Se]; [Ca,Mn,Cu,Zn]), innerhalb derer eine Korrelation auftrat und 3 unabhängige Einzelionen ([K], [Na], [S]) [90]. Die Studie zeigte erstmals Änderungen des Ionenhaushalts für eine ganze Deletions-Kollektion und korrelierte Ionengehalte mit zellulärer Funktion.

2.3.4 Zelluläre pH-Homöostase

Hefen senken den neutralen pH-Wert ihres Cytosols in den sauren Bereich, wenn sie in den metabolischen Ruhezustand übergehen [65]. Dabei werden durch die Glutamin-Synthase Gln1p-Filamente gebildet, was zur organisierten Komplexierung von Enzymen während der metabolischen Ruhe führt [322]. Die katalytische Aktivität des Zentralstoffwechsels ist auch in aktiven Zellen pH-abhängig. So zeigen die Enzyme der Glykolyse verschiedene pH-Optima [204] und die E3-Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase ist ebenfalls pH-abhängig. Die Dihydrolipoamide-Dehydrogenase (E3) ist mit dem Pyruvat-, dem α-Ketoglutarat- und dem Glycerin-Dehydrogenase Komplex assoziiert (EC 1.8.1.4). Moxley u. a. präsentierten 2014 ein Modell der E3-Aktivität für Pro- und Eukaryoten [279]. Der Einfluss des regulierenden Verhältnisses von NAD^+ zu NADH ist dabei maßgeblich vom herrschenden pH-Wert abhängig [279].
Der intrazelluläre pH-Wert von Organismen ist daher ein streng kontrollierter Parameter [301]. Der kompartimentierte Aufbau eukaryotischer Zellen ermöglicht außerdem die räumliche Trennung von Metaboliten und Enzymen in Organellen. Proteine, die Organellen mit signifikanten Bedingungen (z.B. pH und Ladung) zugeordnet werden können, zeigen eine Korrelation zum Wirkungsort in ihrem isoelektrischen Punkt, was auf eine Co-Evolution mit dem subzellulären pH-Wert hindeutet [58, 49]. Kompartimente haben daher spezifische pH-Werte (Vakuole: pH_V=5,6 [301]; Cytosol: pH_C=7,0 [301]; Peroxisom: pH_P=8,2 [357]) und eine komplexe Selektion von Ionen an intrazellulären Membranen. Protonen-Gradienten an zellulären Membranen ermöglichen beispielsweise den Sym- und Antiport von Nährstoffen [434] und die oxidative Phosphorylierung [26]. Der Konzentrationsgradient eines Ions bildet ein elektrochemisches Potential $\Delta\Psi$ und die Summe aller Gradienten das Membranpotential E_m [434, 190].
Im Bereich der experimentellen Elektrophysiologie sind die Übergänge in die Bereiche der Neuro- und der Muskelphysiologie fließend. In den meisten tierischen Zellen wird ΔE der Plasmamembran hauptsächlich durch die Na^+/K^+-ATPase erzeugt. Die im Na^+-Gradienten gespeicherte Energie liefert die treibende Kraft für den Na^+/H^+-Antiport zur Regulation des zellulären pH-Werts [26]. Die Transportbeiträge zur pH-Stabilität von Organellen wurde durch mathematische Simulation an Säugerzellmodellen 2001 untersucht [126].
In Hefe hingegen werden die pH-Werte der Kompartimente direkt über H^+-ATPasen (P-Typ und

V-Typ) reguliert [125, 246]. Orij u. a. konnten 2012 eine Korrelation zwischen dem pH-Wert des Cytosols und der Wachstumsrate von Hefe bestimmen [301]. Veränderungen im pH-Wert von Organellen beeinflussen deren lokale Funktionen und den Transport sekretorischer und endosomaler Vesikel zwischen Membranen [301, 134]. Bei der Glykosylierung von Proteinen im Golgi-Netzwerk verändert sich der pH-Wert von Vesikeln beim Übergang vom cis- zum trans-Golgi [26]. Zanghi et al. (1999) konnten Veränderungen in den Glykosylierungsmustern von Polyglycanen an Zelloberflächen als Antwort auf pH und p_{CO2} in CHO-Zellen zeigen [463]. Die Funktion alternativer Glykosylierungsmuster von Proteinen ist nach wie vor Forschungsgegenstand aktueller Studien [85, 453].
Mit Sicherheit ist der pH-Wert ein sensibler und streng regulierter Parameter in kompartimentierten Zellen [301]. Seine Stabilität bildet die Basis für die korrekte Funktionsweise membranständiger Transporter und katalytischer Aktivitäten für katabole und anabole zelluläre Prozesse. In Hefe ist die Aktivität von Pma1p, der H^+-ATPase in der Plasmamembran, die zentrale Funktion zur Stabilisierung des pH-Werts im Cytosol [434]. Eine Reihe molekularer Mechanismen reguliert die Pma1p-Aktivität *in vivo*: i) die Affinität für ATP wird durch Ptk2p erhöht [125, 96] und ii) durch die kombinierte Funktion der Casein-Kinasen Yck1p und Yck2p reduziert [99, 345]. Hsp30p reprimiert Pma1p [327, 255], weshalb iii) 90% der verfügbaren Pma1p-Aktivität erst durch gezielte Phosphorylierung verfügbar werden [216]; iv) Pma1p wird von zellulärer Glukose aktiviert [379, 333].
Die posttranslationale Modifikation von Pma1p ist ein Bindeglied zwischen der Regulation des pH_C bei wechselnden Reaktionsraten der Glykolyse und bei verschiedenen Stressfaktoren [165]. Die Störung der zellulären pH-Homöostase durch Stressfaktoren oder genetische Mutation kann weitreichende Konsequenzen für die Zelle haben. i) Bei einer Unterfunktion von Pma1p, z.B. durch Hunger mangels einer geeigneten Kohlenstoffquelle oder durch die Anwesenheit von WOAs, sinkt der zelluläre pH-Wert und damit auch die Wachstumsrate [65, 345, 301]. ii) Eine Steigerung ihrer Aktivität, z.B. durch Deletion des Regulatorgens YHC3, führen zur Erhöhung des vakuolären pH_V-Werts [52]. Das humane Homolog CLN3 ist in Mitochondrien, Golgi und Lysosomen lokalisiert [271]. Seine Mutation führt zum Defekt der lysosomalen Proteolyse und verursacht so juvenile neuronale Ceroid-Lipofuszinose (JNCL) [52]. Das Hefe-Modell der JNCL beschreibt daher einen Defekt der Proteolyse durch erhöhten pH_V [271].
Die Möglichkeit zur pH-Messung *in vivo* rückt die Abhängig vieler zellulärer Funktionen von pH-Werten und den Einfluss von Stressfaktoren auf den zellulären pH-Wert in den Fokus zellbiologischer Untersuchungen [302, 300, 301, 416]. Die aktuelle Datenlage schafft auch neue Möglichkeiten für modellgestützte quantitative Betrachtungen des Metabolismus und des Ionentransports.

2.3.5 Modelle des zellulären Ionentransports

Beenden Hefen ihren Ruhezustand, steigen Bicarbonat- und Kalium-Gehalt in den Zellen [64]. Die Initiation des Metabolismus durch Glukose oder Ethanol verläuft in ihrer Kalium-Aufnahme unterschiedlich [239]. Es wurden substratabhängige pH_C-Werte und HCO_3^--Gehalt vermutet. Ryan u. a. untersuchten die Effekte von WOAs und CO_2 auf die Kalium-Homöostase [365, 319] und die Rolle des intrazellulären pHs beim Kationen-Austausch bereits vor 40 Jahren [366].

Lopez u. a. (1999) legten ein Modell zur zellulären Akkumulation von HCO_3^- vor, das den pH durch Pma1p-Aktivität ausgleicht und die entstehende Potentialdifferenz durch die Aufnahme von K^+-Ionen kompensiert [239]. Eine neuere Studie zeigt, dass die Aufnahme von CO_2 zu einer Erhöhung des zellulären K^+-Gehalts führen kann [347]. Diese Erhöhung ist temporär und tritt in stress-adaptierten Zellen nicht mehr auf [347]. Stattdessen erfolgte eine Senkung der K^+-Konzentration [347]. Richard u. a. (2014) vermuten, dass der Ausstoß von K^+ eine Reaktion auf osmotischen Stress sein könnte, der bereits bei WOAs [203] im Zusammenhang mit dem HOG-Signal und dessen *Memory*-Effekten beobachtet wurde [136].
Durch die mathematische Beschreibung einzelner Ereignisse lassen sich die zellulären Vorgänge kombinieren [190]. Zwei Arbeitsgruppen publizierten bis 2006 einfache Modelle zum Ausgleich des osmotischen Potentials durch den HOG-Signalweg [201, 116]. Die Modelle bilden den Wasserhaushalt und die Glycerol-Synthese beim Auftreten ungeladener Stressfaktoren wie Sorbitol ab. Das HOG-Signal modifiziert bei geladenen Stressfaktoren wie NaCl und KCl auch den Ionentransporter Nha1p und den spannungsabhängigen Kanal Tok1p [195].
Ein umfassendes Modell der Kalium-Homöostase, das auch die Funktionen von Nha1 und Tok1 beinhaltet, wurde von Kahm 2011 vorgestellt [183]. Die Arbeit identifiziert die Aktuatoren der Kalium-Homöostase mittels *Reverse Tracking* und belegt die Modell-Hypothese, dass Hefezellen auf plötzlichen externen Kalium-Mangel mit vermehrtem Protonen-Export reagieren. Die experimentellen Grundlagen des Modells belegen, dass die zelluläre CO_2-Produktion und die Pma1p-Aktivität zur Energetisierung der Kaliumaufnahme bei Kalium-Mangel beitragen [183]. Kahms Modell basiert auf der Funktion elektrischer und chemischer Potentialdifferenzen. Die post-translationale Modifikation der zellulären Transporteigenschaften durch die Mechanismen der Stress-Regulation wurde nicht berücksichtigt.
Das spannungsabhängig Kalium-Importsystem Trk1/2p wird durch die Kinasen Hal4p und Hal5p reguliert [282, 46] und mittels Dephosphorylierung durch das Calmodulin/Calcineurin-Signals (CMD/CN) aktiviert [259, 189]. Die Protein-Phosphatasen Ppz1p und Ppz2p [260] sowie die Proteinkinase Sky1p [106] führen zu einer geringeren Transportleistung von Trk1/2p. Snf1p ist an der transkriptionellen Regulation des Systems beteiligt [17].
Ke u. a. (2013) führen die Mechanismen des HOG- und des CMD/CN-Signalwegs in einem mathematischen Modell zur Regulation des Natrium- und Kalium-Transports zusammen. Die Regulation des Membrantransports bei Sorbitol, NaCl, KCl und alkalische pH-Werte als Stress-Faktoren berücksichtigt auch Anpassungen durch post-translationale Modifikation [189]. Den Simulationen zufolge adaptiert das Calzineurin-Signal die Zelle an hohe Na^+-Konzentrationen, nicht jedoch an andere Arten von Stress. Bei NaCl-Perturbation inhibiert das HOG-Signal Tok1p und erhöht das Membranpotential, weshalb weniger Na^+ von der Zelle aufgenommen wird. Eine Verzögerung der (Toxin-)Aufnahme verlängert das Überleben der Zelle, bis eine umfassende Adaptation durch die transkriptionelle Kontrolle erfolgt [189].
Äußere Faktoren wie NaCl, WOAs oder CO_2 erzeugen chemische, elektrische und osmotische Ungleichgewichte, die zur Anpassung der Transportraten von Pma1p, Trk1/2p, Nha1p, Ena1p und Tok1p durch post-translationale Modifikation nach der Signalverarbeitung durch das Transduktionsnetzwerk der Zelle führen [241, 320, 417, 416]. Volkov (2015) gibt einen Überblick quantitativer Rahmenbedingungen der Transportraten von Ionen-

Transportern, -Pumpen und -Kanäle [434]. Keener und Sneyd publizierten 2009 eine Zusammenfassung mathematischer Ansätze zur quantitativen Physiologie in der Zellbiologie [190].

2.4 Signal-Transduktion von CO_2

Signale werden an Rezeptoren wahrgenommen und von nachgeschalteten Signalkaskaden in eine koordinierte Reaktion der Zelle übersetzt. Die Anpassung der Zelle erfolgt in zeitlich gestaffelten Reaktionen [186]. Im Bereich von Millisekunden wirken Ladungsänderungen auf die Elektrophysiologie des Ladungstransports and der Periplasmamembran. Die Bewegung von Ladungsträgern richtet sich nach elektrischen Feldern und den Gesetzen der Diffusion [71]. Eine erste Stressreaktion durch gezielte posttranslationale Modifikation von Membranpoteinen verändert die Transporteigenschaften der Membran innerhalb von Sekunden [189]. In der Zwischenzeit initiiert das gleiche Signal die Produktion von zelleigenen Signalmolekülen, sogenannten *second messengern* [62, 197, 296] und sorgt für die Translokation von Transkriptionsfaktoren zwischen Cytosol und Zellkern [100, 143, 317, 455, 298]. Die auslösenden Signalkaskaden werden nach wenigen Minuten in ihren Ausgangszustand zurückversetzt [147, 320, 189, 381]. Das Signal selbst wurde innerhalb der Zelle verteilt, dabei biochemisch umgeformt und mit anderen Signalen am Zielort koordiniert.
Derzeit sind zwei Signalwege für die Vermittlung eines CO_2-Signals in Hefen bekannt [328]. Der Erste aktiviert die Virulenz in pathogenen Hefen über die Adenylat-Cyclase und nutzt cAMP als *second messenger* bei steigenden CO_2-Gehalten [145, 68]. Die co-Regulation von CO_2- und O_2-Signalen ist für die Morphogenese pathogener Hefen von zentraler Bedeutung. Da *S. cerevisiae* eine CO_2-abhängige Beeinträchtigung des respirativen Metabolismus auslöst [9, 347], wird die O_2-abhängige Regulation respirativer Gene und die Funktionen des cAMP-PKA-Signalwegs im Anschluss näher betrachtet (Abs. 2.4.2 und 2.4.3).

2.4.1 Transkriptionsfaktor CST6 in *S. cerevisiae*

Der zweite Signalweg zur CO_2-Wahrnehmung wurde unabhängig von viraler Morphogenese in *S. cerevisiae*, *C. albicans* und *C. glabrata* nachgewiesen [328]. Dabei fungieren die Serin/Threonin-Kinase Pkh1p und Pkh2 als Sensor eines sphingolipidvermittelten Signals zur Regulation der Endozytose [328]. Pohlers u. a. identifizierten 2017 die Kinase Sch9p als Substrat von Pkh1/2p innerhalb einer Signalkaskade die in *S. cerevisiae*, *C. albicans* und *C. glabrata* einen Transkriptionsfaktor (Cst6p/Rca1p) von NCE103 reguliert [227, 328]. NCE103 kodiert für die Carboanhydrase (CA) von *S. cerevisiae* [8]. Deren Expression erfolgt bei niedrigen CO_2-Gehalten [14]. Abbildung 2.1 zeigt einen Überblick dieser CO_2-abhängigen Signalkaskade.
Cst6p gehört zur ATF/CREB-Familie von Transkriptionsfaktoren (TF) und bestitzt als Homodimer eine bZip-Domäne [69, 227]. Als aktivierender oder repremierender TF (ATF) bindet Cst6p an cAMP-responsive-Elemente (CRE). Cst6p und andere Mitglieder der ATF/CREB Familie (Sko1p und Aca1p) binden an das sub-telomere ATF/CREB Element (SACE: Tab. 2.2 Zeile

1) oder einer zum Teil palindromischen Variante (Tab. 2.2 Zeile 2) [111, 391]. Weitere Zielsequenzen sind die yAP1-Bindestelle von Gcn4p (Tab. 2.2 Zeile 3), dem streng kontrollierten transkriptionellen Aktivator der Aminosäuresynthese [156] und einer Variante, welche yAP-Proteine (Yap1p-Yap8p) bindet (Tab. 2.2 Zeile 4) [104].

TABELLE 2.2: Die Sequenzen von sub-telomeren ATF/CREB-Elementen (SACE) und der AP1-Bindestelle in Hefe (yAP1) werden von TF mit bZip-Domäne besetzt.

Domäne	Sequenz	TF	Literatur
SACE	5'-ATGACGTCAT-3'	Sko1p, Aca1p und Cst6p	[227]
	5'-ATGGTATCAT-3'		[111, 391]
yAP1	5'-ATGAC_TCAT-3'	Gcn4p	[156]
	5'-ATTAC_TAAT-3'	Yap1-8p	[104]

Die Expression von Sko1p ist eine Antwort auf osmotischen und oxidativen Stress [338, 339, 340, 66] während Aca1p eine Rolle bei der Verwendung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen spielt [111]. Die ATF/CREB-Bindestellen dienen als *Upstream Activator/Repressor Sequence* (UAS/URS) von COS-Promotoren [391]. Aguilera u. a. beobachteten die erhöhte Transkription von COS-Genen (COS12, COS2, COS3, COS4, COS5) bei erhöhter CO_2-Belastung [9]. Diese endosomalen Proteine vermitteln ein Signal zur Ubiquitinierung, erzeugen endosomale Subdomänen und separieren damit intakte von fehlgefalteten Membranproteine [243].
Zusammengenommen wurden von Liu u. a. 2016 *in vitro* 38 Bindestellen in den Promotorregionen von 59 Protein-kodierenden Genen identifiziert [227]. Unter diesen Proteinen sind i) 10 DNA-bindende bzw. transkriptionregulierende Gene (CBF2, GAT2, HAP4, PHD1, RMI1, ROX1, SIR4, SOK2, YAP1, und YAP6), ii) 16 mitochondrielle Proteine, davon 6 membranständig, iii) die Expression 7 weiterer Gene wird durch Cst6p reduziert (AHP1, PHD1, YAP6, ACC1, ROX1, HAP4, and PYC1) und iv) die Expression von RPS3 (YNL178W) erhöht (vgl. Abb. 2.1). Außerdem ist Cst6p mit 106 anderen TF an der Co-Regulation weiterer Gene beteiligt. Fünf dieser TF sind als Stress-Antwort-Gene bekannt (Sko1p, Msn2p, Skn7p, Cin5p, and Yap6p), zwei weitere für die Kontrolle bei Pseudohyphen-Wachstum (Ste12 and Sok2p) [146]. Der TF Cst6p ist neben der CO_2-abhängigen Expression von Nce103p auch an der Regulation von Respiration, Gluconeogenese und Stress-Antwort eingebunden [227]. Dabei wechseln die TFs Cst6p und Skn7p bei Hypoxie vom Zellkern ins Cytosol und werden bei ausreichendem Sauerstoffangebot in weniger als einer Stunde wieder relokalisiert [74].

2.4.2 Norm-, hyp- und anoxische Regulation

Als fakultativ anaerober Organismus synthetisiert *S. cerevisiae* in anoxischer Umgebung ATP durch Substratkettenphosphorylierung, während in norm- und hypoxischer Umgebung auch die oxidative Phosphorylierung erfolgen kann. Der ATP-Synthase-Komplex (ATP1-ATP14) fixiert dabei die potentielle Energie des mitochondriellen Protonengradienten in Adenosintriphosphat (ATP). Mitochondriell kodierte Proteine (NDI1, NDE1, NDE2, GUT2) und Proteinkomplexe Succinat-Dehydrogenase (SDH: SDH1, SDH2, SDH3, SDH5),

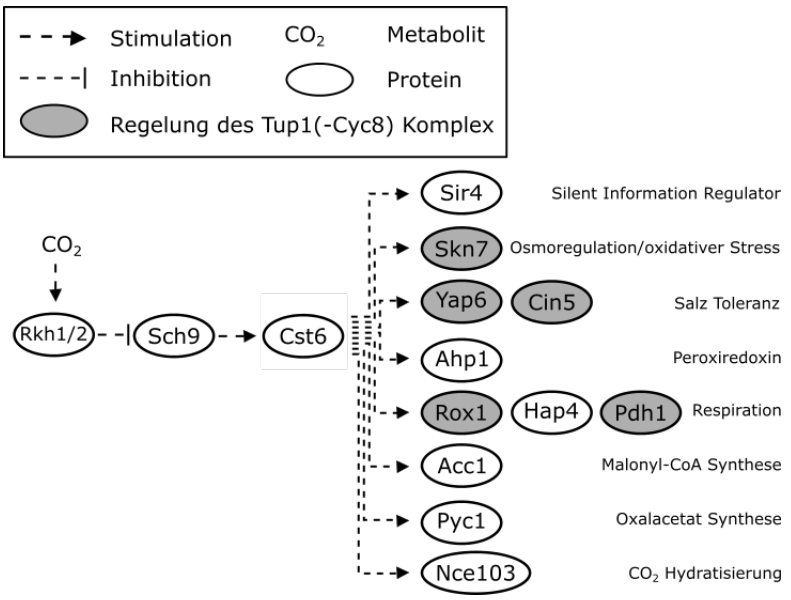


ABBILDUNG 2.1: Die transkriptionelle Regulation bei niedrigen [14] und hohen CO_2-Gehalten durch Cst6p erfolgt als koordinierte Regulation zur Abstimmung von TFs von Umweltsignalen (z.B. Skn7p, Yap6p, Cin5p, Ahp1p [146]) mit der Energiebereitstellung durch mitochondrielle Funktionen (z.B. Rox1p, Hap4p, Pdh1p [275, 228, 461, 95]) und CO_2-abhängigen *precursor*-Synthesen (z.B. Acc1p, Pyc1p, Nce103p [14]) [227, 69]. Einige Proteine (grau) fungieren als Vermittler des transkriptionellen co-Repressor-Komplexes Tup1(-Cyc8) [146]. Die Regulation des *Silence-Information-Repressors* (Sir4p) lässt eine Beteiligung von CO_2 an der Stress-induzierten Änderung von Heterochromatin-Strukturen zu [393]. Die CO_2-abhängige Signalkaskade zur Regulation der Cst6p-Aktivität durch die Kinase Sch9p ist in *S. cerevisiae*, *C. albicans* und *C. glabrata* konserviert [328].

Cytochrome-C-Reduktase (Cyt-c-Red: COR1, QCR2, QCR6, QCR7, QCR9) und Cytochrome-C-Oxidasen (Cyt-c-Ox) der mitochondriellen Elektronentransportkette (MRC) regenerieren den Gradienten durch die Elektronenübertragen von NADH auf Sauerstoff. Die Elektronen-*Carrier* Quinon (QH_2) und Cytochrome-C (Cyt-c) transferieren Ladung zwischen den Proteinkomplexen der MRC [334].

Hypoxie und Reoxigenierung einer Kultur induzieren eine differentielle Expression in 20% des Hefe-Genoms [207]. Es erfordert eine koordinierte Expression der chromosomalen DNA und der mitochondriellen DNA (mtDNA). Mitochondrielle Gene werden als polycistronische RNAs transkribiert, auf mitochondriellen Ribosomen translatiert und umgehend in die mitochondrielle Membran integriert. Lipinski u. a. (2010) geben eine Zusammenfassung der mitochondriellen Genexpression [226].

Die Anpassung an hypoxische Bedingungen geht mit dem Transport von 48 Proteinen aus dem Zellkern ins Cytosol einher [74]. Darunter SWI/SNF-Proteine (z.B. Swi3), deren Lokalisation die Zusammensetzung und Funktion des SWI/SNF-Komplexes verändert und andere Zielsequenzen für Chromatin-Strukturen ermöglicht [59, 74]. Die TFs Mga2p, Rox1p, Hap1p und Mot3p vermitteln die Expression funktionaler Gengruppen zur Sauerstoffregulation [207, 211, 178, 187]. Unter aeroben Bedingungen unterliegt deren Kontrolle dem Aktivator Hap1 und dem Repressor Rox1 [403]. Hypoxie-induzierte Gene verwenden häufig O_2 als Substrat. Es handelt

sich um Einzelgene (z.B. ERG11, HEM13, CPR1, SUT1 und OLE1) und Genpaare, von denen das Eine unter normoxischen und das Andere unter hypoxischen Bedingungen exprimiert wird (CYC1/CYC7, HMG1/HMG2, AAC1/AAC2/AAC3 und TIF51a/ANB1) [473, 228]. Die Expression der Isoformen, z.B. Cytchrom-c-Oxidase-Untereinheit V (COX5b) und Cytochrom-c (CYC7), erhöht bei Hypoxie die Elektronenübertragung auf das limitierte Substrat O_2 [439, 473]. *S. cerevisiae* ist so in der Lage seine PO-Ratio zu erhöhen [334].
Als Signal der O_2-Verfügbarkeit dient die Anwesenheit von Häm, dessen Biosynthese O_2-abhängig ist [314, 207]. Hap1p bindet Häm, wirkt aber Häm-unabhängig an der Consensus-Sequenz 5'-CGGN$_6$CGG-3' als TF [474]. Die Transkription wird durch Rox1p reprimiert, welches nur den Häm-Hap1p Komplex bindet [207]. Rox1p bindet außerdem seinen eigenen Promotor, reprimiert dadurch die eigene Expression und wird zusätzlich durch Häm und Cst6p repimiert [78, 473, 227]. Damit verhindert Rox1p die Expression i) hypoxischer Gene unter normoxischen Bedingungen, ii) anaerober Gene unter aeroben Bedingungen und iii) fördert in Gegenwart von O_2 die Regulation von Isogenen [403]. Rox1p-regulierte Gene sind funktional für die Sterol- und Häm-Biosynthese [403], die Zellwandzusammensetzung [403], die Redox-Regulation des anaeroben Metabolismus [403], die Aktivierung von Eisen [403] und die Regulation von Isogenen in Abhängigkeit vom O_2-Gehalt [403]. Die Sauerstoff- und die Glukose-Verfügbarkeit sind zwei der wichtigsten Signale des aeroben Metabolismus.

2.4.3 cAMP-PKA-Regulation

Die plasmamembranständige Adenylatcyclase (ACyc) reagiert auf das Glukose-Angebot, den intrazellulären pH-Wert und auf Stress-Signale aus der Umgebung. Ihre Aktivität führt zur Synthese des *second messengers* cAMP und ist abhängig von Srv2p, Ras1p oder Ras2p, den Ira-Proteinen und dem *Guanine Exchange Factor* (GEF: Cdc25p und Sdc25p) (siehe Abb. 2.2). Der cAMP-Gehalt ist damit entscheidend an der Regulation der Kohlenhydratspeicher, der Glykolyse und der Gluconeogenese, der Meiose und der Sporulation [430], der Mitose [181] und der Stress-Resistenz beteiligt [62, 405, 182]. Zampar u. a. (2013) zeigen eine Zusammenfassung der Regulation bei Diauxie durch den Wechsel von Glukose zu Ethanol [462]. Eine Zusammenfassung zur Rolle von cAMP bei der Kopplung des Energie-Metabolismus mit dem Zellzyklus wurde von Müller u. a. (2003) gegeben [269]. Eine aktuelle Studie zeigt, dass CO_2/HCO_3^- gemeinsam mit Acetat der meiotischen Zelle Information über ihre Speicherreserven zur Kontrolle der Sporulation liefert [182]. Nach Eintritt in die Meiose wird die Sporulation über den Ras/cAMP/PKA-Signalweg kontrolliert [182].
Eine Aktivierung der ACyc (Cyr1p) erfolgt durch die Interaktion mit den GTPasen Ras1p und Ras2p in ihrer aktiven GTP-bindenden Konformation [62]. Ras2p wird kontinuierlich exprimiert während Ras1p beim Wachstum auf nicht-fermentativen Kohlenstoffquellen reprimiert ist [61]. Die GEFs Cdc25p und Sdc25p stimulieren die Bindung von GTP an Ras, was bei einem natürlich vorhandenen Überschuß von GTP zum Austausch von GDP gegen GTP führt und eine Aktivierung von Ras bewirkt. Damit ist die ACyc-Aktivität auch an den Energie-Status der Zelle gekoppelt [61]. Der Wechsel von Ras in den GDP-bindenden inaktiven Zustand erfolgt entweder über die geringe GTPase-Aktivität von Ras oder durch die GTPase-aktivierenden Proteine (GAP) Ira1p und Ira2p. Da die Ira-Aktivität bei zellulärer Ansäuerung inhibiert wird, kommt es

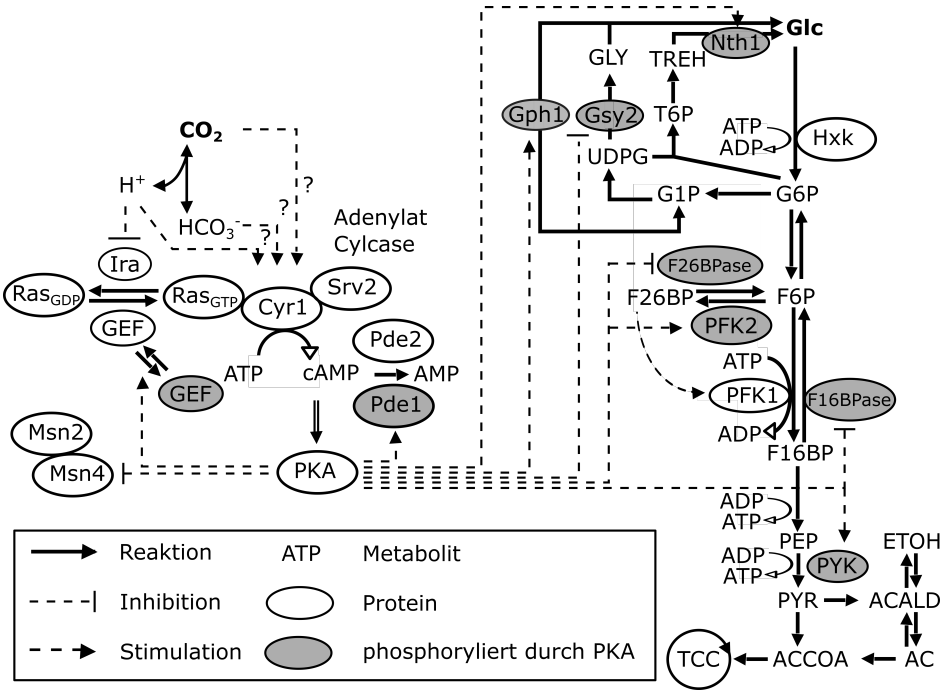


ABBILDUNG 2.2: Postulierte Bedingung eines CO_2/HCO_3^--Signals zur Interaktion mit der Struktur der cAMP/PKA-Signal-Transduktions-Kaskade und dem gekoppelten Energie-Metabolismus. Proteine und Metabolite sind nach Standardnamen oder wie folgt benannt. Kürzel: AC: Acetat, ACALD: Acetaldehyd, ACCOA: Acetyl-CoA, ETOH: Ethanol, F6P: Fruktose-6-Phosphat, F16BP: Fruktose-1,6-Bisphosphat, F26BP: Fruktose-2,6-Bisphosphat, GEF: Cdc25 und Sdc25, Glc: Glukose, GLY: Glykogen, G1P: Glukose-1-Phosphat, G6P: Glukose-6-Phsophat, Hxk: Hxk1, Hxk2 und Glk1, PFK1: Phosphofruktokinase 1, PFK2: Phosphofruktokinase 2, PYR: Pyruvat, PYK: Pyruvat-Kinase, PKA: katalytische Untereinheit der PKA (Tpk1, Tpk2, Tpk3), $Ras_{GDP/GTP}$: Ras1 und Ras2 mit gebundenem GDP oder GTP, TCC: Zitronensäurezyklus, TREH: Trehalose, UDPG: UDP-Glukose. [170, 62, 269, 94, 375]

zum Anstieg des zellulären cAMP-Levels [62, 405].

cAMP diffundiert von der membranständigen ACyc in die Zelle, bindet dort die Protein-Kinase A (PKA) und aktiviert sie. In inaktivem Zustand ist PKA ein Heterotetramer aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten kodiert in den Genen BCY1, TPK1, TPK2 und TPK3 [410, 411]. Durch die Bindung von jeweils zwei cAMP an das Dimer der regulatorischen Untereinheiten (Bcy1p) werden die katalytischen Monomere (Tpk1p, Tpk2p, Tpk3p) der PKA freigesetzt [179]. Diese unterscheiden sich in ihrer Expressionsintensität und ihrer katalytischen Aktivität hinsichtlich der Regulation des filamentösen Wachstums, der Eisen-Aufnahme, der Respiration und dem Trehalose-Abbau [405, 313, 353]. Mitochondrielle Proteingehalte und Cytochrom-C-Level werden insbesondere durch Tpk3p reguliert [57]. Die Menge der regulatorischen Untereinheit Bcy1p erhöht sich beim Wechsel zu nicht-fermentativen Kohlenstoffquellen [443]. Die Deletion von YAK1, einer unter PKA reaktiven Protein Kinase des Glukose-Sensor-Systems, verhindert die Akkumulation von Bcy1p [443]. Der Verbleib von Byc1p im Cytosol ist abhängig von der Kohlenstoffquelle, der Phosphorylierung durch die Kinase Yak1p und der Bindung an Zds1p und Zds2p [132, 133, 131, 130]. Die subzelluläre Lokalisation von Tpk1p dagegen ist abhängig vom cAMP-Gehalt [132].

Der Abbau von cAMP zu AMP erfolgt durch die Phosphodiesterasen Pde1p und Pde2p [405, 315]. Die Hydrolyse sorgt nach einer Transmission innerhalb des cAMP-PKA-Signalwegs für die Signalrückstellung. Insbesondere die Isoform Pde1p hat niedrigere Affinität zu cAMP und wird wahrscheinlich bei hohen cAMP-Gehalten durch PKA phosphoryliert [242]. Dabei ändert sich weder Affinität noch Aktivität der Pde1p [242]. Als mögliche Ursachen einer negativen Rückkopplungsschleife zur Signalrückstellung werden subzelluläre Lokalisation und Protein-Protein-Wechselwirkung vermutet [242].
cAMP und PKA spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation des Kohlenhydrat-Metabolismus (Abb. 2.2). Das umfasst zum einen regulatorische Schlüsselenzyme der Glykolyse und zum anderen Enzyme des Metabolismus zur Kohlenhydrat-Speicherung in Form von Glykogen (Gph1p, Gsy2p) und Trehalose (Nth1p). Dabei werden Gph1p und Nth1p durch Phosphorylierung aktiviert [170, 375]. Die Regulation erfolgt sowohl auf transkriptioneller Ebene, als auch durch spezifische posttranslationale Phosphorylierung glkolytischer Enzyme. Einen Überblick der Thematik geben diverse Publikationen [107, 447]. Außerdem induziert PKA die Phosphorylierung der Phosphofruktokinase 2 (PFK2) und inhibiert die Fruktor-2,6-Bisphosphatase. Der Metabolit Fruktose-2,6-Bisphosphat ist Aktivator der Phosphofruktokinase 1 (PFK1) und Inhibitor der Fruktose-1,6-Bisphosphatase (F16BPase) [329, 192, 32, 425, 161]. Die beiden Isoenzyme der Pyruvat-Kinase, Cdc19p und Pyk2p werden durch die *in vivo*-Phosphorylierung mittels PKA aktiviert [332]. Hohe PKA-Aktivität induziert dadurch den Abbau der zellulären Glykogen- und Trehalose-Speicher und stimuliert die PFK1-Aktivität. Niedrige PKA-Aktivität dagegen erhöht die Synthese von Kohlenhydratspeichern und reduziert den Fluss durch die Glykolyse. Ein Abbau von Glycogen und Trehalose durch erhöhte CO_2-Gehalte in der Umgebung wurde bereits mehrfach beobachtet [205, 4, 347].
Hohe PKA-Aktivität wird i.d.R. mit vegetativem Wachstum auf fermentativen Kohlenstoffquellen verbunden. Beim Wachstum auf Acetat ist niedrige PKA-Aktivität eine Voraussetzung zum Eintritt in die Meiose [400, 460]. Die PKA-Aktivität erhöht nach Eintritt in die meiotische Zellteilung den cAMP-Gehalt, welcher zum Ende des Sporulationsprozesses wieder absinkt [441, 418]. Jungbluth u. a. (2012) zeigten, dass Zeitpunkt und Stärke der PKA-Aktivität wichtig für die Kontrolle der gebildeten Sporenanzahl sind [182]. Es wird vermutet, dass eine ständige Kontrolle des Acetat-Angebots durch das im TCC gebildete CO_2 erfolgt [182].

2.5 Signalverarbeitung lebender Systeme

Die Signalverarbeitung in eukaryotischen Zellen wird im allgemeinen als *komplex* bezeichnet. Viele der Regulationsmechanismen sind speziesübergreifend konserviert und werden deshalb an Modellorganismen untersucht. Die Signal-Antwort-Regulation auf Schlüsselreize wie Nährstoffe [388, 34] und Stress durch Salze [189, 50], organische Verbindungen [166, 51] und Temperatur [334, 168, 110]) sind Gegenstand aktueller Studien an Pflanzen, Pilzen und Säugerzellen. Dabei ist die Interaktion des Zellkerns mit den Mitochondrien [309], den Peroxisomen [298] und dem Endoplasmatischen Reticulum [449]) Thema aktueller Publikationen.
Diese Systeme durchlaufen Zyklen mit Perioden von 40 Minuten bis zu 24 Stunden. Innerhalb eines Zyklus vermitteln die Signalmoleküle an *Checkpoints*, ob die Voraussetzungen zum

Eintritt in den nächsten Abschnitt eines Zyklus gegeben sind. Die Zyklen in einem Organismus müssen für ihren Ablauf aufeinander abgestimmt werden [26]. Vier Typen von Oszillationen wurden in den letzten 50 Jahren in Hefekulturen untersucht [89, 198]. Zyklen treten beim Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen auf und äußern sich in periodischen Änderungen der Sporulation, der Sauerstoffaufnahmerate, der Kohlendioxidbildungsrate, der Exkretion, des ATP-Gehalts, des pH-Werts und der Ethanolbildungsrate. CO_2 ist bekannt dafür zelluläre Zyklen zu verändern.

2.5.1 Circadiane Rhythmik

Circadiane Rhythmik (cR) mit einer Periodenlänge von 24 Stunden wurde in *S. cerevisiae* wenig erforscht. Systeme zur Messung von Tagesrhythmen sind für Tiere, Pflanzen, Pilze und Cyanobakterien bekannt [26]. cRs organisieren Genexpression, Metabolismus und Verhalten von Organismen so, dass sie zu bestimmten Tageszeiten eintreten. Zugrunde liegt ein molekularer Mechanismus aus transkriptionellen und post-transkriptionellen Signalen. Bei Schimmelpilzen wie *Neurospora crassa* sind Änderungen der cR durch Umwelteinflüsse (z.B. CO_2 und Biotin) bekannt [444, 261, 356]. CO_2 unterdrückt die cR und damit das Wachstum durch periodische Sporenbildung mit einer Periode von ca. 20 Stunden [356]. Amplitude, Periodendauer und Dämpfung der cR passen sich der lokalen Umgebung durch zeitgeber-kontrollierte Gene (CCGs: *Clock-Controlled Genes*) an [264, 89]. In kontinuierlichen Kultivierungen zeigen auch haploide, auxotrophe *S. cerevisiae*-Stämme schwache, gedämpfte Oszillationen mit Perioden von 9 bis 24 Stunden [89]. Diese Zeitfenster liegen deutlich über der Länge eines Zellzylkus.

2.5.2 Mitotischer Zellzyklus

Der mitotische Zellzyklus von haploidien MATa-*S. cereviaie*-Zellen ist in vier Zellzyklus-Phasen (G_1, S, G_2 und M) unterteilt. In der G_1-Phase wachsen die Zellen in ihrer Größe bis zum Eintritt in den Zellzyklus. Die Sprossung beginnt mit der DNA-Synthese während der S-Phase und wechselt nach erfolgreicher Replikation in die G_2-Phase. Die replizierten Chromosomen werden in der M-Phase auf zwei Zellkerne verteilt. Die M-Phase wird weiter in Pro-, Meta-, Ana- und Telo-Phase unterschieden. Für die Besonderheiten von Hefe sei auf die Literatur verwiesen [436]. In der Telo-Phase ist die Teilung des Zellkerns abgeschlossen und ein Septum trennt Mutterzelle und Knospe voneinander, bevor während der Cytokinese die assymetrische Teilung in eine größere Mutter- und eine kleinere Tochterzelle erfolgt. Das Substrat-Angebot hat signifikante Auswirkung auf die Länge der G_1-Phase [151]. Unter Stickstofflimitierung kommt es auch zur Verlängerung der anderen Phasen [140]. Die molekularen Mechanismen des Zellzyklus sind geprägt vom oszillierenden Verhalten der regulierenden Komponenten [109, 288, 257].

CO_2 beeinflusst diese Rhythmen. In der pathogenen Hefe *C. albicans* unterdrückt CO_2 die Mitose und stimuliert invasives Wachstum [197]. In der Spalthefe *S. pombe* inhibiert CO_2 die Mitose durch eine Verkürzung der G_2-Phase, was die Zellen in der G_1-Phase arretiert [297]. In der *lag*-Phase von *S. cerevisiae* stimuliert CO_2/HCO_3^- die meiotische Zellteilung über den Ras/cAMP/PKA-Signalweg [435, 182]. Umfassende systemische Analysen der metabolischen

Regulation wurden in den letzten Jahren für meiotische und mitotische Zellteilung durchgeführt [437, 269]. Für einen erfolgreichen Abschluss des Zellzyklus bzw. der Sporulation werden Spitzenleistungen des Zentralstoffwechsels und der Nukleotidsynthese erreicht [269, 437]. Insbesondere die Kontrolle der metabolischen Energieniveaus ist während der meiotischen Differenzierung kritisch [437].

2.5.3 Respiratorischer/reduktiver Zyklus

Der Redox-Status von NADH, Cytochrom-c und der Cytochrom-c-Oxidase unterliegt periodischen Schwankungen zwischen energiereichen und energiearmen Phasen [237]. Lloyd u. a. (2003) haben gezeigt, dass schwankende elektrochemische Potentiale mit struktureller Zustandsänderung der mitochondriellen Matrix einhergehen und eine selbsterzeugende Periode von 42 Minuten aufweisen [237, 236]. Die Energieerzeugung ist dabei bedarfsorientiert und selbst nicht Teil des oszillierenden Mechanismus [237, 236, 234]. Chemostat-Kultivierungen von *S. cerevisiae* (IFO 0233) zeigen diese Periode in der Konzentration des gelösten Sauerstoffs, der Respirationsrate und der Kohlendioxidemissionsrate [237, 236, 234]. Zellzyklusunabhängige Oszillationen von 40-44 Minuten Periodendauer sind auch im Transkriptom verbreitet und mit Mechanismen der DNA-Replikation koordiniert [199]. Li und Klevecz (2007) haben die genomweiten Oszillationen der mRNA-Level (z.B. CIT3, OPT1, STR3 und GND2) als Attraktor eines stabilen Phänotyps beschrieben [223, 198]. Dabei wurden zyklische mRNA-Level den Schwingungsphasen zyklischer MRC-Aktivität zugeordnet. Der respiratorischen Phase mit dem höchsten O_2-Bedarf folgen reduktive Phasen mit charakteristischen mRNA-Mustern [223]. Kern des Zyklus sind Redox-Reaktionen mit NAD(P)H und Dithiol-Disulfid-Gruppen [235]. Ein Neustart des Zyklus tritt durch Entkopplung der MRC ein [234]. Eine Verlängerung der Periode dieses respiratorischen/reduktiven Zyklus von 42 auf 70 Minuten konnte durch den Einsatz von Antidepressiva (Lithium und Phenelzin) erreicht werden [221]. Nach CO_2-Puls wurden von Richard u. a. (2014) ebenfalls das Einsetzen von Oszillation in Respiration und Kohlendioxidemission mit einer Periode von 70 Minuten beobachtet [347]. Wenn man die Vorstellung zellulärer Regulation als transkriptionellen Redox-Attraktor-Zyklus (TRAC: *Transcriptional Redox Attractor Cycle*) betrachtet, kann aus der CO_2-induzierten Oszillation der Respirationsrate eine Beeinträchtigung der mitochondriellen Funktion mit weitreichenden Folgen abgeleitet werden.
Das mitochondrielle Potential treibt den Export von ATP aus der mitochondriellen Matrix im Austausch gegen ADP an. Eine hohe ATP zu ADP Verhältnis in nicht-wachsenden Zellen inhibiert dabei die Glykolyse. Das cytosolische Verhältnis von ATP zu ADP bestimmt damit, ob der zelluläre Metabolismus hauptsächlich oxidativ oder glykolytisch betrieben wird. Erhöhte glykolytische Funktion unter aeroben Bedingungen und eine Unterdrückung mitochondrieller Funktionen sind typische bioenergetische Charakteristika des Warburg-Phänotyps von Krebszellen [247].
Der respiratorische/reduktive Zyklus ist grundlegend für die zeitliche Abstimmung biochemischer Zyklen, die neben der Energiebereitstellung auch die zellulären Prozess der DNA-Replikation und RNA-Transkiption umfassen [392]. Diesen Prozessen sind die Protein-Synthese, Protein-Abbau und der Zellzyklus unterworfen [200]. Die genomweite Koordination, basierend auf der

mitochondriellen Funktion des TRAC, macht dessen Pertubation zu einem genomweiten Ereignis. Wenn bei aufeinander koordinierten transkriptionellen Attraktoren unterschiedlicher Perioden die Information einer mitochondriellen Pertubation eingebracht wird, ist eine langfristige Auslenkung des Systems zu erwarten. Ob und wie schnell die Zelle in das ursprüngliche Attraktor-System zurückkehren kann, ist abhängig von der Auslenkung.

2.5.4 Der Zellkern

Vereinfacht ausgedrückt besteht eine Signalkaskade aus einem Sensor zur Signalwahrnehmung, einem *relay* zur Verstärkung oder Schwächung und einen Teil des Signaltransduktionsnetzwerks, das über Transkriptionsfaktoren TF bis in den Zellkern reicht [163]. Einige TFs wechseln auch zyklisch (Mig1p, Mig2p, Nrg1p, Nrg2p, Msn2p, Msn4p) zwischen dem Cytosol und dem Zellkern [73]. Andere werden nach der Modifikation durch Protein-Kinasen über selektive Porine in der Kernmembran transportiert. Die posttranslationale Modifikation, Translokation und spezifische Bindung an Co-Regulatoren, den Initiationskomplex der RNA-Polymerase und/oder eine DNA-Sequenz sind in Eukaryoten zentrale Mechanismen der komplexen transkriptionellen Regulation.
Zur Initiation der RNA-Polymerisation muss die DNA für den Initiationskomplex zugänglich sein. Die Acetylierung (HAT: Histon-Acetylasen) und Deacetylierung (HDAC: Histon-Deacetylasen) von Histonen ist eine Möglichkeit um über die Zugänglichkeit der DNA die Transkriptionsaktivität im Abschnitt zu regulieren [401, 384, 270, 321]. Eine Antwort auf Temperaturstress durch die TFs Msn2p und Msn4p erfolgt beispielsweise nur, wenn die Deacetylaseaktivität des Rpd3-Komplexes eine Bindung ermöglicht [363]. Es folgt die Bindung stressresponsiver Elemente (STRE) und die Initiation der Transkription [363].
DNA-Abschnitte mit Stressgenen können zusätzlich in Repressome verpackt sein. Zahlreiche DNA-Bindeproteine (z.B. Rap1p, Abf1p und ORC) und ihre Regulatoren (Sir1-4p) sind an *silencing*-Funktionen beteiligt [393, 70]. Der Co-Repressor-Komplex Tup1p/Cyc8p fördert, gelenkt durch TFs, die Ausbildung dieser Strukturen [457, 146, 373]. Bei Zellstress werden Co-Repressor-Komplexe durch alternative TFs umgelenkt bzw. modifiziert, dass Chromatinstrukturen, beispielsweise durch den SWI/SNF-Komplex, umgestaltet werden um die Initiation der Transkription von Stress-Antwort-Genen zu ermöglichen [433, 427, 373]. Abbildung 2.3 zeigt einen Mechanismus der Signalverarbeitung zweier Umweltsignale, der sowohl an der Substrat- als auch an der Stress-Regulation beteiligt ist. Die Verflechtung der transkriptionellen Regulation von Stress-Antworten und dem nicht-fermentativen Metabolismus wurde von Soontorngun (2016) zusammengefasst [388].
Die Expression von Genen kann von transkriptionellen Aktivatoren (TAF: *Transkription Activation Factor*) abhängig sein. Allgemein wird daher zwischen TAF (z.B. TFIID)-abhängigen (85-90%) und TAF-unabhängigen Genen unterschieden. Typisch für Erstere ist das Fehlen einer TATA-Sequenz und die Assemblierung des prä-Initiationskomplexes (pIK) durch TFIID [427, 373]. Die restlichen 10-15% haben eine TATA-Box und werden bevorzugt durch einen SAGA-abhängigen pIK initiiert [452, 27, 221, 304, 426]. TFIID-abhängige Gene sind überwiegend Gene zellulärer Grundfunktionen, sogenannten *housekeeping genes*. Das typische Muster ihrer Expression durch die TFIID-bestimmte Regulation zeigt geringe Varianz bei

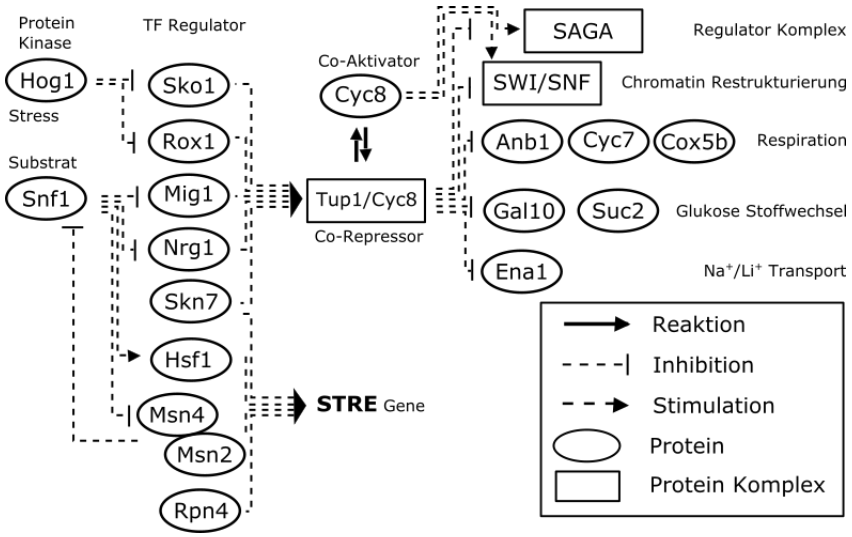


ABBILDUNG 2.3: Schema zeigt die Beziehung ausgewählter Protein-Interaktionen zur Regulation der Signale für Glukose und hohe Osmolarität durch NaCl nach [386, 440, 450, 70, 457, 146, 373, 433, 388]. Umweltsignale aus dem Cytosol werden über MAP- (Hog1) oder Protein-Kinasen (Snf1) an transkriptionelle Repressoren und Aktivatoren im Zellkern gereicht. Die Bindung an Co-Repressoren (Tup1/Cyc8) oder Co-Aktivatoren (Cyc8) entwickelt die Summe der eingehenden Signale im Kontext der bestehenden transkriptionellen Situation. Die spezifischen Protein-Protein-Interaktionen können bei Umweltstress von Repressomen blockierte Stress-Antwort-Gene zur Transkription freigeben und die RNA-Polymerase II durch den Austausch der assoziierten Regulator-Komplexe (SAGA) an entsprechende Zielsequenzen dirigieren. Proteinkomplexe (z.B. SWI/SNF) zur Remodellierung der Chromatinstruktur im Nukleosomen sind beispielsweise für die Expression von SUC2 verantwortlich [396]. Eine Erhöhung der Aktivität in SAGA-assoziierten Polymerasen ermöglicht eine schnelle Reaktion auf Umweltsignale. Schwächt sich das Signal ab, kehrt das System in seinen Ausgangszustand zurück.

stetiger aber limitierter Expression [427].

Das Gleichgewicht zwischen Transkriptionsrate (TR) und Degradationsrate (DR) einer mRNA bestimmt deren Menge (RA) und Stabilität (RS) im Cytoplasma [336, 144]. Bereits die Halbwertszeit der mRNA von Isogenen unterliegt dabei starken Schwankungen [115]. Geisberg u.a. identifizierten 2014 polyU-Motive als stabilisierendes Element, welches mit polyA-Enden *stem-loop*-Strukturen ausbildet und über diese Sekundärstruktur den Abbau der mRNA reguliert [115]. In Hefe beginnt die Degradation der mRNA mit der Deadenylierung durch Ccr4/Pop2/Not- und Pan2/3-Komplexe [144, 316]. Parker u.a. zufolge ist die Inhibition der Deadenylierung Teil der Stressantwort [316]. Deadenylierte RNA ist Ziel von *Exosomen* (3'-zu-5'-Exonuklease) und *Decaysomen* (5'-zu-3'-Exonuklease Xrn1p) [144, 316]. Im Zuge dessen wird auch die *cap* am 5'-Ende durch Dcp2p entfernt [144, 316]. Während im Cytosol diese mRNA-*Decay*-Faktoren (DF) an der Degradation von mRNA beteiligt sind, binden sie nach einem Wechsel in den Zellkern an Chromatin und stimulieren die Transkription [144]. Haimovich u.a. erklärten 2013 Transkription und Degradation als zwei Teile eines robusten *feedback*-Systems zur Stabilisierung zellulärer mRNA-Level [144].

Bei Stress werden *housekeeping genes* durch TF häufig negativ reguliert [148, 219] und die Transkriptionsrate von Stressgenen erhöht [336]. Vorübergehende Veränderungen beim Export

von mRNA aus dem Zellkern und Veränderungen in der Stabilität cytosolischer mRNA können diese Prozesse beschleunigen und zur Feinabstimmung transkriptioneller Stressantworten beitragen [336, 316, 285]. Die SAGA-dominierte Regulation bietet eine größere Flexibilität der Dynamik und wird daher strenger reguliert [427]. Ein Gen kann Teil beider Regulationsmuster sein um in Stress-Situationen eine ausreichende Flexibilität seiner Expression zu gewährleisten [427]. Die Proteinmenge und Lokalisation wird außerdem durch das *splicing* der RNA, ihre Translationseffizienz und die Prozessierung des Proteins durch sekretorische Vesikel reguliert [186].

Durch hochaufgelöste Expressionsanalysen lieferten Granovskaia u.a. 2010 zeitlich korrelierte Transkription von kodierender mRNA (*sense*) und nicht-kodierender (nc)RNA (*antisense*) während des Zellzyklus von *S. cerevisiae* [127]. Unter 523 *antisense* Transkripten wurden 120 zyklisch expremierte ncRNA identifiziert. Im Rahmen diese komplexen Expressionsarchitektur werden kurze ncRNAs (<200 Basen) mit i) *small interfering* RNAs (siRNAs), ii) *micro* RNAs (micRNAs) und PIWI-*interacting* RNAs (piRNAs) sowie lange ncRNAs (>200 Basen) unterschieden [387]. Charakterisiert nach Länge, Stabilität und genomischer Lokalisation wurden sie nach ihrem Auftreten in Mutanten von *S. cerevisiae* gruppiert [387]. Das Transkriptionsprofil von lncRNAs konnte in Hefen einer erweiterten transkriptionellen Antwort auf Stress zugewiesen werden [75, 387]. Eine durch Hog1 ausgelöste transkriptionelle Stressantwort kontrolliert über die Expression einer lncRNA auch die Expression des Zellzyklusregulators CDC28 und ermöglich so nach der Stressantwort eine effiziente Rückkehr in den Zellzyklus [286]. Die Rückstellung des Stresssignals wird demnach bereits bei der Initiation einer Stressadaption mit angelegt [112, 214].

Die Informationen zur Annotation der Genomsequenzen eines Organismus deckt auch in intensiv untersuchten Modellorganismen wie *S. cerevisiae* nicht das komplette Genom ab. Genomweite Transkriptomanalysen für die Rekonstruktion zellulärer Genexpressionsnetzwerke und die Zuordnung von Bindestellen in regulatorischen Regionen der DNA haben in den letzten Jahren maßgeblich zum Verständnis der eukaryotischen Genregulation beigetragen [244, 426, 427, 227]. Mit Cst6p ist ein erster CO_2-abhängiger Transkriptionsfaktor (TF) bekannt, der an cAMP-responsive-Elemente (CRE) bindet (vgl. Abs. 2.4.1) [68, 227]. Bei Hypoxie ist Cst6p als TF inaktiv und im Cytosol lokalisiert [227]. In phosphoryliertem Zustand (an Ser^{399} und Thr^{401}) inhibiert Cst6p die Oleat-induzierten Genloki von POT1, CTA1, FOX2, und POX1 [369]. Cst6p und der im Paralog kodierte Aca1p sind als TFs an der Regulation zur Nutzung alternativer Kohlenstoffquellen beteiligt [369, 111], vermitteln Signale für die Anwesenheit von CO_2 an NCE103 und ROX1 [68, 227]. Überexpression von Cst6p hat Einfluss auf den DNA-Metabolismus [305]. Abbildung 2.1 zeigt, wie niedrige CO_2-Level über den TF Cst6p auf die Stress-Regulation wirken. Das CO_2-Signal ist über Cst6p auch mittelbar mit Funktionen des zentralen Kohlenstoffmetabolismus und der Energiebereitstellung verbunden. Eine Aktivierung des Ras/cAMP/PKA-Signalwegs durch CO_2/HCO_3^- erfolgt möglicherweise durch ein pH-abhängiges Signal (Abs. 2.4.3 Abb. 2.2) [205, 4, 347].

Die PKA-Aktivität ist dabei ein Signalknoten in *S. cerevisiae*, in dem die Wahrnehmung von Glukose, der Energieladung, des Katabolismus, des Zellzyklus-Signals, der Temperaturtoleranz,

der Toleranz bei osmotischem Schock, Sporulation und Alterung kombiniert werden (siehe Abschnitt 2.4.3) [100, 296, 371, 22]. Abbildung 2.4 zeigt ausgewählte Elemente der Regulation bei Hitzeschock (HSE: *Heat Shock Element*), oxidativem Stress und pH-Stress. Die TFs zur Aktivierung bzw. Repression der Regulons HSE und STRE in Abhängigkeit zu den Protein-Kinasen PKA und Snf1p werden dabei modifiziert und translozierd [276]. Zentrales Element der Regulation ist die Phosphorylierung von Yak1p durch

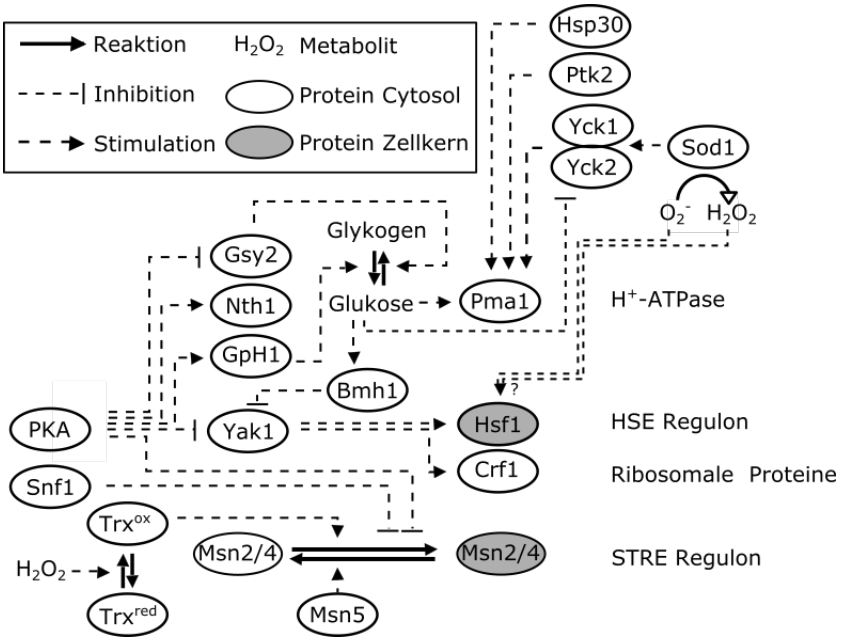


ABBILDUNG 2.4: *Relay* zur Integration von PKA- und Snf1-Signal in die Stress-Antwort. Protein-Kinase A und Snf1 sind durch ihre Phosphorylierungssignal an der Regulation des Zellwachstums bei wechselndem Nährstoffangebot und Stressaufkommen beteiligt. An diesem Signalknoten wird die Wahrnehmung von Glukose, der Energieladung, des Katabolismus, des Zellzyklus-Signals, der Temperaturtoleranz, der Toleranz bei osmotischem Schock, Sporulation und Alterung kombiniert [100, 296, 371, 22]. Proteine sind nach Standardnomenklatur benannt oder wie folgt benannt. Kürzel: Trx^{ox}: oxidiertes cytoplasmatisches Thioredoxin Protein, Trx^{red}: reduziertes cytoplasmatisches Thioredoxin-Protein. Ausgewählte Wechselwirkungen für eine Stress-Antwort des HSE- und STRE-Regulons bei Temperaturschock und oxidativem Stress [220, 217, 276, 401, 388] mit Auswirkung auf den Speicherstoff-Metabolismus [170, 375] und die Regulation der H^+-ATPase Pma1p [99, 327, 96, 216, 255, 345].

aktive PKA bei Glukose-Mangel [217]. Die Bindung von Bmh1p an Yak1p führt zu dessen Inaktivierung durch einen Verbleib des Yak1-Bmh1-Komplexes im Cytosol [217]. Im Zellkern aktiviert Yak1p das HSE-Regulon über Hsf1p [143, 276].

Untersuchungen an anderen Organismen liefern Hinweise, dass freie Adenylatcyclase in Cyanobakterien, tierischen Zellen und *C. albicans* als direkter Sensor für CO_2/HCO_3^- fungiert [54, 197]. Für die Hefen *Cryptococcus neoformans* und *S. cerevisiae* lässt sich das derzeit nicht eindeutig ableiten [268, 182]. Zudem unterschiedet sich die Regulation bei Stressreaktionen und Sauerstoffmangel von *C. albicans* und *S. cerevisiae* [380, 74]. In der pathogenen Hefe beispielsweise sind die Ontologen der TF Msn2p und Msn4p nicht wie in *S. cerevisiae* an der

Stress-Antwort beteiligt [292]. Die Wahrnehmung von CO_2 durch eine lösliche ACyc in *C. albicans* oder *S. cerevisiae* ist nicht lückenlos geklärt. Hess u. a. zufolge besitzt auch *S. cerevisiae* diesen zweiten mitochondriellen Signalweg zur Wahrnehmung von CO_2 [155].
Die zelluläre Regulation bei CO_2-Belastung ist vergleichsweise selten zentrales Thema von Studien an *S. cerevisiae* [180, 9, 347]. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass CO_2 für den Energiemetabolismus ein entscheidendes Signal ist [155]. Die genomweiten Transkriptmuster bei anhaltenden stationären CO_2-Leveln wurden bereits 2005 von Aguilera u. a. untersucht [9]. Untersuchungen zur genomweiten initialen Reaktion des Transkriptoms von *S. cerevisiae* auf steigende CO_2-Gehalte sind nicht bekannt. Der chemische Charakter von CO_2 (vgl. Abs. 2.2), bisherige physiologische Beobachtungen (vgl. Abs. 2.3) und genetisch konservierte Signalwege in eukaryotischen Zellen (vgl. Abs. 2.4) zeigen CO_2 als zelluläres Signalmolekül.

Kapitel 3

Material and Methoden

3.1 Genotyp

Alle Experimente in dieser Arbeit wurden mit dem prototrophen, haploiden Stamm *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D[1] durchgeführt. Der Laborstamm ist aufgrund einer Mutation im Gen der HO-Rekombinase heterothallisch, was einen Wechsel zwischen MATa und MATα verhindert. Eine diploide Phase und der Eintritt in die Sporulation treten bei haploiden Stämmen nur nach der Paarung beider MAT-Typen auf. CEN.PK113-7D sporuliert daher nicht und ist genetisch stabil.

TABELLE 3.1: Beschreibung des Genotyps von Hefestamm *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D [55].

Gen	Beschreibung
MATa	Paarungstyp Lokus a
URA3	kodiert Ortidine-5' phosphatdecarboxylase, beteiligt an der de-novo-Biosynthese von Pyrimidinnukleobasen
HIS3	kodiert Imidazoleglycerol-phosphatdehydratase, beteiligt an der Histidinbiosynthese
LEU2	kodiert beta-Isopropylmalatedehydrogenase, beteiligt an der Leucinbiosynthese und am Glyoxylate Zyklus
TRP1	kodiert Phophoribosylanthranilateisomerase, beteiligt an der Tryptophanbiosynthese
MAL2-8c	kodiert einen Multigen-Komplex für die Fermentation von Maltose
SUC2	kodiert eine Invertase zur Hydrolyse von Saccharose

3.2 Medien

Alle beschriebenen Experimente in dieser Arbeit wurden in Mineralmedium definierter Zusammensetzung durchgeführt. Davon ausgenommen sind die initialen Vorkulturen auf Festmedium.

[1] Institute of Centraalbureau voor Schimmelcultures Fungal Biodiversity Centre of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences

3.2.1 *Yeast-Peptone-Glucose*-Agar

Alle Bestandteile in Tabelle 3.2 (Glukose ausgenommen) wurden in entsalztem Wasser (ddH_2O) gelöst und zusammen autoklaviert (121°C, 20 min). Glukose wurde in ddH_2O gelöst und zur Vermeidung der Maillard-Reaktion separat autoklaviert. Die Lösungen wurden aseptisch gemischt und in Petrischalen abgefüllt.

TABELLE 3.2: Festmedium YPG (*Yeast-Peptone-Glucose*)-Agar

Komponente	**Konzentration [g l^{-1}]**
Glucose	40,0
Peptone	5,0
Yeast Extrakt	5,0
Agar	15,0

3.2.2 Synthetisches Mineralmedium

Ein synthetisches Mineralmedium wurde zur Kultivierung verwendet. Die Zusammensetzung basiert auf der Elementaranalyse von Hefe nach Rieger (1983) und einer Biomasse-Substrat-Ausbeute von Y_{XS}=0,5 g_{DW} g_{Glk}^{-1}. Für die Biomassekonzentration c_X=4 g_{DW} l^{-1} ergibt sich daraus die angegebene Zusammensetzung des Mineralsalzmediums (Tab. 3.3).

TABELLE 3.3: Mineralsalze für die Biomassekonzentration c_X=4 g_{DW} l^{-1} [428].

Komponente	**Konzentration [g l^{-1}]**
$(NH_4)_2SO_4$	15
KH_2PO_4	9

Dieses Basismedium wurde mit entsprechenden Mengen an Spurenelementen (Tab. 3.4), Vitaminen (Tab. 3.5) und Glukose als primäre Kohlenstoff- und Energiequelle in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen supplementiert (Tab. 3.7).
Die Medienkomponenten wurden in ddH_2O gelöst und der pH-Wert auf 5,0 eingestellt. Das Medium wurde entweder sterilfiltriert (Satorius 200 nm Porengröße) oder autoklaviert. Bei Letzterem wurde zur Vermeidung der Maillard-Reaktion separat autoklaviert und aseptisch zugegeben.

3.3 Reaktoraufbau

Sowohl Batch als auch kontinuierliche Kultivierungen wurden in einem 3,7 Liter Stahlreaktor (KLF 2000, Bioengineering AG, Wald, Switzerland) bei einem Arbeitsvolumen von 1,5 Liter durchgeführt. Zur gravimetrischen Regulaton des Arbeitsvolumens im kontinuierlichen Betrieb war der Reaktor auf einer Waage (2151WC, Hardy Instruments, Heidelberg, Deutschland) gelagert. Das Medium wurde von einem sterilen Vorlagegefäß über eine peristaltische Pumpe

TABELLE 3.4: Zusammensetzung der Spurenelemente (SE) [428].

Komponente	**Konzentration [g l^{-1}]**
Na_2EDTA	15
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	4,5
$MnCl_2 \cdot 2H_2O$	1
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,3
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,3
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,4
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,5
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	3
H_3BO_3	1
KI	0,1

TABELLE 3.5: Zusammensetzung der Vitamin-Lösung [428].

Komponente		**Konzentration [g l^{-1}]**
Biotin		0,05
Thiamin·HCl	Vit. B_1	1
Nikotinsäure	Vit. B_3	1
D-Pantothensäure hemicalcium salt	Vit. B_5	1
Pyridoxol·HCl	Vit. B_6	1
p-Aminobenzoesäure		0,2
myo-Inositol		25

(120U, Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen, Deutschland) zugeführt. Der pH wurde bei 5,0$\pm$0,1 durch die automatische Zugabe von 2 M KOH reguliert. Die Signale von Reaktorsonden zur pH-Messung (408-DPAS-SC-K8S/200, Mettler Toledo, Urdorf, Schweiz), zur Messung der Sauerstoffsättigung (INGOLD, Mettler Toledo, Urdorf, Schweiz) und des Innendrucks (Keller GmbH, Wendlingen, Deutschland) waren direkt mit dem Prozessleitsystem (LabVIEW 8.2, National Instruments, Austin, Texas, USA) verbunden. Definierte Mengen Zellsuspension wurden über ein Probenahmeventil (Swagelok, Reutlingen, Deutschland) mit Magnetverschluss und Öffnungszeiteingabe entnommen [377]. Die Begasungsrate für Druckluft oder einem Gasgemisch mit höherem CO_2-Anteil wurde über einen bzw. mehrere Massenflussregler (GFC171S, Analyt-MTC GmbH, Müllheim, Deutschland) auf 45 l h^{-1} (0,5 vvm) begrenzt und der gefilterte Strom (Midisart 2000, Sartorius AG, Goettingen, Deutschland) über eine Begasungsfritte (Bioengineering AG, Wald, Schweiz) dispergiert. Die Zusammensetzung des Reaktorgases wurde im laufenden Prozess aufgezeichnet (BlueSens RS232, BlueSens GmbH, Herten, Deutschland). Kleinere Mengen Antischaumreagenz (Styrol) wurden zur Verhinderung von Schaumbildung in regelmäßigen Intervallen zugegeben.

TABELLE 3.6: Medienzusammensetzung für verschiedene Kultivierungsbedingungen.

Komponente	**Vorkultur** [g_{DW} l^{-1}]	***batch*-Modus** [g_{DW} l^{-1}]	**Kontinuierlicher Modus** [g_{DW} l^{-1}]
D(+)-Glukose	10	40	22,5
Mineralsalze für c_X	2,5	11,5	11,5
$MgSO_4$	0,15	0,75	1,55
SE-Lösung	0,25	1,5	3
Vitamin-Lösung	0,25	1,5	3
pH-Stabilisator	Pufferung	Regelung	Regelung
Base	HPO_4^{2-}	KOH	KOH
Kapazität β[mM]	2,1	k.A.	k.A.

TABELLE 3.7: Kultivierungsparameter

Parameter		**Einheit**	***batch*-Modus**	**Kontinuierlicher Modus**
Verdünnungsrate	D	[h^{-1}]	0	0,05-0,30
Temperatur	T	[°C]	30	30
Biomassekonzentration	c_X	[g_{DW} l^{-1}]	0,1-12	11,5
Arbeitsvolumen	V_{LR}	[l]	1,5	1,5
pH		[-]	5,0	5,0
Rührerumdrehung	N	[rpm]	800	800
Reaktordruck	p_{abs}	[bar]	1,5	1,5
Begasungsrate	$\dot{V}_g^{in}$	[l h^{-1}]	45	45

3.4 Kryo-Kultur

Der Organismus wurde in trockener Form kommerziell erworben und aseptisch in YPG Flüssigmedium (Tab. 3.2.1) angezogen. Klone wurden auf YPG-Agar-Platten vereinzelt (30°C, 48 h) und zur Inokulation von Schüttelkolben mit Mineralsalzmedium (Tab. 3.6) verwendet. Vor Ende der ersten exponentiellen Phase wurden die Zellen geerntet und in Mineralsalzmedium mit 30% Glycerol als Kryoschutz eingefroren (OD_{600}=30, -70°C).

3.5 *batch*-Modus

Der Reaktor wurde mit einer aerob wachsenden Vorkultur in ihrer ersten exponentiellen Phase inokuliert (Tab. 3.6; 10% V_{LR}; μ^{max}=0,4 h^{-1}). Der *batch*-Modus in dieser ersten exponentielle Phase mit Glukose als primärer Kohlenstoffquelle ist geprägt vom Crabtree-Effekt (μ^{max}=0,4 h^{-1}). Der gebildete Ethanol ist die Kohlenstoffquelle der zweiten exponentiellen Phase (μ^{max}=0,05 h^{-1}). Die zweite Phase erzeugt ausreichend Biomasse (c_X>11,5 g_{DW} l^{-1}) um nach einer 5 h Starvation mit den Reaktorbedingungen (Tab. 3.7) in den kontinuierlichen Modus zu wechseln (Y_{XS}=0,3 g_{DW} g_{Glk}^{-1}).

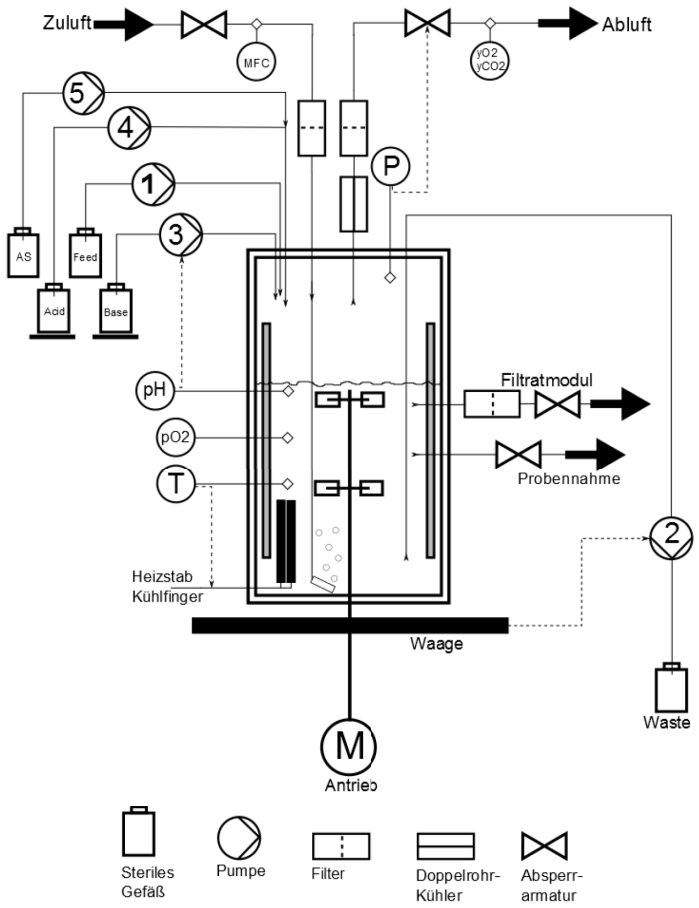


ABBILDUNG 3.1: Verfahrensschema (EN ISO 10628:2000) des Reaktoraufbaus KLF 2000 der Firma Bioengineering AG. Die Peripheriegeräte für Zulauf (*Feed*), Ablauf (*Waste*), Lauge (*Base*), Säure (*Acid*) und Antischaum (AS) sind über die peristaltischen Pumpen (1-5) an den Reaktor angeschlossen. Der Drucksensor (P) erfasst den Reaktordruck als Stellgröße zur Regelung der Öffnungsweite des Abluft-Ventils, während der Zuluftstrom über einen Massenflussregler (MFC) vorgegeben ist. Sensoren im Kulturmedium liefern *online* Signale der sensitiven Kultivierungsparameter pH-Wert (pH), Sauerstoffsättigung (p_{O2}) und Temperatur (T) an das Prozessleitsystem. Ihre Regelung stellt dem Organismus definierte Umgebungsbedingungen zur Verfügung. Im kontinuierlichen Betrieb wird der Medienzulauf (1) vorgegeben, das Arbeitsvolumen gravimetrisch erfasst (Waage) und über die Erntepumpe (2) geregelt (Abb. nach Simon Ringger 2014)

3.6 Kontinuierlicher Modus

Durch die Inbetriebnahme der Zulauf- und Erntepumpe wurde die Kultur aus der *starvation*-Phase des *batch*-Modus in den kontinuierlichen Modus überführt. Bei konstantem Reaktionsvolumen V_{LR} bestimmt der Zulaufstrom (*Feed*) die Durchflussrate D (Gl. 3.1). Bekanntlich entspricht diese der biomassespezifischen Wachstumsrate μ, wenn keine Änderung der Konzentration im Reaktionsvolumen erfolgt. Sie wurde gravimetrisch Δm_{BS} (PG 8001-S, Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland) und hydrometrisch ρ_{BS} (HH91.1, Roth, Deutschland) anhand des

Ablaufstroms über den Zeitraum Δt bestimmt.

$$D = \frac{\Delta m_{BS}}{\Delta t \cdot \rho_{BS} \cdot V_{LR}} \quad (3.1)$$

Nach fünf und sechs störungsfreien Verweilzeiten wurden Proben zur Definition des *steady state* vor dem CO_2-Puls entnommen. Dieser Referenzzustand wurde durch den Wechsel von Druckluft zu einem Gasgemisch (50% CO_2, 21% O_2, 29% N_2) mit erhöhtem CO_2 zum Zeitpunkt Null (t_0=0 h) ausgelenkt (Abs. B.1).
In den folgenden drei Stunden wurden physiologische Effekte als unmittelbare Folge der gestiegenen CO_2-Belastung betrachtet und als Kurzzeitantwort beschrieben. Die Kultivierung wurde unter den gegebenen Bedingungen bis zu zehn Verweilzeiten nach dem CO_2-Aufschlag ausgedehnt.

3.7 Biomasse-Konzentration c_X und Zellzahl n_c

Die Konzentration der Biomasse wurde entweder spektrometrisch oder durch gravimetrische Bestimmung der Zelltrockenmasse ermittelt. Generell gilt die Korrelation zwischen spektrometrischer und gravimetrischer Bestimmung nur unter Bedingungen, für die eine Korrelation zwischen OD_{600} und der Konzentration der Trockenmasse erstellt wurde. Die weniger aussagekräftige spektrometrische Bestimmungen wurden daher zur Beobachtung von Vorkulturen verwendet, während die gravimetrische Bestimmung im kontinuierlichen Modus verwendet wurde.

3.7.1 Spektrometrische Bestimmung

Biomassesuspension wurde mit Saline verdünnt (0.9%$_{ww}$ NaCl in ddH_2O). Die Absorption der Probe bei 600 nm wurde in Polystyrene-Küvetten (Roth, Deutschland) spektrometrisch gegen Saline bestimmt (Dr. Lange, Deutschland). Die Konzentration der Biomasse (c_X) wurde nach Gleichung 3.2 berechnet.

$$c_X = \frac{\Delta OD_{600} - 0{,}02}{2{,}703} \cdot f \quad (3.2)$$

3.7.2 Gravimetrische Bestimmung

Gravimetrische Bestimmung der Trockenmasse wurde nach Zentrifugation (4°C, 4000 rpm, 5 min) (Avanti J-10, Beckman Coulter, Deutschland) von 5 ml Zellsuspension in einem sauber und trocken tarierten 15 ml Zentrifugenröhrchen durchgeführt. Die Pellets wurden drei mal mit ddH_2O gewaschen. Die Pellets wurden vor der Auswaage 48 h bis zur Massenkonstanz bei 120°C getrocknet. Die Konzentration der Biomasse (c_x) wurde nach Gleichung 3.3 berechnet.

$$c_X = \frac{m_X}{V_{BS}} \quad (3.3)$$

3.7.3 Zellzahl-Bestimmung

100 µl verdünnte Suspension wurden 20 s gevortext (M10, VWR international GmbH, Bruchsal, Deutschland). 8,5 µl Probe wurden in jede Kammer eines Thoma Haematocytometer (Hecht, Assistent, Multimed, Kirchheim u. Teck, Deutschland) verteilt und 400 fach unter dem Mikroskop vergrößert (Olympus BH-2-RFCA, Hamburg, Deutschland). 300 Zellen pro Probe wurden zur Bestimmung der Zellkonzentration c_c ausgezählt. Die Zellzahl pro Biotrockenmasse (n_c) ergibt sich nach Gleichung 3.4.

$$n_c = \frac{c_c}{c_X} \tag{3.4}$$

3.8 Filtration extrazellulärer Metaboliten

Ein zentraler Aspekt der Prozessvalidierung ist die Wiederfindung des eingesetzten Kohlenstoffs durch Massenbilanzierung. Die Datengrundlage zur Berechnung von Produkt-bildungs- und Substratverbrauchsraten basiert auf der Konzentrationsbestimmung von kohlenstoffhaltigen Komponenten im Medium und im Arbeitsvolumen (siehe Abs. 3.10).
Ein Keramikfilter (0,2 µm Porengröße) diente der Rückhaltung von Zellen im Reaktor, während zellulärer Überstand mit löslichen kohlenstoffhaltigen Komponenten über eine peristaltische Pumpe abgezogen wurde. Die Überstände wurden bei -20°C gelagert.
Vor der Injektion zellulärer Überstände in *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) -Anlagen wurde Phosphat als Ammoniummagnesiumphosphat zum Schutz der Trennsäule gefällt (Gl. 3.5).

$$\begin{aligned} 3 \cdot NH_3 + 2 \cdot MgSO_4 + K_2HPO_4 + KH_2PO_4 \rightarrow \\ 2 \cdot MgNH_4PO_4 + K_2SO_4 + KNH_4SO_4 \end{aligned} \tag{3.5}$$

3.9 Separation intrazellulärer Metaboliten

Die Separation und Quantifizierung intrazellulärer Metaboliten war Thema diverser Publikationen [138, 123, 291, 402, 446, 42]. Die Geschwindigkeit der biochemischen Kinetik bestimmt den notwendigen Automatisierungsgrad der Materialentnahme aus dem Bioreaktor [374]. Das thermische Abstoppen des Metabolismus erfolgt durch Hitze (permanente Inaktivierung) oder durch Kälte (temporäre Inaktivierung) [42]. Eine Trennung der Suspension in Zellen und Überstand durch Zentrifugation oder Filtration ist notwendig, wenn i) Metaboliten intra- und extrazellulär vorliegen oder ii) die analytischen Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen es erfordern [42, 45]. Die Extraktionsmethode löslicher Metaboliten vom festen Zellmaterial sollte quantitativ erfolgen und sich den Bedürfnissen der Chromatografie und der Methode zur Detektion des Analyten anpassen. Für diverse Methoden und Protokolle wird auf *Yeast Systems Biology: Methods and Protocols* von 2011 verwiesen [47].

3.9.1 Probenahme mit kaltem Quenching

Zur Bestimmung der intrazellulären Nukleotidphosphat- und Aminosäure-Gehalte wurde der Hefemetabolismus bei der Probenahme durch Kühlung temporär abgestoppt. 4 ml Zellsuspension (V_{BS}) wurden in 6 ml 60%$_{(vv)}$ Methanol/Wasser (IS1: 3 mM γAminobuttersäure (GABA), V_{Qs}) bei -40°C gequencht und die Zellen durch sofortige Zentrifugation (5 min, 7000 rcf, -20°C) separiert um eine Pertubation der Zellmembran einzugrenzen. Ein 2 ml Aliquot des Überstands (Qs) wurde bei -70°C bis zur Messung gelagert und der Rest verworfen. Der Aufschluss des bei -70°C gelagerten Pellets erfolgte innerhalb zweier Tage.
Während des zeitnahen Aufschlusses wurde das gefrorene Pellet bei -20°C in 1 ml 4°C kalter 50%$_{(vv)}$ Methanol/Wasser-Lösung (IS2: 300 µM Norvalin, V_{Cs}) resuspendiert und mit 1 ml Chloroform versetzt. Die Extraktion der intrazellulären Metaboliten erfolgte durch 2 h Überkopfschütteln bei -20°C. Das hydrophobe Chloroform dringt dabei in die Zellmembran und hydrophile Metabolite gehen in die Methanol/Wasser-Phase über. Die hydrophobe Phase wurde durch Zentrifugation abgetrennt (5 min, 7000 rcf, -20°C). Der hydrophile Eluent (V_{Cs}) wurde von der hydrophoben Phase mit angereicherten Zellrückständen abgenommen und bei -70°C gelagert.
Der Methanolanteil in den Extrakten (V_{Cs}: 50%$_{(vv)}$) und Überständen (V_{Qs}: 60%$_{(vv)}$) wurde in einer Vakuumzentrifuge (RVC 2-33 IR, Christ GmbH, Osterode, Germany) evaporiert (1500 rcf, 40 mbar). Bei der anschließenden Verdünnung in den Kalibrationsbereich der HPLC-Methode wurde als Injektionsstandard Kaffeesäure (20 µM) oder 2-Amino-2-methylpropionsäure (d.h. AIBA: *2-Aminoisobutyric acid*) (100 µM) zugesetzt. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe von RP-HPLC-DAD und -FLD (Abs. 3.10.3).
Bei der Quantifizierung einer intrazellulären Metabolitkonzentration anhand der detektierten Konzentration wurden die bei unterschiedlichen Aufarbeitungsschritten zugesetzten Internstandards (IS1: GABA, IS2: Norvalin) und der Injektionsstandard (IS3: Kaffeesäure bzw. AIBA) berücksichtigt. Die gravimetrische Kontrolle der Volumina (V_{BS}, V_{Qs}, V_{Cs}) jeder Probe vor und nach der Evaporation erlaubt eine ausgesprochen reproduzierbare Quantifizierung des zellulären Metaboliten.
Die Konzentration eines Metaboliten (ATP [µmol g_{DW}^{-1}]) ist abhängig von seiner detektierten Konzentration (c^*_{ATP}), der gequenchten Biomasse (m_X) und dem Volumen, in dem die Stoffmenge des Metaboliten aus dieser Biomasse gelöst wurde (V_{Cs}).

$$w_{ATP} = \frac{c^*_{ATP} \cdot V_{Cs}}{m_X} \tag{3.6}$$

Wurde der Probe zuvor Methanol entzogen, korrigiert sich das Volumen der Probe mit dem gravimetrisch bestimmten Faktor f_e. Dabei wurde die Dichte der methanolischen Lösung CS (ρ_{Cs}) und die Dichte der wässrigen Lösung eCs (ρ_{eCs}) berücksichtigt.

$$V_{Cs} = V^*_{Cs} \cdot f_e \tag{3.7}$$

$$f_e = \frac{m_{Cs} \cdot \rho_{eCs}}{m_{eCs} \cdot \rho_{Cs}} \tag{3.8}$$

Um im Extrakt eine hohe Konzentration an Metaboliten zu erzielen ist das intrazelluläre Volumen (V_{Cyt}) von m_X für die Quantifizierung bedeutend. Außerdem sind Rückstände (V^P_{Qs}) von Qs in Cs nicht auszuschließen. Die eingesetzte Menge an Cs (V^0_{Cs}) ist bekannt.

$$V^*_{Cs} = V^0_{Cs} + V^P_{Qs} + V_c \tag{3.9}$$

Die Summe aus V_c und V^P_{Qs} wurde über die Internstandards (IS1 und IS2) bestimmt (Gl. 3.10-3.13). Die Stoffmenge n_{Nva} in 1 ml frischer Extraktions-Lösung (c^0_{Nva}) verhält sich dabei äquivalent zur Verdünnung eines intrazellulären Metaboliten und führt zur analytisch bestimmten Konzentration an Norvalin (c^*_{Nva}). Dem Internstandard zufolge beträgt ΔV_{Cs} 10-20% der ursprünglichen Extraktions-Lösung. V^0_{Cs}, was optisch prüfbar und nicht vernachlässigbar ist.

$$V^*_{Cs} = \Delta V_{Cs} + V^0_{Cs} \tag{3.10}$$

$$V^*_{Cs} \cdot (c^*_{Nva} \cdot f_e) = V^0_{Cs} \cdot c^0_{Nva} \tag{3.11}$$

$$(\Delta V_{Cs} + V^0_{Cs}) \cdot (c^*_{Nva} \cdot f_e) = V^0_{Cs} \cdot c^0_{Nva} \tag{3.12}$$

$$\Delta V_{Cs} = V^0_{Cs} \left(\frac{c^0_{Nva}}{c^*_{Nva} \cdot f_e} - 1 \right) \tag{3.13}$$

3.9.2 Bestimmung zellulärer Verluste

Währen des Quenchens der Zellsuspension kommmt es zu Schäden an der Zellmembran und damit zum Verlust von Metaboliten (n_L). Mit der Bestimmung der Metaboliten in der Quenching-Lösung (n_{Qs}) und im Filtrat (n_F) wurden die Verluste anteilig quantifiziert (Gl. 3.14). Die Quenching-Lösung (Qs) wurde dazu äquivalent zur Extraktions-Lösung (Cs) evaporiert und f_e bestimmt (Gl. 3.8).

$$x_L = \frac{n_L}{n^0_c} \tag{3.14}$$

$$n_F = c_F \cdot V_F = c_F \cdot (V_{BS} - V_c) \tag{3.15}$$

$$n_L = c_{Qs} \cdot V_{Qs} - n_F \tag{3.16}$$

$$n^0_c = n_c + n_L \tag{3.17}$$

3.9.3 Enzymatische Analyse

Für eine spezifische Quantifizierung des zellulären Gehalts von Glycogen und Trehalose wurden die Saccharide zunächst enzymatisch in Glukose gespalten und mit HPLC-RID quantifiziert (Abs. 3.10.3). Dafür wurden ca. 10^8 Zellen mit 500 µl 0,25 M Na_2CO_3-Lösung versetzt und zwei Stunden auf 100°C erhitzt. 250 µl dieser Suspension aus perforierten Zellen wurde mit 150 µl 1 M Acetat-Lösung auf pH 5,2 gebracht und mit 0,2 M Natriumacetat-Lösung auf 600 µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

300 µl des Aufschlusses (V_E) wurden mit 2 µl Trehalase (0,05 U/mL; Sigma-Aldrich R1.368) bei 37°C für 12 h inkubiert. Die zweite Hälfte des Aufschlusses wurde mit 5 µl Amyloglukosidase (0,01 U/mL; R1.366; *Aspergilus niger*) bei 57°C für ebenfalls 12 h inkubiert. Die als Glycogen und Trehalose in der Zelle vorliegenden Glukose-Equivalente c_{Glk} [µmol g^{-1}_{DW}] wurden nach

Gleichung 3.18 bestimmt.
Die Temperaturen sind dabei entscheidend für die Substratspezifität der Enzyme. Bei der Trehalosespaltung bleibt das Polysaccharid Glycogen in den Zellen zurück, während das Disaccharid Trehalose die Zelle in beiden Ansätzen verlässt.
Die Trehlose- bzw. Trehalose- und Glycogen-freien perforierten Zellen werden abgetrennt (14.000 rpm; 5 min) und die Glukose-haltigen Überstände bei -20°C gelagert. Die Quantifizierung erfolgte bei einem LOQ=0,05 mM und erfordert keine weitere Aufarbeitung.

$$c_{Glk} = c^{*}_{Glk} \cdot V_E \cdot \frac{n_c}{25 \cdot 10^6} \tag{3.18}$$

3.10 Analytische Quantifizierung von Metaboliten

Proben für die Bestimmung extra- und intrazellulärer Metaboliten wurden dem Bioreaktor in regelmäßigen Zeitintervallen entnommen, aufgearbeitet (Abs. 3.9) und wie nachfolgend beschrieben analysiert. Dazu berücksichtigen die Protokolle zur Extraktion der Metaboliten die Nachweis- (LOD: *limit of detection*) bzw. Quantifizierungsgrenzen (LOQ: *limit of quantification*) der zu quantifizierenden Analyten. Die Extraktion aus Zellmaterial liefert i.d.R. Konzentrationen über dem LOQ des Analyten. Die Quantifizierung in Zellextrakten erfolgt über Kalibrationslösungen durch externe oder interne Kalibration.

3.10.1 Elementaranalyse

Die Elementaranalyse zur Bestimmung des Gehalts an des anorganischen Kohlenstoffs (TIC), des organischem Kohlenstoff (TOC) und des Stickstoffs (TN) in Lösungen, Biomassesuspension und Biomasse wurde wie folgt durchgeführt (Multi N/C 2100s, Analytik Jena, Jena, Deutschland).

Anorganischer Kohlenstoff (TIC_{GC})

Der Anteil gelösten anorganischen Kohlenstoffs (CO_2, H_2CO_3, HCO_3^-, and CO_3^{2-}) in der Biomassesuspension wurde mittels Elementaranalyse quantifiziert. Das Gerät wurde mit Na_2CO_3 Lösung im Konzentrationsbereich von 0-500 mg l^{-1} kalibriert [40]. 1 ml Kulturvolumen (Suspension aus Zellen und Überstand) wurde direkt in einen 10 ml Messkolben, der 100 µl 5 M KOH in ddH_2O enthielt, geleitet. Der basische pH-Wert verschiebt das Gleichgewicht von flüchtigem CO_2 zum stabileren HCO^- und CO^{2-}. Ein Ausgasen des anorganischen Kohlenstoffs nach Entspannung der Suspension außerhalb des Reaktors wird damit verhindert.
Der TIC_{GC} in der Suspension setzt sich aus extra- und intrazellulärem TIC zusammen (Gl. 3.19). Ein unterschiedlicher pH-Wert von zellulärem Milieu (V_c) und Medium (V_L) führt zu unterschiedlichem TIC beider Phasen.

$$\begin{aligned} TIC_{GC} = & \left([CO_{2,L}] + [H_2CO_{3,L}] + [HCO^-_{3,L}] + [CO^{2-}_{3,L}]\right) \frac{V_L}{V_{LR}} \\ & + \left([CO_{2,c}] + [H_2CO_{3,c}] + [HCO^-_{3,c}] + [CO^{2-}_{3,c}]\right) \frac{V_c}{V_{LR}} \end{aligned} \tag{3.19}$$

Bestimmung von Kohlenstoff (TC) und Stickstoff (TN_b)

Der Gehalt von Stickstoff (TN_b) und Kohlenstoff (TC) in Lösungen und der Biomassesuspension wurde nach vollständiger Oxidation des Probenmaterials im Gasstrom quantifiziert. Das Gerät wurde mit Phenylalanin-Lösung (C/N_{Phe}=9,09) im Konzentrationsbereich von 0-1 g l^{-1} (10 Stufen) kalibriert.
Fermenterfiltrat und Zellsuspension wurden mit ddH_2O passend zum Kalibrationsbereich verdünnt und gemessen. Der zelluläre Kohlenstoff und Stickstoffgehalt wurde mit gewaschenen und resuspendierten Zellen bestimmt. Zellen aus 2 ml Suspension wurden durch Zentrifugation separiert (14 000 rpm, 4°C, 5 min), das Pellet zwei mal mit 1 ml ddH_2O gewaschen und in ddH_2O resuspendiert. In den Proben ergibt sich der organische Kohlenstoff (TOC) nach Gleichung 3.20. Für weitere Messungen wurden Zellpellets bei -20°C gelagert.

$$TOC = TC - TIC_{GC} \tag{3.20}$$

3.10.2 Energieladung EC

Die Energieladung (EC: *energy charge*) einer Zelle wurde aus dem Phosphorylierungsgrad des Adenosinphosphat-Gehalts nach Gleichung 3.21 berechnet. Der Gehalt an Adenosintriphosphat [ATP], Adenosindiphosphat [ADP] und Adenosinmonophosphat [AMP] wurde wie in Abschnitt 3.10.3 beschrieben bestimmt. Prinzipiell kann ein EC innerhalb jeder Nukleosidphosphat-Verteilung oder aus der Summe aller Nukleosidphosphate bestimmt werden.

$$EC_A = \frac{[ATP] + 0{,}5 \cdot [ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]} \tag{3.21}$$

Die Verteilungen der zellulären Nukleotidphosphat- und Reduktionsäquivalent-Gehalte wurden als *Box-Whisker-Plot* dargestellt. Die *Box* um den Median enthält dabei die Hälfte der Messwerte, was über ihre Länge den Interquartilsabstand (IQA) definiert und Schieflagen innerhalb der Messwertverteilung anzeigt. Ein *Whisker* endet mit dem Messwert der noch innerhalb des eineinhalbfachen IQAs liegt. Da jede Stichprobe lediglich sechs Messwerten, enthält wurde auf einen Nachweis der Normalverteilung verzichtet.

3.10.3 *High Performance Liquid Chromatography*

Die Konzentrationen der Substrate und Produkte in Tabelle 4.1 wurden mit einer Umkehrphasen *High Performance Liquid Chromatography* (d.h. RP-HPLC: *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography*) (Agilent G1329A ALS), ausgestattet mit einer Rezex ROA *organic acid column* H^+ (300 x 7,8 mm, 8 µm) Trennsäule geschützt durch eine Rezex ROA *organic acid column* H^+ (50 x 7,8 mm) Vorsäule, bestimmt. Die isokratische Methode arbeitet mit 10 µl Injektionsvolumen, nutzt 5 mM H_2SO_4 als Eluent und arbeitet bei einer Säulentemperatur von 50°C bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml min^{-1}. Die Konzentration wurde durch Änderung des Brechungsindex RID bei 360nm (Agilent G1315B RID) durch externe Kalibrierung (8 Stufen) im gegebenen Konzentrationsbereich (Tab. 4.1) bestimmt.

TABELLE 3.8: Gegenüberstellung von Analyt mit der Retentionszeit bei Umkehrphasen Chromatographie im verwendeten linearen Kalibrationsbereich. Ab 50 µM wurde auf die Bestimmung von Nachweis- (LOD) und Quantifizierungsgrenzen (LOQ) verzichtet.

Analyt	**Retentionszeit [min]**	**Kalibrationsbereich [mM]**
Trehalose	12,6±0,2	0,05-01,00
Glukose	15,0±0,2	0,05-01,00
myo-Inositol	15,6±0,2	0,05-10,00
Malat	16,0±0,2	0,05-10,00
Succinat	19,7±0,2	0,05-10,00
Laktat	20,7±0,2	0,10-10,00
Glycerol	21,5±0,2	0,05-01,00
Acetat	24,2±0,2	0,20-10,00
Ethanol	33,0±0,2	0,50-10,00

Die Bestimmung intrazellulärer Adenosin- und Guanosin-Phosphate nach Kaltextraktion (Abs. 3.9.1) wurde an einer HPLC-Anlage (Agilent 1200 Series) durchgeführt. Ausgestattet mit einer Supelco LC-18 Trennsäule (4,6 x 150 mm, 3 µm) und geschützt durch eine Thermo Fisher Scientific BDS-Hypersil-C18 Vorsäule (10 x 4,6 mm, 5 µm) wurde mit einem Injektionsvolumen von 50 µl gearbeitet. Der Eluationspuffer bestand aus der polaren Komponente A (0,1 M KH_2PO_4, 0,1 M K_2HPO_4, 4 mM TBAS, pH 6) und der unpolaren Komponente B (0,1 M KH_2PO_4, 0,1 M K_2HPO_4, 4 mM TBAS, 30%$_{(vv)}$ Methanol, pH 7,2). Die Ionenpaarchromatographie trennt die Nukleosid-Phosphate (Tab. 3.9) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml min^{-1} und 30°C

TABELLE 3.9: Gegenüberstellung von Analyt mit ihrer Retentionszeit bei Umkehrphasen Chromatographie im verwendeten linearen Kalibrationsbereich mit den erzielten Konzentrationsgrenzen für Nachweis (LOD) und Quantifizierung (LOQ).

Analyt	**Retentionszeit [min]**	**Kalibrationsbereich [mM]**	**LOD [µM]**	**LOQ [µM]**
CMP	3,2±0,02	0,005-0,1	0,4±0,04	1,2±0,13
UMP	4,5±0,1	0,005-0,1	1,5±0,3	4,7±0,8
GMP	6,0±0,1	0,005-0,1	1,8±0,4	5,6±1,3
CDP	6,7±0,0	0,005-0,1	0,5±0,07	1,6±0,2
NAD	10,2±0,2	0,005-0,1	0,7±0,1	2,2±0,3
UDP	12,2±0,2	0,005-0,1	1,4±0,3	4,3±0,8
AMP	12,9±0,2	0,005-0,1	0,9±0,2	2,7±0,5
GDP	13,2±0,1	0,005-0,1	0,8±0,1	2,5±0,4
NADP	14,9±0,2	0,005-0,1	1,0±0,3	3,1±0,9
CTP	15,7±0,2	0,005-0,1	0,4±0,05	1,1±0,1
UTP	19,9±0,2	0,005-0,1	0,7±0,08	2,0±0,2
GTP	20,2±0,2	0,005-0,1	0,7±0,2	2,2±0,5
ADP	21,3±0,1	0,005-0,1	0,4±0,03	1,1±0,1
Kaffeesäure	23,9±0,0	0,005-0,1		
ATP	27,3±0,1	0,005-0,1	0,6±0,06	1,7±0,2
cAMP	31,1±0,1	0,005-0,1	0,7±0,1	2,2±0,4

TABELLE 3.10: Gegenüberstellung von Analyten mit ihrer Retentionszeit bei Umkehrphasen Chromatographie im verwendeten linearen Kalibrationsbereich mit den erzielten Konzentrationsgrenzen für Nachweis (LOD) und Quantifizierung (LOQ).

Analyt	**Retentionszeit [min]**	**Kalibrationsbereich [mM]**	**LOD [µM]**	**LOQ [µM]**
Aspartat	2,9±0,1	0,001-0,4	0,5±0,02	1,5±0,07
Glutamat	4,7±0,1	0,001-0,4	1,0±0,05	3,1±0,1
Asparagin	8,3±0,1	0,001-0,4	0,5±0,02	1,5±0,06
Serin	8,9±0,1	0,001-0,4	0,3±0,01	0,9±0,03
Glutamin	10,1±0,1	0,001-0,4	0,6±0,03	1,7±0,09
Histidin	10,5±0,1	0,001-0,4	1,3±0,05	3,8±0,1
Glycin	11,2±0,1	0,001-0,4	0,5±0,02	1,5±0,06
Threonin	11,5±0,1	0,001-0,4	0,4±0,01	1,1±0,04
Arginin	13,3±0,1	0,001-0,4	0,5±0,02	1,6±0,06
Alanin	13,8±0,1	0,001-0,4	0,4±0,01	1,0±0,04
GABA	14,3±0,1	0,001-0,4		
AIBA	14,9±0,1	0,001-0,4		
Tyrosin	16,1±0,1	0,001-0,4	0,8±0,03	2,5±0,09
Valin	19,7±0,1	0,001-0,4	1,2±0,04	3,5±0,1
Methionin	20,1±0,1	0,001-0,4	0,5±0,02	1,4±0,06
Norvalin	20,8±0,1	0,001-0,4		
Tryptophan	21,7±0,1	0,001-0,4	1,5±0,07	4,6±0,2
Phenylalanin	22,5±0,1	0,001-0,4	0,8±0,03	2,4±0,08
Isoleucin	22,9±0,1	0,001-0,4	0,9±0,03	2,8±0,1
Ornithin	23,2±0,1	0,001-0,4		
Leucin	24,2±0,1	0,001-0,4	5±0,2	15,1±0,5
Lysin	24,7±0,1	0,001-0,4	2,3±0,4	7±1,2
Prolin	31,9±0,1	0,001-0,4	4,8±0,7	14±2

Säulentemperatur in linearen Gradienten (B%) zwischen den Zeitpunkten t_{min} ($t_0$0%-$t_{3.5}$0%-t_{20}25%-t_{22}30%-t_{40}60%-t_{48}100%-t_{55}100%-t_{60}0%). Die Absorbtion der Metabolite wurde bei 260 nm mit der Referenzwellenlänge 360 nm detektiert (Agilent 1200 Series DAD, Waldbronn, Germany). Die Signale wurden mittels externer Kalibrierung (8 Level, 0-100 µM) quantifiziert.
Die Konzentrationen intrazellulärer Aminosäuren und der internen Standards (IS1 und IS2) wurden durch RP-HPLC (Agilent 1200 Series, Agilent Technologies, Deutschland) auf einer Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 column (4.6 x 250 mm, 5 µm) geschützt durch eine Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Vorsäule (12.5 x 4.6 mm, 5 µm) chromatographisch getrennt [40]. Die Proben wurden in den Kalibrationsbereich (0-250 µM) verdünnt und ein Injektionsstandard (20 µM AIBA) zugesetzt. Das Signal wurde mittels externen Kalibration (8 Stufen, 0-250 µM) quantifiziert.

3.11 *Next Generation Sequencing* und Expressionsanalyse

RNA-Polymerasen transkribieren *messenger*-Ribonukleinsäuren (mRNA) von offenen Leserahmen (ORF: *open reading frame*) auf der DNA. Die Nukleotidsequenz eines DNA-Einzelstrangs wird dazu als RNA-Strang komplementiert. Dieser enthält *Introns* (nicht kodierende Bereiche) und *Exons* (kodierende Bereiche). Die Reifung der RNA erfolgt in drei Schritten: i) Beim sogenannten *Capping* wird 7-Methylguanosin an das 5'-Ende des Primärtranskripts angehängt. ii) Die Polyadenylierung erfolgt am 3'-Ende des Transkripts und sorgt für die Stabilität des Konstrukts. iii) Durch den Vorgang des *splicings* werden die *Introns* entfernt und die *Exons* fusioniert. Die gereifte mRNA verlässt den Zellkern und wird an Ribosomen translatiert. Die Kopienzahl einer mRNA ist mitbestimmend für die Menge des entstehenden Proteins. Eine Änderung der Kopienzahl lässt Rückschlüsse auf die Vorgänge im Zellkern zu, die zu seiner Zu- oder Abnahme geführt haben. Zudem gibt sie für Enzym-kodierende mRNAs die Entwicklung der Menge des Katalysators einer biochemischen Reaktion an. Die Expression des Enzyms und der Stoffffluss einer Reaktion korrelieren nicht selten miteinander. Die Bestimmung relativer mRNA-Level aus Zellmaterial und die Analyse der differentiellen Genexpression DGE wurde in den folgenden Abschnitten zusammengefasst.

3.11.1 Isolierung – Sequenzierung – Quantifizierung

Etwa 100 µl Zellsuspension (ca. 10^8 Zellen) wurden entnommen und kurz (3 s) bei -20°C zentrifugiert. Der Überstand des Pellets wurde verworfen und das Pellet umgehend bei -70°C in flüssigen Stickstoff eingefroren. Eine Lagerung bei -70°C erfolgte bis zu zwei Wochen.

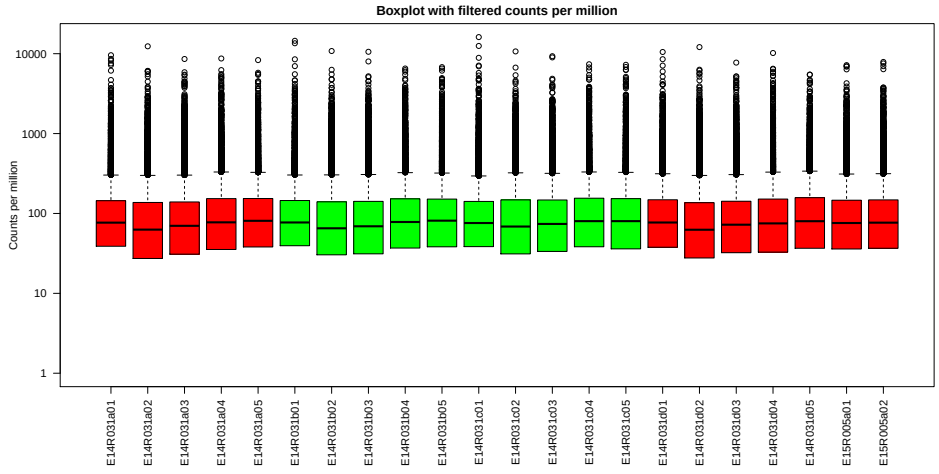


ABBILDUNG 3.2: Das *Next Generation Sequencing* (NGS) erbrachte die Verteilung der *readcounts* in 22 Proben aus 4 Prozessen. Jeder *boxplot* entspricht der Verteilung aus ca. 8 Millionen *readcounts*. Die Nummerierung der Proben ergibt sich aus dem Auftrag (E14R031 oder E15R005) dem Prozess (a, b, c und d) und den Zeitpunkt der Probenahme (01: Referenz; 02: 10 min; 03: 30 min; 04: 60 min; 05: 5 Verweilzeiten (VZ) und $06_{\text{E15R005a01,E15R005a02}}$: 10 VZ). Prozesse mit D=0,05 h^{-1} (grün) und D=0,1 h^{-1} (rot) wurden zu fünf bzw. sechs Zeitpunkten im biologischen Duplikat beprobt.

Die Extraktion der mRNA erfolgte nach einem Standardprotokoll (Quiagen RNeasy Mini Kit) bei der Firma MFT Services Tübingen. Die RNA-Qualität wurde dort mithilfe des Lab-on-a-Chip-Systems Bioanalyzer 2100 (Agilent, Böblingen, D) geprüft und die Konzentration mit einen Nano-Drop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) gemessen.
Zur Herstellung der cDNA-*Library* wurde die ribsomale RNA aus 1 µg extrahierter RNA mithilfe des Ribo-Zero^{TM}Magnetic Gold Kit (Yeast) (Epicentre, Madison, WI, USA) abgetrennt und die Sequenzierung unter Verwendung des TruSeq Ribo Profile (Yeast) Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Die cDNA-Library (Fragmentlänge $\sim$100 bp) wurde mit dem QC Bioanalyzer 2100 untersucht und die Konzentration ($\sim$40 ng ml^{-1}) mit einem Qubit Fluorometric Quantitation (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt. Die cDNA-Library wurde nach Herstellerangaben denaturiert und auf 9 pM verdünnt. Etwa 10 Millionen *cluster* pro Probe wurden mit dem Illumina HiSeq 2500 Instrument (Illumina, San Diego, CA, USA) im *highoutput*-Modus in 68 Zyklen mit *single-end-reads* sequenziert.

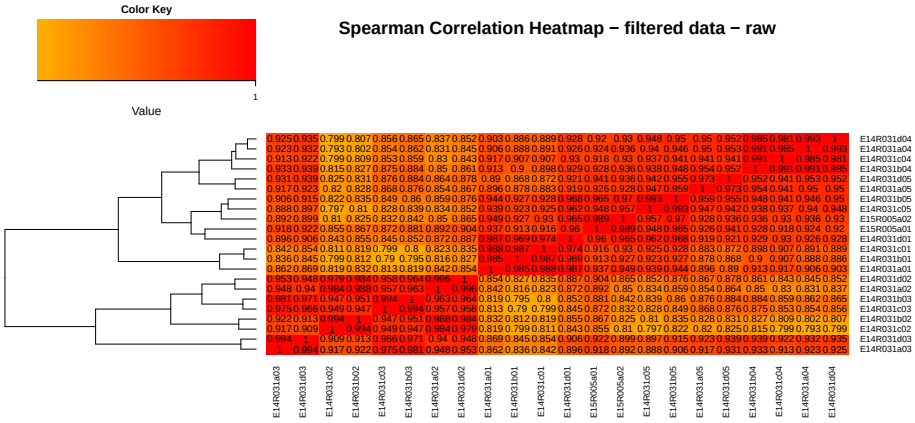


ABBILDUNG 3.3: Die Spearman Rangkorrelation gibt an, wie hoch die lineare Korrelation der *readcounts* zweier Proben ist. So ergibt sich für die Replikate E14R031a04 und E14R031d04 eine Korrelation von 0,993 während eine unbehandelte Referenz (E14R031a01; 0 min) im Vergleich zum CO_2-belasteten Zeitpunkt (E14R031a02; 10 min) die schlechtere Korrelation von 0,842 zeigt. Die Nummerierung der Proben ergibt sich aus dem Auftrag (E14R031 oder E15R005) dem Prozess (a, b, c und d) und den Zeitpunkt der Probenahme (01: Referenz; 02: 10 min; 03: 30 min; 04: 60 min; 05: 5 Verweilzeiten (VZ) und $06_{E15R005a01,E15R005a02}$: 10 VZ).

Die Intensitäten der *cluster* wurde mit der Illumina bcl2fastq Conversion Software v.1.8.4.[2] ins FASTQ-Format konvertiert. Die Rohdaten im FASTQ-Format wurden auf verbleibende Sequenzierungsadapter durchsucht. Mit Cutadapt v.1.8.3 [250] wurden verbliebene Adapter-Basen entfernt bevor das *alignment* durchgeführt wurde. Die *Reads* wurden gegen das *S. cerevisiae* S288C Referenzgenom von Ensembl Genomes (Gen-Bank: GCA_ 000146045.2) mithilfe des RNA-*sequencing aligners* STAR v.2.4.2a [84] und des Bowtie-Algorithmus (Langmead et

[2] http://support.illumina.com/downloads.html

al. 2009) alignt [213]. Im Durchschnitt konnten 95% der sequenzierten *reads* auf dem Referenzgenom kartiert werden.
Die Quantifizierung der *reads* erfolgte durch die Python-Anwendung HTSeq-count (Anders et al., 2014). Die Qualitätskontrolle und Auswertung der Daten durch die Software Sequencing Analysis Viewer v1.9.1 zeigte eine sehr gute Sequenzierqualität der *reads* (>32), ca. 8 Millionen *readcounts* pro *sample* und eine homogene Verteilung der *readcounts* nach der Normalisierung (siehe Abb. 3.2).
Aufgrund der gleichen Verteilung konnten Daten aller beprobter Zeitpunkte zur weiteren Auswertung verwendet werden. Die Vergleichbarkeit biologischer Replikate wurde über ihre Linearität innerhalb einer Spearman Rangkorrelation bestimmt. Alle Replikate erreichten eine erforderliche Linearität (>0,95; Abb. 3.3). Die Dimensionsreduktion durch ein MDS-Verfahren (*Multi Dimensional Scaling*) zeigte nur geringe Unterschiede zwischen den Prozessen aber eine tendentielle Trennung auf Basis der Zeitreihe in der 2. Dimension.

3.11.2 Expressionsanalyse

Eine erste statistische Analyse zur differentiellen Genexpression (DGE) wurde noch von der Firma MFT Services durchgeführt. Zur Analyse der DGE wurden die CPM-normalisierten *count*-Daten verwendet. Als Basis diente ein generalisiertes lineares Modell unter der Annahme einer negativen Binomialverteilung. Eine DGE wurde durch die Untergrenze einer logarithmischen Änderung ($\log_2$FC: *fold change*) von $|1|$ zwischen zwei Zeitpunkten definiert. Zu mindestens einem Zeitpunkt sollte der Anteil der mRNA 50 CPM übersteigen. Durch die Streuung der vier Werte wurde der DGE damit auch eine statistische Wahrscheinlichkeit p für das Auftreten eines FC zugewiesen. Es wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 als obere Grenze verwendet. Multiples Testen zur Berechnung der p-Werte erfordert eine Anpassung der Gewichtung weshalb zur Korrektur der p-Werte die Korrektur (FDR: *false discovery rate*)-Methode nach Benjamini-Hochberg verwendet wurde. Tabelle 3.11 fasst die Ergebnisse der statistischen Vergleiche zusammen.

k-means clustering

Das initiale Verfahren zeigt, wie viele der Gene im direkten Vergleich zweier Proben differentiell expremiert werden. Sollen Gene mit ähnlicher DGE im zeitlichen Verlauf eines Prozesses zusammengefasst werden, bietet sich zunächst ein simpler Algorithmus zur Gruppierung an. Der *k-means*-Algorithmus verwendet ein heuristisches Verfahren um Zentren zur Bildung von *clustern* zu bestimmen. Dabei wird aus dem Datensatz M eine Anzahl an *clustern* k mit den Zentren Z bestimmt. Die Zuordnung der Elemente m (logFC) aus M erfolgt durch die Bestimmung der Abstände d zwischen Z und m. Die Matrix M enthält die logFCs zwischen dem Referenzexpressionsniveau CPM_r (t_0) und den Zeitpunkten i (t_{10}, t_{30}, t_{60}, t_∞) der Zeitreihe aus Kultivierung j.

$$m_{0i} = log_2(\frac{CPM_r}{CPM_i}) \tag{3.22}$$

$$M = \begin{bmatrix} m_{01,1} & \dots & m_{01,j} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ m_{0i,1} & \dots & m_{0i,j} \end{bmatrix} \tag{3.23}$$

Das erste Zentrum Z_1 wird zufällig aus M gewählt. Das nächste Zentrum Z_2 wird durch die Wahrscheinlichkeit p aus Gleichung C.1 ermittelt, wobei $d_{(M_m,Z_z)}$ den Abstand zwischen m und Z gibt.

$$p = \frac{d^2_{(M_m,Z_1)}}{\sum_{z=1}^{n} d^2_{(M_z,Z_1)}} \tag{3.24}$$

Die Zugehörigkeit von m zu einem Zentrum z bzw. Cluster ergibt sich durch die Wahrscheinlichkeit $p_{(M,m,Z)}$ aus Gleichung 3.25. Das Verfahren wird wiederholt, bis die Anzahl der Cluster k erreicht ist [283].

$$p_{(M,m,Z)} = \frac{d^2_{(x_m,Z_p)}}{\sum_{h;x_h \in Z_p}^{n} d^2_{(x_h,Z_p)}} \tag{3.25}$$

TABELLE 3.11: Die statistische Analyse der DGE fasst biologische Replikate zusammen. Die Nummerierung der Proben ergibt sich aus dem Prozess (a, b, c und d) und den Zeitpunkt der Probenahme (01: Referenz; 02: 10 min; 03: 30 min; 04: 60 min; 05: 5 Verweilzeiten (VZ) und 06: 10 VZ). Prozesse mit D=0,05 h^{-1} (b und c) und D=0,1 h^{-1} (a und d) wurden zu fünf bzw. sechs Zeitpunkten im biologischen Duplikat beprobt.

Vergleich	**log_2FC Filter** $\lvert log_2 FC\rvert \geq 1$	**p-Wert Filter** $p \leq 0,05$	**log_2FC und p-Wert Filter** $\lvert log_2 FC\rvert \geq 1 \cap p \leq 0,05$
Pad-01 vs. Pad-02	1586	989	909
Pad-01 vs. Pad-03	928	516	488
Pad-01 vs. Pad-04	622	250	236
Pad-01 vs. Pad-05	706	341	301
Pad-01 vs. Pad-06	395	123	87
Pbc-01 vs. Pbc-02	1995	1605	1431
Pbc-01 vs. Pbc-03	1815	1402	1266
Pbc-01 vs. Pbc-04	766	386	345
Pbc-01 vs. Pbc-05	778	453	395
Pad-01 vs. Pbc-01	128	0	0
Pad-02 vs. Pbc-02	149	10	8
Pad-03 vs. Pbc-03	141	14	11
Pad-04 vs. Pbc-04	90	2	1
Pad-05 vs. Pbc-05	353	98	88
Pad-06 vs. Pbc-05	601	441	262

Datenbankabgleich

Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, führt die DGE zweier Zeitpunkte zu verschiedenen Clustern. Zum statistischen Abgleich mit *gene ontology* GO-Daten im Rahmen biologischer Prozesse, zellulärer Komponenten und molekularer Funktionen wurde die *Saccharomyces Genome Database*[3] [55] auf Ontologien in den Expressionsmustern durchsucht. Die Visualisierung von GO-Daten kann mithilfe der AmiGO Web Applikation[4] erfolgen [43] (Abb. 3.4). Hefe als einzelliger Organismus mit 6476 Genen kann innerhalb des Spezies-übergreifenden Systems für Eukaryoten nicht alle Funktionen besetzen. Es wurde daher eine reduziertere Form der Darstellung verwendet (Appendix D).
Auf Grundlage einer hypergeometrischen Verteilung wurde die Wahrscheinlichkeit für das zufällige Auftreten bekannter Ontologien (GOs) in den Clustern bestimmt [351]. Die hypergeometrische Verteilung beschreibt dabei die Wahrscheinlichkeit p, mit der in der Stichprobe n aus der Grundgesamtheit N k Treffer erzielt werden können, wenn N H Elemente der gewünschten Eigenschaft enthält (Gl. 3.26). N ist dabei die Anzahl der Gene im Genom, n eine Gruppe differentiell expremierten Gene und h die Anzahl der Treffer in einem GO mit H Genen.

$$p_{H,h} = \frac{\binom{H}{h} \cdot \binom{N-H}{n-h}}{\binom{N}{n}} \tag{3.26}$$

Die α-Fehler-Kumulation durch multiples Testen der gleichen Stichprobe n wurde durch Anwendung der Holm-Bonferroni-Methode kompensiert [164]. Der Abgleich von Gengruppen, mit biochemischen Reaktionswegen erfolgte in den Datenbanken KEGG[5] und Reactome[6].

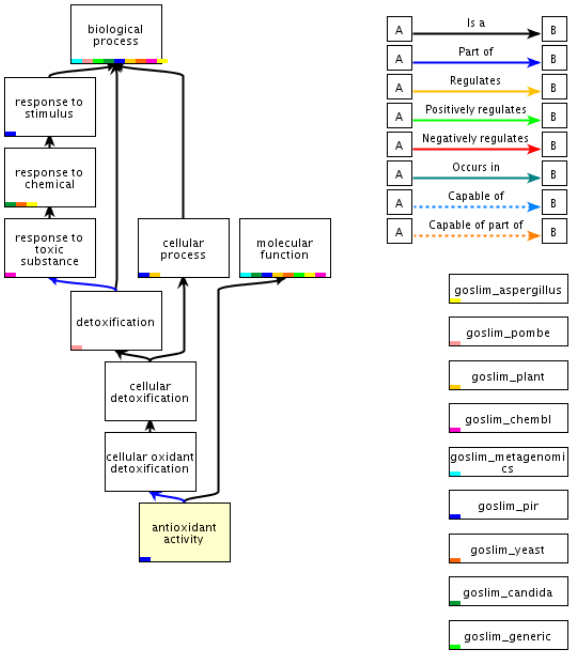


ABBILDUNG 3.4: Die Visualisierung von QuickGO - www.ebi.ac.uk/QuickGO zeigt einen Netzwerkabschnitt aus dem *Gene Ontology Project*. Knoten (Rechtecke) repräsentieren Gene oder Gengruppen, während Kanten (Pfeile) verschiedene Arten der Interaktion zwischen den Genen bzw. Genprodukten der Knoten beschreiben.

[3] http://www.yeastgenome.org/
[4] http://amigo.geneontology.org
[5] http://www.genome.jp/kegg/pathway.html
[6] http://www.reactome.org/

3.12 Aufnahme- und Exkretionsraten im Prozess

Dieses Teilkapitel beschreibt die Berechnung von Aufnahme- und Exkretionsraten aus der experimentellen Bestimmung intra- und extrazellulären Metaboliten. Die Raten sind Eingabeparameter für eine dynamische Simulation der ATP-Kosten mithilfe eines ODE-Modells in Kapitel 5 und für die metabolische Flussanalysen (MFA) in Kapitel 6.

3.12.1 Berechnung von Raten und Parametern

Die Berechnung der Raten basiert auf der dynamischen Massenbilanz einer Komponente i in einem Bioreaktor (Abb. 3.1):

$$\frac{dm_i}{dt} = \frac{dV}{dt} \cdot c_i + \frac{dc_i}{dt} \cdot V = \frac{d(V \cdot c_i)}{dt} = F \cdot c_{i0} - F_p \cdot c_i + Q_{vi} \cdot V \tag{3.27}$$

Berücksichtigt man

$$\frac{d(V \cdot c_i)}{dt} = \frac{dV}{dt} \cdot c_i + \frac{dc_i}{dt} \cdot V \tag{3.28}$$

und substituiert die Volumenbilanz

$$\frac{dV}{dt} = F - F_p, \tag{3.29}$$

kann Gleichung 3.27 umgeformt werden und ergibt

$$V \cdot \frac{dc_i}{dt} = F \cdot (c_{i0} - c_i) + Q_{vi} \cdot V. \tag{3.30}$$

Aufgelöst nach Q_{vi} ergibt die gewünschte Formel:

$$Q_{vi} = \frac{dc_i}{dt} - \frac{F}{V} \cdot (c_{i0} - c_i). \tag{3.31}$$

Es scheint wichtig zu erwähnen, dass Gleichung 3.31 unabhängig vom Modus der Kultivierung im Reaktor (*batch*, *fed-batch* oder kontinuierlich) geeignet ist die Funktionsweise zu beschreiben da die Abflussrate F_p aus der Formel eliminiert wurde. Volumetrische Raten können für alle Kultivierungsbedingungen ermittelt werden. Biomassespezifische Raten q_i werden über Gleichung 3.32 bestimmt

$$q_i = \frac{Q_{vi}}{c_X}, \tag{3.32}$$

in der c_X die Konzentration der Biomasse oder der molaren Mengen

$$\tilde{q_i} = q_i \cdot \frac{M_X}{M_i}, \tag{3.33}$$

mit M_X und M_i als molare Massen der Biomassekomponente i entspricht. Diese biomassespezifischen molaren Raten wurden als Eingabewerte für die Simulation in Kapitel 6 verwendet.

Die molare Sauerstoff-Aufnahmerate (OUR) pro Volumeneinheit und die dazugehörige Kohlendioxid-Abgaberate (CER) wurden unter der Annahme eines idealen Gases und dem inerten Verhalten von Stickstoff (N_2) zum Ausgleich von Volumendifferenz zwischen Reaktor und Auslass beschrieben:

$$Q_{O2} = \frac{\dot{V}_g p_{abs}}{RTV_{LR}} \left(y_{O2}^{in} - y_{O2}^{out} \frac{(1 - y_{O2}^{in} - y_{CO2}^{in})}{(1 - y_{O2}^{out} - y_{CO2}^{out})} \right) \tag{3.34}$$

$$Q_{CO2} = \frac{\dot{V}_g p_{abs}}{RTV_{LR}} \left(y_{CO2}^{out} \cdot \frac{(1 - y_{O2}^{in} - y_{CO2}^{in})}{(1 - y_{O2}^{out} - y_{CO2}^{out})} - y_{CO2}^{in} \right) \tag{3.35}$$

In Gleichung 3.34 und 3.35 beschreibt y den Gasvolumenanteil am Reaktor-Einstrom und -ausstrom, p_{abs} den absoluten Druck, T die absolute Temperatur, V_{LR} das Arbeitsvolumen und R die ideale Gaskonstante. Die Begasungsrate wird durch $\dot{V}_g$ beschrieben. Dabei ist $\dot{V}_g$ gleich dem Volumenstrom in den Reaktor $\dot{V}_g^{in}$ und aus dem Reaktor $\dot{V}_g^{out}$ heraus.
Kommen zur zellulären Austauschrate Änderungen in der Biomassezusammensetzung hinzu — wie bei CO_2-Gradienten der Fall —, werden diese durch eine Erweiterung der Rahmenbedingungen zur Ratenberechung berücksichtigt. Die Konzentration einer Komponente innerhalb der Biomasse wird mit $c_{X,k}$ beschrieben (Gl. 3.36).

$$c_{X,k} = c_X \cdot w_{X,k} \tag{3.36}$$

Sie ergibt sich aus der Gewichtsfraktion der Komponente k in der Biomasse und kann, unter der Berücksichtigung von c_{X0}=0, in Gleichung 3.31 substituiert werden, was Gleichung 3.40 ergibt.

$$\begin{aligned} Q_{vX,k} &= \frac{d(c_X \cdot w_{X,k})}{dt} + \frac{F}{V} \cdot c_X \cdot w_{X,k} \\ \Leftrightarrow Q_{vX,k} &= \frac{dc_X}{dt} \cdot w_{X,k} + \frac{dw_{X,k}}{dt} \cdot c_X + \frac{F}{V} \cdot c_X \cdot w_{X,k} \end{aligned} \tag{3.37}$$

Umgeformt ergibt sich Gleichung 3.38

$$Q_{vX,k} = Q_{vX} \cdot w_{X,k} + c_X \cdot \frac{dw_{X,k}}{dt}, \tag{3.38}$$

in der Q_{vX} nach Gleichung 3.31 bestimmt wurde. Alternativ kann die Konzentration von k statt als $w_{X,k}$ als intrazelluläre Konzentration $c_{k,c}$ (pro Einheit Zellvolumen) angegeben werden. Zwischen $w_{X,k}$ und $c_{k,c}$ ergibt sich die Korrelation nach Gleichung 3.39

$$c_{k,c} = \frac{c_X \cdot w_{X,k}}{c_c \cdot V_c} \tag{3.39}$$

in der c_c die Konzentration der Zellen pro Reaktorvolumen und V_c das mittlere Volumen einer einzelnen Zelle innerhalb der Kultur beschreibt. Durch Substitution von Gleichung 3.40 in

Gleichung 3.36 ergibt sich $Q_{vX,k}$ wie folgt:

$$Q_{vX,k} = \frac{F}{V} \cdot c_c \cdot V_c \cdot c_{k,c} + \frac{dc_c}{dt} \cdot v_c \cdot c_{k,c} + \frac{dV_c}{dt} \cdot c_c \cdot c_{k,c} + \frac{dc_{k,c}}{dt} \cdot c_c \cdot V_c \tag{3.40}$$

Die Berechnung der zugehörigen biomassespezifischen Rate kann wie zuvor beschrieben durchgeführt werden.

3.12.2 Fehlerfortpflanzung

Der zufällige Fehler bei der zuvor beschriebenen Bestimmung von Aufnahme- und Exkretionsraten (Abs. 3.12.1) wurde auf Basis der Annahme von unabhängigen Messwerten abgeschätzt. Für die meisten Messwerte ist diese Annahme begründet. Eine Ausnahme bilden dabei die voneinander abhängigen Gasvolumenanteile y, deren Summe eine Erhaltungsgleichung erfüllt und 1 entspricht. Aufgrund der fehlenden Kovarianzen wurde dieser Effekt in den folgenden Berechnungen vernachlässigt.
Wenn Q_{vi} eine Funktion des Vektors der unabhängigen Variable x ist, kann ihre Standardabweichung über die Gauß'sche Fehlerfortpflanzung berechnet werden (Gl. 3.42).

$$Q_{vi} = f(x) \tag{3.41}$$

$$s(Q_{vi}) = \sqrt{\sum_i \left(\frac{\partial Q_{vj}}{\partial x_i}\right)^2 \cdot s(x_i)^2}, \tag{3.42}$$

s bezeichnet dabei die empirisch ermittelte Standardabweichung und x_i die beteiligten Messgrößen. Auf diese Weise kann die Standardabweichung verschiedener spezifischer Raten wie $Q_{vX,k}$ berechnet werden. Die verschiedenen $s(x_i)$ wurden aus eigenen experimentellen Daten, Herstellerinformationen oder basierend auf eigenen Annahmen berechnet. Die Berechnung der Standardabweichungen für verschiedene Raten wurde mit Matlab durchgeführt. In Verbindung mit den verschiedenen Aufnahme- und Exkretionsraten wurde die Standardabweichung als Eingabewert zum Lösen überbestimmter Gleichungssysteme durch MFA verwendet (siehe Abs. 3.13.1).

3.12.3 Varianzanalyse

Der statistische Nachweis einer Korrelation zweier Ereignisse wird mithilfe von univariaten Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Die ANOVA prüft, ob die Veränderung einer experimentell bestimmten Zufallsvariablen *y* in Abhängigkeit zu einem im Experiment auftretenden Einflussfaktor steht. *j* beschreibt eine endliche Anzahl bekannter Einflussfaktoren, während *i* eine ebenfalls endliche Anzahl an Beobachtungen repräsentiert. Im Mittelwertmodell (Gl. 3.43) gibt $\bar{y}_{.j}$ den konstanten Mittelwert von *y* mit normalverteiltem Fehler konstanter Varianz ε. Die ANOVA testet die Hypothese H_0 gleicher $\bar{y}_{.j}$ in mehreren Gruppen (Gl. 3.44) gegen die alternative

Hypothese eines Unterschieds zwischen diesen Gruppen.

$$y_{ij} = \bar{y}_{.j} + \varepsilon_{ij} \tag{3.43}$$

$$H_0 : \bar{y}_{.1} = \bar{y}_{.2} \tag{3.44}$$

Dazu teilt die ANOVA die Gesamtabweichungsquadratsumme (*SST*) in die Residuenquadratsumme (*SSR*), verursacht durch die Varianz zwischen Gruppen, und das Fehlerquadrat, verursacht durch die Varianz innerhalb einer Gruppe (*SSE*) (Gl. 3.45). Die Fisher-Snedecor-Verteilung F_{ij} ergibt sich nach Gleichung 3.46 aus *SSR*, *SSE* und deren Freiheitsgraden, wobei *G* die Anzahl aller unabhängigen Messwerte, *g* die Anzahl der unabhängigen Messwerte innerhalb einer Gruppe und *b* die Anzahl der Gruppen geben. In der vorliegenden Arbeit verwendet die ANOVA das balancierte Modell (g>4).

$$\begin{aligned} SST &= SSR + SSE \\ \sum_i \sum_j (y_{ij} - \bar{y}_{..})^2 &= \sum_j g_j (\bar{y}_{.j} - \bar{y}_{..})^2 + \sum_i \sum_j (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_{.j})^2 \\ G - 1 &= (b-1) + (G-b) \end{aligned} \tag{3.45}$$

$$F_{ij} = \frac{SSR \cdot (b-1)^{-1}}{SSE \cdot (G-b)^{-1}} \tag{3.46}$$

H_0 wird für zu große Werte der Teststatistik abgelehnt. Der Nachweis des signifikanten Unterschieds unter den Gruppen soll erbracht sein, wenn H_0 mit geringem α-Fehler α_0 abgelehnt werden kann (Gl. 3.47; α_0=0,05). Das vorgegebene Signifikanzniveau p liegt dafür unter 5% (Gl. 3.48 und 3.49; p≤0,05).

$$p \leq \alpha_0 \tag{3.47}$$

$$P_{F(y|b-1;G-b) \geq B|H_0)} \leq \alpha_0 \tag{3.48}$$

$$p = P_{F(y|b-1;G-b) \geq F_{ij}|H_0)} \tag{3.49}$$

3.13 Metabolische Netzwerke

Metabolische Netzwerke korrelieren das Genom mit molekularer Physiologie. Eine Rekonstruktion von Stoffwechselwegen wie die Glykolyse wird in die chemischen Reaktionen ihrer Enzyme zerlegt und im Kontext der Stöchiometrie des gesamten Reaktionsnetzwerks analysiert. Relevante metabolische Information aus einer Reaktionsdatenbank wie KEGG[7] kann in die *Systems Biology Markup Language* (SBML) und damit in ein mathematisches Modell des Stoffwechsels übersetzt werden. Die Verfahren zur automatischen Rekonstruktion stöchiometrischer Modelle aus Reaktomdatenbanken sind mittlerweile standardisiert [406]. Eine Rekonstruktion aus Genomsequenzen wird derzeit durch die Konvertierung der genetischen Information über das Proteom zum Reaktom limitiert.

[7] http://www.genome.jp/kegg/pathway.html

3.13.1 Metabolische Flussanalyse MFA

Ein stöchiometrisches Netzwerk besteht im Kern aus einer stöchiometrischen Matrix S in der die Reihe angibt an, welchen Reaktionen ein Metabolit i beteiligt ist und eine Spalte zeigt welche Metabolite an einer Reaktion j teilnehmen (Gl. 3.50). Zur Bilanzierung sind die chemische Summenformel und die Ladung jedes Metaboliten hinterlegt.

$$S = \begin{bmatrix} s_{1,1} & \dots & s_{1,j} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ s_{i,1} & \dots & s_{i,j} \end{bmatrix} \tag{3.50}$$

Findet eine Reaktion mit der Flussrate v statt, ist bekannt, welche Änderung der Stoffmenge n_i das über die Zeit t mit sich bringt (Gl. 3.51).

$$\frac{dn_i}{dt} = \sum s_i \cdot v \tag{3.51}$$

Wird Gleichung 3.51 auf alle Komponenten des stöchiometrischen Netzwerks erweitert, beschreibt die Matrix N die Änderung der Stoffmengen im System über die Zeit (Gl. 3.52).

$$\frac{dN}{dt} = S \cdot v \tag{3.52}$$

Im Reaktionsgleichgewicht beschreibt die Kontinuitätsgleichung 3.54 den Massenerhalt ohne Stoffmengenänderung innerhalb des Systems (Gl. 3.53).

$$\frac{dN}{dt} = 0 \tag{3.53}$$

$$S \cdot v = 0 \tag{3.54}$$

Die Lösung des Reaktionsgleichgewichts ist zeitunabhängig und bedarf keiner kinetischer Parameter. Als Eingangsparameter einer metabolischen Flussanalyse (MFA) werden biomassespezifische Aufnahme- und Exkretionsraten q_i verwendet (siehe Abs. 3.12.1). Es gilt die Fehlerquadratsumme σ_i^2 aller Eingangsparameter q_i und der vorhergesagten Flussraten r_i zu minimieren und mit den Standardabweichungen s(q$_i$) zu gewichten (Gl. 3.55). Die Matrix R in Gleichung 3.55 beschreibt die mit q_i vorgegebenen Bedingungen und ergibt zusammen mit Gleichung 3.54 das Minimierungsproblem.

$$minSSR = \sum \frac{r_i - q_i}{\sigma_i^2} r_i = R_i \cdot v \tag{3.55}$$

Die Nullraummatrix K beschreibt in ihren Spalten die Basisvektoren des Lösungsraums von S (Gl. 3.56). Die Anzahl dieser Vektoren entspricht der Anzahl der Freiheitsgarde u des Modells (Gl. 3.57). Für eine bestimmte Lösung werden genauso viele Messwerte wie Freiheitsgarde benötigt.

$$S \cdot K = 0 \tag{3.56}$$

$$v = K \cdot u \tag{3.57}$$

Werden Gleichung 3.55 und 3.57 in Gleichung 3.55 ersetzt, ergibt sich Gleichung 3.58. welche

$$minSSR = \sum \frac{R_i \cdot K \cdot u - q_i}{\sigma_i^2} \tag{3.58}$$

Eine analytisch lösbare Form entsteht wenn Gleichung 3.58 mit Gleichung 3.59 substituiert wird. Die Wichtungsmatrix W führt die Standardabweichungen s(q_i) in geeigneter Form ein (Gl. 3.60).

$$X = K \cdot R \tag{3.59}$$

$$W = \frac{1}{\sigma^2} \tag{3.60}$$

Die resultierende Gleichung 3.61 hat eine in Gleichung 3.62 dargestellte analytische Lösung für u. Der Lösungsvektor v ergibt sich nach Rücksubstitution der Parameter und Einsetzen von Gleichung 3.59 in Gleichung 3.62.

$$minSSR = (X \cdot u - q)^T \cdot W \cdot (X \cdot u - q)^T \tag{3.61}$$

$$u = (X^T \cdot W \cdot X)^{-1} \cdot X^T \cdot W \cdot q \tag{3.62}$$

$$v = K \cdot (K^T \cdot R^T \cdot W \cdot R \cdot K)^{-1} \cdot K^T \cdot R^T \cdot W \cdot q \tag{3.63}$$

Der Vorteil der metabolischen Flussanalyse besteht demnach in der analytischen Lösung eines Systems dessen Freiheitsgrade durch experimentelle Daten beschränkt sind. Der Vektor v stellt die Raten r der Stoffflussverteilung des metabolischen Netzwerks in Abhängigkeit des Vektors q der gemessenen biomassespezifischen Raten dar.

3.13.2 Gewöhnliche Differentialgleichungen

Eine weitere Methode zur Beschreibung von Reaktionsnetzwerken ist die Verwendung gewöhnlicher Differentialgleichungen (d.h. ODE: *Ordinary Differential Equations*). Ein Set dieser Gleichungen fasst die zeitliche Abhängigkeit seiner Variablen in einem Phasenraum zusammen. In einem Netzwerk von n Komponenten der Konzentration c zum Zeitpunkt t wird die zeitliche Entwicklung einer Komponente i durch Gleichung 3.64 beschrieben.

$$\frac{dc_i}{dt} = f(c_1, c_2, ...c_n) \tag{3.64}$$

Hier wird die Funktion f nach den Prinzipien der chemischen Reaktionskinetik formuliert. Die angewandten Prinzipien der Elektrochemie und Enzymkinetik werden am ODE-Modell erläutert (Appendix B).

$$\frac{dc_i}{dt} = 0 \tag{3.65}$$

Zur Berechnung wird jeder Variable c_i ein Startwert zugewiesen. Ein Set an Startwerten ist ideal, wenn im Phasenraum der zeitlich stabile Zustand eines Reaktionsgleichgewichts (explizite Lösung) oder ein zeitlich grenzstabiler Zustand (Attraktor) eingenommen wird. Die explizite

Lösung ist mit dem Ergebnis der metabolischen Flussanalyse vergleichbar (Abs. 3.13.1).
In dieser Arbeit basieren die Untersuchung der steigenden CO_2-Belastung des Organismus immer auf einer expliziten Lösung. Durch Änderung eines Startwerts (z.B. y_{CO2}) erreicht das System eine neue explizite Lösung. Die physiologische Relevanz des ursprünglichen Reaktionsgleichgewichts stützt sich auf experimentelle Daten. Die Resultate der Simulationen wurden anhand experimenteller Daten und der Sensitivitätsanalyse des Systems diskutiert.

3.13.3 Sensitivitätsanalyse

Allgemein wird die Sensitivität einer Variable y für einen Parameter x nach Gleichung 3.66 für kleine Änderungen von x formuliert [201]. Zur Bestimmung der Parametersensitivität des Systems wird eine lineare Stabilitätsanalyse des stationären Zustands bei D=0,1 h^{-1} durchgeführt. Die Sensitivität O gibt die prozentuale Änderung der stationären Variable bei prozentualer Änderung eines Parameters.

$$\frac{x}{y}\frac{dy}{dx} \approx \frac{x}{y}\frac{\Delta y}{\Delta x} \tag{3.66}$$

$$O = \frac{x}{{}^0y}\cdot\frac{{}^1y - {}^0y}{(p-1)\cdot x} = \frac{1}{{}^0y}\cdot\frac{{}^1y - {}^0y}{(p-1)} \tag{3.67}$$

Exemplarisch ist O der Variablen $[H_C^+]$, E_m, $[K_C^+]$, $[CO_{2,C}]$, $[HCO_{3,C}^-]$, r_{ST}, r_{Pma1}, r_{Nha1}, $r_{Trk1,2}$, $[CO_{2,L}]$, $[HCO_{3,L}^-]$, $[K_L^+]$ und $[CO_{2,g}]$ in Abhängigkeit von der unabhängigen Variable $[H_L^+]$ gegeben (Gl. 3.68). Die Anlayse wurde für eine Reihe weiterer zentraler Parameter und Variablen ($r_{H,p}$, $r_{CO2,p}$, y_{CO2}^{in}, k_{ST}, k_{Pma1}, k_{Nha1}, $k_{Trk1,2}$, k_{NSC} und $P_{s,Tok1}$) durchgeführt. Die Parameter wurden mit p=0,9 um 10% gesenkt und mit der Differenz der Variablen ins Verhältnis gesetzt (Gl. 3.67).

$$O_{[H_L^+]} = \begin{bmatrix}
\frac{[H_L^+]}{{}^0[H_C^+]} \cdot \frac{{}^1[H_C^+]-{}^0[H_C^+]}{(p-1)\cdot[H_L^+]} \\
\frac{[H_L^+]}{{}^0E_m} \cdot \frac{{}^1E_m-{}^0E_m}{(p-1)\cdot[H_L^+]} \\
\frac{[H_L^+]}{{}^0K_C^+} \cdot \frac{{}^1[K_C^+]-{}^0[K_C^+]}{(p-1)\cdot[H_L^+]} \\
\frac{[H_L^+]}{{}^0CO_{2,C}} \cdot \frac{{}^1[CO_{2,C}]-{}^0[CO_{2,C}]}{(p-1)\cdot[H_L^+]} \\
\frac{H_L^+}{{}^0HCO_{3,C}^-} \cdot \frac{{}^1[HCO_{3,C}^-]-{}^0[HCO_{2,C}^-]}{(p-1)\cdot[H_L^+]} \\
\frac{[H_L^+]}{{}^0r_{ST}} \cdot \frac{{}^1r_{ST}-{}^0r_{ST}}{(p-1)\cdot[H_L^+]} \\
\frac{H_L^+}{{}^0r_{Pma1}} \cdot \frac{{}^1r_{Pma1}-{}^0r_{Pma1}}{(p-1)\cdot[H_L^+]} \\
\frac{[H_L^+]}{{}^0r_{Nha1}} \cdot \frac{{}^1r_{Nha1}-{}^0r_{Nha1}}{(p-1)\cdot[H_L^+]} \\
\frac{[H_L^+]}{{}^0r_{Trk1/2}} \cdot \frac{{}^1r_{Trk1/2}-{}^0r_{Trk1/2}}{(p-1)\cdot[H_L^+]} \\
\frac{[H_L^+]}{{}^0CO_{2,L}} \cdot \frac{{}^1[CO_{2,L}]-{}^0[CO_{2,L}]}{(p-1)\cdot[H_L^+]} \\
\frac{[H_L^+]}{{}^0HCO_{3,L}^-} \cdot \frac{{}^1[HCO_{3,C}^-]-{}^0[HCO_{3,C}^-]}{(p-1)\cdot[H_L^+]} \\
\frac{[H_L^+]}{{}^0K_L^+} \cdot \frac{{}^1[K_L^+]-{}^0[K_L^+]}{(p-1)\cdot[H_L^+]} \\
\frac{[H_L^+]}{{}^0CO_{2,g}} \cdot \frac{{}^1[CO_{2,g}]-{}^0[CO_{2,g}^+]}{(p-1)\cdot[H_L^+]}
\end{bmatrix} = \begin{bmatrix}
\frac{1}{{}^0[H_C^+]} \cdot \frac{{}^1[H_C^+]-{}^0[H_C^+]}{(p-1)} \\
\frac{1}{{}^0E_m} \cdot \frac{{}^1E_m-{}^0E_m}{(p-1)} \\
\frac{1}{{}^0[K_C^+]} \cdot \frac{{}^1[K_C^+]-{}^0[K_C^+]}{(p-1)} \\
\frac{1}{{}^0[CO_{2,C}]} \cdot \frac{{}^1[CO_{2,C}]-{}^0[CO_{2,C}]}{(p-1)} \\
\frac{1}{{}^0[HCO_{3,C}^-]} \cdot \frac{{}^1[HCO_{3,C}^-]-{}^0[HCO_{2,C}^-]}{(p-1)} \\
\frac{1}{{}^0r_{ST}} \cdot \frac{{}^1r_{ST}-{}^0r_{ST}}{(p-1)} \\
\frac{1}{{}^0r_{Pma1}} \cdot \frac{{}^1r_{Pma1}-{}^0r_{Pma1}}{(p-1)} \\
\frac{1}{{}^0r_{Nha1}} \cdot \frac{{}^1r_{Nha1}-{}^0r_{Nha1}}{(p-1)} \\
\frac{1}{{}^0[r_{Trk1/2}]} \cdot \frac{{}^1[r_{Trk1/2}]-{}^0[r_{Trk1/2}]}{(p-1)} \\
\frac{1}{{}^0[CO_{2,L}]} \cdot \frac{{}^1[CO_{2,L}]-{}^0[CO_{2,L}]}{(p-1)} \\
\frac{1}{{}^0HCO_{3,L}^-} \cdot \frac{{}^1[HCO_{3,C}^-]-{}^0[HCO_{3,C}^-]}{(p-1)} \\
\frac{1}{{}^0[K_L^+]} \cdot \frac{{}^1[K_L^+]-{}^0[K_L^+]}{(p-1)} \\
\frac{1}{{}^0CO_{2,g}} \cdot \frac{{}^1[CO_{2,g}]-{}^0[CO_{2,g}^+]}{(p-1)}
\end{bmatrix} \tag{3.68}$$

Kapitel 4

Inhibition von Wachstum durch CO_2

4.1 Einführung

Der Einfluss des flüchtigen Stimulus CO_2 wird vorzugsweise in druckregulierten Umgebungen mit definierter Gasatmosphäre analysiert. Vorangegangene publizierte Studien zeigen eine höhere Sensitivität von Hefen für CO_2 unter aeroben Bedingungen [9]. Auf eine Beeinträchtigung der mitochondriellen Respiration durch CO_2/HCO_3^- wurde daher häufig hingewiesen [9, 180, 347]. CO_2-sensitive Stoffwechselzustände sind demnach bei respirativem und respiro-fermentativem Metabolismus gegeben. CO_2 und HCO_3^- sind Inhibitoren und Aktivatoren zahlreicher Enzyme des Citratzyklus (TCC) und der mitochondriellen Atmungskette (MRC) [180]. Aber die Liste der möglichen Wechselwirkungen von CO_2/HCO_3^- mit zellulären Strukturen und Mechanismen ist umfangreich und zum Teil auch widersprüchlich.
Fest steht, dass sich die biochemische Leistungsfähigkeit eines Organismus durch die CO_2-Belastung seiner Umgebung verändert. Eine Beeinträchtigung der Produktsynthese durch CO_2 kann daher während des *scale up* von Prozessen auftreten, sobald die Konzentration des gelösten CO_2 steigt. Ist bekannt, ab wann und warum Beeinträchtigungen auftreten, können Grenzwerte eingehalten werden. Die Problematik wird dadurch kalkulierbar.
Im Idealfall kann CO_2 zur Rentabilität einer Prozessstrategie beitragen. Die Produktion von Succinat beispielsweise wird durch die Anwesenheit von CO_2 unterstützt, wenn die Medienzusammensetzung auf die Bedingungen abgestimmt ist. Supplemente wie Ca^{2+} beeinflussen dabei die Produktsynthese in CO_2-angereichertem Medium in relevantem Ausmaß [465, 464].
Ein verbreitetes Produktionsverfahren ist der *batch*-Prozess. Der absatzweise Prozess ist einfach und ermöglicht unlimitiertes Wachstum unter aeroben, mikroaeroben und anaeroben Bedingungen. Das Wachstum von CEN.PK113-7D auf Glukose im *batch* unter aeroben Bedingungen mit drei CO_2 Belastungen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

4.2 Einfluss von CO_2 im *batch*-Prozess

Während einer ersten exponentiellen Wachstumsphase erfolgt das respiro-fermentative Wachstum auf Glukose und die Synthese von Ethanol. Der metabolische Zustand wird geprägt durch das Verhältnis der Substrataufnahme zur mitochondriellen Endoxidation. Ist die Kapazität der Substrataufnahme größer als die der Endoxidation wird Ethanol gebildet. Einer Übergangs- oder *lag*-Phase folgt eine zweite exponentielle Wachstumsphase auf Ethanol, die nicht Teil des Experimentes ist.

Das exponentielle Wachstum auf Glukose wurde bei der Anwesenheit verschiedener CO_2-Gehalte im Zuluftstrom (0%, 20%, 50%) beobachtet, um die vielfach in der Literatur beschriebene Beeinträchtigung der Wachstumsgeschwindigkeit µund der Wachstumseffizienz Y_{XS}) durch die Anwesenheit von CO_2 unter definierten Laborbedingungen zu messen.
Stündlich wurden während der Prozesse die Konzentration der Biomasse, Glukose, organische Säuren und Alkohole im Prozessüberstand bestimmt. Der Gesamtkohlenstoff (TC: *Total Carbon*) und der anorganische Kohlenstoff (TIC: *Total Inorganic Carbon*) in Suspension wurden gaschromatographisch bestimmt und aus der Differenz der Gehalt des organischen Kohlenstoffs (TOC: *Total Organic Carbon*) abgeleitet.
Der Reaktor bildet das Bilanzsystem des zum Zeitpunkt Null vorhandenen organischen Kohlenstoffs (TOC_0) und der Wiederfindung des verbliebenen Kohlenstoffs (TOC_{1-12}) im späteren Verlauf. Die Differenz hat den Reaktor als volatiler Kohlenstoff in Form von CO_2^{out} verlassen.

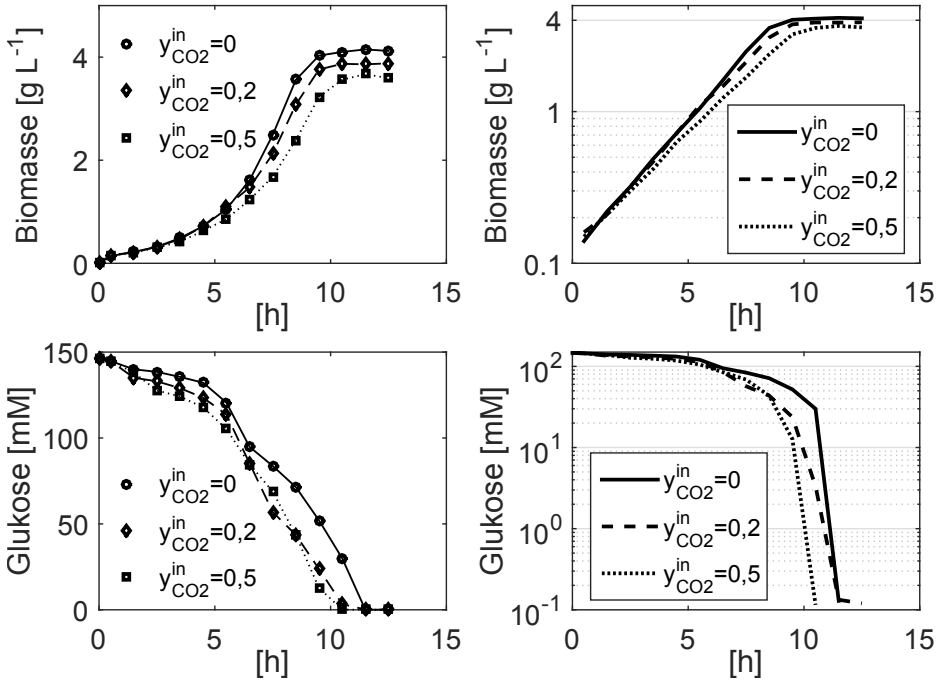


ABBILDUNG 4.1: Einfluss des CO_2-Gehalts (y^{in}_{CO2}: 0, 0,2, 0,5) in der Zuluft auf den Verlauf der Biomassekonzentration (oben) und der Glukosekonzentration (unten) in aerober *batch*-Fermentation.

Der TOC entspricht zu allen Zeitpunkten der Summe des Kohlenstoffs in Biomasse und Überstand. Kohlenstoffhaltige Edukte und Produkte wurden messtechnisch erfasst und ihre Summe C mit dem TOC verglichen. Der CO_2-Anteil im Zuluftstrom y^{in}_{CO2} wird als inerter Kohlenstoff betrachtet.
Die Verteilung des Kohlenstoffs in der Biomasse, dem Überstand und der Anteil an volatilem C verändert sich über die Prozesszeit und mit dem CO_2-Anteil im Zuluftstrom (y^{in}_{CO2}). 50% CO_2-Anteil y^{in}_{CO2}=0,5 reduziert die maximale Wachstumsrate μ^{max} von 0,4 h^{-1} auf 0,35 h^{-1} und die Biomasse-Substrat-Ausbeute Y_{XS} von 0,16 g_{DW} g^{-1}_{Glk} auf 0,14 g_{DW} g^{-1}_{Glk}. Die spezifische Glukoseaufnahmerate $q_{Glukose}$ wurde im Mittel von 0,57 g_{Glk} g^{-1}_{DW} h^{-1} auf 0,71 g_{Glk} g^{-1}_{DW} h^{-1} bei

einem absoluten CO_2-Partialdruck von 0,6 bar erhöht (Abb. 4.1, Tab. 4.1).

TABELLE 4.1: Durch den CO_2-Gehalt der Zuluft wurden erhöhte TIC-Werte in der Suspension bei den maximalen Wachstumsraten µmit linearer Regression R^2 bis 8 Stunden Prozesszeit und abschließender Biomasse-Substrat-Ausbeute Y_{XS} erreicht.

y^{in}_{CO2} [-]	µ [h^{-1}]	R^2 [-]	Y_{XS} [g g^{-1}]	TIC [mM]
0	0,404	0,999	0,16	-
0,2	0,377	0,998	0,15	16,0±2,5
0,5	0,345	0,999	0,14	25,3±1,4

Zum Prozessende wurde durch die Anwesenheit des CO_2 mehr Ethanol (50 mM), Acetat (5 mM) und Succinat (0,2 mM) gebildet (Abb. 4.2). Die Konzentrationsverläufe von Glycerol und Laktat wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (Abs. 3.12.3; $p \leq 0{,}05$). In der Biomassesuspension lag die Konzentration des anorganischen Kohlenstoffs TIC mit 16 mM (y^{in}_{CO2}=0,2) und 25 mM (y^{in}_{CO2}=0,5) deutlich über der nach Henry geschätzten Konzentration für die Phasengrenzfläche (c^{*}_{CO2}; Gl. B.6) (Abb. 4.2).

Bei volatilem Kohlenstoff handelt es sich um CO_2 (>99%, $p^{D}_{CO2} = 5,73 \cdot 10^6$ Pa [262]) mit geringen Anteilen flüchtigen Ethanols (<1%, $p^{D}_{C2H6O} = 5,8 \cdot 10^3$ Pa [262]). Ein hoher TIC führte zu deutlich weniger volatilem CO_2 (Abb. 4.3).

Ein Vergleich des organischen Kohlenstoffgehalts (TOC) mit der Summe des Kohlenstoffs aus Biomasse (26,4 g_{DW} mol_C^{-1} [212]), Glukose (180,16 g mol_{6C}^{-1}), Ethanol (46,07 g mol_{2C}^{-1}), Acetat (60,05 g mol_{2C}^{-1}), Glycerol (92,09 g mol_{3C}^{-1}), Lactat (90,08 g mol_{3C}^{-1}) und Succinat (118,09 g mol_{4C}^{-1}) stimmt meist überein. Die Verteilung des Kohlenstoffs auf Glukose, Biomasse und Produkte des fermentativen Metabolismus ist schlüssig.

Die Konzentrationsverläufe von Ethanol, Acetat, Glycerol, Lactat und Succinat zeigen fermentativen Stoffwechsel in den ersten ein bis zwei Stunden Prozesszeit. Unabhängig vom CO_2-Anteil der Zuluft kommt es zum erneuten Rückgang von Ethanol, Aceatat, Lactat und Succinat, was vor dem Hintergrund der Katabolitrepression nicht unbedingt schlüssig ist. Diauxisches Wachstum tritt bei *S. cerevisiae* bei geringer Glukoseverfügbarkeit auf, die über 100 mM. nicht gegeben ist. Da der weitere Wachstumsverlauf keine Limitierungen zeigt, muss die Aussage der Messung an dieser Stelle unbegründet bleiben.

Deutlich wird eine Umstellung des Metabolismus beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase (Abb. 4.1). Mit zunehmender Limitierung von Glukose wird die Bildung von Ethanol, Glycerol, Lactat und Succinat eingestellt (Abb. 4.2). Der TIC sinkt dabei um etwa 10%. Die Bildung von Acetat bleibt bei hohem CO_2-Anteil der Zuluft bestehen.

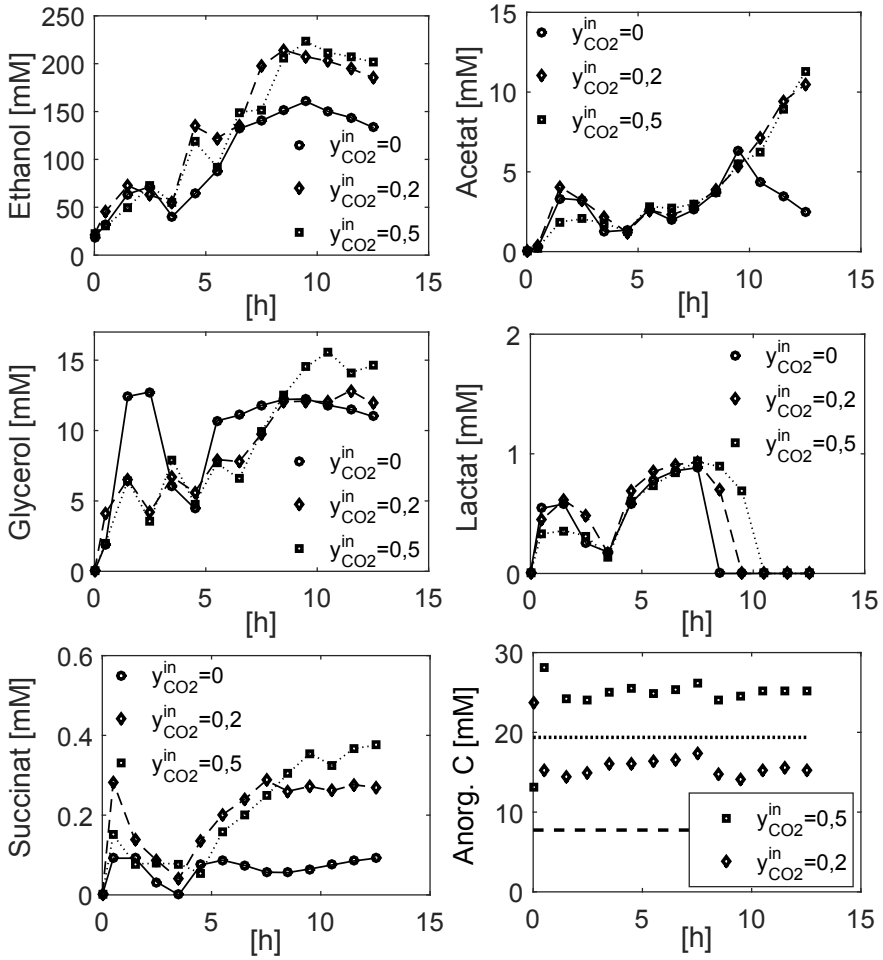


ABBILDUNG 4.2: Konzentrationen der Produkte Ethanol, Acetat, Glycerol, Lactat und Succinat über die Prozesszeit unter aeroben unlimitierten Bedingungen bei y^{in}_{CO2} von 0, 0,2 und 0,5 in der Zuluft. Anorgan. C (TIC) der Suspension bei y^{in}_{CO2} von 0,2 und 0,5 bei einem absoluten Druck von 1,2 bar. Linien zeigen das theoretische c^{*}_{CO2} bei 30°C in H_2O (Gl. B.6; $K_{H_{CO2(30)}} = 0,0294\ M_{CO2}bar^{-1}$).

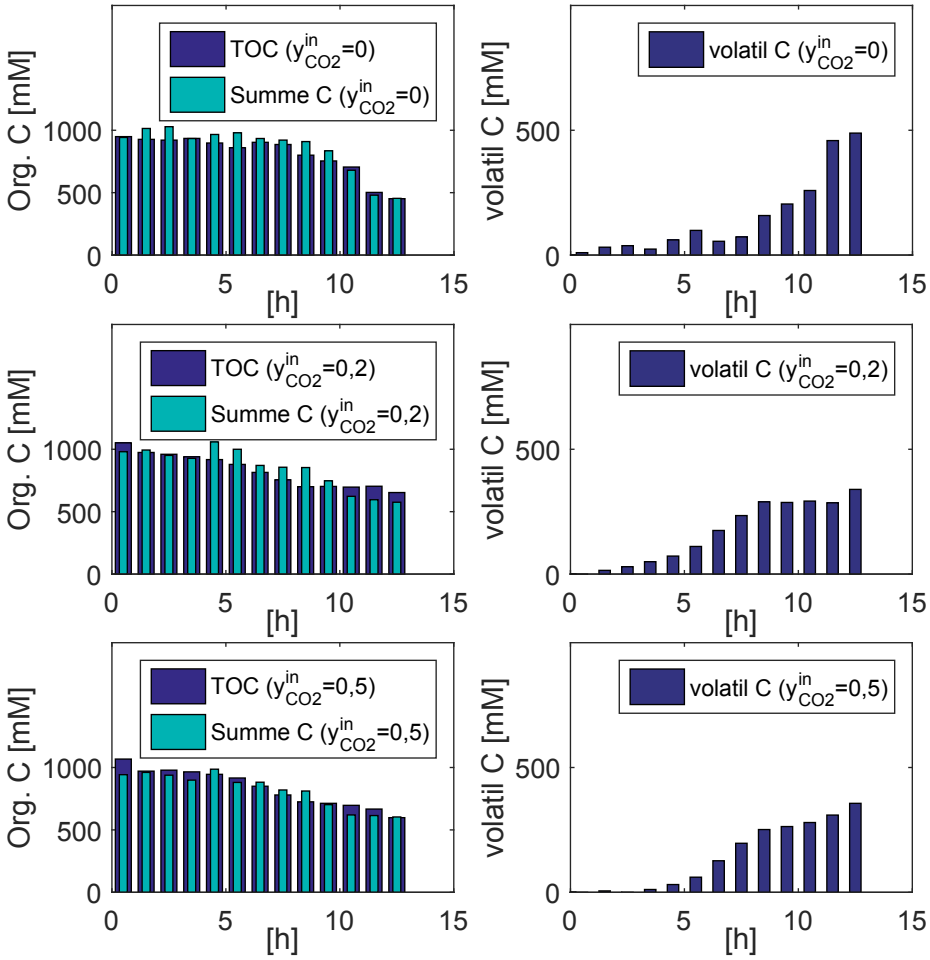


ABBILDUNG 4.3: Bilanz des Kohlenstoffs (Org. C) als TOC (Abs. 3.10.1) und als Summe in gelösten Komponenten (HPLC: Abs. 3.10.3) und der Biomasse (Abs. 3.7.2) unter areoben unlimitierten Bedingungen bei y^{in}_{CO2} von 0 (oben), 0,2 (mitte) und 0,5 (unten) in der Zuluft (links). Die Summe des ausgetragenen Kohlenstoffs (volatile C) ergibt sich aus der Differenz des TOC zum Zeitpunkt Null mit dem TOC zur jeweiligen Prozesszeit (rechts).

Die maximale Wachstumsgeschwindigkeit von *S. cerevisiae* auf Mineralmedium beträgt 0,4 g_{DW} $g_{DW}^{-1}h^{-1}$. Dabei besteht eine Balance zwischen Katabolismus und Anabolismus. Bei geringer CO_2-Belastung ist die Glukoseaufnahme und damit die katabole Aktivität geringer als bei hoher CO_2-Belastung. Der Anabolismus limitiert gegenüber dem Katabolismus. CO_2 erhöht die katabole Aktivität und senkt die Wachstumsrate. Bei Stoffmengenanteilen von 0,2 und 0,5 CO_2 in der Zuluft können die Glukoseaufnahme oder nachgeschaltete katabole Prozesse die Wachstumsrate limitieren, während die anabole Leistung unter ihrem Maximum bleibt.
Der Rückgang von Y_{XS} resultiert aus der durch CO_2 verursachten Verlagerung von respirativem auf fermentativen Metabolismus. Steigender Energiebedarf ist aus diesem Experiment nicht abzuleiten. Für eine eingehendere Betrachtung sind präzisere Daten erforderlich.

Kapitel 5

Transduktion eines (physiologischen) Signals durch CO_2-Gas

5.1 Einleitung

In Kapitel 4 wurde deutlich, dass Glukose mit geringen Mengen Ethanol, Acetat, Laktat und Succinat als Kohlenstoffquelle von der Hefe aufgenommen wurde. Die Katabolitrepression durch Glukose war demnach nicht absolut. Das komplexere Verhalten des respiro-fermentativen Metabolismus von *S. cerevisiae* im *batch*-Prozess benötigt für eine Interpretation daher mehr Messwerte. Das erhöht die mögliche Varianz in der Gesamtbilanz eines Prozesses wenn Messungenauigkeiten berücksichtigt werden. Ein ausschließlich respirativer Metabolismus bei Glukoselimitierung (q_{Glc}<3 $mmol_{Glc}$ $g_{DW}^{-1}h^{-1}$) vermeidet Nebenprodukte und erlaubt daher eine präzisere Bilanzierung und Interpretation. Unter den Zulaufverfahren *chemostat* und *fed-batch* liefert der *chemostat* präzisere Ergebnisse, da die Anzahl der notwendigen Messdaten zur Bilanzierung von Raten auf ein Minimum reduziert wird.
Im Fließgleichgewicht des *chemostat* wurde der CO_2-Anteil des Zuluftstroms erhöht um eine CO_2-Konzentration bei hohen hydrostatischen Drücken in großen Bioreaktoren zu simulieren. Dabei war die physiologisch wirksamen Menge anhand der *batch*-Prozesse und früherer Studien abzuschätzen. Die Belastung der Zelle mit CO_2 und HCO_3^- wurde mithilfe bekannter physikalischer und chemischer Parameter bestimmt. Dabei wurden zahlreiche Einflussfaktoren zu einem Modell von Reaktor und Zelllumen kombiniert.

5.2 Modellvalidierung

Das Gleichgewicht von CO_2 und HCO_3^- ist pH-abhängig. Der zelluläre pH-Wert ist eine Grundvoraussetzung für enzymatische Katalysen, Proteinglykosylierung und Zellteilung [300] und daher ein streng regulierter Parameter. Stoff- und Ladungstrennung an selektiven Membranen werden durch elektrochemische Potentiale erzeugt. Protonengradienten werden durch aktiven Transport über die Periplasma- und die innere Mitochondrienmembran aufrechterhalten.
Die Regulation des zellulären pH-Werts, der Kalium-Homöostase und zahlreicher weiterer Transportvorgänge sind in Hefe indirekt miteinander gekoppelt. CO_2 nimmt daher Einfluss auf den Ladungstransport und die elektrochemischen Potentiale an Membranen. Zahlreiche Studien zum zellulären pH [300], der zellulären Pufferung [33, 335], des Kalium-Transports und der

-Homöostase [239, 183], der Regulation bei osmotischem Stress [201, 189] und der metabolischen Regulation ausgelöst durch CO_2 [347] haben zahlreiche CO_2-relevante Wechselwirkungen beschrieben.
Im systembiologischen Zyklus aus Prognose, experimenteller Validierung und Modellentwicklung stehen die Simulationsergebnisse sowohl als Prognose als auch zur Validierung erhobener Daten zur Verfügung. Es erfolgt ein fortwährender Abgleich zwischen den Daten der experimentellen Messung und der Approximation durch mathematische Beschreibung. Die Beschreibung des Sachverhalts durch prädiktive Simulation ist dabei Bestandteil des wissenschaftlichen Erkenntnisgewinns.

5.2.1 Dynamik der Transportbilanz zwischen Gas- und Flüssigphase

Die Modellentwicklung begann daher mit der mathematischen Beschreibung des ideal durchmischten Bilanzraums (Abb. 5.1). Erhöht sich der CO_2-Anteil an der Begasung von 0 auf 50%, dauert es theoretisch vier Minuten bis die Sättigung der Gasphase über der Biosuspension eintritt. Das Modell simuliert den CO_2-Anstieg inklusive der Verzögerungen, die bei der Sättigung der Biosuspension auftreten. Ein experimentelles Design in Abhängigkeit von den Einflussgrößen c_x, D, pH des Mediums und y_{CO2} der Gasphase wurde damit im Vorfeld erstellt. Ziel war das experimentelle Design und die Beschreibung eines CO_2-*shift*-Experiments. Der Organismus sollte dabei durch CO_2 aus dem metabolischen Gleichgewicht eines respirativen Stoffwechsels ausgelenkt werden und durch eigene Regulation in das Fließgleichgewicht eines respirativen Metabolismus zurückkehren.

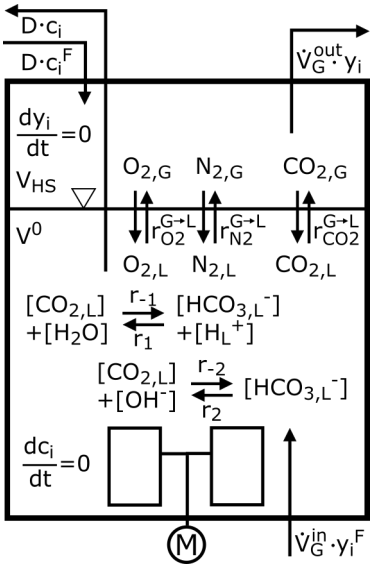


ABBILDUNG 5.1: Schema eines ideal durchmischten 3-L-Bioreaktors, der in kontinuierlichem (*chemostat*)-Modus mit einer Durchflussrate von D (h^{-1}) arbeitet. Dargestellt sind die Volumina der Flüssigreaktion (V_{LR}, *volume of liquid reaction*) und der Gasphase (V_{GR}, *volume of gasreaction*). Der eingehende Gasstrom ist dargestellt als (L h^{-1}) und besteht aus den molaren Fraktionen y für CO_2, O_2 und N_2. Wie gezeigt wird, sind die Gaskomponenten [$O_{2,g}$], [$N_{2,g}$] und [$CO_{2,g}$] über individuelle Austauschraten r eng mit ihren gelösten Anteilen verbunden. Für pH 5 (kontrolliert in der Fermentation) ist das Gleichgewicht für die CO_2-Dissoziation ebenfalls angegeben.

Der Massentransfer zwischen Gas- und Flüssigphase ist in Abbildung 5.1 illustriert. Wie gezeigt, wurden die chemischen Gleichgewichte beider Phasen über den Austausch von Gas gekoppelt. Der Bicarbonatgehalt (ODE 5.6) war vom pH-Wert der Flüssigphase abhängig. Wenn eine Base (z.B. HPO_4^{2-}) Protonen absorbierte, beeinflusste das auch das H_2CO_3-HCO_3^--Verhältnis. Die Pufferkapazität β_{HPO4} wurde daher berücksichtigt. Die zelluläre Phase agierte durch den Transport von Protonen ebenfalls als Puffer (Abb. 5.2).

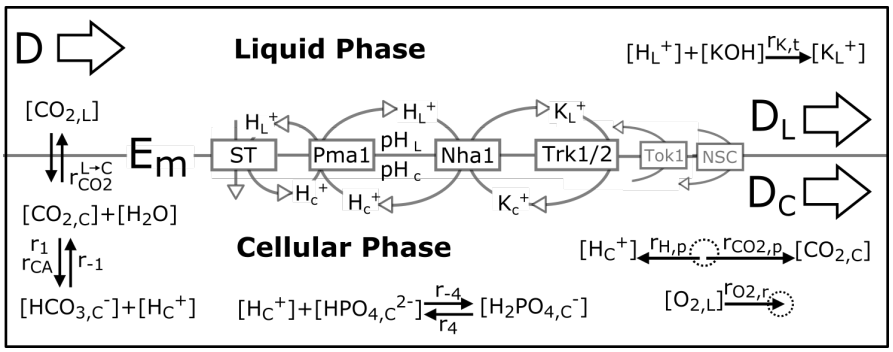


ABBILDUNG 5.2: Überblick eines ausbalanzierten Massentransfers und den Gleichgewichtsmechanismen an der Phasengrenze von Medium (Phase L) und Zelle (Phase C). Hefezellen wurden in einem *steady state* bei einer Wachstumsrate D kultiviert, die in D_L (Flüssigphase, *liquid phase*) und D_C (Zellphase, *cellular phase*) aufgeteilt werden kann. CO_2 diffundiert in die Zellphase und dissoziiert wie angegeben. Die Transporter ST, Pma1, Nha1, Trk1,2, Tok1 und NSC transportieren Ionen zwischen der Flüssig- und der Zellphase (Details siehe Text). Außerdem wird die zelluläre Pufferung durch $[HPO_{4,c}^2]$ und $[H_2PO_{4,c}]$ angegeben. $r_{H,p}$ und $r_{CO2,p}$ stellen die Produktion von Protonen und CO_2 durch metabolische Aktivität dar, die als durchgehend konstant angenommen wurde.

Da der Organismus bei respirativem Metabolismus CO_2 und Protonen produziert, wurden in der finalen Version des Modells diese Raten berücksichtigt. Der Gasaustausch der Zelle (r_{O2} und r_{CO2}), der Protonen- (r_{Pma1}, r_{ST}, r_{Nha1}) und der Kaliumtransport ($r_{Trk1,2}$, r_{Nha1}, r_{Tok1} und r_{NSC}) über die Zelloberfläche wurden für ein sich mit D ständig erneuerndes Zelllumen bilanziert. Die Reaktionsparameter wurden an den Salzgehalt von Medium und Zelllumen angepasst. Die aktive zelluläre Konzentration von CO_2 und HCO_3^- wurde damit bilanziert. Als Berechnungsgrundlage dienten biomassespezifische Aufnahme- bzw. Abgaberaten für CO_2, O_2, H^+ und Biomasse (D) (Kapitel 6). Die Wiederfindung des limitierten Kohlenstoffs entspracht etwa 1,02±0,05. Für CEN.PK 113-7D wurde die von Lange u. a. 2001 publizierten wachstumsratenspezifischen Elementar- und Biomassezusammensetzungen angenommen (Apx. C) [212].

Um das Modell des Massentransfers zwischen Gas- und Flüssigphase zu validieren, wurden CO_2 und O_2 in der Gasphase G (ODE 5.1 bis 5.3) und in der Flüssigphase L (ODE 5.4 bis 5.9) bilanziert. Der pH-Wert der flüssigen Phase $[H_L^+]$ wurde simuliert und mit Experimentaldaten verglichen (Abb. 5.3). Gegenübergestellt wurden CO_2 und O_2 in der Abluft und der pH-Wert der Flüssigphase während des Wechsels der Begasung mit Luft auf ein Gasgemisch mit hohem CO_2-Anteil (50% CO_2, 21% O_2 und 29% N_2). Die Studie wurde an (A) Phosphatpuffer (200 mM) und (B) ruhender Hefekultur (11 $g_{DW}L^{-1}$) in Medium ohne Kohlenstoffquelle durchgeführt. Die Biosuspension (B) setzt sich aus einem Volumen von 1,4 L mit pH 5 und einem

Zellvolumen 0,1 L mit pH 6 zusammen. pH-Wert [H^+_C] sowie die Pufferkapazität wurden durch [$HPO^{2-}_{4,C}$] und [$H_2PO^-_{4,C}$] berücksichtigt (ODE 5.5, 5.12, 5.14 und 5.15).

$$\frac{d[CO_{2,g}]}{dt} = \frac{p_0 T_R}{p_R T_0}\frac{1}{V_{GR}}\left(\dot{V}_g^{in}[CO_{2,g}^{in}] - \dot{V}_g^{out}[CO_{2,g}]\right) - r_{CO2}^{G\to L} \quad (5.1)$$

$$\frac{d[O_{2,g}]}{dt} = \frac{p_0 T_R}{p_R T_0}\frac{1}{V_{GR}}\left(\dot{V}_g^{in}[O_{2,g}^{in}] - \dot{V}_g^{out}[O_{2,g}]\right) - r_{O2}^{G\to L} \quad (5.2)$$

$$\frac{d[N_{2,g}]}{dt} = \frac{p_0 T_R}{p_R T_0}\frac{1}{V_{GR}}\left(\dot{V}_g^{in}[N_{2,g}^{in}] - \dot{V}_g^{out}[N_{2,g}]\right) - r_{N2}^{G\to L} \quad (5.3)$$

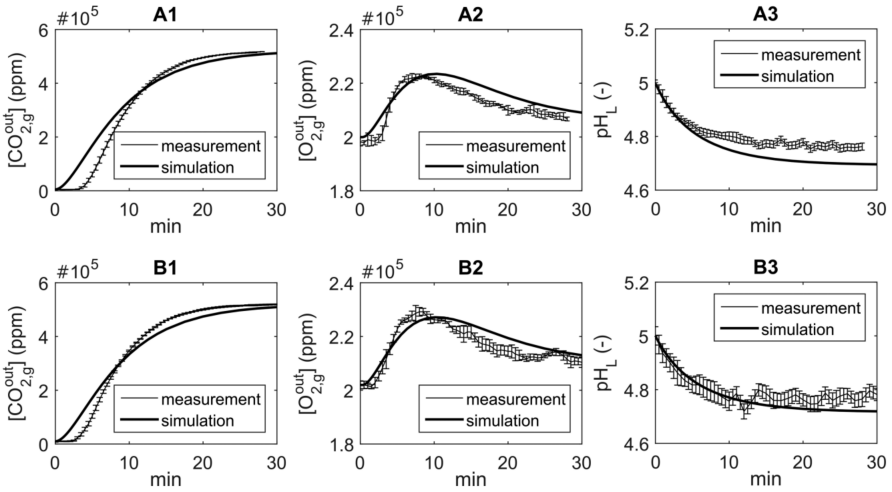


ABBILDUNG 5.3: Gemessene und simulierte Dynamiken von gasförmigem (1) [$CO^{out}_{2,g}$], (2) [$O^{out}_{2,g}$] und (3) flüssigem pH_L in einem gut durchmischten Bioreaktor nach der Umstellung der Begasung von Umgebungsluft (0,5 vvm) auf synthetisches Gas (50% CO2, 21% O2 und 29% N2). 'A' bezieht sich auf Studien mit zellfreiem Phosphatpuffer (200 mM, 30°C, pH 5). 'B' zeigt Ergebnisse mit einer Biosuspension mit 11 g_{DW} L^1 ruhenden Zellen. Fehlerbalken zeigen die Variation zwischen fünf Replikaten.

Abbildung 5.3 zeigt einen pH-Abfall von 0,2 als Folge der CO_2-Erhöhung. Der simulierte pH-Verlauf zeigte eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Beobachtungen. Die Simulation von Medium mit ruhenden Hefezellen (Abb. 5.3.B3) erzielte dabei eine bessere Übereinstimmung als der zellfreie Phosphatpuffer (Abb. 5.3.A3).

Die Dynamik von CO_2 in der Gasphase war geringfügig schneller als das Signal am Reaktorauslass. Ursache der Diskrepanz können eine unterschätzte CO_2-Löslichkeit in der Simulation oder das verzögerte Signal des Messgeräts - z.B durch nicht berücksichtigte Volumina im Leitungssystem sein. Erwähnenswert ist hier, dass der niedrige pH das Verhältnis CO_2/HCO_3^- erhöhte. Die Pufferkapazität (β=0,03 mM) in Lösung war gering. Daher erfolgte bei CO_2-Anstieg in der Gasphase ein schneller Anstieg der Konzentration des gelösten Gases begleitet von

einem ebenso schnell sinkenden pH-Wert.

$$\frac{d[K_L^+]}{dt} = (2r_{Nha1} - r_{Trk1,2} - r_{NSC} + r_{Tok1} + r_{K,t})\frac{V_c}{V_L} + D\frac{V_L}{V_{LR}}\left([K_L^F] - [K_L^+]\right) \tag{5.4}$$

$$\frac{d[H_L^+]}{dt} = 0 \tag{5.5}$$

$$\frac{d[HCO_{3,L}^-]}{dt} = r_1 + r_2 - r_{-1} - r_{-2} + D\frac{V_L}{V_{LR}}\left([HCO_{3,L}^F] - [HCO_{3,L}^-]\right) \tag{5.6}$$

$$\frac{d[CO_{2,L}]}{dt} = r_{CO2}^{G\to L} - r_{CO2}^{L\to C}\frac{V_c}{V_L} - r_1 + r_{-1} - r_2 + r_{-2} + D\frac{V_L}{V_{LR}}\left([CO_{2,L}^F] - [CO_{2,L}]\right) \tag{5.7}$$

$$\frac{d[O_{2,L}]}{dt} = r_{O2}^{G\to L} - r_{O2,r} + D\frac{V_L}{V_{LR}}\left([O_{2,L}^F] - [O_{2,L}]\right) \tag{5.8}$$

$$\frac{d[N_{2,L}]}{dt} = r_{N2}^{G\to L} + D\frac{V_L}{V_{LR}}\left([N_{2,L}^F] - [N_{2,L}]\right) \tag{5.9}$$

$$\frac{dE_m}{dt} = \frac{FV_c}{C_m A_c} \times \left(\frac{d[H_c^+] + d[K_c^+] + d[H_2PO_{4,c}^-] - d[OH_c^-] - d[HPO_{4,c}^{2-}] - d[HCO_{3,c}^-]}{dt}\right) \tag{5.10}$$

$$\frac{d[K_c^+]}{dt} = r_{Trk1,2} + r_{NSC} - 2r_{Nha1} - r_{Tok1} - D\frac{V_c}{V_{LR}}[K_c^+] \tag{5.11}$$

$$\frac{d[H_c^+]}{dt} = r_{Pma1} + 3r_{Nha1} + r_{ST} + r_{H,p} + r_1 - r_{-1} + r_4 - r_{-4} - D\frac{V_c}{V_{LR}}[H_c^+] \tag{5.12}$$

$$\frac{d[OH_c^-]}{dt} = \frac{dH_c^+}{dt \cdot K_w} \tag{5.13}$$

$$\frac{d[HPO_{4,c}^{2-}]}{dt} = r_4 - r_{-4} \tag{5.14}$$

$$\frac{d[H_2PO_{4,c}^-]}{dt} = r_{-4} - r_4 \tag{5.15}$$

$$\frac{d[HCO_{3,c}^-]}{dt} = r_1 + r_2 - r_{-1} - r_{-2} + r_{CA} - D\frac{V_c}{V_{LR}}[HCO_{3,c}^-] \tag{5.16}$$

$$\frac{d[CO_{2,c}]}{dt} = r_{CO2}^{L\to C}\frac{V_L}{V_c} + r_{CO2,p} - r_1 + r_{-1} - r_2 + r_{-2} - D\frac{V_c}{V_{LR}}[CO_{2,c}] \tag{5.17}$$

5.2.2 Phänotyp bei hohem CO_2-Gehalt im *chemostat*

Chemostat-Kultivierungen bei Verdünnungsraten von 0,05 h^{-1} und 0,1 h^{-1} wurden mit Luft und 50% CO_2 Atmosphäre begast. Die metabolischen Aktivitäten nach fünf Verweilzeiten wurden

in den Tabellen 6.1, 5.1 und 5.2 beschrieben. Wie von Aguilera et al. 2005 beschrieben, sank die Biomassesubstratausbeute unter CO_2-Anreicherung [9]. Die Biomassespezifische Glukoseaufnahmerate ($q_{Glukose}$) und die respiratorische Aktivität (q_{O2}, q_{CO2}) erhöhten sich bei hohem CO_2-Gehalt geringfügig (Tab. 6.1). Bei beiden Verdünnungsraten wurden oszillierende Atmungsraten mit einer Periode von 70 Minuten beobachtet. Unter diesen Bedingungen war Succinat das dominante Nebenprodukt, während Acetat, Malat, Glycerol und Ethanol nicht detektiert wurden (Tab. 6.1).
Abbildung 6.2 zeigt eine signifikante Änderung der Biomassezusammensetzung im Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff (Y_{CN}) bei hohem CO_2-Gehalt (Abs. 3.12.3; $p \leq 0{,}05$). Während der ersten 3 h fiel Y_{CN} auf 6,5 und sank weiter auf 6,17 bei D=0,1 h^{-1} (Y_{CN}=0,62$\pm$0,24) und D=0,05 h^{-1} (Y_{CN}=1,19$\pm$0,05) über die Dauer von fünf Verweilzeiten. Der Ausgangswert regenerierte sich bei D=0,1 h^{-1} nach zehn Verweilzeiten. Das Ausgangsverhältnis von Y_{CN} unter kohlenstofflimitierten Wachstumsbedingungen ist typisch für den Phänotyp von CEN.PK113-7D. Y_{CN} verringerte sich mit steigender Wachstumsrate von 7,30 bei 0,05 h^{-1} auf 6,67 bei 0,1 h^{-1} und weiter zu 6,29 bei 0,23 h^{-1} (Lange und Heijnen 2001).
Außerdem erhöhte sich die biomassespezifische Protonenproduktionsrate q_{H+} bei der Verdünnungsrate 0,05 h^{-1} um 35% verglichen mit der Begasung durch Luft. Keine Veränderung von q_{H+} konnte bei 0,1 h^{-1} beobachtet werden (Tab. 6.1).
Die Energieladung des Adenosinphosphat-*pools* (EC_A) wurde während der Experimente mithilfe von *offline* Messungen überwacht. Die Quantifizierung der zellulären Adenosinphosphatgehalte ATP_C: 2,9$\pm$0,9 , ADP_C: 0,8$\pm$0,2 und AMP_C: 0,3$\pm$0,1 (µmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$) zeigte keine signifikanten Beeinträchtigungen durch die CO_2-Exposition (Abs. 3.12.3; $p \leq 0{,}05$). Eine Tendenz zu sinkenden Energieladungen konnte in Abbildung 7.4 gezeigt werden. Scheinbar wechselwirkt CO_2 mit Mechanismen der zellulären Energiebereitstellung und verursacht nach CO_2-Erhöhung sinkende Energieladungen.

5.2.3 Stationäre Bilanzierung des TIC

In wachsenden Hefe wurden Protonen und CO_2 produziert und mit der Umgebung ausgetauscht (siehe q_{H+} und q_{CO2} in Tab. 6.1). Um das vorgestellte Modell zu validieren, wurden die simulierten Werte des Gehalts an anorganischem Kohlenstoff (TIC) mit Messdaten verglichen. Der TIC-Wert repräsentierte dabei die Summe aus der $CO_{2,L}$-, $CO_{2,C}$-, $HCO_{3,L}^-$- und $HCO_{3,C}^-$-Fraktion (Gl. 3.19). Wie in Tabelle 5.1 gezeigt, wiesen gemessene TIC_{GC}- und simulierte TIC_{model}-Werte bei angereicherter CO_2-Atmosphäre eine hohe Übereinstimmung auf. Den Modellberechnungen zufolge reichern sich mehr als 30% des TIC in der Zellphase an, obwohl diese nur 6,5-7,5% des Reaktionsvolumens V_{LR} ausmacht.

5.2.4 Dynamische Ionengleichgewichte bei selektivem Membrantransport

Angetrieben durch das Membranpotential tauschten Transportsysteme Protonen und Kalium zwischen der Flüssig- und der Zellphase aus. Sogenannte *sources* und *sinks* repräsentierten die metabolischen Aktivität der Zelle mit den Raten $r_{H,p}$, $r_{CO2,p}$ und $r_{O2,p}$). Während eines *steady*

TABELLE 5.1: CO_2/HCO_3^- Gleichgewicht gemessen unter *steady-state*-Bedingungen (pH 5, 30°C, 0,5 vvm) bei unterschiedlicher CO_2-Exposition. Standardabweichungen wurden aus sechs Replikaten berechnet. TIC_{Modell} gibt die Summe aller CO_2- und HCO_3^--Fraktionen in Phase L und Phase C des simulierten *steady states*.

CO_2 inlet gas [%]	D_L [h^{-1}]	k_La_{O2} [min^{-1}]	TIC_{GC}	$CO_{2,L}$	$HCO_{3,L}^-$	$CO_{2,c}$	$HCO_{3,c}^-$	TIC_{model}
					[mM]			
0,05	0,05	12,1±0,8	4,5±0,3	0,7	0,0	3,2	23,8	2,7
50	0,05	12,1±0,8	32,4±1,1	22,5	1,5	24,0	135	33,2
0,05	0,1	14,3±0,8	6,2±0,7	1,2	0,1	6,2	49,6	5,4
50	0,1	10,8±1,6	37,7±3,3	23,0	1,6	27,0	176	37,8

states wurden alle Konzentrationen in der Flüssig- und der Zellphase durch das Zusammenwirken der Transporter ST-Pma1, Pma1-Nha1 und Nha1-Trk1,2 im Gleichgewicht gehalten (Abb. 5.2). Die Bilanzen aller Ionentransporte, der Zu- und Ablauf von H^+ und K^+ durch die Verdünnungsrate waren zu jedem Zeitpunkt geschlossen (verglichen in Tab. 5.2). Demnach konnten die Raten von r_{ST}, r_{Pma1}, r_{Nha1} und $r_{Trk1,2}$ (Tab. 5.2) aus den experimentell ermittelten Werten von q_{H+}, q_{CO2} und q_{O2} (Tab. 6.1) berechnet und die Verteilung des TIC in CO_2 und HCO_3^- simuliert werden (Tabelle 5.1).

TABELLE 5.2: Ionaustausch-Raten (r_{ST}, r_{Pma1}, $3r_{Nha1}$, $2r_{Nha1}$, $r_{Trk1,2}$), Membranpotential (E_m) und zellulares Kaliumniveau [K_c^+] berechnet für verschiedene Verdünnungsraten (D) und [$CO_{2,g}^{in}$] Konzentrationen. Die Raten $r_{CO2,p}$ and $r_{H,p}$ wurden aus den gemessenen Raten q_{CO2} and q_{H+} in Tabelle 6.1 abgeleitet. r_{ST} wurde aus der Wachstumsrate unter Rücksicht auf die Biomassezusammensetzung der Hefe berechnet. Zeile 1 bis 3 zeigt Ergebnisse von D= 0,05 h^{-1}. Zeile 1 gibt den Referenzzustand ([K_c^+]=0,28 M, pH_c=7,0 und [HPO_{4,c^2}]=45 mM). Zeile 2 zeigt den simulierten kurzzeit-*shift* nach CO_2-Exposition. Reihe 3 zeigt zelluläre Bedingungen (r_{ST}, $r_{CO2,p}$ und $r_{H,p}$) nach fünf Verweilzeiten. Analog dazu, zeigen Reihe 4 bis 6 ähnliche Änderungen für D = 0,1 h^1. Erhöhte zelluläre Pufferkapazität (90 mM*) hat in der Simulation nur geringe Auswirkungen auf das Ergebnis (Zeile 7).

CO_2 [%]	$r_{CO2,p}$	$r_{H,p}$	r_{ST}	r_{Pma1}	$r_{Nha1,H}$	$r_{Nha1,K}$	$r_{Trk1,2}$	E_m [mV]
				[mM min^{-1}]				
0,05	1,76	0,565	-1,130	2,032	-0,336	0,224	-0,242	-66
⇒ 50	1,76	0,565	-1,290	2,655	-0,792	0,528	-0,552	-99
50	2,16	0,762	-1,099	2,219	-0,348	0,232	-0,248	-63
0,05	3,06	1,302	-2,301	3,945	-0,336	0,224	-0,259	-68
⇒ 50	3,06	1,302	-2,675	4,837	-0,840	0,560	-0,610	-105
50	3,76	1,302	-2,339	4,068	-0,378	0,252	-0,289	-72
⇒ 50*	3,06	1,302	-2,675	4,781	-0,804	0,536	-0,585	-103

Die Kultur wurde dann von diesem *steady state* auf Bedingungen mit erhöhtem CO_2-Gehalt ausgelenkt. Dabei wurden Ionenkonzentrationen und Austauschraten wie in Tabelle 6.1 und 5.2 angegeben verändert. Beispielsweise wurden ein negativeres Membranpotential (-100 mV) und ein schnellerer Austausch des Kalium-*pools* durch Trk1,2 und Nha1 simuliert, als die Kultur bei D=0,05 h^{-1} mit 50% CO_2 angereichert wurde (Tab. 5.2, Zeile 1 und 2). Der Kaliumgehalt in der zellulären Phase stieg, was von einer Erhöhung der Protonen-Transportrate r_{Nha1} begleitet

wurde, was wiederum eine Erhöhung von r_{Pma1} und damit einen entsprechenden ATP-Bedarf mit sich brachte. Vermehrter Protonenexport in r_{Pma1} erhöhte die Protonenaufnahme durch r_{ST} und r_{Nha1} angetrieben durch das Membranpotential E_m. Letztendlich normalisierte sich der Energieaufwand, als das Membranpotential auf den ursprünglichen Wert zurückgesetzt wurde (Tab. 5.2, Zeile 3 und 6).

5.3 Signaltransduktion von CO_2 auf pH, Membranpotential und K^+-Transport

Die dynamischen Änderungen in den Konzentrationen, den Raten und dem Membranpotential wurden in Abbildung 5.4 dargestellt. Die Erhöhung von CO_2 in der Gasphase erzeugt eine schnelle Erhöhung der Konzentration an gelöstem CO_2 in der flüssigen Phase. Eine ähnlich schnelle Erhöhung des CO_2-Gehalte wurde für das Innere der Zelle simuliert. Dabei sorgte der extrazelluläre pH von 5 für ein hohes Verhältnis von CO_2 zu HCO_3^-. Mit dem Modell konnte bestätigt werden, dass ein hoher CO_2-Gradient zwischen extra- und intrazellulärem Milieu angelegt wurde und das Gas dabei schnell über die Membran in die Zelle diffundierte (Jones und Greenfield 1982) [180].
Einmal in der Zelle, dissoziierte CO_2 in HCO_3^- und H^+. Der Anteil der zellulären Pufferkapazität (β_{HPO4}), der nicht auf Bicarbonat basierte, kompensierte 4,4% der entstehenden Protonen. Als Folge fiel der intrazelluläre pH-Wert innerhalb von 10 Minuten um 0,25 Einheiten ($\Delta[H_C^+]$ 125 nM) (siehe Abb. 5.4.C4).
Die zelluläre Antwort, um bei steigendem CO_2-Gehalt das System wieder ins Gleichgewicht zu bringen, konnte in drei Schritte gegliedert werden:

I Innerhalb der ersten 2 min: Die schnelle Aufnahme gelösten CO_2 verursachte eine eben so schnelle Depolarisation des Membranpotentials E_m (Abb. 5.4.C3. Aufgrund der steigenden H^+-Konzentration erhöhte sich E_m in den ersten 120 s (siehe Gl. 5.10), was einer Erhöhung von 1,35 C der positiven Absolutladung entsprach.

II Zwischen 2 und 10 min: Nach 5 min kehrt E_m durch die Aufnahme von Kaliumionen auf ein negatives physiologisches Niveau zurück. Zur gleichen Zeit war der pH bereits um 0,15 Einheiten gefallen und damit die Nährstoffaufnahme durch den Symport mit Protonen (r_{ST}) verlangsamt. Pma1 wurde aktiviert (Abb. 5.4.C12) und die Exportrate von 4 mM min^{-1} (oder 1,6 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$ im Referenzzustand auf 175% erhöht, was Kosten von einem ATP pro Proton verursacht. Zusätzliche 2,8 mmolATP $g_{DW}^{-1}h^{-1}$ waren notwendig um das Absinken des pH-Werts unter 6,8 zu verhindern. 10 min nach Atmosphärenwechsel war damit eine maximale Auslenkung erreicht (Abb. 5.4.C8).

III Nach 10 min: Trk1,2, das Hauptsystem zur zellulären Kaliumaufnahme, zog K^+-Ionen beinahe äquimolar zur Erhöhung des zellulären HCO_3^--Gehalts [$HCO_{3,C}^-$] in die Zelle und brachte E_m ins Gleichgewicht. Ein neuer *steady state* war nach 60 min bei einem negativeren E_m erreicht. Die neue Bedingung erhöhte die K^+-Aufnahme durch Trk1,2 (Abb. 5.4.C10) und seine Abgabe über Nha1 (Abb. 5.4.C11) dauerhaft.

Aufgrund der langsamen Hydratisierung von CO_2 prognostizierte die Simulation das Erreichen eines neuen *steady states* (Tab. 5.2, Zeile 2 und 6) nach 120 min. Die Bedingungen für ein neues Gleichgewicht wurden durch die Erhöhung von $[CO_{2,C}]$ (1 auf 23 mM), $[HCO^-_{3,C}]$ (50 auf 176 mM) und $[K^+_C]$ (280 auf 380 mM) bei pH 6,95 und einem Membranpotential von -100 mV definiert.

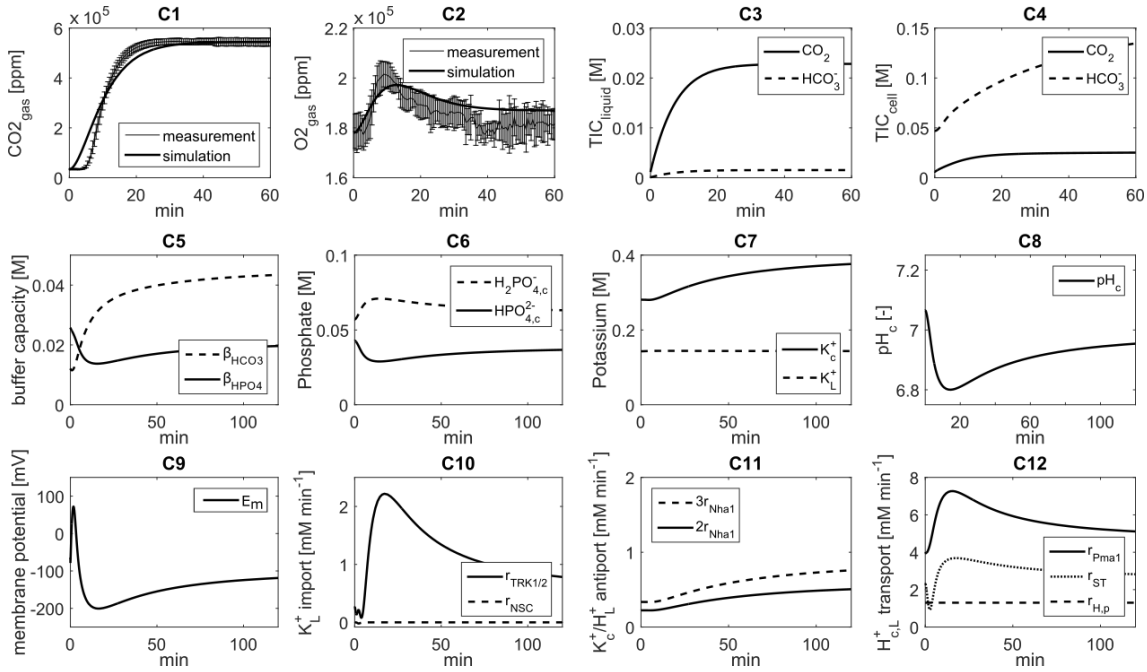


ABBILDUNG 5.4: *Saccharomyces cerevisiae* kultiviert im *steady state* (D=0,1 h^{-1}, $[K^+_C]$=0,28 M, pH_C=7,05, β_{HPO4}=26 mM, E_m=-70 mV) mit der metabolischen Aktivität q_{CO2}, q_{O2} und q_{H+} wurde mit 50% CO_2 begast. Die zelluläre Dynamik von $[CO_{2,C}]$ und $[HCO^-_{3,C}]$, Pufferkapazitäten β_{HPO4}, β_{HCO3}, pH_C, Membranpotential E_m, Transportaktivitäten (Trk1,2, NSC, Tok1, Nha1, Pma1, ST), metabolische Aktivität $r_{H,p}$ und $[K^+_C]$ sind dargestellt. Die Dynamiken der Konzentration in Flüssigkeit $[CO_{2,L}]$, $[HCO^-_{3,L}]$ und $[K^+_L]$ werden gezeigt. Messung und Simulation von $[CO^{out}_{2,g}]$ und $[O^{out}_{2,g}]$ sind ebenfalls gegeben.

5.4 Sensitivitätsanalyse des Modells

Um die Zusammenhänge zwischen zeitinvarianten Koeffizienten (Parametern), abhängigen und unabhängigen Variablen näher zu beschreiben, wurde eine lineare Sensitivitätsanalyse durchgeführt. Die Transportfunktionen von $[H^+]$ (Pma1, ST [189] und Nha1) und $[K^+]$ (Trk1,2 [289], Nha1 [21], Tok1 [240] und NSC [189]) eigneten sich, den pH-Wert und das Membranpotential der zellulären Phase bei der Erhöhung des CO_2-Gehalts zu stabilisieren. Das Verhalten beim Übergang vom Reaktions- bzw. Transportgleichgewicht wurde durch die identifizierten Parameter (zeitinvariante Koeffizienten) beschrieben (siehe Gl. 5.18 und 5.19).

$$\frac{d[H^+_C]}{dt} = f_{(k^+_{Pma1},k^+_{ST},k^+_{Nha1})} = 0 \tag{5.18}$$

$$\frac{d[K^+_C]}{dt} = f_{(k^+_{Nha1},k^+_{Trk1,2},P_{s,Tok1},k_{NSC})} = 0 \tag{5.19}$$

Die Trivial-Lösung für Gleichungen 5.18 und 5.19 – kein Austausch von Ionen über die Phasengrenze – wurde bereits durch die Startwertbedingung der unabhängigen Variable $r_{H,p}$ und der abhängigen Variable E_m ausgeschlossen (Gl. 5.20 und 5.21).

$$r_{H,p} > 0 \quad \Rightarrow \quad r_{Pma1} > 0 \tag{5.20}$$

$$E_m^2 > 0 \quad \Rightarrow \quad r_{Trk1,2} > 0 \tag{5.21}$$

Die Sensitivität S von 130 Abhängigkeiten zwischen 13 Variablen und 10 Parametern im Modell wurde kalkuliert (siehe Abs. 3.13.3). Tabelle 5.3 zeigt eine Übersicht der (in)sensitiven Korrelationen in Graustufen schattiert. Korrelationen mit einem Übersetzungsgrad kleiner 10% ($|O|$<0,1) wurden als gering eingeschätzt, während ausgeprägte Korrelationen ab 30% ($|O|$>0,3) als relevant erachtet werden.

Wie bereits erwähnt, waren die berechneten Gleichgewichte stabil gegenüber den Änderungen der Parameter k_{NSC} und $P_{s,Tok1}$ (Tab. 5.3, Spalte 10 und 11). Diese hatten damit keinen Einfluss auf das Resultat der Simulation.

Die Korrelation von y^{in}_{CO2} mit allen untersuchten Variablen war ebenfalls schwach ausgeprägt. Ursache für die geringe Sensitivität ist die Übersetzung zwischen Gasphase in Anteilen pro Million und der Flüssigphase in Mol pro Liter (Tab. 5.3, Spalte 4). Deutlich sensitiver reagierte das Modell auf CO_2 welches in der Zelle entstand (Tab. 5.3, Spalte 3). Dabei reagierte der Bicarbonatgehalt der Zelle [$HCO^-_{2,C}$] mit einem Wirkungsgrad von 0,97. Der Kaliumgehalt [K^+_C] gleicht negative Ladung über den Kalium-Importer ($r_{Trk1,2}$) aus, was auch die Exportrate (r_{Nha1}) veränderte. Der zelluläre pH-Wert [H^+_C] und der Protonentransport (r_{Pma1} und r_{ST}) zeigten hingegen nur ein schwaches Antwortverhalten.

Der pH-Wert der Flüssigkeit [H^+_L] war positiv mit dem zellulären pH und E_m korreliert, was den Protonentransport in beide Richtungen erhöhte. Geringerer pH und geringeres Membranpotential senkten [$HCO^-_{3,C}$] und [K^+_C], während die zellulären Austauschraten stiegen (Tab. 5.3, Spalte 1).

Auf vermehrte Produktion von Protonen ($r_{H,p}$) reagierten der zelluläre pH [H^+_C] und r_{Pma1} positiv. [K^+_C] verringerte sich und der Austausch von Kalium mit der Flüssigphase ging zurück. Der zelluläre pH sank von 7,0 auf 6,9 und schwächte damit den Protonengradienten der Periplasmamembran. Extrazelluläres Kalium stieg aufgrund der Titration von Protonen durch KOH (Tab. 5.3, Spalte 2).

Die Erhöhung des Parameters k_{ST^+} erhöhte den Transport von H^+ über die Membran, senkte [K^+_C] und den Transport von K^+ über die Membran, da dadurch E_m gesenkt wurde. Eine Erhöhung von k^+_{Pma1} depolarisierte E_m und hatte dadurch den gegenteiligen Effekt auf zelluläres Kalium wie der Parameter k_{ST^+} (Tab. 5.3, Spalte 5 und 6).

Mit der Erhöhung von k^+_{Nha1} kam es ebenfalls zur Depolarisation der Membran, somit weniger [K^+_C], aber zu höheren Transportraten. [$CO_{2,C}$] und [$HCO^-_{3,C}$] verringerten sich durch das Reaktionsgleichgewicht mit [H^+_C] durch die Senkung des zellulären pH-Werts. Erhöhte sich der pH-Wert wie bei der Anhebung von $k^+_{Trk1,2}$, stieg der Gehalt anorganischen Kohlenstoffs in Form von CO_2 und HCO^-_3. Negativeres Membranpotential erhöhte die Menge zellulärer Kaliumionen sowie deren Austausch mit der Flüssigphase (Tab. 5.3, Spalte 7 und 8).

Besonders die Sensitivität des zellulären Kaliumgehalts für die Anzahl der Protonenpumpen, repräsentiert durch k^{+}_{Pma1}, war überraschend hoch. Es zeigte, wie ein hoher zellulärer pH-Wert die Bicarbonatkonzentration erhöhte und dessen negative Ladung durch K^+ kompensierte. Ein gegenteiliger Effekt entstand bei einem geringen extrazellulären pH-Wert. Dieser senkte die Bicarbonatkonzentration und damit auch der zelluläre Kaliumgehalt. Es zeigte sich eine enge Kopplung zwischen Kationen und Anionen in der zellulären Phase.

TABELLE 5.3: Die Sensitivität der Variablen (Spalte 1) gegenüber den Parametern (Zeile 1) des Modells gibt Art (Anstieg >0; Absenkung <0) und Intensität (stark $|O|$>0,3; schwach $|O|$<0,1) ihrer Kopplung an.

	$[H^+_L]$	$r_{H,p}$	$r_{CO2,p}$	y^{in}_{CO2}	k^+_{ST}	k^+_{Pma1}	k^+_{Nha1}	$k^+_{Trk1,2}$	k_{NSC}	$P_{s,Tok1}$
$[H^+_C]$	0,45	0,27	0,09	0,00	0,45	-0,81	0,16	-0,05	0,03	0,00
E_m	0,88	-0,26	0,10	0,00	-0,42	0,48	0,28	-0,55	-0,07	-0,07
$[CO_{2,C}]$	-0,29	-0,16	0,12	0,00	-0,28	0,42	-0,09	0,03	-0,01	-0,01
$[HCO^-_{3,C}]$	-0,67	-0,33	0,97	0,00	-0,65	1,17	-0,17	0,17	0,05	0,05
$[K^+_C]$	-1,10	-0,53	0,93	0,00	-1,07	1,87	-0,26	0,29	0,09	0,09
r_{ST}	0,41	-0,11	0,04	0,00	0,83	0,30	0,10	-0,17	0,00	0,00
r_{Pma1}	0,43	0,24	0,06	0,00	0,42	0,28	0,13	-0,08	0,00	0,00
r_{Nha1}	2,13	-0,45	0,36	0,00	-0,79	1,16	0,79	0,12	0,00	-0,01
$r_{Trk1/2}$	1,80	-0,39	0,35	0,00	-0,71	1,04	0,67	0,12	-0,01	-0,01
$[CO_{2,L}]$	0,06	0,00	0,96	0,02	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
$[HCO^-_{3,L}]$	-1,05	0,05	1,04	0,02	0,05	0,06	0,05	0,06	0,05	0,05
$[K^+_L]$	-0,06	0,31	-0,07	0,00	-0,07	-0,07	-0,07	-0,07	-0,06	-0,07
$[CO_{2,g}]$	0,00	0,00	0,94	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

5.5 Transkriptionelle Regulation von Transportern und Kanälen

Die Modellvorhersage prognostizierte eine maximale Ansäuerung der zellulären Phase nach 10 min und eine schnelle Anreicherung des Anions HCO^-_3 ($\Delta[HCO^-_{3,c}]$>2 mM min^{-1}) innerhalb einer Stunde. Daher wurde die Genexpression des Organismus unmittelbar vor dem Wechsel zu 50%iger CO_2-Atmosphäre (t_0), nach 10 min (t_{10}), 30 min (t_{30}) und 60 min (t_{60}) der Anwesenheit von CO_2 verglichen. Das Expressionsprofil nach fünf (D=0,05 h^{-1}) und zehn (D=0,1 h^{-1}) Verweilzeiten (100 h) mit konstanter CO_2-Belastung der Kulturen schloss das Experiment ab. Im genannten Zeitraum wurde nach Anzeichen transkriptioneller Änderung bei Transportern, Kanälen und Effektoren gesucht, die auf Veränderungen im Membrantransport hinweisen sollten.

Die differentielle Genexpression DGE der Transporter Pma1p, Trk1p, Trk2p und Nha1p in der Plasmamembran erreichte das Niveau einer signifikanten Änderung ($|\log_2 FC|$>0,6) meist nicht (Tab. 5.4). Eine Ausnahme bildeten die Gene PMA1 und TRK2. Tendentiell verdoppelt sich die Expression von PMA1, während die von TRK2 um die Hälfte reprimiert wurde. TRK1, NHA1 und ENA1 (Na^+-ATPase) zeigten keine signifikante Änderung ihrer Expression. Auch Gene, die für Ionentransporter an intrazellulären Membranen kodieren - Kha1p (K^+/H^+-Antiporter; Golgi), Nhx1p (Na^+/H^+ bzw. K^+/H^+-Antiporter; Vakuole und Endosomen), Vnx1p (Ca^{2+}/H^+-Antiporter; ER), Vhc1p (Na^+/Cl^- bzw. K^+/Cl^--Symport; Vakuole) und Vcx1p (Ca^{2+}/H^+ bzw.

K^+/H^+-Antiport; Vakuole) - zeigten geringe Veränderungen ihrer Expressionsniveaus. Die Untereinheiten der vakuolären H^+-ATPase (Vma1p, Vma7p, Vph1p, Stv1p) zeigten eine temporäre Induktion ihrer Expressionsniveaus (Tab. 5.4). Offensichtlich wurden die meisten genannten Transporter während des Experiments nicht oder nur bedingt durch ihre transkriptionelle Expression reguliert.

Die Gene mehrerer regulatorischer Proteine der plasmamembranständigen H^+-ATPase (Hsp30p, Mrh1p, Yck1p/2p und Ptk2p) zeigten ausgeprägtere DGE als das Gen PMA1. Die Expression des Pma1p-Inhibitors Hsp30p wurde deutlich und dauerhaft reprimiert, was eine Aktivierung von Pma1p durch zelluläre Kohlenhydrate ermöglichte (Tab. 5.4). Die Repression von HSP30 unterschied die zelluläre Antwort auf erhöhte CO_2-Gehalte von der Antwort auf Hitze-, Osmo- und WOA-Stress bei denen HSP30 Piper u. a. zufolge induziert wurde [327]. Die DGE der Casein Kinase I (Yck1p/2p) zur Anpassung des K_m-Werts von Pma1p für ATP war gering. Eine Regulation der Stabilität von Yck1p/2p erfolgt durch Sod1p [345]. Das kodierende Gen SOD1 wurde transkriptionell reprimiert. Auslöser dafür könnte ein Sauerstoff- oder Glukose-Signal gewesen sein. Glukose ist außerdem ein Aktivator für Pma1p [379] und stand intrazellulär trotz der Glukoselimitierung bei t_{10-30} höchstwahrscheinlich in ausrechender Menge zur Verfügung (siehe Kapitel 6). Der C-Terminus von Ptk2p vermittelt die glukoseabhängige Aktivierung von Pma1p durch Phosphorylierung am Pma1p-Ser^{899} [96]. CO_2 reprimierte PTK2 (t_{10-30}). Zusammen mit Ptk2p wurde auf transkriptioneller Ebene PMP3 reprimiert und SKY1 induziert. Die Proteinkinase Sky1p und das Membranprotein Pmp3p wurden bereits von Forment u. a. 2002 mit dem K^+-Transport durch Trk1p/2p, mit Salztoleranz gegenüber Li^+ und Na^+ und mit Änderungen des Membranpotentials in Verbindung gebracht [106]. Ppz1p und Ppz2p sind Phosphatasen, die bei Salzstress über das Trk1,2p-Transportsystem auf den zellulären K^+-Gehalt und den zellulären pH wirken [260, 362]. Ein CO_2-Anstieg führte zur Induktion von PPZ1 und der Repression von PPZ2.

Die Regulation des zellulären pH durch Pma1p und der Kaliumhomöostase durch Trk1,2p wird bei CO_2-*shift* aktiviert. Die Regulation findet transkriptionell und posttranslational durch die DGE regulatorischer Proteine wie Hsp30p statt. Es gibt Hinweise auf eine Co-Regulation von Pma1p mit der respiratorischen Aktivität bei Anwesenheit von Sauerstoff und Glukose durch Yck1,2p und Sod1p [345]. Außerdem erfolgt eine Co-Regulation mit der Kalium-Homöostase durch Trk1,2p mittels der Phosphatasen Ppz1p und Ppz2p [260, 362]. Die Regulation von Pma1p bei CO_2-*shift* ist qualitativ verschieden zur Regulation die bei Osmo- und WOA-Stress erfolgt [327].

Die Regulation der Plasmamembran H^+-ATPase-Aktivität und der vakuolären H^+-ATPase-Aktivität unterlagen wahrscheinlich einer Co-Regulation, die sowohl den vakuolären pH als auch die cytosolische Pufferkapazität reguliert. Hsp30p, Vhc3p und Btn2p waren möglicherweise an einer Co-Regulation der Ionenhomöostase beteiligt [52]. Tripel-defiziente Deletionsstämme hatten in anderen Studien sowohl eine hohe Pma1p- als auch eine hohe V-ATPase-Aktivität [52]. Alle drei Gene wurden beim Anstieg von CO_2 reprimiert. Bemerkenswert war die Induktion von VPH1, während STV1 reprimiert wurde. Vph1p ist die Untereinheit der vakuolären V_0-Einheit der V-ATPase, während Stv1p die Isoform in der V-ATPase im Golgi und den Endosomen gibt. Die gegenläufige Expression der beiden Gene könnte auf eine vermehrte

TABELLE 5.4: Die differentielle Genexpression DGE zellulärer Ionentransporter und regulatorischer Proteine zu den Zeitpunkten t_{10}, t_{30}, t_{60} und *steady state* t_∞ jeweils verglichen mit t_0. Eine signifikante DGE (grau) ist mit $|\log_2 FC|>0,6$ und $p<0,05$ gegeben. Die Standardabweichung resultiert aus vier unabhängigen Kultivierungen (D=0,1 h^{-1} und D=0,05 h^{-1}) mit je zwei biologischen Replikaten.

Gen	Sys. Name	$\log_2 FC_{10}$	$\log_2 FC_{30}$	$\log_2 FC_{60}$	$\log_2 FC_\infty$
PMA1	YGL008C	0,9±0,4	1,1±0,6	0,4±0,2	0,8±0,3
TRK1	YJL129C	0,4±0,2	0,3±0,2	0,2±0,1	0,3±0,2
TRK2	YKR050W	-0,8±0,1	-0,8±0,1	-0,7±0,3	-0,2±0,3
NHA1	YLR138W	0,2±0,1	0,3±0,2	-0,2±0,2	-0,3±0,2
ENA1	YDR040C	-2,0±0,3	-1,9±0,3	-1,9±0,1	-0,3±1,1
KHA1	YJL094C	-0,6±0,1	-0,5±0,1	-0,2±0,1	0,2±0,2
NHX1	YDR456W	-0,5±0,1	-0,2±0,2	0,6±0,1	0,2±0,1
VNX1	YNL321W	-1,1±0,2	-0,7±0,2	0,1±0,2	0,2±0,6
VCX1	YDL128W	-0,3±0,2	0,0±0,3	-0,1±0,2	0,0±0,4
VHC1	YBR235W	-0,5±0,1	-0,4±0,2	0,2±0,2	0,4±0,2
VMA1	YDL185W	0,9±0,2	0,3±0,2	0,3±0,1	0,2±0,1
VMA7	YGR020C	0,5±0,1	0,9±0,2	0,6±0,2	0,0±0,3
VPH1	YOR270C	1,3±0,2	0,8±0,2	0,5±0,1	0,3±0,2
STV1	YMR054W	-0,6±0,1	0,1±0,1	0,8±0,1	0,6±0,1
HAL1	YPR005C	-1,5±0,2	-0,8±0,2	-0,3±0,1	0,4±0,1
PHO91	YNR013C	1,6±0,5	0,9±0,5	0,2±0,2	0,5±0,3
SNA2	YDR525W-A	-0,6±0,2	-1,0±0,4	-0,7±0,2	-1,0±0,2
HSP30	YCR021C	-2,5±0,7	-1,9±1,0	-0,4±0,8	-3,7±1,0
YRO2	YBR054W	-0,9±0,2	-0,1±0,3	0,1±0,6	-2,2±0,5
MRH1	YDR033W	1,0±0,2	1,2±0,6	1,7±0,3	1,1±0,4
YCK2	YNL154C	0,7±0,2	1,0±0,3	0,4±0,2	0,3±0,2
SOD1	YJR104C	-1,3±0,3	-1,3±0,4	-0,2±0,2	-0,5±0,6
PPZ1	YML016C	0,5±0,1	0,9±0,1	0,5±0,1	0,3±0,1
PPZ2	YDR436W	-1,5±0,1	-0,8±0,1	-0,1±0,2	-0,2±0,3
PTK2	YJR059W	-1,5±0,1	-0,6±0,2	0,4±0,1	0,4±0,2
SKY1	YMR216C	1,3±0,4	0,6±0,2	0,4±0,2	0,4±0,1
PMP2	YEL017C-A	0,8±0,4	1,5±0,4	1,1±0,3	0,6±0,6
PMP3	YDR276C	-0,8±0,2	-1,0±0,4	-0,1±0,2	-0,2±0,5
	YHL008C	0,0±0,4	1,0±0,1	1,4±0,2	0,7±0,3
ATC1	YDR184C	2,4±0,4	1,8±0,6	0,1±0,4	0,3±0,2
YHC3	YJL059W	-1,4±0,3	-0,3±0,3	0,2±0,2	-0,3±0,1
BTN2	YGR142W	-1,4±0,5	-1,4±0,9	-0,8±0,3	-0,6±0,5

Präsenz der V-ATPase in der vakuolären Membran hindeuten.

Weitere regulatorische Mechanismen wären mit der physischen Interaktion des Transporters Nha1p mit Hsp30p und Hog1p gegeben [337]. YHL008C war an der Aktivierung von hochaffienen Cl^--Transportern bei Konzentrationen unter 1 mM beteiligt [176]. Überexpression von ATC1 verhinderte einen kationensensitiven Phänotyp in calzineurindefizienten Zellen und war damit an der Kationen-Homöostase beteiligt [154]. Die Transkription beider regulatorischer Gene wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten als Antwort auf hohe CO_2-Gehalte induziert.

Die folgenden Transporter nutzen den Protonengradienten der Plasmamembran für den Im-

und Export von Acetat und Glycerol (Tab. 5.5). Der Monocarboxylat-Transporter Aqr1p (H^+-Antiporter) aus der DHA1-Transporterfamilie wird von der Zelle auch zum Export von Acetat verwendet (siehe Kapitel 6). Der Monocarboxylat-Transporter Jen1p (H^+-Symporter) und der Glycerol-Transporter Stl1p (H^+-Symporter) werden durch Glukose reprimiert und damit die Aufnahme von Acetat und Glycerol [48, 105]. Ihre basalen Expressionsniveaus unter glukoselimitierten Bedingungen waren mit mehr als 1000 CPM mindestens sechs mal höher als der Durchschnitt. Das Membranprotein Mrh1p wurde bei hohem CO_2-Gehalt vermehrt transkribiert. Es interagiert mit dem Pma1p-Repressor Hsp30p und ist an der Resistenz gegenüber Acetat beteiligt.
Die Gene MCH1-5 haben Homologien mit Monocarboxylate-Permeasen in Säugerzellen, transportieren diese aber nicht. Bei Mch5p handelt es sich um einen Riboflavin-Transporter. Das Vitamin (B2) ist nicht Bestandteil des Mediums. Die DGE von MCH5 bei steigendem CO_2-Gehalt ist ein Signal für den Bedarf an Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadeninedinukleotid (FAD). FMN und FAD sind Co-Faktoren der mitochondriellen Elektronentransportkette (MRC).

TABELLE 5.5: Die differentielle Genexpression DGE von Transportern und regulatorischer Proteine zu den Zeitpunkten t_{10}, t_{30}, t_{60} und *steady state* t_∞ jeweils verglichen mit t_0. Eine signifikante DGE (grau) ist mit $|\log_2 FC|>0{,}6$ und $p<0{,}05$ gegeben. Die Standardabweichung resultiert aus vier unabhängigen Kultivierungen (D=0,1 h^{-1} und D=0,05 h^{-1}) mit je zwei biologischen Replikaten.

Gen	**Sys. Name**	**$\log_2 FC_{10}$**	**$\log_2 FC_{30}$**	**$\log_2 FC_{60}$**	**$\log_2 FC_\infty$**
AQR1	YNL065W	4,7±0,4	1,8±0,6	1,0±0,4	0,2±0,7
STL1	YDR536W	-5,2±0,3	-4,6±0,2	-3,0±0,5	0,5±0,9
JEN1	YKL217W	-4,4±0,3	-3,6±0,2	-2,3±0,7	-1,1±1,6
MCH4	YOL119C	-0,6±0,1	-0,2±0,2	-0,3±0,1	-0,7±0,1
MCH5	YOR306C	2,8±0,5	1,1±0,3	0,0±0,1	-0,5±0,3

Ionenkanäle sind wie reine Ionentransporter meist konstitutiv exprimiert. Ob ein Kanal in geöffnetem oder geschlossenem Zustand vorliegt, ist bei spannungsabhängigen Kanälen wie Tok1p vom Potential der Membran abhängig (siehe Anhang B). In der Simulation des CO_2-*shift* herrschten zu keinem Zeitpunkt Bedingungen, die zum Export von Kalium durch Tok1p geführt hätten. Transkriptionell wurde der Kanal bei steigendem CO_2-Gehalt kurzzeitig reprimiert. Gleichzeitig reprimiert wurde außerdem YVC1, welches für einen Ca^{2+}-Kanal zum vakuolären Export bei hyperosmotischem Schock kodiert (Tab. 5.6). Über die Potentialdifferenz zwischen Cytosol und Vakuole bei steigendem CO_2-Gehalt könnte an dieser Stelle nur spekuliert werden. Dehnungs- und spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle in der Plasmamembran (Cch1p) und dem endoplasmatischen Retikulum (Mid1p) zeigten keine DGE. Selbes galt für einen spannungsabhängigen Cl^--Kanal des Golgi-Apparats (Gef1p).

Eine deutliche DGE zeigten regulatorische Proteine des Aquaglyceroporins Fps1p. Fps1p exportiert Glycerol und importiert Acetat. Beides hilft der Regeneration von NAD^+ im Cytosol und damit dem Ausgleich der Redox-Bilanz bei NADH-Überproduktion. Die Phosphorylierung des Kanals durch Ypk1/2p führt zu seiner Öffnung. Die Phosphorylierung durch Hog1p

TABELLE 5.6: Die differentielle Genexpression DGE zellulärer Ionenkanäle und regulatorischer Proteine zu den Zeitpunkten t_{10}, t_{30}, t_{60} und *steady state* t_∞ jeweils verglichen mit t_0. Eine signifikante DGE (grau) ist mit $|\log_2 FC|>0{,}6$ und $p<0{,}05$ gegeben. Die Standardabweichung resultiert aus vier unabhängigen Kultivierungen (D=0,1 h^{-1} und D=0,05 h^{-1}) mit je zwei biologischen Replikaten.

Gen	Sys. Name	$\log_2 FC_{10}$	$\log_2 FC_{30}$	$\log_2 FC_{60}$	$\log_2 FC_\infty$
YVC1	YOR087W	-0,9±0,2	-0,9±0,1	0,0±0,1	0,1±0,3
TOK1	YJL093C	-0,7±0,1	-0,4±0,2	-0,1±0,1	-0,2±0,1
CCH1	YGR217W	0,5±0,1	0,5±0,2	0,1±0,1	0,3±0,1
MID1	YNL291C	0,2±0,2	0,4±0,2	0,5±0,1	0,3±0,1
GEF1	YJR040W	0,0±0,3	-0,5±0,1	0,1±0,1	-0,2±0,1
FPS1	YLL043W	-0,1±0,2	0,0±0,3	0,0±0,2	-0,2±0,4
ASK10	YGR097W	1,0±0,2	0,7±0,1	0,2±0,2	-0,4±0,4
RGC1	YPR115W	-0,7±0,1	-0,6±0,3	0,1±0,1	0,1±0,1
HOG1	YLR113W	1,1±0,3	0,9±0,2	1,0±0,2	0,8±0,3
YPK1	YKL126W	-0,7±0,1	0,1±0,2	0,5±0,1	0,2±0,2
YPK2	YMR104C	-1,6±0,3	-0,8±0,1	-0,7±0,1	-0,5±0,5
AQY1	YPR192W	-1,5±0,2	-2,0±1,0	-1,1±0,7	-1,5±0,8
AQY2	YLL052C	0,6±0,2	1,0±0,3	0,5±0,3	-1,1±0,6
AQY3	YFL054C	-2,1±0,3	-1,2±0,4	-0,3±0,3	-0,5±0,4

schließt Fps1p bei hohen extrazellulären Acetatgehalten und die Phosphorylierung von Fps1p-assoziiertem Ask10p durch Hog1p schließt Fps1p bei osmotischem Stress (extrazelluläre Hyperosmolarität). Ask10p dissoziiert und bildet ein Dimer mit Rgc1p. Durch CO_2 wurde ASK10 transkriptionell induziert, während RGC1 und YPK1/2 vorübergehend reprimiert wurden (Tab. 5.6). Über wenige Minuten konnte die Abgabe von Glycerol ins Medium detektiert werden. Der Export war gering, erreichte 20-30 µmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$ und wurde abrupt abgebrochen (siehe Kapitel 6). YPK1/2 wurden nach dem Wechsel zu CO_2 transkriptionell reprimiert, während Hog1 induziert wurde. Die Indizien deuteten auf einen Rückgang der Glycerolsynthese und die Schließung von Fps1p hin. Tatsächlich erfolgte bei CO_2-Einfluss eine Repression der Glycerol-3-Phosphat-DH (Gpd1; EC 1.1.1.8). Die Reaktion der Zelle passte qualitativ zum simulierten zellulären HCO_3^--Gehalt, welcher den osmotischen Druck in der Zelle gegenüber dem umgebenden Medium erhöht.

AQY1 kodiert in CEN.PK 113-7D für ein funktionales Aquaporin in der Plasmamembran, während AQY3 in der vakuolären Membran lokalisiert wurde. AQY1/3 wurden reprimiert (Tab. 5.6). AQY2 bildet nicht in allen Hefestämmen einen funktionales Porin.

Beim Eindringen von CO_2 in die Zelle könnten zumindest zwei Parameter, die der zellulären Regulation unterliegen, verändert worden sein. Zum einen drohte der zelluläre pH-Wert durch die Entstehung von HCO_3^- abzusinken. Der Transport von Protonen wurde induziert und der Repressor der H^+-ATPase Pma1p (Hsp30p) dauerhaft reprimiert. Außerdem erhöht HCO_3^- den osmotischen Druck in der Zelle und störte das Ladungsgleichgewicht. Der Transport von Ionen konnte daher auf vielfältige Weise ausgelenkt werden. Bei der Produktion von Glycerol und der Regulation von Aquaporinen handelte es sich wahrscheinlich um Maßnahmen zur Anpassung des Wasserhaushalts innerhalb der Zelle. Die Expression einiger membranständiger Proteine

ließ sich mit den Mechanismen der mitochondriellen Energiesynthese in Verbindung bringen. Dazu wurde im folgenden Abschnitt die Expression von Genen betrachtet, auf deren mRNA-Niveau *S. cerevisiae* bereits bei geringer Erhöhung sensitiv reagiert.

5.6 Transkriptionelle Regulation dosissensitiver Gene

Die Anpassung des Ionen- und Stofftransports konnte als Maßnahmenpaket zur Stabilisierung des pH_C und des elektrischen sowie osmotischen Potentials der Zelle erklärt werden. Sinkende cytosolische pH-Werte können ein Grund für sinkende Wachstumsraten sein [301]. Die maximale Wachstumsrate konnte in Gegenwart von 16 mM und 25 mM TIC_{GC} nicht aufrecht erhalten werden (Tab. 4.1). Die gewählten Durchflussraten (0,1 h^{-1} und 0,05 h^{-1}) waren im *chemostat* daher bewusst gering zu halten. Der pH_C konnte hier offensichtlich von der Zelle auf einem für die Wachstumsrate 0,1 h^{-1} ausreichenden Niveau gehalten werden. Es stellt sich die Frage, ob neben dem Ionengleichgewicht weitere Effekte durch CO_2 auftraten, die die Wachstumsrate beeinträchtigt haben könnten.
Die Überexpression eines Gens führt bei *S. cerevisiae* bei 15% der Gene zu reduziertem Wachstum [389]. 2013 identifizierten Makanae et al. 786 Gene, deren Überexpression bereits bei niedrigen Stückzahlen ihrer mRNA zu Wachstumseinbußen führt [245].
Ein Abgleich dieser Gene mit dem Muster der DGE bei CO_2-Belastung ergab, dass 69 dieser Gene bei mindestens einem Zeitpunkt CO_2-responsiv waren (Tabelle 5.6). Aus 69 Genen wurden nur 11 Gene permanent induziert und 15 reprimiert. Da im statistischen Mittel einer hypergeometrischen Verteilung eine Identifizierung von etwa 100 dosissensitiven Genen erwartet werden könnte, war ihre DGE mit 26 identifizierten Genen statistisch unterrepräsentiert. Andererseits konnte diesen 26 mit hoher Wahrscheinlichkeit eine physiologische Relevanz zugesprochen werden, da bekanntlich bereits geringe Änderungen ihrer mRNA-Gehalte das Wachstum beeinträchtigen [245].

TABELLE 5.7: Die differentielle Genexpression DGE dosissensitiver Gene DSGs zu den Zeitpunkten t_{10}, t_{30}, t_{60} und *steady state* t_∞, jeweils verglichen mit t_0. Eine signifikante DGE (grau) ist mit $|\log_2 FC|>0{,}6$ und $p<0{,}05$ gegeben. Die Standardabweichung resultiert aus vier unabhängigen Kultivierungen (D=0,1 h^{-1} und D=0,05 h^{-1}) mit je zwei biologischen Replikaten. * Deletionsmutante zeigt auffälligen cytosolischen pH-Wert [301]. **) Deletionsmutante zeigt auffälligen vacuolären pH-Wert [36].

Gen	Sys. Name	$\log_2 FC_{10}$	$\log_2 FC_{30}$	$\log_2 FC_{60}$	$\log_2 FC_\infty$
ACO1	YLR304C	-0,4±0,3	1,3±0,3	2,1±0,2	1,2±0,2
AFT1	YGL071W	0,2±0,2	0,6±0,2	1,1±0,1	1,3±0,4
APE3	YBR286W	-0,8±0,1	-1,5±0,2	-1,1±0,1	-1,1±0,7
ARF2	YDL137W	-0,9±0,2	-1,2±0,3	-0,2±0,1	-0,2±0,2
BGL2	YGR282C	-0,2±0,1	0,1±0,1	0,0±0,1	-1,0±0,3
BMH2	YDR099W	-1,0±0,1	-1,1±0,2	-0,2±0,1	-0,3±0,2
CHO1	YER026C	-0,9±0,1	-0,9±0,0	-0,8±0,2	-0,4±0,4
EFT1	YOR133W	0,5±0,2	0,9±0,2	0,3±0,2	0,3±0,2

Fortsetzung

Tabelle 5.7 – *Fortsetzung*

Gen	Sys. Name	$\log_2$FC$_{10}$	$\log_2$FC$_{30}$	$\log_2$FC$_{60}$	$\log_2$FC$_{\infty}$
EFT2	YDR385W	0,9±0,1	1,1±0,2	0,2±0,1	0,3±0,1
ERG2	YMR202W	-0,4±0,2	-0,5±0,3	-0,6±0,5	-1,0±0,4
ERG25	YGR060W	-0,5±0,3	-1,9±0,4	-3,1±0,6	-2,8±0,5
ERG28*	YER044C	-0,5±0,3	-1,1±0,3	-0,4±0,3	-1,2±0,4
ERG6**	YML008C	-1,1±0,1	-2,1±0,2	-2,2±0,2	-1,6±0,8
ERV29	YGR284C	-0,8±0,1	-1,5±0,3	-0,5±0,1	-0,5±0,2
GAS1	YMR307W	1,3±0,4	1,4±0,5	0,7±0,3	0,7±0,5
GIC2	YDR309C	0,9±0,3	2,0±0,3	1,9±0,5	2,3±0,6
GSP1	YLR293C	1,7±0,4	1,5±0,5	0,6±0,3	0,5±0,3
KAP123	YER110C	1,4±0,2	1,1±0,4	-0,6±0,2	0,4±0,1
MPC2	YHR162W	0,9±0,3	0,5±0,4	0,2±0,3	0,6±0,2
MSC1	YML128C	-2,4±0,4	-4,2±1,0	-1,9±0,6	-3,0±0,5
MYO4	YAL029C	1,6±0,4	0,5±0,3	0,5±0,1	0,8±0,1
NCE102	YPR149W	-1,9±0,4	-2,8±0,7	-1,6±0,2	-1,7±0,6
NDE1	YMR145C	0,2±0,1	0,7±0,2	1,1±0,2	0,8±0,3
NSR1	YGR159C	3,4±0,3	1,6±0,8	-0,5±0,5	-0,1±0,3
OM14	YBR230C	-1,8±0,1	-1,6±0,3	-0,6±0,4	-0,2±0,3
PEF1	YGR058W	0,6±0,3	0,8±0,2	0,8±0,2	0,9±0,1
PEP4	YPL154C	-1,6±0,2	-1,8±0,4	-0,4±0,2	-0,9±0,1
PET9	YBL030C	0,0±0,2	1,1±0,4	1,7±0,4	0,9±0,2
PIL1	YGR086C	-1,8±0,2	-3,4±0,6	-1,9±0,3	-0,8±0,4
PMP2	YEL017C-A	0,8±0,4	1,5±0,4	1,1±0,3	0,6±0,6
PMP3	YDR276C	-0,8±0,2	-1,0±0,4	-0,1±0,2	-0,2±0,5
POR1	YNL055C	-1,0±0,2	-0,4±0,4	0,6±0,1	0,8±0,2
PRB1	YEL060C	-1,5±0,2	-1,8±0,3	-0,7±0,2	-0,2±0,5
PSE1	YMR308C	1,6±0,3	1,3±0,4	0,4±0,2	0,4±0,2
RPL15A	YLR029C	1,0±0,2	1,0±0,3	-0,1±0,2	-0,1±0,1
RPL9A	YGL147C	1,3±0,3	1,5±0,5	-0,6±0,4	-0,6±0,3
SOK1	YDR006C	1,4±0,3	0,4±0,3	0,2±0,2	0,2±0,3
SSE1	YPL106C	0,8±0,2	0,5±0,3	0,7±0,1	0,2±0,3
STE12	YHR084W	0,6±0,3	0,8±0,2	0,5±0,4	0,6±0,3
ELO3	YLR372W	1,1±0,2	1,3±0,4	0,0±0,3	0,2±0,2
TDH3	YGR192C	-1,1±0,5	-1,7±1,0	-0,4±0,6	-0,9±0,1
TEF1	YPR080W	1,4±0,1	1,2±0,4	0,1±0,2	0,6±0,4
TIF4631	YGR162W	1,7±0,2	1,4±0,3	0,2±0,1	0,5±0,1
TOM20	YGR082W	0,0±0,2	0,4±0,1	0,8±0,2	0,5±0,2
TOM40	YMR203W	-0,3±0,1	-0,1±0,2	0,6±0,2	0,7±0,1
TOM70	YNL121C	-0,4±0,2	0,0±0,3	0,9±0,1	0,9±0,2
TPK1	YJL164C	-3,2±0,5	-1,8±0,9	-0,4±0,7	-1,2±0,5

Fortsetzung

Tabelle 5.7 – *Fortsetzung*

Gen	Sys. Name	$\log_2$FC$_{10}$	$\log_2$FC$_{30}$	$\log_2$FC$_{60}$	$\log_2$FC$_{\infty}$
TPK2	YPL203W	-2,0±0,2	-1,7±0,6	-0,1±0,3	-0,5±0,1
TPK3	YKL166C	1,0±0,4	1,1±0,5	0,3±0,4	0,4±0,3
XDJ1	YLR090W	-0,3±0,2	0,4±0,1	1,0±0,2	0,5±0,2
YRB1	YDR002W	1,5±0,3	1,4±0,3	0,5±0,2	0,1±0,2
AIM19	YIL087C	-1,6±0,3	-1,8±0,5	-0,7±0,1	-1,0±0,2
BTN2	YGR142W	-1,4±0,5	-1,4±0,9	-0,8±0,3	-0,6±0,5
CDC48	YDL126C	-0,8±0,2	-1,2±0,4	-0,1±0,2	-0,1±0,1
CDC53	YDL132W	-1,2±0,1	-1,2±0,4	-0,3±0,3	-0,3±0,1
CTR1	YPR124W	-0,2±0,2	1,0±0,2	1,8±0,2	0,9±0,5
FAR1	YJL157C	0,6±0,2	1,1±0,2	1,0±0,2	1,0±0,4
FCP1	YMR277W	1,0±0,2	1,0±0,3	0,6±0,2	0,7±0,2
HMS1	YOR032C	-0,5±0,1	-1,1±0,4	-0,9±0,3	-1,0±0,3
HSL1	YKL101W	-0,2±0,1	0,4±0,1	0,5±0,1	0,7±0,2
HTA1	YDR225W	-1,0±0,2	-1,6±0,1	-1,7±0,2	-0,8±0,2
ODC1	YPL134C	-0,6±0,1	-0,3±0,2	0,6±0,3	1,0±0,2
PDE2	YOR360C	3,1±0,6	1,3±0,3	1,0±0,3	0,8±0,3
SNC1	YAL030W	-1,6±0,1	-1,6±0,3	-0,6±0,1	-0,6±0,3
SOK2	YMR016C	1,2±0,4	0,9±0,2	1,0±0,3	0,1±0,4
SOL4	YGR248W	-2,8±0,5	-3,4±0,9	-1,0±0,6	-2,4±0,4
UBP10	YNL186W	1,4±0,3	0,8±0,3	0,0±0,2	0,4±0,2
UPC2	YDR213W	0,7±0,3	-0,5±0,4	-1,4±0,4	-1,0±0,1
XBP1	YIL101C	-2,4±0,3	-2,4±0,4	-1,4±0,1	-0,7±0,4

Es wurden nur Gene betrachtet, die dauerhaft mindestens eine Verdopplung ihres Expressionsniveaus abzüglich ihrer Standardabweichung zeigten. Diese Gene (ACO1, AFT1, GIC2, MYO4, PEF1, PET9, POR1, TOM40, TOM70, FAR1 und ODC1) kodieren für ein katalytisches Enzym des TCC (Aco1p), einen Transkriptionsfaktor (Aft1p), mitochondrielle Membranproteine (Pet9p, Por1p, Tom40p, Tom70p, Odc1p), Effektoren der Actinstruktur (Gic2p, Myo4p, Pef1p), und einen Effektor des Zellzyklus (Far1p).

Die Aconitase (Aco1p: EC 4.2.1.3) hat neben ihrer katalytischen Funktion auch Aufgaben in der Nukleoidstruktur von Mitochondrien und ist eines von 48 mitochondriellen Phosphoproteinen. Der TF Aft1p ist ein Aktivator der zellulären Eisenaufnahme, welche mit mitochondriellen Funktionen co-reguliert ist. Tom40p bildet die β-*barrel*-Struktur zur Translokation von Proteinen über die äußere Mitochondrienmembran, während Tom70p mit Chaperonen der HSP70-Familie interagiert, welche an der Faltung und Translokation von Proteinen in die Mitochondrien beteiligt sind. Bei Por1p handelt es sich um einen spannungsabhängigen Kanal zum Transport von Anionen über die äußere Mitochondrienmembran. Pet9p und Odc1p sind Transporter der inneren Mitochondrienmembran. Petp transportiert cytosolisches ADP im Austausch gegen mitochondrielles ATP und importiert Häm in die Mitochondrien. Der Oxodicarboxylat-Carrier Odc1p exportiert unter anderem α-Ketoglutarat aus den Mitochondrien.

Der GTPase-Effektor Gic2p, welcher mit Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat und Cdc42p zur Initiation der Sprossung interagiert, wird durch CO_2/HCO_3^- sehr deutlich überexprimiert. Myo4p ist als Typ V Myosinmotorprotein am Transport von mRNA und der Vererbung corticaler ER-Tubulie an wachsende Sprossen beteiligt. Pef1p reagiert mit einer C-terminalen Bindedomäne auf das zelluläre Ca^{2+}-Niveau und ist während der G_1- und G_2-Phase an der Sprossung beteiligt.
Far1p inaktiviert den Cdc28p/Clnp-Komplex und hilft zwei haploiden Hefezellen, den Start der Zellteilung in der G_1-Phase hinauszuzögern um die geschlechtliche Paarung zu synchronisieren. Far1p untersteht der MAPK-aktivierten TF Ste12p, der auch an der Ausbildung von Pseudohyphen beteiligt ist. Abgesehen von GIC2 wurde noch keines der Gene mit erhöhten CO_2/HCO_3^--Gehalten in Verbindung gebracht.
Das *screening* dosissensitiver Gene deutete damit auf die Anpassung komplexer zellulärer Abläufe hin. Die 11 induzierten Gene wurden bisher 76 GOs (26 Funktionen; 31 Prozesse; 19 Komponenten) zugeordnet [63, 43]. 21 von 76 GOs betraffen den mitochondriellen Membrantransport (12) und den Energiehaushalt (8). 24 GOs beschrieben Vorgänge des Zellzyklus, der Sprossung und der Organisation des Cytoskeletts. Transporte über die Plasmamembran und die Regulation von Prozessen des endoplasmatischen Retikulums waren in 10 GOs vertreten. Weitere GOs betraffen die Aktivierung der RNA-Polymerase II und die Transkription sowie Protein- und mRNA-Transport des Zellkerns.
15 Gene (APE3, BGL2, ERG2, ERG25, ERG28, ERG6, NCE102, PEP4, TDH3, TPK1, AIM19, HMS1, HTA1, SOL4 und UPC2) der Gruppe wurden dauerhaft reprimiert. Sie kodieren vakuoläre Proteasen (Ape3p: EC 3.4.11.-, Pep4p), eine Glucanosyltransferase (Bgl2p: EC 2.4.1.-), Proteine der Ergosterolsynthese (Erg2p: EC 5.3.3.1, Erg25p: EC 1.14.13.72, Erg28p, Erg6p: EC 2.1.1.41, Upc2p), der Proteinsekretion (Nce102p), der Glykolyse/Gluconeogenese (Tdh3p: EC 1.2.1.12), der cAMP-abhängigen Protein-Kinase (Tpk1p: EC 2.7.11.31), einem Tim23p assoziiertem Protein (Aim19p), einem Transkriptionsfaktor (Hms1p), einem Histon (Hta1p) und einer 6-Phosphogluconolactonase (Sol4p: EC 3.1.1.31).
Die 15 reprimierten Gene wurden bisher 79 GOs (18 Funktionen; 39 Prozesse; 22 Komponenten) zugeordnet [63, 43]. 20 betreffen den zentralen Kohlenstoffmetabolismus (14) und die Mitochondrien (6). Die strukturelle Organisation der Zellwand (2), der Sprossung (0) und des Cytoskeletts (0) traten bei reprimierten Genen in den Hintergrund. Vorgänge des Zellzyklus waren mit 2 GOs vertreten. 28 GOs beschreiben die Regulation von Prozessen des endoplasmatischen Retikulums (18), der Vakuole (6) sowie in Vesikeln und Mizellen (4). Die Organisation von Chromatin, Vorgänge zur Transkription von mRNA durch die RNA-Polymerase II und ihre weitere Prozessierung in Zellkern und Cytosol (15) waren ebenfalls Prozesse, denen reprimierte Gene zugeordnet sind.
Die permanente DGE von 26 dosissensitiven Genen wies auf eine bleibende Anpassung des Metabolismus in allen Organellen hin. Das bestätigte frühere Beobachtungen, in denen sich die Beeinträchtigung durch hohe CO_2-Gehalte in vielen zellulären Abläufen auswirkten [180]. Verglichen mit den Veränderungen, die bei der initialen DGE angestoßen werden, handelte es sich bei der soeben beschriebenen Restreaktion nur noch um rückläufige Feinjustierungen zellulärer Abläufe. Ein besseres Verständnis der Restreaktion wurde durch die Betrachtung der

DGE in den vorangegangenen Zeitpunkten erwartet.
Die Rhythmik des Zellzyklus kann von der Zelle nur durch ausreichende Substrat- bzw. Energieversorgung aufrechterhalten werden. Höhere Funktionen werden in diesem Fall der Sicherung des Grundbedarfs untergeordnet. Da hohe CO_2-Gehalte in der Zelle zusätzliche Energiekosten verursacht haben (Abs. 5.3), erschien die Regulation des respiro-fermentativen Metabolismus als eine grundlegende Komponente zur Stressbewältigung. Der Fokus richtete sich dabei insbesondere auf mitochondrielle Funktionen, welche bei steigender CO_2-Belastung stark ausgelenkt wurden. Im folgenden Kapitel wurde der zentrale Kohlenstoffmetabolismus in fünf Zeitpunkten (t_0, t_{10}, t_{30}, t_{60} und t_∞) bei den Durchflussraten 0,05 h^{-1} und 0,1 h^{-1} betrachtet.

Kapitel 6

CO_2-induzierter respiro-fermentativer Metabolismus

6.1 Einleitung

Kapitel 4 zeigte, dass die Anwesenheit von CO_2 die Effizienz des Wachstums von Hefe beeinträchtigt. Kapitel 5 demonstrierte die periphere Wahrnehmung eines CO_2-Anstiegs und Maßnahmen zur Stabilisierung des zellulären Millieus. Durch eine Früherkennung wäre die Beeinträchtigung der Wachstumsrate und der Biomasse-Substrat-Ausbeute vermeidbar. Regulatorproteine von Transportern und dosissensitive Gene können als Marker zur frühen Erkennung einer CO_2-Belastung dienen. Eine Abweichung vom Optimum könnte bereits detektiert werden, bevor die Leistungsgrenzen der zellulären Regulation erreicht werden.
Kapitel 6 geht auf die Probleme des Energiehaushalts bei steigender CO_2-Belastung ein, spezifiziert beeinträchtigte Mechanismen, zeigt welche Möglichkeiten die Zelle zur Deckung ihres Energiebedarfs nutzt und wie hohe CO_2-Gehalte dauerhaft kompensiert werden.
Prozesse wurden im kontinuierlichen Betrieb mit gasförmigem CO_2 ausgelenkt und eine Bilanz des katabolen und anabolen Metabolismus erstellt. Metabolische Flussanalysen wurden der Veränderung der Genexpression DGE gegenübergestellt. Die Zellen bedienten einen erhöhten Energiebedarf (siehe Kapitel 5) und adaptierten ihre Mitochondrien durch eine Entkopplung des Citratzyklus TCC und der Atmungskette MRC. In Folge wurde das Reaktionsgleichgewicht des Ausgangszustands angenähert.

6.2 Durchflussraten und Prozessphasen

In der hierarchisch organisierten Zelle löst CO_2 als primäres Ereignis *in vivo* mehrere sekundäre Signale, DGE und schließlich die Adaption an CO_2 aus. Es wurde ein Rückgang der maximalen Wachstumsrate beobachtet bei dem die zelluläre Regulation bereits an ihrer Leistungsgrenze arbeitet. Geringere Wachstumsraten dehnen die Reaktionszeiten und führen so zur besseren Auflösung der sekundären Ereignisse. Statt unterschiedlicher CO_2-Gehalte wurden daher zwei Wachstumsraten bei gleichem CO_2-Gehalt untersucht. Tabelle 6.1 zeigt die Aufnahme- und Abgaberaten der Substrate und Produkte im *steady state*. Die Wiederfindung des Kohlenstoffs schloss hohe Produktionsraten weiterer organischer Verbindungen aus. Abbildung 6.1 zeigt extrazelluläres Succinat, Acetat, Ethanol und Glycerol im Prozessverlauf. Zum

Zeitpunkt Null wurde die Kultur einer aeroben mit CO_2 angereicherten Atmosphäre (50% CO_2) ausgesetzt. Bemerkenswert ist die Durchflussraten abhängige Entwicklung der Succinat- und Acetat-Konzentration. Das Verhalten der Kulturen war initial identisch und wich nach einer Stunde voneinander ab. Bei geringerer Glukoseaufnahmerate $q_{Glukose}$ verschwinden die Anzeichen einer CO_2-Belastung schneller. Die vollständige physiologische Adaption der Kulturen an CO_2 dauerte bei beiden Wachstumsraten mehrere Generationen. Ungeachtet der äußeren Anzeichen erfolgte sie mit verdoppeltem Selektionsdruck (vgl. D=0,1 h^{-1} und D=0,05 h^{-1}) und verdoppelter $q_{Glukose}$ auch mit doppelter Geschwindigkeit.
Die kontinuierliche Entwicklung der Kultur wurde anhand der Succinat-Konzentration und dem Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff in der Biomasse Y_{CN} (Abb. 6.2 oben) in vier Phasen eingeteilt.

Phase i) beschreibt den Referenzzustand mit einer q_{CO2}-abhängigen CO_2-Sättigung des Reaktors. Es fand kein Export von Succinat statt. Y_{CN} stimmte mit den für D typischen Verhältnissen überein.

Phase ii) In der ersten Stunde bestand akuter Handlungsbedarf ausgelöst durch den CO_2-Stimulus. Der Export von Succinat und der Abfall von Y_{CN} waren allen Kulturen gemeinsam.

Phase iii) Bis zu fünf Verweilzeiten (50 h bei D=0,1 h^{-1} und 100 h bei D=0,05 h^{-1}) sank Y_{CN} in allen Kulturen auf ein Minimum von 6,17 $mol_C\ mol_N^{-1}$. Die Produktionsrate von Succinat $q_{Succinat}$ stieg bei D=0,1 h^{-1} während D=0,05 h^{-1} nur noch geringe Raten zeigte. Es besteht zwischen 0,5 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$ und 1,1 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$ eine starke Abhängigkeit von $q_{Succinat}$ und $q_{Glukose}$.

Phase iv) Ab fünf Verweilzeiten kehrte sich der Trend von Y_{CN} um. D=0,1 h^{-1} erreichte das Ausgangsniveau nach weiteren 50 h bei rückläufiger $q_{Succinat}$. D=0,05 h^{-1} steigerte $q_{Succinat}$ und Y_{CN} bei gesteigertem $q_{Glukose}$ durch gesunkenes Y_{XS}.

Die Durchflussrate definierte in allen Phasen $q_{Glukose}$. Abhängig davon stellte sich die zeitliche Länge der G_1-Phase des Zellzyklus und die Wachstumsrate (μ=D) ein. Y_{CN} wurde maßgeblich durch den Gehalt an Glykogen und Trehalose bestimmt. Diese werden in der G_1-Phase aufgebaut und als Energiequelle zur Reproduktion genutzt [382, 269]. Im Referenzzustand konnten daher Y_{CN}, $q_{Glukose}$ und die zellulären Gehalte von Glykogen und Trehalose mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen übereinstimmen (D=0,05 h^{-1}: 11,0%$_{ww}^{Gly}$, 6,1%$_{ww}^{Tre}$; D=0,1 h^{-1}: 6,1%$_{ww}^{Gly}$, 2,9%$_{ww}^{Tre}$) [382, 212]. CO_2 veränderte Y_{CN} und damit die Biomassezusammensetzung in ihren Polymerverhältnissen.

TABELLE 6.1: Produktbildung von *S. cerevisiae* Kulturen im Fließgleichgewicht bei pH 5, 30°C bei y^{in}_{CO2} von 0,0005 und 0,5.

CO_2 inlet gas [%]	D [h^{-1}]	Y_{XS} [$g_{DW}g^{-1}$]	$q_{Glucose}$ [$mmolg^{-1}_{DW}h^{-1}$]	q_{O2} [$mmolg^{-1}_{DW}h^{-1}$]	q_{CO2} [$mmolg^{-1}_{DW}h^{-1}$]	q_{H^+} [$mmolg^{-1}_{DW}h^{-1}$]	C Recovery [−]
0,05	0,051±0,002	0,499±0,001	0,567±0,008	1,54±0,19	1,62±0,2	0,23±0.03	1,04±0,06
50	0,051±0,002	0,446±0,001	0,634±0,003	1,82±0,23	1,78±0,33	0,31±0,02	0,98±0,04
0,05	0,101±0,002	0,505±0,003	1,109±0,016	2,85±0,13	2,79±0,13	0,53±0,01	1,00±0,03
50	0,100±0,002	0,485±0,002	1,166±0,021	3,13±0,31	3,24±0,49	0,55±0,02	1,04±0,08

CO_2 inlet gas [%]	D [h^{-1}]	$q_{Ethanol}$ [$mmolg^{-1}_{DW}h^{-1}$]	$q_{Acetate}$ [$mmolg^{-1}_{DW}h^{-1}$]	$q_{Glycerol}$ [$mmolg^{-1}_{DW}h^{-1}$]	$q_{Succinate}$ [$mmolg^{-1}_{DW}h^{-1}$]	q_{Malat} [$mmolg^{-1}_{DW}h^{-1}$]	Y_{CN} $mol_C \cdot mol_N^{-1}$
0,05	0,051±0,002	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	7,25±0,05
50	0,051±0,002	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,01±0,00	0,00±0,00	6,17±0,1
0,05	0,101±0,002	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	6,58±0,05
50	0,100±0,002	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,05±0,02	0,00±0,00	6,17±0,15

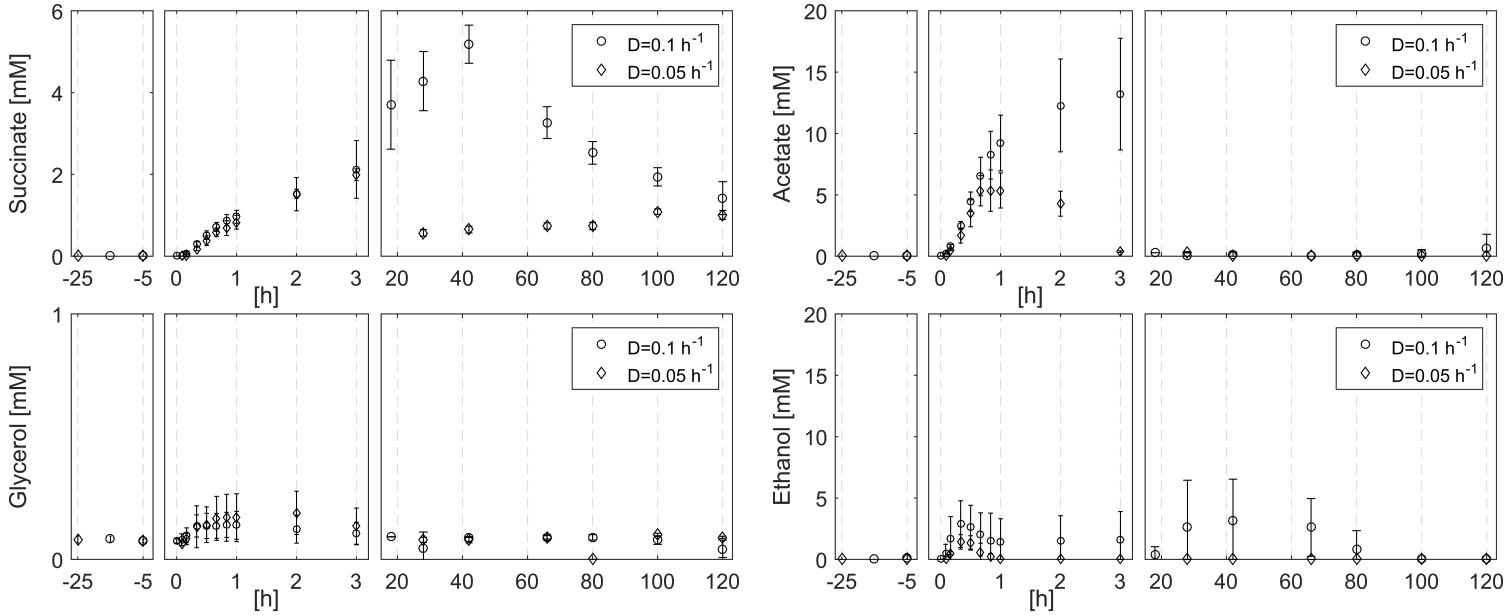


ABBILDUNG 6.1: Extrazelluläre Konzentration von Succinat, Acetat, Glycerol und Ethanol im Prozessverlauf.

Abbildung 6.2 stellt den zeitlichen Verlauf von Y_{CN} und den zellulären Anteil von Glykogen und Trehalose gegenüber. Trehalose wurde beim Wechsel der Atmosphäre schneller in Glukose gespalten als Glykogen. Abbildung 6.3 zeigt die zellulären Abbauraten der Speicherstoffe in Glukose-Equivalenten. Innerhalb von 5 Minuten wurde die Glukoseverfügbarkeit, verglichen mit der Glukoseaufnahmerate $q_{Glukose}$ (D=0,1 h^{-1}, $q_{Glukose}$=1,1 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$; D=0,05 h^{-1}, $q_{Glukose}$=0,57 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$), für den Organismus annähernd verdreifacht (1,93 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$) bzw. verfünffacht (2,52 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$). Der CO_2-Anteil der Gasphase lag zu diesem frühen Zeitpunkt laut Abgasmessung noch unter 20% und die zellulären Konzentrationen von $[CO_{2,C}]$ und $[HCO_{3,C}^-]$ in der Zelle laut Simulation bei etwa 15 mM und 60 mM (siehe Kapitel 5). Auch geringere CO_2-Anteile konnten diese Reaktion auslösen [347].
Das CO_2-Signal wurde in den ersten Minuten in ein zelluläres Signal, welches kontrolliert Glukose freisetzt, umgewandelt. Der Abbau von Trehalose setzte sich bei rückläufigem Tempo fort bis der Anteil auf unter 1% der Zellmasse gefallen war. Glykogen erreichte ein Minimum von 2% der Zellmasse nach 2 h CO_2-Einfluss. Höhere Trehalose-Anteile in den Zellen führen zu deutlich schnellerem Abbau. Das Disaccharid wurde, wenn in ausreichender Menge vorhanden, mit 2 $mmol_{Glk}$ $g_{DW}^{-1}h^{-1}$ umgesetzt. Glykogen lag in höheren Massenanteilen vor und erreichte bei D=0,05 h^{-1} die maximale Abbaurate von 1 $mmol_{Glk}$ $g_{DW}^{-1}h^{-1}$ bei 10 Minuten. Der CO_2-Gehalt der Gasphase lag zu diesem Zeitpunkt bei über 30%.
Mancher Leser mag an dieser Stelle die Bestimmung zellulärer Kinetiken in der Glykolyse mithilfe von Glukose-Puls-Experimenten erinnern. Solche Experimente betrachten i.d.R. Zeitskalen bis drei Minuten nach der extrazellulären Zugabe von Glukose [137]. Bestimmt werden damit die Änderung der Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Änderung der Substratkonzentration einer enzymatischen Reaktion [190]. Intermediate der Glykolyse zur Berechnung einer metabolischen Kontrollanalyse MCA wurden in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt.
Die Freisetzung zellulärer Glukose aus Glykogen und Trehalose als Folge der Aktivierung von Nth1p und Gph1p erfolgte langsamer und erhöhte das Glukoseangebot für den Organismus weniger drastisch. Alle zellulären Prozesse, die nach der Freisetzung der Glukose folgen, konnten Teil des koordiniert initiierten zellulären Prozesses sein.

6.2.1 Phase i)

In Phase i) wurden weder Alkohole noch organische Säuren produziert. Die Biomasse-Substrat-Ausbeute Y_{XS} und die Atmungsraten q_{O2} und q_{CO2} entsprachen den Erwartungen. Viele Arbeiten verwenden die Prozessstrategie des C-limitierten Fließgleichgewichts als kontrollierte Standardbedingung ihrer Studien [269, 137]. Daher kommen wir gleich zur nächsten Phase.

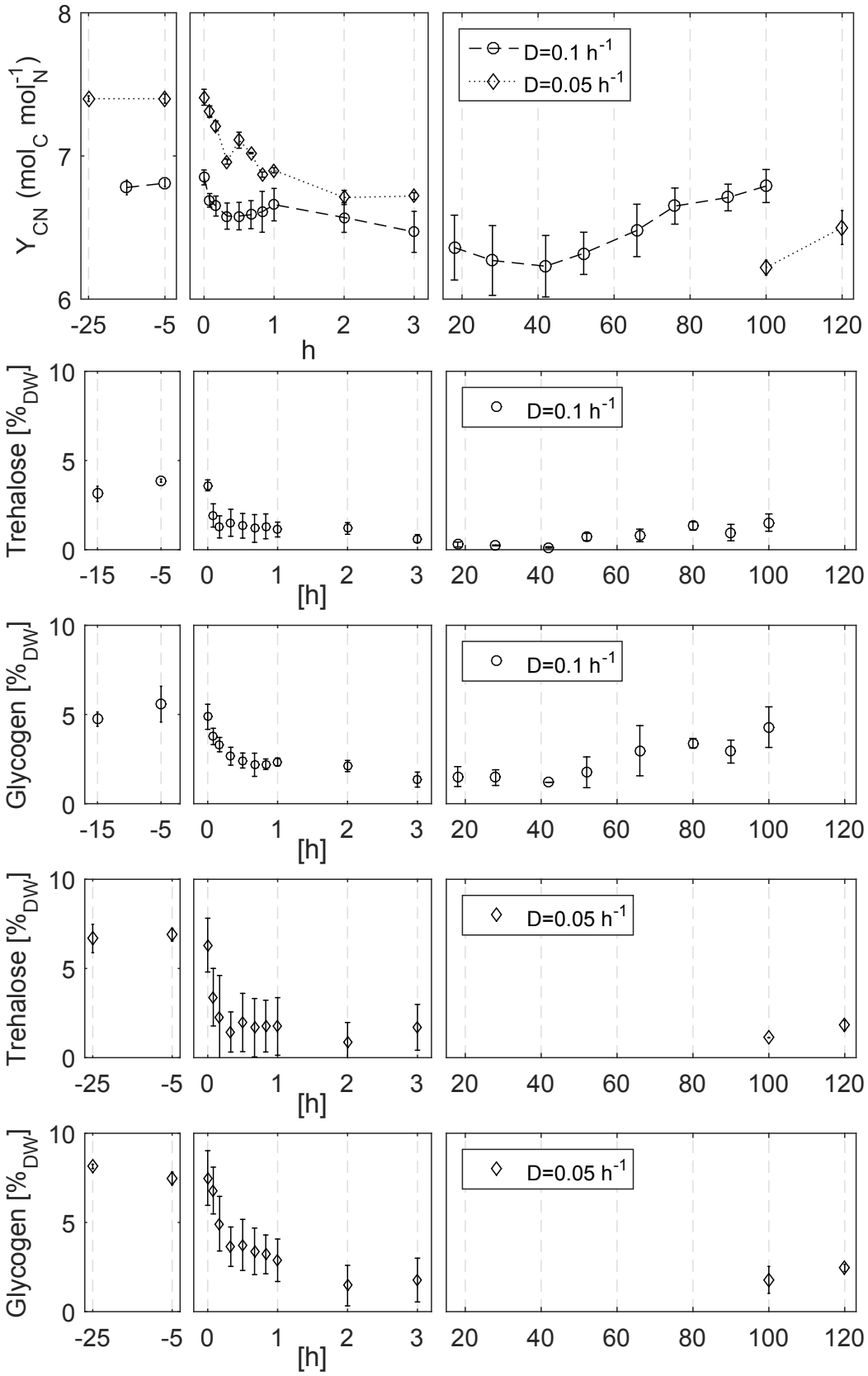


ABBILDUNG 6.2: Glykogen- und Trehalose-Gehalt der Biomasse bei den Durchflussraten 0,05 und 0,1 h^{-1} und das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff im Referenzzustand (Links), kurz nach Erhöhung des CO_2-Gehalts (Mitte) und im weiteren Prozessverlauf mit 50% CO_2 (Rechts). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von sechs Bestimmungen aus drei (D=0,1 h^{-1}) bzw. zwei biologischen Replikaten (D=0,05 h^{-1}) mit je zwei bzw. drei unabhängigen Quantifizierungen um den Mittelwert.

6.2.2 Phase ii)

Die Kulturen reagierten in Phase ii) mit Succinat-, Glycerol-, Acetat- und Ethanolproduktion. Bei höherer Durchflussrate konnten die Produkte früher im Überstand detektiert werden (vgl. Abb. 6.4 und 6.5). Ein höheres D bringt eine höhere q_{CO2} und damit einen geringfügig schnelleren Anstieg von CO_2 und HCO_3^- mit sich. Kritische Niveaus könnten daher etwas früher erreicht worden sein. Ein höheres D bringt aber auch eine höhere $q_{Glukose}$ und damit eine höhere Auslastung der Glykolyse mit sich. Der zur Ethanolbildung notwendige Pyruvat-Gehalt im Cytosol konnte daher früher erreicht werden. Die Transkription der Pyruvat-Decarboxylase-Gene PDC1 (YLR044C) und PDC5 (YLR134W) zeigte eine unveränderte PDC1- bzw. induzierte PDC5-Expression. Die Synthese von Ethanol war bei D=0,1 h^{-1} deutlich ausgeprägter (1,2 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$) als bei D=0,05 h^{-1} (0,6 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$) und korrelierte daher nicht mit dem Abbau der Speicherstoffe, sondern mit $q_{Glukose}$. Der sogenannte Crabtree-Effekt währte 30 Minuten bis der Ethanol aktiv abgebaut wurde. Die Alkohol-Dehydrogenasen (Adh1p und Adh2p) wurden in den Zeitpunkten 10 und 30 Minuten transkriptionell reprimiert.
Die Glycerol-Produktion setzte mit der Ethanol-Produktion ein, erreichte ein Maximum von 0,02 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$ und wurde nach 30 Minuten zusammen mit der Ethanol-Produktion eingestellt. Glycerol wird im Allgemeinen zur Regeneration von NAD^+ produziert und akkumuliert bei hoher extrazellulärer Osmolarität in Hefe. Die Synthese von Glycerol erfordert die Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (Gpd1p), deren Expression in Phase ii) ebenfalls transkriptionell reprimiert wurde.
Die Synthese von Acetat erreichte unter beiden Bedingungen eine maximale Syntheserate von 1,2 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$ (Abb. 6.4 und 6.5). Die Synthese bei D=0,05 h^{-1} war allerdings kürzer. Die eigentümliche Kinetik von q_{Acetat} ließe sich durch den gleichzeitigen Abbau von Ethanol erklären. Eine Oxidation von Ethanol zu Acetat könnte im Cytosol zusätzliches NAD^+ reduzieren, welches unter aeroben Bedingungen über die MRC regeneriert würde.
In Phase ii) erfolgte die Synthese von Succinat bei beiden Durchflussraten mit maximal 0,13 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$ (Abb. 6.4 und 6.5). Aguilera u. a. erreichten bei N-Limitierung (D=0,1 h^{-1}; 79% CO_2) eine höhere Succinatproduktion ($q_{Succinat}$=0,18 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$), als das unter C-Limtierung der Fall war (D=0,1 h^{-1}; 79% CO_2; $q_{Succinat}$=0,13 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$) [9]. Es wurde daher eine Abhängigkeit von $q_{Succinat}$ mit $q_{Glukose}$ und dem CO_2-Partialdruck p_{CO2} angenommen. Theoretisch wäre eine Synthese über den oxidativen oder den reduktiven Zweig des TCC möglich. Solange unter aeroben Bedingungen eine Regeneration von NAD^+ über die MRC erfolgen kann, bietet der oxidative Zweig gegenüber dem reduktiven energetische Vorteile.

6.2.3 Phase iii) und iv)

Acetat konnte bei D=0,05 h^{-1} nach zwei Stunden nicht ausgespült sondern aktiv durch den Organismus abgebaut werden. Bei D=0,1 h^{-1} wurde kein Abbau detektiert. Da die Fettsäuresynthese und der Glyoxylat-*shunt* bei beiden Durchflussraten bereits in Phase ii) reprimiert wurden (siehe Kapitel 7), ist der Abbau durch den TCC wahrscheinlich. Das bedeutet es konnten geringe Mengen Acetat abgebaut werden, während $q_{Succinat}$ bei D=0,05 h^{-1} noch 0,05 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$ betrug.

In Phase iii) wurden bei D=0,1 h^{-1} maximal 0,05 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$ und bei D=0,05 h^{-1} kein Succinat produziert. $q_{Succinat}$ hing daher von $q_{Glukose}$ und dem Prozess der mitochondriellen Adaption ab. In Phase iv) sank $q_{Succinat}$ während Y_{XS} stieg. Beides deutete auf eine effizientere Nutzung des Substrats hin. Die zellulären Kohlendydratspeicher und der Y_{CN} stiegen ebenfalls. Letztendlich erreichte Y_{XS} in Phase iv) 96% der Phase i).

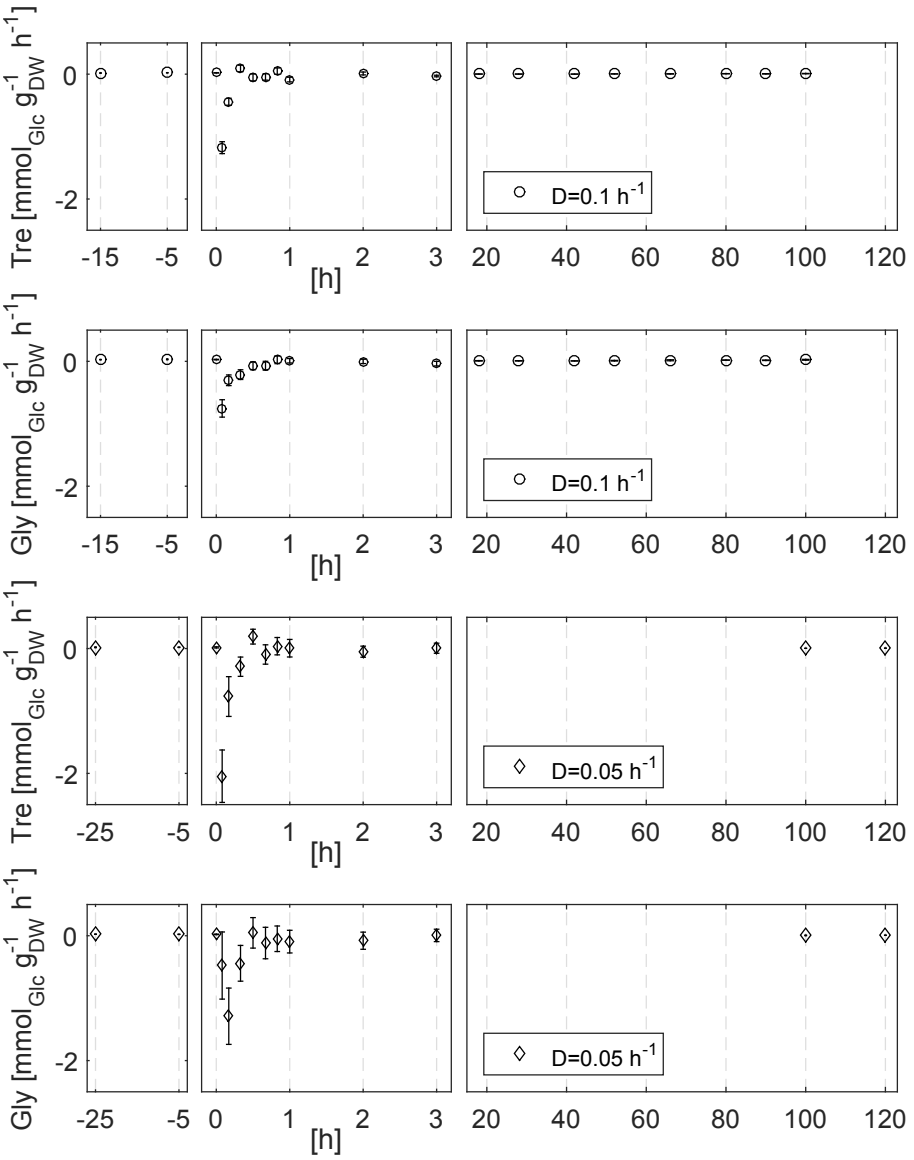


ABBILDUNG 6.3: Abbaurate der Kohlenhydratspeicher Glykogen (Gly) und Trehalose (Tre) bei den Durchflussraten 0,1 h^{-1} und 0,05 h^{-1} bei einer Erhöhung des CO_2-Gehalts auf 50%. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von sechs Bestimmungen aus drei (D=0,1 h^{-1}) bzw. zwei biologischen Replikaten (D=0,05 h^{-1}) mit je zwei bzw. drei unabhängigen Quantifizierungen um den Mittelwert.

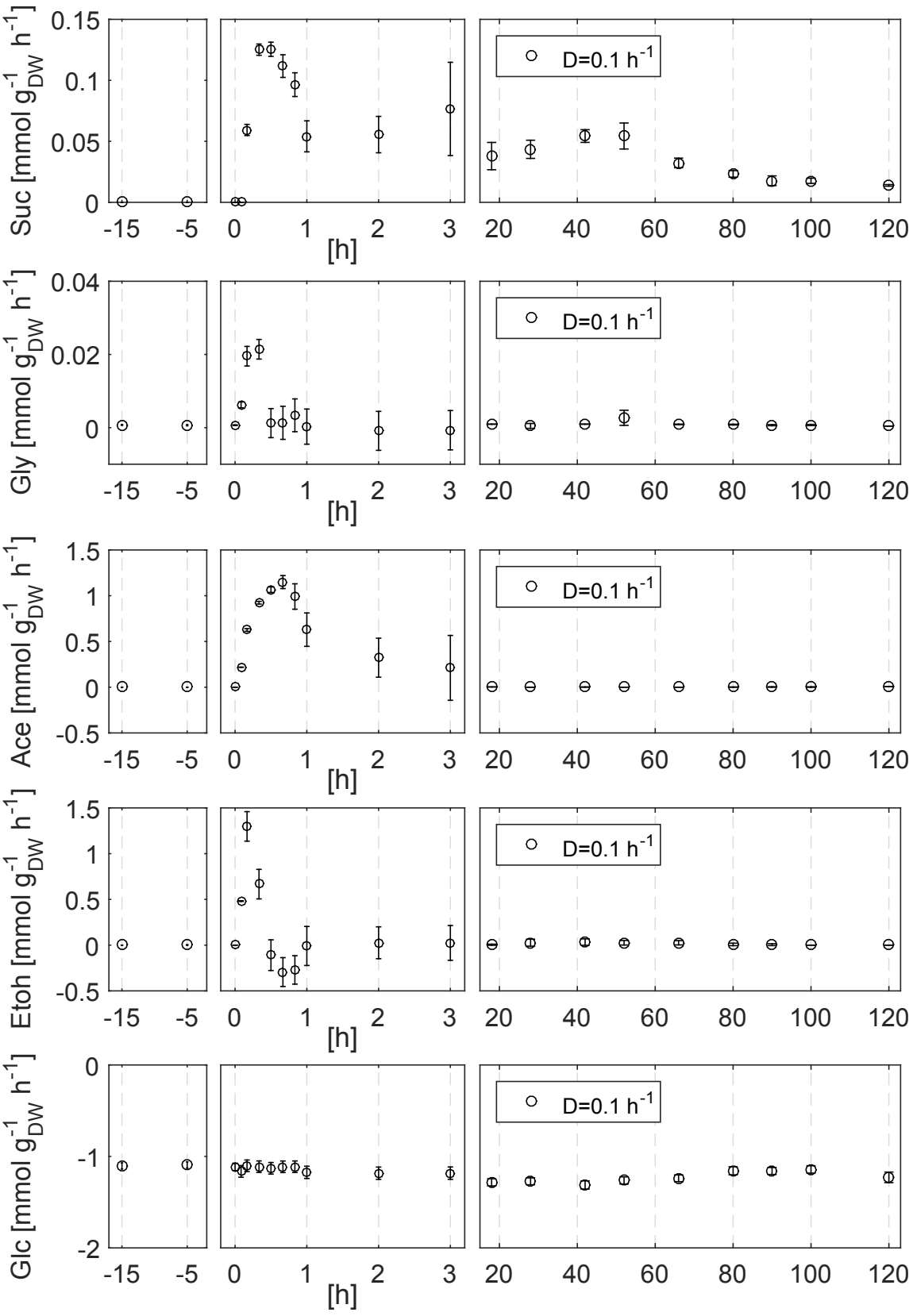


ABBILDUNG 6.4: Aufnahme- und Produktbildungsraten der organischen Säuren Acetat (Ace) und Succinat (Suc) und der Alkohole Ethanol (Etoh) und Glycerol (Gly) bei D=0,1 h^{-1}. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten mit je zwei unabhängigen Quantifizierungen um den Mittelwert.

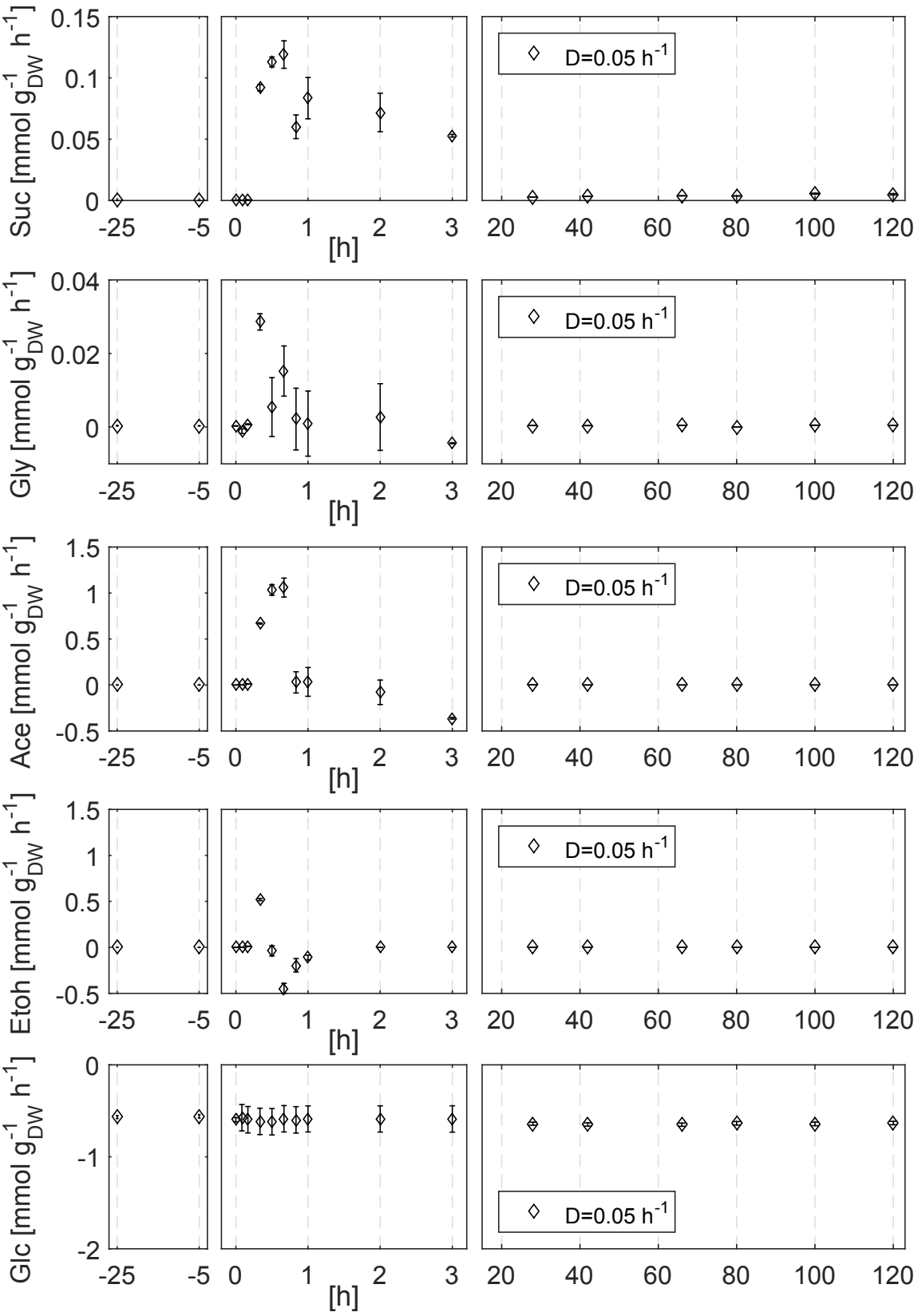


ABBILDUNG 6.5: Aufnahme- und Produktbildungsraten der organischen Säuren Acetat (Ace) und Succinat (Suc) und der Alkohole Ethanol (Etoh) und Glycerol (Gly) bei D=0,05 h^{-1}. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von sechs Bestimmungen aus zwei biologischen Replikaten mit je drei unabhängigen Quantifizierungen um den Mittelwert.

6.3 Stickstoffverteilung und -Metabolismus

Die Stickstoff-Katabolit-Repression (NCR) regelt in der Anwesenheit mehrerer Stickstoffquellen, welche davon vom Metabolismus bevorzugt verwendet wird [378]. Reaktionen die Ammonium in Glutamin und Glutamat fixieren, werden als zentraler Stickstoff-Metabolismus bezeichnet (CNM). Ammonium ist die exklusive Stickstoffquelle in allen Experimenten dieser Arbeit. Durch die Aktivitäten der Glutamat-Synthase (GOGAT: EC 1.4.1.13, YDL171C), der Glutamin-Synthase (GS: EC 6.3.1.2, YPR035W), der NAD^+-abhängigen Glutamat-Dehydrogenase (Gdh2p: EC 1.4.1.2, YDL215C) und der $NADP^+$-abhängigen Glutamat-Dehydrogenase (Gdh1p/3p: EC 1.4.1.3, YOR375C und YAL062W) wird die Stickstoffassimilation und damit die Gleichgewichte zwischen α-Ketoglutarat, Glutamat und Glutamin reguliert [348, 349]. Die Expression von Gdh1p und Gdh3p zur Synthese von Glutamat ist durch die Glukoseverfügbarkeit mit dem zentralen Kohlenstoffmetabolismus (CCM) co-reguliert, während die Expression von GDH2 durch den intrazelluläre Ammoniumgehalt und die Stickstoffquelle reguliert ist [378].
Die Hefe exprimierte GDH1 beim Wachstum auf Glukose und verstärkte dessen Expression beim Anstieg von CO_2. Da die Expression im Referenzzeitpunkt (t_0) starker Streuung unterlag und die Induktion bei D=0,05 h^{-1} kürzer (t_{30}) war als bei D=0,1 h^{-1} (t_{10}-t_∞), wurde in der Übersicht des TCC von Abbildung 6.9 keine Induktion verzeichnet. Die Expression von GDH2, dessen Enzym Gdh2p die Rückreaktion zu Gdh1p katalysiert, war in Phase i) gering und wurde in Phase ii) zusätzlich reprimiert (t_{10}-t_{60}). Die Aktivität und die Proteolyse des Enzyms wird durch cAMP-abhängige Phosphorylierung reguliert [233]. Die Repression von GDH2 eignete sich daher für die Steigerung der Nettosyntheserate von Glutamat bei Substratwechsel und Stress. Die Induktion von GLN1 (t_{10}-t_{30}) konnte dann die Syntheserate von Glutamin erhöhen. Die veränderten Expressionsniveaus von GDH2 und GLN1 waren nach 5 Verweilzeiten (t_∞) in den Ausgangszustand zurückgekehrt.
Der Organismus bildete im kontinuierlichen Prozess eine charakteristische Homöostase der zellulären Aminosäuren aus. Die Art der Stickstoffquelle und ihr Angebot bestimmen dabei den zellulären Gehalt freier Aminosäuren $_f$AS im Cytosol und der Vakuole [233]. Der Austausch zwischen Cytosol, Vakuole und Mitochondrien hält dessen Homöostase aufrecht [364, 233]. Gene die Transporter (YDL210W, YLL028W, YMR088C, YBR293W, YJL059W, YJR001W) zur vakuolären Speicherung von $_f$AS (R, N, D, Q, E, H, I, L, K, F, W und Y) oder zum vakuolären Export (YER119C, YNL101W, YKL146W, YCL038C, YCR075C) kodieren waren nicht responsiv oder kurz reprimiert (t_{10-30}). Gene die für mitochondrielle Transporter (YBR291C, YBR104W, YKL120W, YGR096W) kodieren wurden kurz (t_{10-60}) bzw. permanent (t_∞) induziert (YPL134C; YPR021C) oder waren transkriptionell nicht responsiv (YOR130C, YPR058W, YOR222W, YBL089W, YNL003C, YHR002W). Die Ammoniumaufnahmesysteme (YGR121C, YNL142W, YPR138C) der Plasmamembran wurden transkriptionell kaum reguliert. Ein Ammoniumexporter (YDR384C) wurde permanent reprimiert. Weitere Komponenten des Aminosäure-Metabolismus wurden von Ljungdahl und Daignan-Fornier 2012 zusammengefasst [233].
Abbildung 6.6 und 6.7 zeigen den zellulären Gehalt von 20 $_f$AS im zeitlichen Verlauf. In

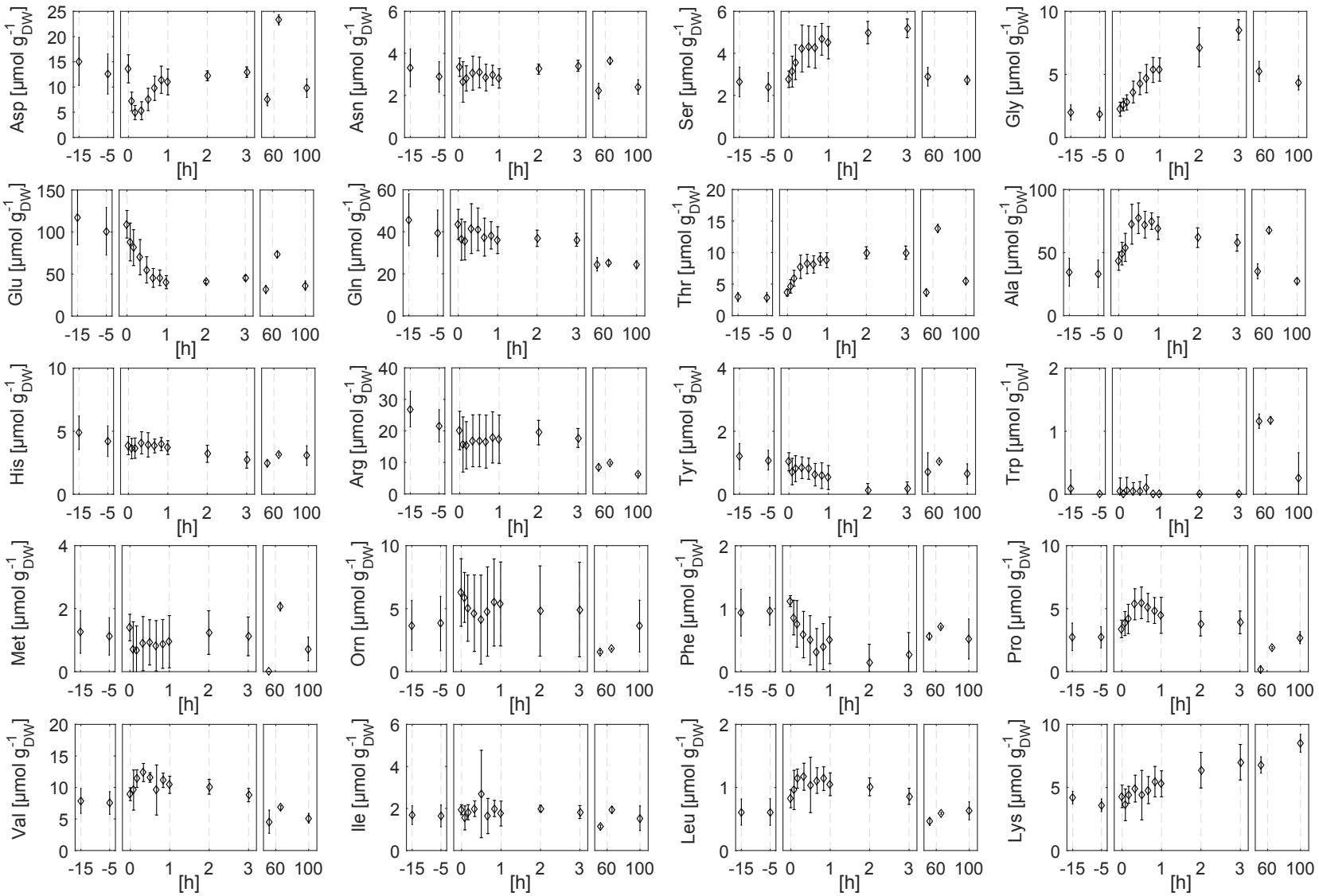


ABBILDUNG 6.6: Zellulärer Gehalt freier Aminosäure im Referenzzustand (links), kurz nach Erhöhung des CO_2-Gehalts (mittel) und im weiteren Prozessverlauf mit 50% CO_2 (rechts) bei D=0,1 h^{-1}. Kürzel: Asp: Aspartat, Asn: Asparagin, Ser: Serin, Gly: Glycin, Glu: Glutamat, Gln: Glutamin, Thr: Threonin, Ala: Alanin, His: Histidin, Arg: Arginin, Tyl: Tyrosin, Trp: Tryptophan, Met: Methionin, Orn: Ornithin, Phe: Phenylalanin, Pro: Prolin, Val: Valin, Ile: Lsoleucin, Leu: Leucin, Lys: Lysin. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten mit je zwei unabhängigen Messungen (siehe Abs. 3.9 und 3.12.2).

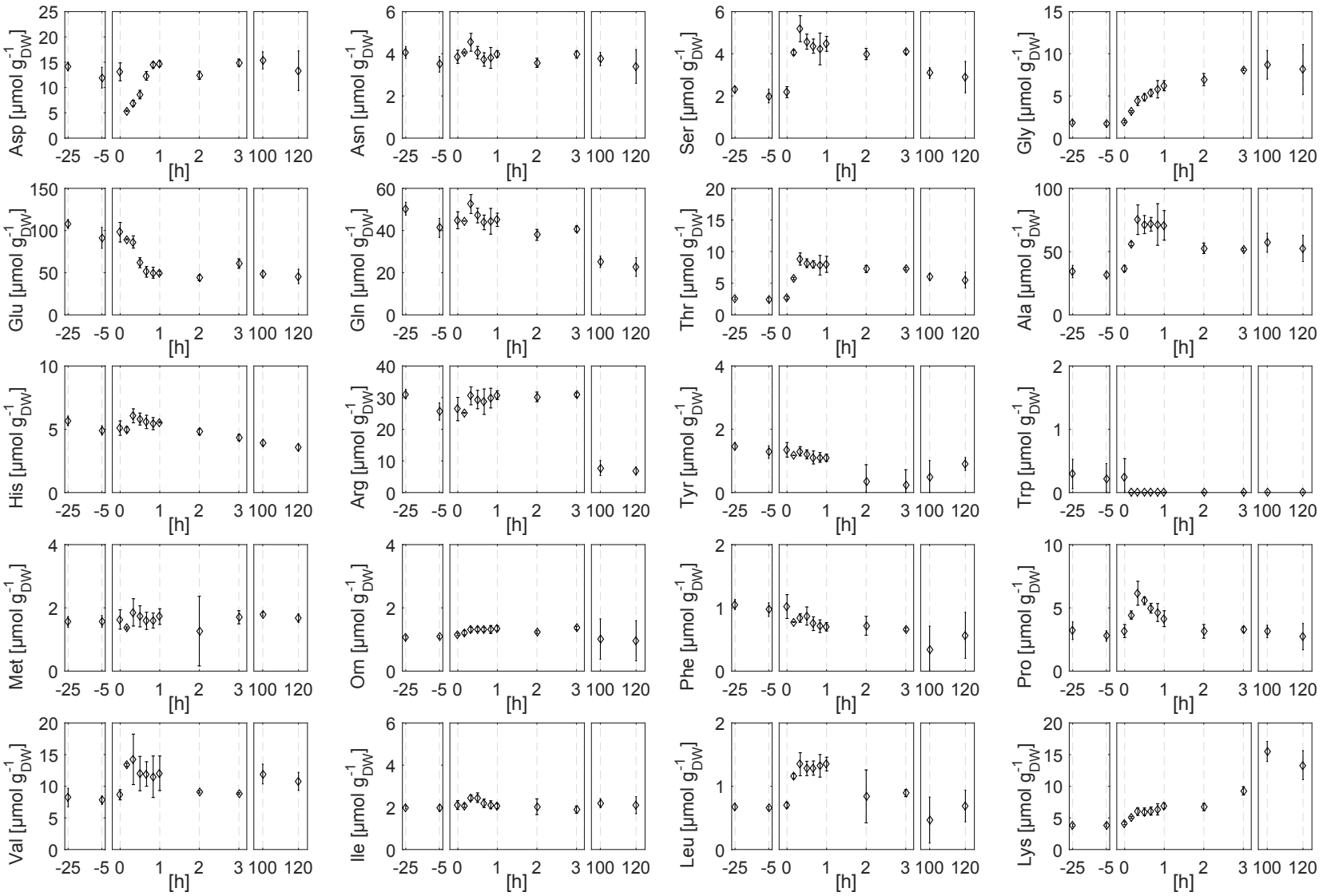


ABBILDUNG 6.7: Zellulärer Gehalt freier Aminosäure im Referenzzustand (links), kurz nach Erhöhung des CO_2-Gehalts (mittel) und im weiteren Prozessverlauf mit 50% CO_2 (rechts) bei D=0,05 h^{-1}. Kürzel: Asp: Aspartat, Asn: Asparagin, Ser: Serin, Gly: Glycin, Glu: Glutamat, Gln: Glutamin, Thr: Threonin, Ala: Alanin, His: Histidin, Arg: Arginin, Tyl: Tyrosin, Trp: Tryptophan, Met: Methionin, Orn: Ornithin, Phe: Phenylalanin, Pro: Prolin, Val: Valin, Ile: Lsoleucin, Leu: Leucin, Lys: Lysin. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus zwei biologischen Replikaten mit je drei unabhängigen Messungen (siehe Abs. 3.9 und 3.12.2).

Phase i) gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Durchflussraten (vgl. Abb. 6.4 und 6.5). Signifikante transiente Änderungen konnten beim Gehalt von Aspartat (D), Serin (S), Glycin (G), Glutamat (E), Threonin (T), Alanin (A), Arginin (R), Prolin (P), Valin (V), Leucin (L) und Lysin (K) bestimmt werden (Abs. 3.12.3; $p \leq 0{,}05$). Hohe CO_2/HCO_3^--Konzentrationen senkten den Glutamat-, den Glutamin- und den Argininggehalt in der Zelle.
Der Glutamatgehalt sank von 120 auf 40 µmol g_{DW}^{-1}. Der Glutamingehalt sank langsamer von 40 auf 20 µmol g_{DW}^{-1}. Es folgte eine Umverteilung des Stickstoffs aus der α-Ketoglutarat-Familie (E, Q und R) in die Oxalacetat-Familie (K, D und T), die 3-Phosphoglycerat-Familie (S und G) und die Pyruvat-Familie (A, V und L). 60 Minuten nach CO_2-Anstieg wurden etwa 70 µmol g_{DW}^{-1} aus dem Glutamat-*pool* in andere Aminosäure-*pools* umverteilt (S, G, T, A, P, V, L und K). Die Umverteilung fand in Phase ii) zeitgleich mit der Degradation zellulärer Speicherstoffe statt. Bei D=0,1 h^{-1} kam es zum unmittelbaren Anstieg von fünf Aminosäuren (S, G, A, V und L), welche sich aus dem 3-Phosophoglycerat- und dem Pyruvat-*pool* ableiten.
Bemerkenswert war die Kinetik des Aspartatgehalts in Phase ii). Zwei Aspartat-Amino-transferasen katalysieren den reversiblen Transfer einer Aminogruppe von Glutamat auf Oxalacetat in den Mitochondrien und dem Cytosol. Der Abfall des Aspartatgehalts resultierte wahrscheinlich aus fehlendem Oxalacetat. Die cytosolische Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat ist die anaplerotische Synthese für TCC-Intermediate. Ihre Katalyse durch die Pyruvat-Carboxylasen (EC 6.4.1.1: Pyc1p, YGL062W; Pyc2p, YBR218C) nutzt Pyruvat und HCO_3^- als Substrate und ist streng reguliert [38]. PYC1 wird aber auch durch einen CO_2-sensitiven TF (Cst6p) reguliert [227]. Die Expression der Carboxylase war zehn Minuten nach Atmosphärenwechsel reprimiert. Der Aspartatgehalt der Zelle stabilisiert sich nach 60 Minuten auf dem Ausgangsniveau der Phase i). Brewster u. a. zeigten 1994, dass die Deletion von PYC1 zu hohem Aspartat-Bedarf führte [38]. Weitere Möglichkeiten zur Erklärung der Kinetik des Asparat-*pools* wären ein höherer Aspartatverbrauch durch anabolen Metabolismus oder die allosterische Inhibition von Pyc1p durch α-Ketoglutarat.
In Phase ii) bestand eine Korrelation zwischen der Expression der Citrat-Synthase (CIT1, YNR001C), der α-Ketoglutarat-Dehydrogenase (KGD1, YIL125W; KGD2, YDR148C; LPD1, YFL018C), der Succinat-Dehydrogenase (SDH1, YKL148C; SDH2, YLL041C) und der Pyruvat-Carboxylase (PYC1, YGL062W). Gleichzeit erfolgte eine Induktion des Malatenyzms (MAE1, YKL029C), welches mitochondrielles Malat zu Pyruvat decarboxyliert. Die Repression von PYC1, CIT1, KGD1/2, LPD1, SDH1 und SDH2 und die Induktion von MAE1 könnten die Reaktionsrate des TCC durch den Entzug von Intermediaten kontrolliert gesenkt haben. Die transkriptionelle Expression von PYC1, CIT1, KGD1/2, LPD1, SDH1 und SDH2 wurde nach 30 Minuten auf Niveau von Phase i) angehoben und nach 60 Minuten in Phase ii) signifikant erhöht.
Der folgende Abschnitt erläutert die Ergebnisse der metabolischen Flussanalyse. Auch *in silico* ergab sich aus den Glukoseverbrauchsraten, den Produktbildungsraten und der Veränderung intrazellulärer Polymer- und Metabolit-*pools*, dass die Reaktionsrate des TCC in Phase i) abnahm (t_{10-30}) und nach 60 Minuten die ursprünglichen Reaktionsraten fast wieder erreicht werden konnte.

6.4 Metabolische Flussanalysen der Prozessphasen i-iii)

Die Umstellung vom respirativen zum respiro-fermentativen Metabolismus konnte zur Berechnung von metabolischen Flussanalysen mithilfe eines einfachen metabolischen Netzwerks genutzt werden. Als Datenbasis dienten die in Tabelle 6.1 und den Abbildungen 6.2, 6.3, 6.4 und 6.5 präsentierten und bereits interpretierten biomassespezifischen Raten. Die Änderung des zellulären Aminosäuregehalts (Abb. 6.6 und 6.7) wurde in den Simulationen berücksichtigt. Der mathematische Hintergrund der MFA wurde in Kapitel 3 Abschnitt 3.13.1 erläutert.
Für die MFA wurde die Stöchiometrie eines Reaktionsnetzwerks des Organismus *S. cerevisiae* an die Elementarzusammensetzung des Stammes CEN.PK 113-7D angepasst und für jeden Zeitpunkt an eigene Experimentaldaten angepasst. Das Netzwerk (siehe Anhang C) hatte mit 142 Reaktionen und 101 Metaboliten 30 Freiheitsgrade. Die experimentell bestimmten Eingabeparameter ermöglichten so die datengetriebene Simulation in diesem mehrfach überbestimmten System. Tabelle 6.2 stellt die Eingabeparameter und die Simulationen mit dem geringsten Fehlerquadrat gegenüber. Aus der Stoffflussverteilung wurde die ATP-Syntheserate der oxidativen Phosphorylierung q_{ATP}^{OxP}, der Substratkettenphosphorylierung q_{ATP}^{SkP} und die Biomasse-ATP-Ausbeute Y_{XATP} bei der stöchiometrischen Kopplung von q_{ATP}^{OxP} zu q_{O}^{COX} (1,15 mol_{ATP} mol_{O}^{-1}) und dem Erhaltungsstoffwechsel m_S (1,3 $mmol_{ATP} g_{DW}^{-1} h^{-1}$) abgeleitet.
Durch weniger biochemische Details verringerten sich die Dimensionen des Lösungsraums. Die Anzahl der möglichen Lösungen sank und die Eingabeparameter konnten in der Simulation schlechter reproduziert werden. Andererseits bot eine überbestimmte Lösung verglichen mit einem unterbestimmten Ergebnis weniger Möglichkeiten zur Spekulation. Innerhalb jedes Messdatensatzes berücksichtigte die Lösung das Kriterium der Massen- und Ladungserhaltung und verifiziert so die Summe der Messdaten durch die Wiederfindung des Kohlenstoffs innerhalb des Systems. Synthese und Verbrauch aller Energieträger - ATP, NADH und NADPH - befinden sich im Gleichgewicht. Das Ergebnis repräsentiert die Lösung des überbestimmten Gleichungssystems mit der geringsten Fehlerquadratsumme zu den gemessenen Eingabeparametern (Abs. 3.13.1).
Den Reaktionsraten wurde die differentielle Genexpression DGE von Enzymen, die an der Katalyse beteiligt waren, gegenübergestellt. Die Abbildungen 6.8 und 6.9 zeigen den zentralen Kohlenstoffmetabolismus.

6.5 Korrelation von Reaktionsrate und differentieller Genexpression

In vivo lag in Phase i) ein respirativer Metabolismus vor (siehe Tab. 6.2). Dieser wurde in Phase ii) in den respiro-fermentativen Metabolismus ausgelenkt. In Phase iii) und iv) näherte die Hefe wieder einen energetisch effizienteren respirativen Metabolismus an (siehe Abs. 6.2). Es wurde daher der Übergang des Metabolismus von der Phase i) über ii) zu iii) betrachtet. Phase i) wurde durch den Zeitpunkt 0 (t_0), Phase ii) in den Zeitpunkten zehn Minuten (t_{10}) und 30

Minuten (t_{30}) und die Phase iii) durch Zeitpunkt 60 Minuten (t_{60}) repräsentiert. Das Ergebnis einer metabolischen Flussanalyse von Phase iv) ähnelte dem Ergebnis von Phase i).

TABELLE 6.2: Gegenüberstellung von experimentellen Prozessraten (EPR) und Raten der MFA in Prozessphase i) (t_0), Phase ii) (t_{10}, t_{30} und Phase iii) t_{60}). Die Respirationsquotienten (RQ), die Rate der oxidativen Phosphorylierung (q_{ATP}^{OxP}), der Substratkettenphosphorylierung (q_{ATP}^{SkP}) und die Biomasse-ATP-Ausbeute (Y_{XATP}) basieren auf dem *maintenance* (m_s) und dem ATP-Sauerstoff-Verhältnis (PO) des Hefemodells. Die Standardabweichungen der Prozessraten basieren auf drei biologischen Replikaten (D=0,1 h^{-1}).

	t [min]	Y_{CN} [$mol_C\ mol_N^{-1}$]	$q_{Glukose}$	q_{O2} [mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$]	q_{CO2}	RQ [-]
EPR	0	6,85±0,05	-1,11±0,04	2,85±0,13	2,79±0,13	0,98
MFA		6,91	-1,08	2,40	2,56	1,07
EPR	10	6,65±0,07	-1,10±0,06			
MFA		6,69	-1,20	2,14	3,21	1,50
EPR	30	6,58±0,09	-1,13±0,06			
MFA		6,64	-1,15	2,23	2,06	0,93
EPR	60	6,66±0,11	-1,17±0,07			
MFA		6,62	-1,13	2,29	2,42	1,06
	t [min]	$q_{Gly} + q_{Tre}$	$q_{Ethanol}$	$q_{Acetate}$ [mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$]	$q_{Glycerol}$	$q_{Succinate}$
EPR	0	0,05±0,01	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
MFA		0,04	0,00	0,00	0,00	0,00
EPR	10	-0,74±0,13	1,30±0,16	0,63±0,01	0,02±0,00	0,06±0,00
MFA		-0,85	1,18	0,61	0,02	0,06
EPR	30	-0,12±0,12	-0,11±0,16	1,07±0,03	0,00±0,00	0,13±0,01
MFA		-0,18	-0,36	1,12	0,00	0,12
EPR	60	-0,10±0,07	-0,01±0,21	0,63±0,18	0,00±0,00	0,05±0,01
MFA		-0,11	-0,01	0,58	0,00	0,06
	t [min]	q_{ATP}^{OxP}	q_{ATP}^{SkP} [$mmol_{ATP} g_{DW}^{-1}h^{-1}$]	m_s	PO [$mol_{ATP} mol_O$]	Y_{XATP} [$g_{DW} mol_{ATP}^{-1}$]
MFA	0	5,9	2,8	1,3	1,15	11,5
	10	5,8	7,1			7,7
	30	5,9	4,2			10,0
	60	5,9	3,6			10,6

Der *steady state* von Phase i) wurde mit sogenannten pseudo-*steady states* (t_{10}, t_{30} und t_{60}) verglichen. Da es sich dabei um Übergangszustände des Metabolismus handelt, waren signifikante Unterschiede in den Eingangsparametern für die Berechnung der MFA entscheidend. Die Konzentration zellulärer Metabolite war nicht konstant und wurde daher so weit bekannt durch entsprechende Eingabeparameter berücksichtigt. Die Vergleiche der Stofflussverteilungen wurden in Abbildungen 6.8 und 6.9 dargestellt.

Die selben Abbildungen enthalten außerdem die Tendenz der Expression relevanten Gene. Diese kodieren für Enzyme des C- und N-Metabolismus, welche unmittelbar an der Katalyse der dargestellten Reaktionen beteiligt waren (t_{10-60}). Reaktionen ohne Rate waren nicht Teil des stöchiometrischen Netzwerks. Weitere Hintergründe zur transkriptionellen Regulation der Phasen i) bis iv) wurde in Kapitel 7 erläutert.

Die Gegenüberstellung von MFA und der Expression katalysierender Enzyme zeigte vier logische Korrelationen zwischen Reaktionsrate und Genexpression:

- CO_2/HCO_3^- beeinträchtigte die katalytische Effizienz des Enzyms (z.B. Sdh2p). Das senkte die Reaktionsrate. Die Expression des Gens wurde zur Kompensation induziert (Abb. 6.9).
- Der Einfluss von CO_2/HCO_3^- ließ die Substratkonzentration eines Enzyms (z.B. Tdh1p) ansteigen. Das steigerte die Reaktionsrate. Die Expression des Gens wurde zur Kompensation der Reaktionsrate reprimiert (Abb. 6.8).
- CO_2/HCO_3^- erhöhte in der Zelle den Bedarf eines Metaboliten (z.B. ATP). Die Gene zur Bereitstellung dieses Metaboliten wurden induziert (Abb. 6.9).
- CO_2/HCO_3^- reduzierte in der Zelle den Bedarf eines Metaboliten (z.B. Acetyl-CoA). Die Gene zur Bereitstellung dieses Metaboliten wurden reprimiert (Tab. 6.9).

Die Summe der Maßnahmen hatte in Phase iv) offensichtlich Erfolg, da der Glykogen-*pool* und die Biomasse-Substrat-Ausbeute einem positiven Trend folgte (Abb. 6.2 und Tab. 6.1). Das System strebte, so weit das beurteilt werden konnte, seinem ursprünglichen *steady state* oder zumindest einem ähnlich effizienten Zustand entgegen. Im Reaktionsnetzwerk würde die neue Stoffflussverteilung mangels alternativer Stoffwechselwege der ursprünglichen Verteilung entsprechen und damit keinen informellen Mehrwert bieten.
Im Einzelfall wurde versucht neben der Korrelation von Genexpression und Reaktionsrate auch die Kausalität beider zu diskutieren. In den Zeitpunkten t_{10}, t_{30} und t_{60} wurde daher auch der Hintergrund allosterischer Effekte und posttranslationaler Modifikation diskutiert (siehe Kapitel 8).

6.5.1 Speicherstoffmetabolismus

In der Simulation von Phase i) speicherte das System aufgenommene Glukose bei positiven Rate von q_{Gly} und q_{Tre}. Glukose wurde anschließend in Phase ii) aus Glykogen und Trehalose freigesetzt (Tab. 6.2). Glykogen und Trehalose stellten 9‰$_{ww}$ der Biomasse, wovon in Phase ii) 7‰$_{ww}$ als Glukose innerhalb einer Stunde freigesetzt wurden. Das senkte Y_{CN} (Tab. 6.2). Die MFA zeigte, dass eine Stoffflussverteilung innerhalb der Standardabweichung der experimentell bestimmten Raten und des Y_{CN} möglich war.
Gene zur Synthese von Glykogen und Trehalose wurden in Phase ii) reprimiert (Abb. 6.8). Die Expression regulatorischer Schlüsselgene zur Phosphorylierung der freigesetzten Glukose (HXK2: YMR105C, PFK1: YGR240C und PFK2: YMR205C) wurde in Phase ii) erhöht. Die erste Reaktion des Pentosephosphatwegs wurde in der Glukose-6-phosphate-Dehydrogenase reprimiert (ZWF1: YNL241C). Gene reversibler Reaktionen (FBA1: YKL060C, TDH1: YJL052W, TDH3: YGR192C, GPM1: YKL152C und GPM2: YDL021W) zur Umwandlung von Fruktose-1,6-Bisphosphat in Phosphoenolpyruvat wurden transkriptionell reprimiert (Abb. 6.8). Die Reaktionsrate der Glykolyse verdoppelte sich.

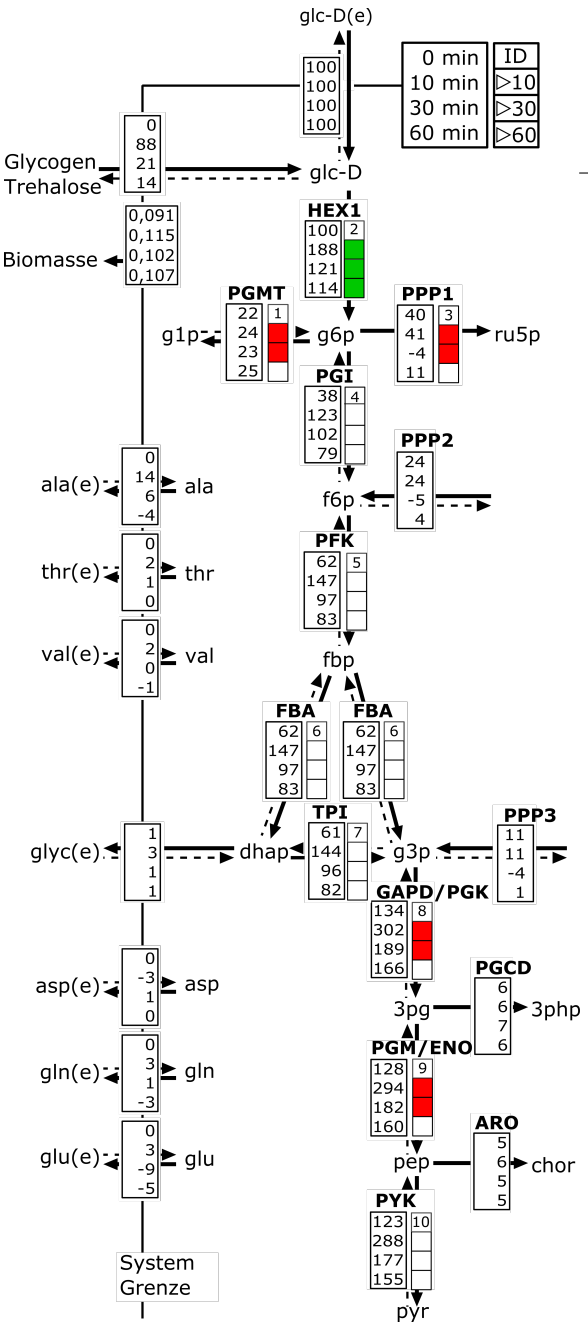


ABBILDUNG 6.8: Ausschnitt der MFA basierend auf pseudo-*steady states* nach CO_2-*shift*. $q_{Glukose}$ [µmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$] wurde auf $D{\cdot}10^3$ normiert und sind in Tabelle 6.2 aufgeführt. Volle Pfeile zeigen die Flussrichtung bei pos. Wert. Die differentielle Expression katalytisch relevanter Gene zwischen Referenz und den Zeitpunkten 10, 30 und 60 ist der Reaktion zugeordnet (Rot: [$\log_2$FC<-0,6]; Grün: [$\log_2$FC>0,6]). Kürzel: glc-D: D-Glukose, g6p: Glukose-6-phosphat, g1p: Glukose-1-phosphat, ru5p: Ribulose-5-phosphat, f6p: Fruktose-6-phosphat, fdp: Fruktose-1,6-bisphosphat, dhap: Dihydroxyacetonphosphat, g3p: Glyceraldehyd-3-phosphat, 3pg: 3-Phospho-D-glycerat, 3php: 3-Phosphohydroxypyruvat, pep: Phosphoenolpyruvat, pyr: Pyruvat, chor: Chorismat, ala: Alanin, thr: Threonin, val: Valin, glyc: Glycerin, asp: Aspartat, gln: Glutamin, Glu: Glutamat. ID: 1) YMR105C 2) YGL253W 3) YNL241C 4) YBR196C 5) YGR240C, YMR205C 6) YKL060C 7) YDR050C 8) YJL052W, YGR192C 9) YKL152C, YDL021W 10) YAL038W.

6.5.2 Pyruvatknoten

Der letzte irreversible Reaktionsschritt zur Synthese von Pyruvat wird durch die beiden Isoenzyme der Pyruvat-Kinase (Cdc19p: YAL038W, Pyk2p: YOR347C) katalysiert (EC 2.7.1.40). Eine signifikante transkriptionelle Induktion von CDC19 konnte zu keinem Zeitpunkt bestimmt werden. Die Rate wurde durch den Abbau der Speicherstoffe erhöht (Abb. 6.8). Die strenge allosterische Regulation von Cdc19p durch Fruktose-1,6-Bisphosphat sorgt für eine Co-Regulation mit der Phosphofruktokinase-Aktivität (siehe Kapitel 2). Cdc19p könnte durch HCO_3^- inhibiert [180] oder bei einer Phosphorylierung durch die Protein-Kinase A aktiviert worden sein [269]. Das Isoenzym (Pyk2p) wurde transpriptionell reprimiert. Ursache dafür könnte die intrazelluläre Freisetzung von Glukose gewesen sein [332].

Große Mengen Pyruvat wurden zu Acetaldehyd decarboxyliert (Pdc1p: YLR044C), welcher zu Acetat und Ethanol umgesetzt wurde. Das konstitutiv exprimierte Enzym führt *in vivo* beim Anstieg des Pyruvatgehalts zum respiro-fermentativen Metabolismus.
Von den fünf Isoenzymen der Aldehyd-Dehydrogenase katalysieren Ald5p und Ald6p den Großteil der Synthese von Acetat [368]. Die cytosolische Ald6p (YPL061W) und die mitochondrielle Ald5p (YER073W) nutzen $NADP^+$ als Co-Faktor. Die anderen Isoenzyme nutzen sowohl NAD^+ (Ald2p: YMR170C, Ald3p: YMR169C, Ald4p: YOR374W), als auch $NADP^+$ (Ald4p). Die cytosolischen Isoformen konnten durch Glukose reprimiert werden (Ald2p, Ald3p). Die Expression aller fünf Enzyme wurde bei CO_2 Anstieg signifikant reprimiert. Aldehyd-Dehydrogenase (Ald6p) und Glukose-6-Phosphat-DH (Zwf1p: YNL241C) konkurrierten bei CO_2-Anstieg im Cytosol um den Co-Faktor $NADP^+$.
Der oxidative Pentosephosphatweg war der NADPH-Donor anaboler cytosolischer Synthesen in der MFA des Referenzzustands. Die Glukose-6-Phosphat-DH (EC 1.1.1.49) wird ab Konzentrationen von 20 mM HCO_3^- inhibiert (siehe Tab. 2.1). Eine vollständige Inhibition des Enzyms wäre bei den simulierten 150 mM HCO_3^- theoretisch möglich (siehe Kapitel 5). Die Acetat-Synthese bot in der MFA zusätzliches NADPH, das mit der Metabolisierung von anorganischen Substraten (Sulfat und Ammonium) und der Synthese von Aminosäuren im Gleichgewicht stand. Das NADPH-Angebot und damit die Summe aus Acetat-Synthese und oxidativem Pentosephosphatweg war bestimmend für die Biomassebildung, da keine weiteren Reaktionen zur Regeneration von $NADP^+$ im Modell implementiert waren. Das Modell konnte bei ausreichender Acetat-Synthese auf die Bereitstellung von NADPH durch die Glukose-6-Phosphat-DH verzichten.
Laut MFA sank der Import von 57% auf 17% der Reaktionsrate in der Glykolyse. Dabei wurden mindestens 60% des Pyruvats zu Acetaldehyd decarboxyliert. Nach der Oxidation durch Ald6p wurden 25% der Glykolyserate als Acetat aus der Zelle transportiert. Ein weiterer signifikanter Teil floss in die Synthese von Ethanol. Zwei Alkohol-Dehydrogenasen (Adh1p: YOL086C, Adh5p: YBR145W) konkurrieren in Hefe mit Ald6p im Cytosol um Acetaldehyd, zwei weitere (Adh3p: YMR083W, Adh4p: YGL256W) mit Ald5p in den Mitochondrien. Bis zu 35% der Glykolyserate diffundierten als Ethanol über die Zellmembran.
Ein dynamischer Verbrauch von ATP zur Stabilisierung des zellulären pH-Werts, wie in Kapitel 5 beschrieben, konnte im Fließgleichgewicht der MFA nicht implementiert werden. Zum Ausgleich der Überproduktion an Energieträgern wurden in der MFA Reaktionsraten des anabolen Metabolismus verstärkt. *In silico* glich eine 16%$_{ww}$ige Zunahme der Syntheserate von Protein, RNA, Mannoprotein, Lipiden und Glycanen den Gewichtsverlust in den *pools* von Glykogen und Trehalose aus (Abb. 6.8). Die Rate des Biomassewachstums (μ=0,1 $g_{DW}g_{DW}^{-1}h^{-1}$) blieb damit konstant.

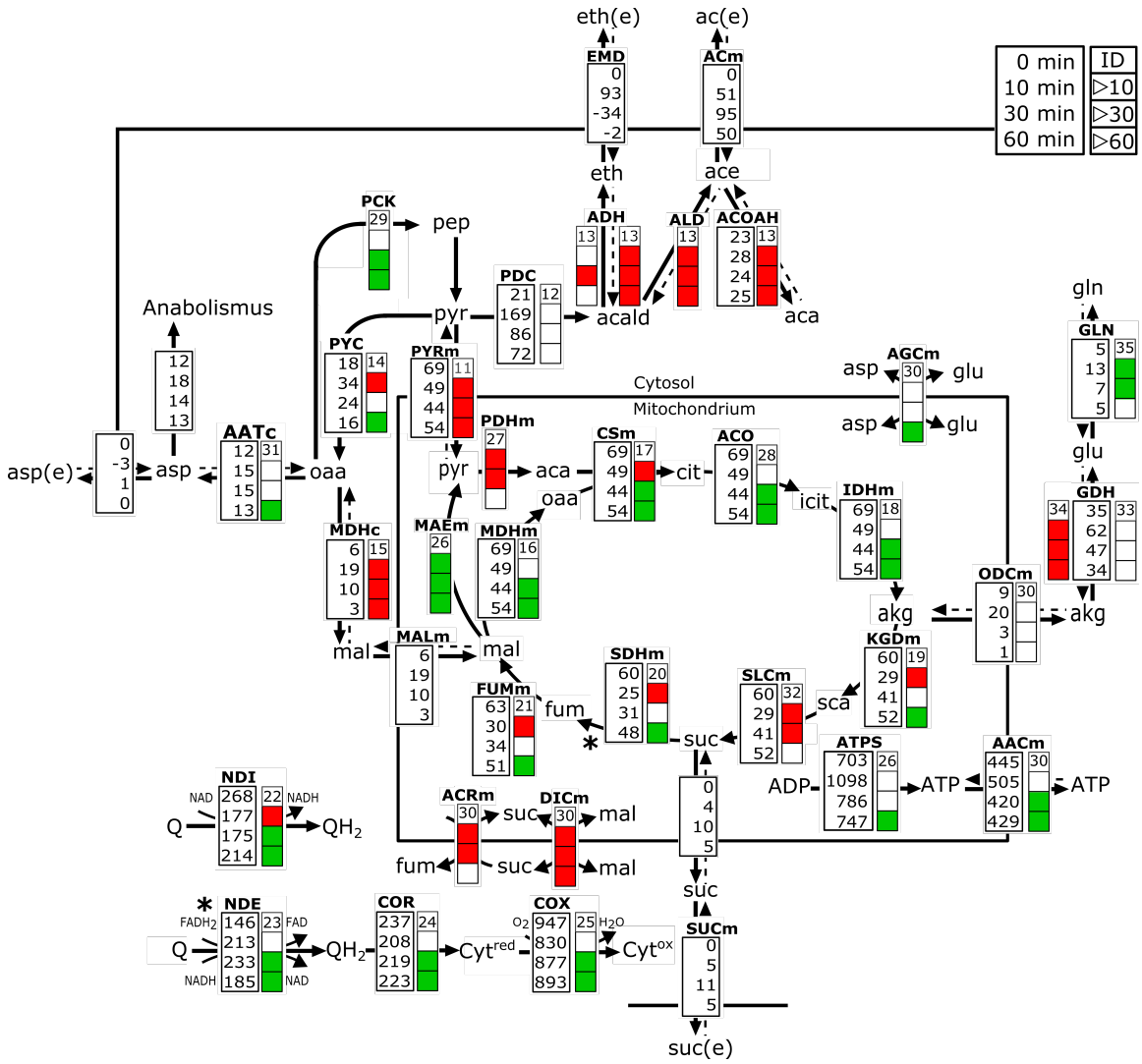


ABBILDUNG 6.9: Ausschnitt der MFA basierend auf pseudo-*steady states* nach CO_2-*shift*. $q_{Glukose}$ wurde auf D·10^3 normiert. Volle Pfeile zeigen die Flussrichtung bei pos. Wert. Die differentielle Expression katalytisch relevanter Gene zwischen Referenz und den Zeitpunkten 10, 30 und 60 Minuten ist der Reaktion zugeordnet (Rot: [$\log_2$FC$\leq$-0,6]; Grün: [$\log_2$FC$\geq$0,6]). Kürzel: pep: Phosphoenolpyruvat, pyr: Pyruvat, oaa: Oxalacetat, mal: Malat, acald: Acetaldehyd, etoh: Ethanol, ace: Acetat, aca: Acetyl-CoA, cit: Citrat, icit: Isocitrat, akg: α-Ketoglutarat, glu: Glutamat, gln: Glutamin, sca: Succinyl-CoA suc: Succinat, fum: Fumarat, asp: Aspartat, NAD(H): Nikotinamidadenindinukleotid, FAD(H_2): Flavinadenindinukleotid, Q(H_2): Coenzyme Q_{10}, $CytC^{Red/Ox}$: Cytochrom c, O_2: Sauerstoff, H_2O: Wasser. ID: 11) YGL080W, YGR243W, 12) YLR044C, 13) YAL054C, YPL061W, YMR170C, YMR169C, YMR303C, YOL086C, 14) YGL062W, 15) YOL126C, 16) YKL085W, 17) YNR001C, 18) YNL037C, YOR136W, YDL066W, 19) YIL125W, YDR148C, YFL018C, 20) YKL148C, YLL041C, 21) YPL262W, 22) YML120C, 23) YMR145C, 24) YBL045C, YPR191W, YFR033C, 25) YNL052W, YLR038C, 26) YBL099W, YJR121W, YBR039W, YPL078C, YDR298C, YKL016C, YLR393W, YNL315C, 27) YFL018C, YER178W, YNL071W, YGR193C, YBR221C, 28) YLR304C, 29) YKR097W, 30) YJR095W, YLR348C, YPR021C, YPL134C, YOR222W, YBL030C, YBR085W, 31) YLR027C, 32) YOR142W, YGR244C, 33) YOR375C, 34) YDL215C, 35) YPR035W. *) SDH reduziert FAD in der mitochondriellen Matrix. NDE oxidiert $FADH_2$ in der mitochondriellen Matrix und überträgt Elektronen von NADH im mitochondriellen Intermembranraum.

6.5.3 Citratzyklus in Mitochondrien

Obwohl sich die Reaktionsrate der Glykolyse verdoppelte, sank die Rate des mitochondriellen Pyruvat-Imports durch den mitochondriellen Pyruvat-Transporter, bestehend aus Mpc1p, Mpc2p und Mpc3p, in der Simulation um ein Viertel. Die Expression der Untereinheiten MPC2p (YHR162W) und MPC3p (YGR243W) ist abhängig von der Kohlenstoffquelle. Zusammen mit MPC1p (YGL080W) bilden sie einen spezifischen Transportkomplex für das Substratangebot unter fermentativen (MPC1p mit MPC2p) und respirativen (MPC1p mit MPC3p) Bedingungen [25].
Reprimiert wurden bei CO_2-Anstieg MPC1 und MPC3 (Abb. 6.9). MPC2 wurde gleichzeitig induziert. Ein Expressionsmuster, das Hefe auch unter anaeroben Bedingungen verwendet, da der mitochondrielle Bedarf für Pyruvat unter anaeroben Bedingungen deutlich geringer ist, wurde auch der Transport von Pyruvat in die mitochondrielle Matrix eingeschränkt.
Die Geschwindigkeit des TCC wird *in vivo* maßgeblich von der Citrat-Synthase-Aktivität (Cit1p: YNR001C) bestimmt. Inhibitorische Effekte durch CO_2 und HCO_3^- auf die katalytische Leistung dieser Enzyme wurden von Jones und Greenfield 1982 zusammengefasst. Beeinträchtigt werden die Funktion der Cytochrom-C-Oxidase (EC 1.9.3.1), Isocitrat-DH (EC 1.1.1.42), Succinat-DH (EC 1.6.99.3) und Malat DH (EC 1.1.1.37, 1.1.1.39) [180]. In der Simulation wurden keine Effektoren berücksichtigt. Die MFA basierte auf den zellulären Transferraten der Phasen ii) und iii). Die Simulation bestätigte einen Rückgang der mitochondriellen Pyruvataufnahme um 27%. Trotz einer erhöhten Carboxylierung von Oxalacetat reduzierte sich die Synthese von Citrat. Die Transaminierung von α-Ketoglutarat und die Produktion von Succinat zogen Intermediate aus dem TCC ab. Der Stoffffluss von Succinat zu Fumarat verringerte sich um 56%. Die beobachtete transkriptionelle Induktion der TCC- und MRC-Enzyme 30 Minuten nach CO_2-Anstieg bestätigte CO_2 als inhibitorischen Effektor für die Succinat-DH-Aktivität des mitochondriellen Metabolismus.

6.5.4 Atmungskette und oxidative Phosphorylierung

Bei der Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 2-Phosphoglycerat wurde NAD^+ zu NADH reduziert. Die Simulation eines aeroben Metabolismus regenerierte dieses NAD^+ zu 100% durch die Übertragung der Elektronen an die Quinon-Oxidoreduktase (Nde1p: YMR145C) auf der cytosolischen Seite der Mitochondrienmembran (Abb. 6.9). Mit Anstieg der Glykolyse erhöhte sich dieser Elektronentransfer um 74%. Die Steigerung anaboler Reaktionen erhöhte die Übertragung um weitere 16% auf bis zu 90% des Referenztransfers. Dieser Anstieg kompensierte den Rückgang der Elektronenübertragung aus der mitochondriellen Matrix. Die Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff ging damit lediglich um 10-15% zurück. Es blieb ein Rückgang der oxidativen Phosphorylierung von 11% im Verhältnis zur Glukoseaufnahme.
Die Synthese von Ethanol konnte als Zeichen einer vollständigen Auslastung der MRC verstanden werden. Das bedeutet eine zeitliche Entkopplung der ATP-Synthese durch Substratkettenphosphorylierung und einer späteren oxidativen Phosphorylierung durch NADH, das bei der Ethanol-Reoxidation entstand. Der rückläufige Reaktionsrate der Glykolyse beendete die Auslastung der MRC (Nde1p) und ermöglichte nach 30 Minuten die Oxidation von Ethanol

zu Acetat. Die Regulation der notwendigen Alkohol-Dehydrogenase (Adh2p: YMR303C) oblag den TFs Adr1p (an 5'-TTGGRG-3') und Cat8p (an 5'-CCCGGTGTTCCG-3') [459, 360]. Die Expression beider TFs wurde bei zehn Minuten reprimiert. Adr1p wird durch PKA phosphoryliert und damit inaktiviert, was die Expression von ADH2 inhibiert [86, 56]. 30 Minuten nach CO_2-Anstieg wurden ADR1 und CAT8 bereits wieder induziert. Das bedeutete die Aufhebung der Katabolitrepression für nicht-fermentierbare Kohlenstoffquellen unter aeroben Bedingungen.
Die Substratkettenphosphorylierung der Glykolyse stellte vorher bis zu 4,3 $mmol_{ATP}g_{DW}^{-1}h^{-1}$ zusätzlich bereit (Tab. 6.2). Die Biomasseausbeute Y_{XATP} sank daher zwischenzeitlich von 11,5 auf 7,7 $g_{DW}mol_{ATP}^{-1}$. Bei den gegebenen Rahmenbedingungen bewegen sich diese Werte in realistischen Größenordnungen [347]. Sowohl Y_{XS} als auch Y_{XATP} waren vom Grad der metabolischen Anpassung an den CO_2-Gehalt abhängig. Zahlreiche Elemente der MRC und sechs Untereinheiten der ATP-Synthase wurden 30 Minuten nach CO_2-Anstieg transkriptionell induziert (siehe Kapitel 7). Die Zellen leiteten damit langfristig die Adaption an hohe CO_2-Gehalte ein.
Ein stabiles Energieniveau stand allen anabolen Prozessen vor und ermöglichte die Umstellung der enzymatischen Ausstattung für katabole Prozesse. Maßnahmen erfolgten daher schnell und auf mehreren Ebenen gleichzeitig. Die Zelle aktivierte in der Stresssituation alternative Transkriptionsfaktoren. Die Beschränkung der Transkriptions- und Translationsleistung wurde dabei aufgehoben und die Umstellung des Stoffwechsels massiv beschleunigt. So wurde in Phase ii) die Handlungsfähigkeit der Zelle gesichert und in Phase iii) über mehrere Generationen ausgebaut bis die Effizienzeinbuße in Phase iv) auf 5% reduziert wurde. Kapitel 7 erläutert die Stressantwort als Folge von CO_2-Belastung.

Kapitel 7

CO_2-induzierte transkriptionelle Stressantwort

7.1 Analyse des Transkriptoms bei CO_2-induziertem Stress

CO_2/HCO_3^- sind essentielle Komponenten mit Signalwirkung für die Zelle. Der zelluläre Komfortbereich von HCO_3^- als Substrat beginnt bei einstelligen millimolaren Konzentrationen [14]. Die $K_{m,HCO3}$-Werte, der Enzyme Pyc1p und Acc1p liegen in diesem Bereich [14]. Das Zehnfache dieser Konzentration ist im Cytosol (pH 7) und den Mitochondrien (pH 7,2) bereits bei Referenzbedingungen durch die Respiration ($15 < Q_{CO2} < 60$ mmol $L^{-1}h^{-1}$) gegeben (siehe Kapitel 5).
In vitro kommt es im millimolaren Bereich durch HCO_3^- auch zur allosterischen Beeinträchtigung der Pyruvatcarboxylase [14, 180]. *In vivo* reprimiert CO_2 die Expression von PYC1 und ACC1 [227, 328]. Die allosterische und transkriptionelle Regulation dieser beiden Gene durch CO_2/HCO_3^- findet in einem weiten Bereich (ca. 1-100 $mM_{HCO3,c}$ und 1-10 $mM_{CO2,c}$) statt. Im Labormaßstab können höhere CO_2-Belastungen entstehen und durch den *scale-up* in den Produktionsmaßstab verstärkt werden. Der Metabolismus von *S. cerevisiae* reagierte auf hohe CO_2-Belastung vergleichsweise robust aber dennoch gestresst (Abs. 2.2.2). Der Grad der Belastung in den vorgestellten Experimenten war daher für den Organismus angemessen hoch.
Aguilera u. a. identifizierten 2005 CO_2-responsive Gene in *S. cerevisiae* [9]. Kürzlich konnte auch der stressresponsive TF Cst6p mit der Regulation von CO_2-responsiven Genen wie der Carboanhydrase in Verbindung gebracht werden [227]. Aktuelle Literatur geht damit von zwei Signalwegen zur Wahrnehmung von CO_2/HCO_3^- in *S. cerevisiae* aus [155, 328]. Frühere Studien deuteten auf eine vielschichtige Anpassung des Organismus hin. Es war daher das Ziel der vorliegenden Studie die Vorgänge dieser Anpassung zeitlich aufzulösen.
Dazu wurden NGS-Transkriptomanalysen durchgeführt. Innerhalb eines Prozessverlaufs wurde das *in vivo*-Expressionsmuster zu fünf Zeitpunkten bestimmt. Die Daten zeigten den Übergang der Stoffwechselkontrolle durch *housekeeping*-Gene an das zelluläre Stressprogramm. Die Expressionsmuster in den ersten 60 Minuten unterschieden sich daher deutlich von einer CO_2-adaptierten Regulation bei konstantem CO_2-Niveau (siehe Kapitel 6). Tabelle 7.1 zeigt die Anzahl differentiell exprimierter Gene (DEG) zeitlich aufgelöst. Die Gene wurden in vier Prozessen (D=0,1 h^{-1} und D=0,05 h^{-1}) identifiziert. Initial wurden bis zu 28% des Genoms differentiell exprimiert. Die Anzahl sank nach fünf Verweilzeiten auf unter 10%.

TABELLE 7.1: Dargestellt ist die Anzahl differentiell exprimierter Gene zwischen dem Referenzzeitpunkt t_0 und den Zeitpunkten t_{10}, t_{30}, t_{60} und t_∞ (neues Gleichgewicht). Als differentiell exprimiert galt ein Gen, wenn die Änderung seiner Expression i) den FC erreicht, ii) p<0,05 war und iii) mindestens 50 CPM erreicht wurden (Abs. 3.11).

$\lvert\log_2 FC\rvert$	Tendenz	DGE			
		t_{10}	t_{30}	t_{60}	t_∞
	Induktion	422	140	121	62
$\geq$1	Repression	488	390	159	120
	Summe	**910**	**530**	**280**	**182**
	Induktion	726	526	392	263
$\geq$0,6	Repression	1037	687	321	230
	Summe	**1763**	**1203**	**713**	**493**

7.1.1 Statistisch identifizierte Prozesse, Komponenten und Funktionen

Gene mit ähnlicher differentieller Genexpression DGE wurden in die Gen-*cluster* I-VIII gruppiert (Abb. 7.1). In diesen *clustern* wurden Stoffwechselwege und Gen-Ontologie-Termini (GOs) statistisch identifiziert. Die mathematischen Details zur Methode wurden in Kapitel 3 Abschnitt 3.11 beschrieben.

Über 25% aller Gene wurden bei CO_2-Anstieg ausgelenkt (Tab. 7.1). Die Erläuterungen in dieser Arbeit beschränken sich auf Gengruppen, deren Änderung als systemrelevant erachtet wurde. Dazu gehören alle identifizierten Stoffwechselwege (Tab. 7.2), Gene zur Regulation des Transports über Membranen (Kapitel 5), Gene des Energiestoffwechsels (Kapitel 6 und 7) und Gene die über Tage differentiell exprimiert blieben (Abs. 7.2).

Stoffwechselwege in Gen-*clustern*

Die Funktion von Genen des TCC, der MRC und der aeroben Respiration wurden im Abschnitt 6.4 beschrieben. Sie sind mit hoher Wahrscheinlichkeit ($p<10^{-5}$) Gen-*cluster* I zuzuordnen und damit durch CO_2 positiv reguliert. Die Fettsäureoxidation wurde im DGE-Profil des *cluster* III als reprimiert identifiziert ($p<10^{-2}$). Der Schwefelmetabolismus ($p<10^{-3}$), Abkömmlinge der Phosphoribosylpyrophosphat-Biosynthese ($p<10^{-2}$) und die Biosynthese verzweigter Aminosäuren ($p<10^{-2}$) waren im Gen-*cluster* IV zu finden (Tab. 7.2). Die Metabolisierung von Schwefel und die biochemische Übertragung von C_1-Einheiten unterstützten die Adaption der Mitochondrien an hohe CO_2-Niveaus. Diphthamid ist Bestandteil eines Elongationsfaktors, was die Translation erhöhen konnte. Die Stoffwechselwege wurden entweder bereits in Kapitel 6 im Detail erläutert oder sind in den Abschnitten 7.1.2 bis 7.2.1 beschrieben.

Im direkten Vergleich der Expressionsmuster zeigte D=0,1 h^{-1} eine beschleunigte Abwicklung der Stressantwort gegenüber D=0,05 h^{-1}. Gene werden im zeitlichen Profil von D=0,1 h^{-1} früher reguliert und ihre Induktion bzw. Repression konnte zeitlich kürzer erfolgen. Die schnellere Rückführung der Kultur zum Expressionsprofil des Ausgangszustands konnte im direkten Vergleich von D=0,1 h^{-1} und D=0,05 h^{-1} beobachtet werden. Darüber hinaus sind die Unterschiede der DGE bei D=0,1 h^{-1} und D=0,05 h^{-1} eher gering (siehe Tab. 3.11 Zeile 10, 11, 12 und 14).

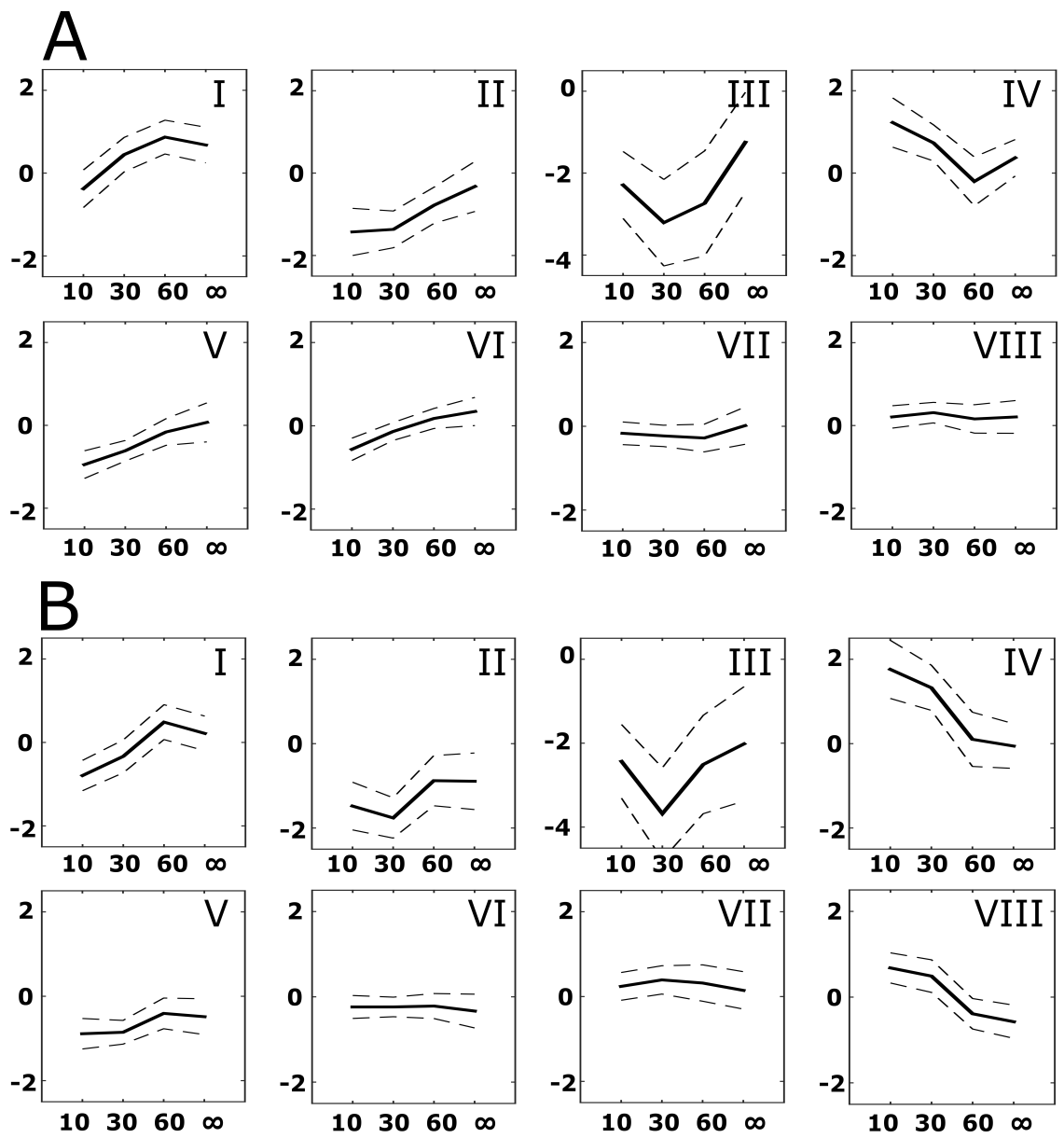


ABBILDUNG 7.1: 6289 Gene wurden in den NGS-Transkript-Daten identifiziert. Anhand der zeitlichen Veränderung ihres CPM-Werts wurden die Gene in acht Gruppen unterteilt. Die differentielle Genexpression (DGE) jedes Gen-*clusters* (I-VIII) wurde auf der vertikalen Achse als logarithmischer *fold change* ($\log_2$FC) für D=0,1 h^{-1} (A) und D=0,05 h^{-1} angegeben (B).

GOs in Gen-*clustern*

Neben diesen zehn Stoffwechselwegen wurden im zeitlichen Profil 600 Gen-Ontologie-Termini (GOs) identifiziert. GOs werden in die Kategorien biologischer Prozess (Prozesse), zelluläre Komponente (Komponenten) und molekulare Funktion (Funktionen) unterteilt [43]. Tabelle 7.3 zeigt eine Übersicht, wie viele GOs in den Gen-*clustern* I-VIII identifiziert wurden. Das zeitliche Profil aller identifizierten GOs wurde im Appendix D zusammengefasst (Abb. D.1-D.6).

Die Anzahl der identifizierten GOs in Gen-*cluster* I-III, V, VII und VIII war ähnlich. Bei D=0,1 h^{-1} wiesen *cluster* IV deutlich mehr und *cluster* VI deutlich weniger GOs auf als D=0,05 h^{-1}

TABELLE 7.2: Ein Abgleich der Datenbanken BIOCYC und KEGG identifizierte acht Stoffwechselwege in den Gen-*clustern* I-VIII. Die Anzahl der zur Identifikation relevanten Gene und die daraus resultierende Zufallswahrscheinlichkeit p sind für NGS-Transkript-Daten der Durchflussraten 0,1 h^{-1} und 0,05 h^{-1} gegeben.

Gen-*cluster*	***pathway***	**Gene**		**p**	
	BIOCYC	**0,1**	**0,05**	**0,1**	**0,05**
I	MRC und Aerobe Respiration PWY3O-188	15	15	$< 10^{-5}$	$< 10^{-4}$
	TCC und Aerobe Respiration TCA-EUK-PWY	12	12	$< 10^{-5}$	$< 10^{-4}$
	TCC und Glyoxylat Cycle PWY3O-94	11	11	$< 10^{-5}$	$< 10^{-4}$
III	Fettsäure Oxidation YEAST-FAO-PWY	6	6	$< 10^{-2}$	$< 10^{-2}$
IV	Schwefel-Aminosäure Biosynthese PWY-821	12	11	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$
	Sulfat Assimilation PWY-781	5	5	$< 0,05$	$< 10^{-2}$
	S-Adenosylmethionin Zykus PWY-5041	-	4	-	$< 0,05$
	Histidin-Purin-Pyrimidin Biosynthese PRPP-PWY	18	-	$< 10^{-2}$	-
	Leucin-Isoleucin-Valin Biosynthese BRANCHED-CHAIN-AA-SYN-PWY	8	6	$< 10^{-2}$	$< 0,1$
VIII	Diphthamid Biosynthese PWY-6482	-	3	-	$< 0,05$

(Tab. 7.3). Bei höherem D wurden in der Frühphase (t_{10} und t_{30}) mehr GOs mit positiver DGE identifiziert, während bei geringerem D der nicht-responsive Gen-*cluster* VI mehr GOs enthielt. Jeder GO wurde über die DGE von mindestens fünf Genen identifiziert. Aufgrund der unterschiedlichen Geschwindigkeit in der Stressantwort und der Adaption sei für den direkten Vergleich auf den einzelnen GO im Appendix D verwiesen (Abb. D.1-D.6).

In der ersten Stunde nach Beginn des CO_2-Anstiegs wurde die Regulation anaboler und kataboler Prozesse auf mRNA-Ebene beobachtet. Die zelluläre Stressantwort reprimierte kurzzeitig zahlreiche vegetative Prozesse. Dazu gehören beispielsweise die Bildung von Organellen wie Vakuolen (GO: 323, 324, 5773, 5775, 44437) und Peroxisomen (GO: 5777, 5778, 5782, 5783, 44439). Die Synthese von Zellwandbestandteilen (GO: 5618, 9277) und Membranen (GO: 16020, 19867, 30312, 31090, 31903, 31907, 44425, 98588, 98805) wurde ebenfalls reprimiert (Apx. D Abb. D.5). Der Einfluss hoher CO_2-Niveaus reprimierte den Lipidstoffwechsel (GO: 6629, 34440, 44242, 44255), den Fettsäurestoffwechsel (GO: 6631, 6635, 9062, 15909, 19395) und die Steroidsynthese (GO: 6694, 6696, 8202, 8204, 16125, 16126, 16128, 16129) (siehe Tab. 7.2). Die Metabolisierung anderer nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquellen wie Monocarbonsäuren (GO: 32787, 46395, 72329) und Alkoholen (GO: 55114, 1902652, 1902653) wurde ebenfalls reprimiert. Gene der Stressantwortregulation (GO: 33554, 34599, 42221, 50896, 51716) wurden kurzzeitig induziert, aktivierten Prozesse und wurden bereits

TABELLE 7.3: In den Gen-*clustern* I-VIII wurden Gen-Ontologie-Termini (GOs) gemäß der AmiGO Datenbank identifiziert. GOs sind in die Kategorien *Prozesse*, *Komponenten* und *Funktionen* gegliedert. Die Anzahl der GOs, welche mit einer Zufallswahrscheinlichkeit p<0,05 identifiziert wurden, sowie die minimale und maximale Anzahl der dabei verwendeten Gene sind bei den Durchflussraten 0,1 h^{-1} und 0,05 h^{-1} gegeben.

cluster	**Anzahl GOs**		**Anzahl Gene pro GO**		**Kategorie**	**p**
	0,1	**0,05**	**0,1**	**0,05**		
	99	94	7 - 346	6 - 509	Prozesse	
I	61	64	5 - 385	6 - 551	Komponenten	$< 0,05$
	5	9	11 - 71	31 - 80	Funktionen	
	16	30	8 - 336	9 - 408	Prozesse	
II	9	4	13 - 236	10 - 281	Komponenten	$< 0,05$
	2	2	55 - 219	60 - 263	Funktionen	
	26	39	7 - 49	6 - 134	Prozesse	
III	8	8	6 - 37	6 - 58	Komponenten	$< 0,05$
	6	10	5 - 33	6 - 88	Funktionen	
	133	86	6 - 620	6 - 366	Prozesse	
IV	37	22	5 - 399	5 - 278	Komponenten	$< 0,05$
	26	20	8 - 402	13 - 248	Funktionen	
	60	53	17 - 661	10 - 760	Prozesse	
V	37	27	9 - 678	7 - 801	Komponenten	$< 0,05$
	5	4	9 - 162	6 - 198	Funktionen	
	80	137	24 - 761	25 - 853	Prozesse	
VI	57	49	21 - 997	13 - 926	Komponenten	$< 0,05$
	2	6	17 - 211	19 - 229	Funktionen	
	46	49	15 - 205	6 - 569	Prozesse	
VII	1	4	6 - 267	25 - 61	Komponenten	$< 0,05$
	3	18	6 - 34	113 - 273	Funktionen	
	63	78	24 - 400	11 - 443	Prozesse	
VIII	4	19	10 - 424	10 - 291	Komponenten	$< 0,05$
	4	14	14 - 313	9 - 202	Funktionen	

wieder reprimiert, während die von ihnen angestoßenen zellulären Programme abliefen (Apx. D Abb. D.2-D.4).

Induziert wurde die stressbedingte Transkription zellulärer Komponenten (Tab. 7.3) des Transkriptions- und Translations-Apparats. Im Zellkern erfolgte bis t_{10} die Expression von RNA-Polymerasen (GO: 5634, 5666, 5730, 5736). Durch die Expression von Genen ribosomaler Untereinheiten und Translationsinitiationsfaktoren bei t_{10} und t_{30} erfolgte eine Anpassung der Translationskapazität (GO: 313, 314, 315, 5840, 30427, 30529, 30684, 30686, 30687, 30688, 33553, 34388, 34455, 43614, 44391, 1990904). Abbildung D.5 (Apx. D) zeigt, dass mitochondrielle ribosomale Gene erst bei t_{60} differentiell exprimiert auftraten (GO: 5759, 5761, 5762, 5763, 42645, 98798).

Induziert wurden außerdem Gene, deren molekulare Funktionen (Tab. 7.3) unterstützend auf

Transkription und Translation wirken. Darunter Transkriptionsfaktoren zur Modifikation der RNA-Polymerase-Bindestellen (GO: 3899, 8649, 8168, 1901265), Aktivitäten zur Synthese, der molekularen Modifikation und der Beladung von tRNAs (GO: 4812, 8175, 16875, 16876), Strukturkomponenten der RNA-RNA-Wechselwirkung (GO: 3723, 3729, 30515) darunter auch diverse RNA-Helikasen (GO: 3724, 4004, 8026, 70035) und Komponenten zur Modifikation der ribosomalen Aktivität (GO: 3735, 8173, 44822) (siehe Apx. D Abb. D.6).
Auch unter den biologischen Prozessen (Tab. 7.3) wurde die Bereitstellung und Modifikation ribosomaler Proteine (GO: 54, 33750, 33753, 42254, 42255, 42273, 42274, 71166, 71426, 71428, 71826), ribosomaler RNA (GO: 447, 459, 460, 462, 463, 466, 467, 469, 470, 472, 478, 479, 480, 16072, 42790), die Biogenese von Ribosomen (GO: 30689) durch den NOC-Komplex und die tRNA-Bereitstellung (GO: 6360, 6399, 6400, 6418, 8033, 30488) bei t_{10} und t_{30} transkriptionell positiv reguliert. Die Stress-Regulation aktivierte den zellulären Aminosäure-Metabolismus (GO: 6555, 6575, 6725, 8652, 9066, 1901605, 1901607) zur Beladung dieser tRNAs (GO: 43038, 43039). Die Metabolisierung anorganischer Substrate (NH_4^+, Fe^{3+} und SO_4^{2-}) unterstützte dabei die Synthese von biochemischen Grundbausteinen. Die Synthese von Aminosäuren bedurfte eines erhöhten Stickstoff-Metabolismus (GO: 6807, 34641, 1901564, 1901566) zur Ammonium-Assimilation. Gene des Schwefel-Metabolismus (GO: 96, 97, 103, 6790, 44272, 70813, 70814) zur Assimilation und Reduktion von Sulfat wurden bei t_{10} und t_{30} ebenfalls erhöht.
Die zelluläre Umverteilung von Kohlenstoff wurde in Kapitel 6 Abschnitt 6.4 im Detail erläutert. Einige GOs für den Glycogen- und Trehaloseabbau (GO: 271, 5975, 5976, 5977, 5978, 5991, 5996, 6109, 6112), den fermentativen (GO: 16053, 16054, 32787, 44107, 44108, 46394, 46395) und respirativen Metabolismus (GO: 6099, 9060, 45333) konnten im Transkriptom identifiziert werden (siehe Apx. D Abb. D.2-D.4). Anhand des Transkriptoms folgt hier die Erläuterung anaboler Funktionen in den Abschnitten 7.1.2 bis 7.2.1.

7.1.2 Biosynthese von Aminosäuren

In Kapitel 6 wurde erläutert, dass der Import von Pyruvat in die Mitochondrien um 37% und die Reaktionsraten des Tricarbonsäurezyklus (TCC) um etwa 56% verringert wurden. Abbildung (Abb. 7.2) zeigt die Biosynthese der Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin. Die biochemische Synthese der Vorstufen 2-Keto-3-methyl-Valerat und 2-Keto-iso-Valerat aus Pyruvat findet in den Mitochondrien statt. Die Expression katalysierender Enzyme (EC: 2.2.1.6, 1.1.1.86, 4.2.1.9, 4.3.1.19) untersteht der Kontrolle der generellen Aminosäuresynthese und konnte Gen-*cluster* IV zugeordnet werden (Tab. 7.2). Bei detaillierter Betrachtung wurde ersichtlich, dass nur die mitochondrielle Transaminierung dem Profil des Gen-*cluster* IV entsprechend induziert wurde. Die cytosolische Transaminierung ist transkriptionell reprimiert. Beides zusammen deutet eine verstärkte mitochondrielle Synthese der drei Aminosäuren an.
Diese kompartimentell differenzierte DGE könnte einen überwiegend mitochondriellen Bedarf von Valin, Leucin und Isoleucin bei CO_2-Anstieg andeuten. Die Simulation ergab für Valin eine geringe, für Leucin und Isoleucin keine Veränderung der Syntheserate (Abb. 7.2). Dabei wurde allerdings nicht zwischen mitochondrieller und cytosolischer Synthese unterschieden.

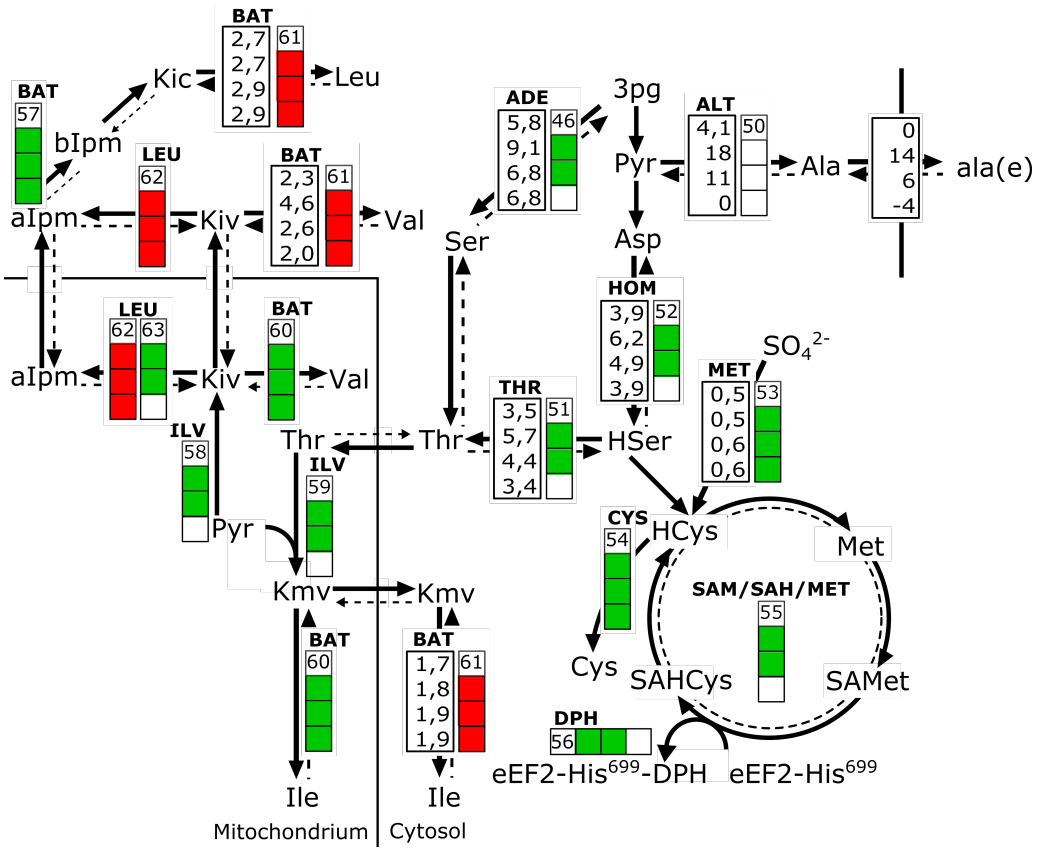


ABBILDUNG 7.2: Übersicht der Synthese von verzweigtkettigen Aminosäuren [55], des Schwefel-Metabolismus [218] und seiner essentiellen Funktion für die ribosomale Aktivität in Eukaryoten [229, 232]. MFA-Ergebnisse basierend auf pseudo-*steady states* nach CO_2-*shift* sind den Reaktionen so weit bekannt zugeordnet. $q_{Glukose}$ wurde auf $D{\cdot}10^3$ normiert. Volle Pfeile zeigen die Flussrichtung bei pos. Wert. Die differentielle Expression katalytisch relevanter Gene zwischen Referenz und den Zeitpunkten 10, 30 und 60 ist der Reaktion zugeordnet (Rot: [$\log_2$FC$\leq$-0,6]; Grün: [$\log_2$FC$\geq$ 0,6]). Kürzel: Pyr: Pyruvat, Ala: Alanin, Kiv: 2-Keto-iso-Valerat, Kmv: 2-Keto-3-methyl-Valerat, Kic: α-Keto-iso-Caproat, aIMP: α-Isopropylmalat, bIMP: β-Isopropylmalat, Val: Valin, Leu: Leucin, 3pg: 3-Phospho-D-glycerat, Ser: Serin, Gly: Glycin, Asp: Aspartat, HSer: Homoserin, Thr: Threonin, Ile: Isoleucin, SO_4^{2-}: Sulfat, HCys: Homocystein, Met: Methionin, SAMet: S-Adenosyl-Methionin, SAHCys: S-Adenosyl-Homocystein, eEF2-His^{699}: Histidinseitenkette des Translations-Elongations-Faktor 2, DPH: Diphthamid. ID: 46) YOR184W, YGR208W, YER081W, 50) YLR089C, 51) YHR025W, 52) YER052C, 53) YKL001C, YPR167C, YJR137C, YFR030W, 54) YER091C, YGR155W, YAL012W, 55) YDR502C, YLR180W, YER043C, YER091C, 56) YKL191W, YLR172C, 57) YGL009C, YCL018W, YHR208W, 58) YMR108W, YLR355C, YJR016C, 59) YER086W, YMR108W, YLR355C, YJR016C, 60) YHR208W, 61) YJR148W, 62) YNL104C, 63) YOR108W.

Betrachtet man den zellulären Gehalt der drei Aminosäuren, zeigte Valin eine signifikante temporäre Zunahme (Abs. 3.12.3; p$\leq$0,05). Der Anstieg von Threonin, einer biochemischen Vorstufe von Isoleucin, wurde anteilig zu etwa 5% in den Isoleucin-*pool* fortgesetzt (Abb. 6.6 und 6.7). In Summe lag die Synthese von Valin, Leucin und Isoleucin bei 10% des mitochondriellen Pyruvat-Imports. Dieser sank durch den CO_2-Anstieg, während die Synthese der Aminosäuren induziert wurde. Das steigerte den Pyruvat-Anteil für die Aminosäuresynthese auf 15-20% des

mitochondriellen Pyruvat-Imports.
Pyruvat konnte auch über die Decarboxylierung von Malat synthetisiert werden. Das katalysierende Malat-Enzym (Mae1p) ist Teil der Gluconeogenese. Mae1p nutzt $NADP^+$ als Co-Faktor und bietet neben dem $NADP^+$-abhängigen Isoenzym der Isocitrat Dehydrogenase Idp1p (YDL066W) eine alternative Quelle für mitochondrielles NADPH [372]. Die DGE von MAE1 (YKL029C) erhöht sich bei CO_2-Anstieg rapide und blieb zu jedem Zeitpunkt auf signifikant erhöhtem Niveau (1,5<FC<3,3).
Die NADPH-Bereitstellung im Cytosol wurde in MFAs bei CO_2-Anstieg vom oxidativen Pentosephosphatweg zur Acetat-Synthese verlagert. Die Isocitrat-DH-Reaktionsrate sank laut Simulation in diesem Zeitraum um 30%. Wenn es induziert wird, entzieht Mae1p dem TCC Intermediate. In Kombination mit der Pyruvat-Carboxylase und einem mitochondriellen Oxalacetat-Importer könnte CO_2 vom Cytosol in die mitochondrielle Matrix transportiert werden. Für sich betrachtet senkt Mae1p die Reaktionsrate des TCC und synthetisiert mitochondrielles Pyruvat und NADPH. Über die Funktionen von Mae1p für den mitochondriellen Stoffwechsel könnte mit der gegebenen Datenlage viel gemutmaßt werden.

7.1.3 Mitochondrielle Transporter

In Mitochondrien stehen Fumarat, Malat und Oxalacetat über die Fumarase Fum1p (YPL262W) und die Malat-Dehydrogenase Mdh1p (YKL085W) im reversiblen Reaktionsgleichgewicht. Mitochondrielle Dicarboxylat-Transporter sorgen für ihren Austausch zwischen Cytosol und mitochondrieller Matrix. Succinat, Malonat, Citrat, Isocitrat und α-Ketoglutarat wurden ebenfalls transportiert (siehe auch Abb. 6.9).
Dic1p (YLR348C) importiert Malonat, Malat und Succinat im Austausch mit Phosphat [184, 312] und wurde durch CO_2 transkriptionell reprimiert. Sfc1p (YJR095W) importiert Succinat im Austausch gegen Fumarat beim Wachstum auf Ethanol und Acetat [310] und wurde bis t_{30} reprimiert. Der Citrat- und Isocitrat-Transporter Ctp1p (YBR291C) wurde bei t_{10} und t_{30} induziert [185]. Import von Malonat, Oxalacetat und Sulfat durch Oac1p (YKL120W) erfolgt als Protonensymport [311]. Die Expression des Transporters wurde bei t_{10}, t_{30} und t_{60} induziert.
Der Transport von Dicarbonsäuren in Kombination mit der katalytischen Aktivität von Mae1p (YKL029C) wurde in der Literatur diskutiert [413, 20]. Die Intention einer transkriptionellen Induktion von Oac1p und Mae1p könnte die mitochondrielle Bereitstellung von NADPH für den mitochondriellen Anabolismus sein.
Durch die CO_2-Belastung kam es zur Inhibition mitochondrieller Katalysen, was durch die transkriptionelle Induktion mitochondrieller Proteine angezeigt wurde. Der Reduktionsgrad des mitochondriellen NAD(H)-*pool* galt dabei als allosterischer Effektor der TCC-Reaktionsrate zur Abstimmung mit der Elektronentransportkette. Da mitochondrielles $NADP^+$ durch die Isocitrat-Dehydrogenase Idh2p des TCC reduziert wurde, könnte es bei geringer Reaktionsrate des TCC zu einem Rückgang des Reduktionsgrades im NADP(H)-*pool* kommen, obwohl der Reduktionsgrad des NAD(H)-*pool* hoch ist. Oac1p und Mae1p wären geeignet innerhalb des Kompartiments NADH in NADPH umzuwandeln und Pyruvat für die Aminosäuresynthese bereitzustellen.
Das Malat-Enzym Mae1p entzieht dem TCC aktiv Intermediate. Bei CO_2-Belastung scheinen

diese zeitweise im Überschuss vorhanden zu sein, da Succinat mit $q_{Succinat}$=0,12 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$ exportiert wurde. Fest steht, dass diese Intermediate durch den Import von C_4- (z.B. Oxalacetat), C_5- (z.B. α-Ketoglutarat) und C_6-Körper (z.B. Citrat) in die Mitochondrien ersetzt wurden. Dazu wurde die anaplerotische Carboxylierung von Pyruvat im Cytosol induziert. Die gezielte Repression von Transportern für Dicarbonsäuren könnte Ausdruck veränderter Metabolit-Gehalte zwischen Cytosol und Mitochondrium sein. Die Interpretationsmöglichkeiten sind aufgrund fehlender Messdaten und der Simplifizierung des stöchiometrischen Modells begrenzt.
Etwa 99% der mitochondriellen Proteine sind im Zellkern kodiert aber wurden im Cytosol synthetisiert. Schätzungsweise werden 1000-2000 verschiedene Proteine in die Mitochondrien transportiert und dort zusammengesetzt. Die molekularen Prozesse der Translokation, Sortierung und Assemblierung von mitochondriellem Proteinen wurden von einigen Proteinen durchgeführt.
Allgemein kann zwischen den Funktionen von sieben Proteinstrukturen unterschieden werden. Der TOM-Komplex (Translokase der äußeren Membran) umfasst sieben verschiedene Proteine (Tom5p, Tom6p, Tom7p, Tom20p, Tom22p, Tom40p, Tom70p). Die mRNA-Gehalte von fünf der sieben Gene wurden bei t_{60} positiv reguliert (Tom5: YPR133W-A, TOM7: YNL070W, TOM20: YGR082W, TOM40: YMR203W, TOM70: YNL121C). Der TIM23 Komplex (Translokase der inneren Membran) besteht aus zehn Untereinheiten (Ssc1p, Mge1p, Pam17p, Tim14p, Tim16p, Tim17p, Tim21p, Tim23p, Tim44p, Tim50p), wovon SSC1 (YJR045C), TIM14 (YLR008C), TIM16 (YJL104W), TIM17 (YJL143W) und TIM23 (YNR017W) ebenfalls bei t_{60} vermehrt trankribiert wurden. Sogenannte kleine TIM-Komplexe aus Tim9p und Tim10p bzw. Tim8p und Tim13p vermitteln Proteine im Intermembranraum zwischen dem TOM-Komplex und dem TIM22-Komplex bzw. dem TOB-Komplex. TIM10 (YHR005C-A) und TIM13 (YGR181W) wurden eine Stunde nach dem *shift* erhöht exprimiert. Der TIM22-Komplex vermittelt eine membranpotentialabhängige Integration und besteht aus vier verschiedenen Proteinen (Tim12p, Tim18p, Tim22p, Tim54p). Temporär vermehrt exprimiert wurde TIM54 (YJL054W).
Es ist naheliegend, dass die Translokation mitochondrieller Proteine nach deren Synthese im Cytosol durch vermehrten Membrantransport unterstützt werden konnte.

7.1.4 Biosynthese von Methionin und Elongationsfaktor 2

Eine zentrale Bedeutung für die Adaption an CO_2 hatte die Regulation der Sulfat-Assimilation. Als Schwefelquelle wurde Sulfat reduziert und zur Synthese der schwefelhaltigen Aminosäurevorstufe Homocystein verwendet. Cystein und Methionin werden über den S-Adenosylmethionin-Zyklus gebildet (Abb. 7.2). Der Zyklus dient außerdem zur Übertragung von Methylgruppen aus dem 5-Methyl-Tetrahydrofolat-*pool* (5-CH_3-THF). Das Codon AUG zum Start der Translation an einer mRNA kodiert für Methionin und koppelt so die ribosomale Aktivität auch an die Verfügbarkeit von beladener Methionin-tRNA.
Eine signifikante Änderung des Methionin-*pools* konnte nicht bestimmt werden (Abb. 6.6 und 6.7; Abs. 3.12.3; $p \leq 0{,}05$). Für detaillierte Informationen zur kombinatorischen Kontrolle des Schwefelmetabolismus durch den Transkriptionsfaktor Met4p (YNL103W) mit den Cofaktoren Cbf1p (YJR060W), Met31p/Met32p (YPL038W/YDR253C) und Met28p (YIR017C) sei auf Lee u. a. verwiesen [218]. Cbf1p-abhängige Gene (Sul1: YBR294W, Sul2: YLR092W, MET5:

YJR137C, MET10: YFR030W, GSH1: YJL101C, CYC4: YGR155W, MET1: YKR069W, MET8: YBR213W, MET16: YPR167C, MET14: YKL001C und MET22: YOL064C) und Cbf1p-unabhängige Gene (MET3: YJR010W, CYS3: YAL012W, STR3: YGL184C, MET17: YLR303W, MET6: YER091C, SAM1: YLR180W, SAM2: YDR502C) wurden bei t_{10} induziert. Die beiden Gengruppen wurden unter CO_2-Einfluss in ähnlichem Muster differentiell exprimiert.
Es kommt durch die Ribosomen-Neusynthese wahrscheinlich zur stressbedingten Erhöhung der Translationsleistung und im Zuge dessen zur Bildung des Translations-Elongationsfaktors 2 (eEF-2). His^{699} des eEF-2 durchläuft eine der komplexesten posttranslationalen Modifikation der Zelle [229]. Die drei Reaktionsschritte werden in Hefe durch Dph1/2/3p (YIL103W, YKL191W, YBL071W-A), Dph5p (EC: 2.1.1.98, YLR172C) und Rrt2p (EC: 6.3.1.14, YBR246W) katalysiert.
Sie sind in allen eukaryotischen Zellen konserviert [231, 141, 442, 395]. In Humanzellen wurde das Tumor-Repressor-Gen OVCA1 (HsDPH1) als Homolog zu DPH2 identifiziert [232]. Die Synthese von Diphthamid benötigt die Übertragung von vier Methylgruppen durch S-Adenosyl-Methionin. Die DGE des S-Adenosylmethionin Zyklus in Stresssituationen war an der Erhöhung der Translationsleistung bei steigender CO_2-Belastung beteiligt.
Eine zelluläre Akkumulation von Cystein war wegen ihrer Reaktivität nicht wahrscheinlich, weshalb keine Daten zum zellulären Cystein-Gehalt erhoben wurden. Die Aminosäure ist Schwefel-Donor für die mitochondrielle Synthese anorganischer schwefelhaltiger Co-Faktoren. Die rhomboedrischen und kubischen *cluster* der Typen [2Fe-2S] und [4Fe-4S] bestehen aus Eisen ($Fe^{2+/3+}$) und Sulfid (S^{2-}). Sie sind in Proteinen gebunden und katalysieren die Übertragung von Elektronen auch innerhalb der MRC. Trotz ihres einfachen chemischen Charakters sind die Mechanismen der zellulären Synthese komplex. Der folgende Abschnitt fasst die transkriptionelle Änderung innerhalb des Eisen-Regulons zur Synthese von Eisen-Schwefel-*cluster* zusammen.

7.1.5 Eisen-Regulon zur Biogenese von Eisen-Schwefel-*clustern*

Eisen ist ein essentieller Nährstoff, der als Bestandteil von Eisen-Schwefel-*cluster* (Fe-S-*cluster*), in Häme und als direkter Aktivator von Enzymen mit einfachen oder dualen Eisenzentren dient [306, 314, 225]. Das Eisen-Regulon steuert die Mechanismen zur Aufnahme in die Zelle, den Eisengehalt des Cytosols, seine Komplexierung in Häme, die Aufnahme in die Mitochondrien, die Bildung verschiedener Fe-S-*cluster*, deren Komplexierung in Transportprotein und ihre weitere Übertragung als Cofaktoren auf katalysierende Proteine in Stoffwechselwegen. Das Sauerstoffangebot und die Eisenverfügbarkeit sind zentrale Umweltfaktoren des Regulons für die Deckung eines angepassten metabolischen Bedarfs bei wechselndem Substratangebot.
Induziert wurde dabei die Genexpression zur Sekretion von Siderophoren wie Hydroxamin Ferrichrom (Fit1p: YDR534C, Fit2p: YOR382W, Fit3p: YOR383C), zur Bindung (Fre1p: YLR214W, Fre2p: YKL220C, Fre3p: YOR381W) und zur Aufnahme von Siderophor-komplexiertem Fe^{3+} (Arn1p: YHL040C, Arn2p: YHL047C, Arn3p: YEL065W, Arn4p: YOL158C). Philpott u. a. beschrieben in ihren Arbeiten die molekularen Mechanismen und die kodierenden Gene [324, 323]. Ein zweites hochaffines Aufnahmesystem dient der Versorgung mit Eisen bei niedriger Konzentration (Ftr1p: YER145C, Fet3p: YMR058W, Ccc2p: YDR270W)

[323]. Mit Anstieg des CO_2-Niveaus wurde die Expression der in diesem Absatz genannten Gene induziert (Fe^{3+} im Medium etwa 3 mg L^{-1}). Abgesehen von der Expression eines Transporters für zweiwertige Kationen (Smf3p: YLR034C) erfolgte keine signifikante DGE von Systemen zum vakuolären Eisentransport (Fre6p: YLL051C, Fre5p: YOR384W, Fth1p: YBR207W, Ccc1p: YLR220W).

Die Fe-S-*cluster*-Synthese in Mitochondrien beginnt mit der Übertragung von Schwefel vom Donor Cystein auf die Desulphurase (Nfs1p: YCL017C; Isd11: YER048W-A). Fe^{2+} wird aus dem Cytosol über spezifische Transporter (Mrs3p: YJL133W, Mrs4p: YKR052C) importiert [108]. Ihre Expression unterliegt der Kontrolle des Eisen-Regulons durch die TF Aft1p (YGL071W) und Aft2p (YPL202C) [263]. Die Expression von AFT2 war temporär bei t_{10}-t_{30} erhöht, während AFT1 im späteren Verlauf nach fünf Verweilzeiten mit CO_2-Aufschlag maximal war. Die Transkription beider Transporter unterliegt dieser Regulation, wobei die DGE von MRS3 bei t_{10} und MRS4 bei t_{60} ein Maximum erreichte. Dem Expressionsmuster von MRS4 folgten auch die Expression der Ferredoxin-Reduktase (Arh1p: YDR376W), die von Ferredoxin (Yah1p: YPL252C) und von Frataxin (Yfh1p: YDL120W), welche bis zu fünf Verweilzeiten nach CO_2-Erhöhung in ihren Transkriptniveau erhöht blieben.

Die Neusynthese der *cluster* erfolgt an Cystein-Resten des *scaffold*-Proteins Isu1p (YPL135W). Das *scaffold*-Protein interagiert mit Frataxin und bildet die Fe-S-*cluster* über cysteingebundene Persulfide. Von dort aus werden die *cluster* über einen Transferkomplex in Zielproteine wie Sdh2p (YLL041C) transferiert [225, 284]. An der ATP-abhängigen Übertragung des [4Fe-4S]-*clusters* auf einen Transferkomplex sind das Chaperon Ssq1p (YLR369W), das Co-Chaperon Jac1p (YGL018C), der Nukleotid-Austausch-Faktor Mge1p (YOR232W) und die Oxidoreduktase Grx5p (YPL059W) beteiligt. Isa1p (YLL027W), Isa2p (YPR067W) und Iba57p (YJR122W) bilden den Transferkomplex für [4Fe-4S]-*cluster* [256]. ISA1 zeigte bei erhöhtem CO_2-Niveau permanent erhöhte Expression, während ISA2, IBA57, NFU1 und BOL3 durch CO_2 zunächst reprimiert wurden und damit dem Expressionsmuster von Komplex II der Elektronentransportkette MRC und dem des Fe-Transporters Mrs4p folgten.

Nfu1p (YKL040C) übernimmt den *cluster* vom Transferkomplex und überführt ihn auf ein Akzeptorprotein wie beispielsweise die Aconitase des TCC. Dieses liegt in der Apo-Form vor und wird bei der Übertragung in seine Holo-Form überführt. Nfu1p interagiert bei der Übertragung auf andere Apo-Proteine mit Bol3p (YAL046C), Ind1p, Bol1p (YAL044W-A) [419]. An der Assemblierung von Komplex I der MRC ist Ind1p, Bol3p (YAL046C) und Nfu1p (YKL040C) beteiligt [41, 419]. Der Transfer eines *clusters* in Sdh2p und die Assemblierung mit den Untereinheiten Sdh1p, Sdh3p und Sdh4p zu Komplex II der MRC wird durch Sdh6p (YDR379C-A) und Sdh7p (YDR511W) untersützt [284].

Die cytosolische und nukleäre Synthese von Fe-S-*clustern* (CIA: *cytosolic iron-sulfur-protein assembly*) wurde von Lill 2009 zusammengefasst [225] und wird hier nicht weiter diskutiert. Bemerkenswert im Zusammenhang mit CO_2 war das Expressionsniveau der CIA-Komponente Dre2p (YKR071C). Dre2p trägt [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-*cluster*, ist als CIA-Komponente essentiell, aber seine Funktion ist unklar [225]. Dre2p interagiert mit Tah18p (YPR048W) [290]. TAH18 ist Element der oxidativen Stressantwort und kontrolliert nach lethalen Dosen von H_2O_2 die mitochondrielle Integrität und den Zelltod. Vernis u. a. sehen die Beteiligung der Mitochondrien

bei der Apoptose durch oxidativen Stress unter der Kontrolle des Dre2p-Tah18p-Komplex [429]. Die Diflavin-Reduktase Tah18p überträgt Elektronen von NADPH auf Dre2p und ist an der NO-Synthese, einem Stresssignal bei hohen Temperaturen, beteiligt [293]. Die Bedingungen bei CO_2-Anstieg induzierten die Transkription von TAH18 und DRE2. Weitere Gene des CIA (ERV1:YGR029W, GSH1: YJL101C, GSH2: YOL049W, NBP35: YGL091C, CFD1: YIL003W, NAR1: YNL240C und CIA1: YDR267C) blieben unauffällig.
Der TF Aft1p kontrolliert die überwiegende Zahl der Gene zur Aufnahme von Eisen in die Zelle [324]. Durch Interaktion mit den Kernporen vermittelt Pse1p (YMR308C) den Import von Aft1p und weiteren TF bei Hypoxie (Pdr1p: YGL013C) und oxidativem Stress (Yap1p: YML007W) [174, 79]. Das mRNA-Niveau von PSE1 wurde im Verhältnis zu den mRNA-Niveaus der TF deutlich erhöht. Bei einer Anreicherung von Aft1p bildet der TF einen Komplex mit glutathionabhängigen Oxidoreduktasen (Grx3p: YDR098C, Grx4p: YER174C). Ueta u. a. diskutierten die Komplexierung cytosolischer [2Fe-2S]-*cluster* mit Grx3p/4p und Glutathion als Signal der mitochondriellen [2Fe-2S]-Synthese. Cytosolische [2Fe-2S]-*cluster* schwächen demnach die Bindung des TF Aft1p an Zielsequenzen im Zellkern [414]. Diesem Regulationsmodell zufolge beendet eine Beeinträchtigung der mitochondriellen [2Fe-2S]-Synthese die Repression des Eisen-Regulons, wenn Aft1p durch Pse1p vom Cytosol in den Zellkern transportiert wird [414, 323].
Durch die Beteiligung der Stresselemente TAH18 und DRE2 wurde eine Parallele zwischen CO_2-induziertem Stress, Temperatur- und oxidativem Stress aufgezeigt. Bei CO_2-induziertem Stress wurde keine Apoptose eingeleitet. Statt der Lyse von Mitochondrien kam es vielmehr zur Induktion der Fe-S-*cluster*-Synthese und im weiteren zeitlichen Verlauf zum Einbau dieser Co-Faktoren in Proteinkomplexe der MRC. Die Stressantwort koordiniert die Ausstattung der MRC zusammen mit dem Energie-, Aminosäure- und Nukleotid-Metabolismus. Bei einer stressinduzierten Synthese von Ribosomen und erhöhter Transkription stieg offensichtlich der Bedarf an Purinen. Die Übertragung von C_1-Einheiten aus dem THF-*pool* in der Purin-Synthese wird innerhalb des C_1-Regulons zusammen mit dem Schwefel-Metabolismus geregelt.

7.1.6 C_1-Regulon und Purin-Synthese

Das Verhältnis von zellulärem Methionin zu S-Adenosylmethionin ist eine Stellgröße für das C_1-Regulon [408]. Das Gleichgewicht der beiden Metaboliten ist abhängig von den Methyltransferasen Sam4p (YPL273W) und Mht1p (YLL062C) [408]. MHT1 zeigte bei hohen CO_2-Gehalten eine Verdreifachung seines Transkriptniveaus. Diese erfolgte lange nach der Induktion von Genen durch das initiale Stresssignal. Die Expression von Sam4p war nur während der Stressantwort bei t_{10} und t_{30} erhöht.

Eine ähnliche temporäre Erhöhung zeigte sich auch für den transkriptionellen Regulator der Synthese von Histidin (HIS-Gene), Purinen (ADE- und IMP-Gene) und Pyrimidinen (URA-Gene), Bas1p (YKR099W) und die DGE des TF Bas2p (YDL106C). Das Signal verstärkte sich erst in der DGE katalysierender Enzyme der Purin-Synthese (ADE- und IMP-Gene in Abbildung 7.3), einigen HIS- (YER055C, YOR202W, YCL030C, YIL020C und YBR248C) und URA-Genen (YKL216W, YJL130C, YEL021W, YML106W, YKL024C und YBL039C) [359, 358]. Die DGE dieser Gene fand nur im Zeitraum der zellulären Stressantwort statt.

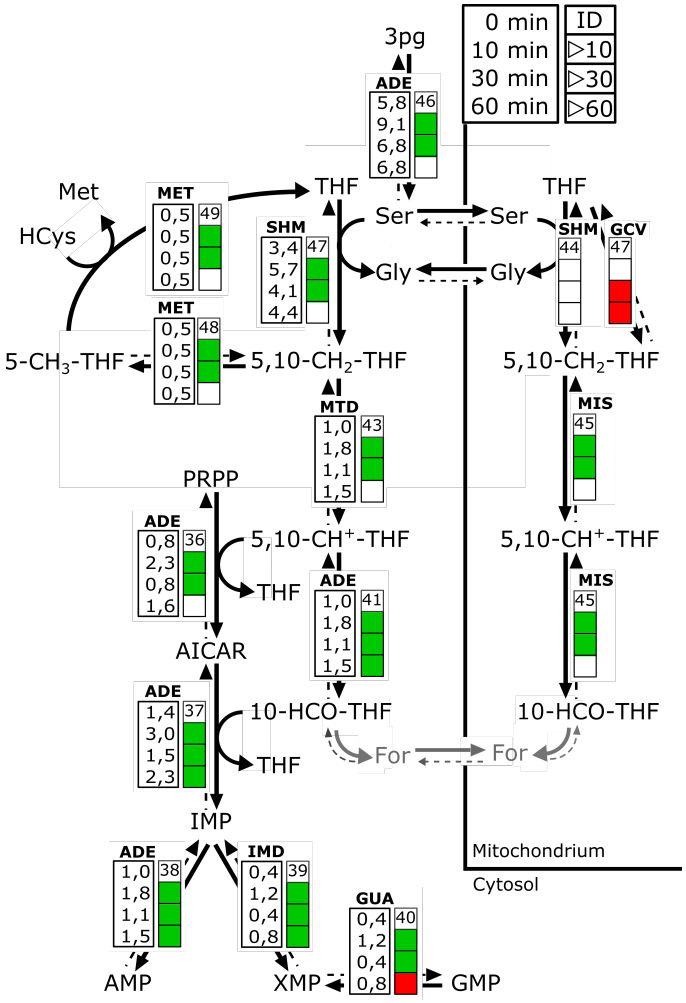


ABBILDUNG 7.3: Das C_1-Regulon demonstriert die Co-Regulation von Purin und Methionin De-novo-Synthese [408, 358]. Die Regulation erfolgt durch den 5,10-Methylene-THF-*pool*. Das mitochondrielle *Glycine Cleavage* System (GCV) ist ein Bindeglied des Metabolismus von C_1-, C_2- und C_3-Komponenten. Produkte des C_1-Metabolismus reprimieren GCV. MFA-Ergebnisse basierend auf pseudo-*steady states* nach CO_2-*shift* sind den Reaktionen so weit bekannt zugeordnet. $q_{Glukose}$ wurde auf $D{\cdot}10^3$ normiert. Volle Pfeile zeigen die Flussrichtung bei pos. Wert. Die differentielle Expression katalytisch relevanter Gene zwischen Referenz und den Zeitpunkten 10, 30 und 60 ist der Reaktion zugeordnet (Rot: [$\log_2$FC$\leq$ -0.6]; Grün: [$\log_2$FC$\geq$ -0,6]). Kürzel: 3pg: 3-Phospho-D-glycerat, Ser: Serin, Gly: Glycin, Met: Methionin, HCys: Homocystein, CO_2: Kohlendioxid, NH_4^+: Ammonium, THF: C_l-Tetrahydrofolat, 5-CH_3-THF: 5-Methyl-THF, 5,10-CH_2-THF: 5,10-Methylene-THF, 5,10-CH^+-THF: L- 5,10-Methenyl-THF, 10-HCO-THF: 10-Formyl-THF, For: Format, PRPP: 5-Phospho-Ribosyl-1-Pyrophosphat, AICAR: 5-Amino-4-Imidazol-Carboxamide-Ribonukleotid, IMP: Inosin 5'-Monophosphat, AMP: Adenosin 5'-Monophosphat, XMP: Xanthosin 5'-Monophosphat, GMP: Guanosin 5'-Monophosphat. ID: 36) YMR300C, YGL234W, YGR061C, YAR015W, YLR359W, 37) YMR120C, 38) YLR359W, YNL220W, 39) YHR216W, YLR432W, YML056C, 40) YMR217W, 41) YGR204W, 42) YLR058C, 43) YKR080W, 44) YBR263W, 45) YBR084W, 46) YGR208W, YER081W, 47) YDR019C, YMR189W, YAL044C, 48) YGL125W, 49) YER091C.

Eine dauerhafte Expressionsänderung der IMP-Gene, wie von Aguilera u. a. 2005 bei *microarray*-Hybridisierung (Affymetrix YG-S98 GeneChips®) beobachtet [9], wurde in dieser Arbeit mit NGS-Datensätzen nicht reproduziert. IMP1 (YMR150C) und IMP2 (YMR035W) zeigten einen Rückgang ihrer RNA-Niveaus, während IMP3 (YHR148W) und IMP4 (YNL075W) bei t_{10} und t_{30} ansteigen.

Die stressabhängige Aktivierung des C_1-Metabolismus zeigte eine koordinierte DGE mit dem

Schwefel-Metabolismus und der Purin-Synthese. Der Phosphorylierungszustand von Purinen und Pyrimidinen wurde im Kontext der Regulation des Energiemetabolismus im folgenden Abschnitt erläutert.

7.1.7 Regulation der MRC durch das CO_2/sAC/cAMP/PKA-Signal

Die Sauerstoffverbrauchsrate neigte in den Experimenten von Richard u. a. 2014 bei erhöhtem CO_2-Level zu periodischen Schwankungen im 70-Minuten-Intervall [347]. Ähnliche Beobachtungen konnten auch in eigenen Prozessen gemacht werden und lassen sich durch Schwankungen in der Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität erklären. Als Untereinheit V und VI der Cytochrome-c-Oxidase sind Cox5Ap (YNL052W) und Cox6p (YHR051W) direkt an der Reduktion von Sauerstoff beteiligt. Bei hohem CO_2-Level wurden sie dauerhaft transkriptionell überexprimiert (Tab. 7.6). Den normoxischen Bedingungen entsprechend, wurde das für allosterische Regulation durch ATP sensitive Cox5A exprimiert.
Die Phosphorylierung mitochondrieller Proteine ist in allen eukaryotischen Zellen ein zentraler Mechanismus zur Koordination der Reaktionsraten von TCC, MTC und ATP-Synthase. Da die metabolische Flussanalyse eine Entkopplung von MRC und TCC ergab, lag es nahe die Entkopplung CO_2 oder HCO_3^- zuzuschreiben. Eine mitochondrielle Adenylatzyklase (sAC) reguliert in tierischen Zellen die respirative Energiesynthese durch Phosphorylierung der Cytochrom-c-Oxidase [7, 6].
2014 wurde ein Ansatz zur allosterischen Regulation der MTC durch ATP von Hess u. a. präsentiert. Dieser Ansatz sah HCO_3^- als Entkoppler der oxidatischen Phosphorylierung. Dabei nimmt HCO_3^- Einfluss auf die mitochondrielle ATP-Synthese. ATP hemmt die Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität. Es folgten die langsamere Oxidation von NADH und die Anpassung der Reaktionsrate des TCC, was sich auf das HCO_3^-- und das ATP-Level auswirkt.
Die Phosphodiesterase Pde1p zeigte keine DGE nach dem CO_2-Signal. Pde2p (YOR360C) hingegen war zu jedem Zeitpunkt $t_{10-\infty}$ induziert. Pde2p besitzt hohe Affinität für cAMP, wandelt dieses zu AMP um und könnte zur Signalrückstellung beitragen. Die Deletion des nichtessentiellen Gens erzeugt Sensitivität gegenüber Hitze und oxidativem Stress. Da Pde2p im Zellkern lokalisiert ist, vermuteten Namy u. a. 2002, dass sich von einer plasmamembranständigen Adenylatzyklase ein cAMP-Gradient bis in den Zellkern ausbilden könnte [287].
Die Bestimmung der zellulären Mono-, Di- und Triphosphonukleotide AMP, ADP, UDP, GDP, CDP, ATP, UTP, GTP und CTP während des Anstiegs von CO_2 ergab Schwankungen der Energieladung im Adenosinphosphat-*pool* der Zelle (Abb. 7.4). Der Phosphorylierungsgrad von Uridin-, Guanosin- und Cytidinphosphaten war 30 Minuten nach CO_2-Anstieg rückläufig. Der Cytidinphosphat-*pool* zeigte außerdem einen signifikanten Rückgang, der in den anderen drei Phosphonukleotid-*pools* nicht zu beobachten war. Als Co-Substrate und allosterische Effektoren sind Phosphonukleotide an der Regulation kataboler und anaboler Stoffwechselwege beteiligt. Dabei erhöht die CO_2-Belastung den Energiebedarf um etwa 7,5%. Welche Prozesse dauerhaft beeinträchtigt waren, wurde im folgenden Abschnitt 7.2 über die Langzeitbelastung durch CO_2 zusammengefasst.

TABELLE 7.4: DGE der mitochondriellen ATP-Synthase UE bei 50% CO_2 (t_∞) verglichen mit 0,05% CO_2 (t_0) aus den *counts per million* (CPM) als *fold change* (FC) für D=0,1 h^{-1} und D=0,05 h^{-1}.

Gen	**ORF**	**t_0** **D: 0,05 / 0,1**	**t_∞** **D: 0,05 / 0,1**	**log_2FC** **D: 0,05 / 0,1**
ATP1	YBL099W	1289±70 / 1640±355	2639±63 / 2256±42	1,03 / 0,48
ATP2	YJR121W	1840±107 / 2463±557	3851±0 / 3823±86	1,07 / 0,65
ATP3	YBR039W	594±13 / 707±117	984±41 / 1188±36	0,73 / 0,76
ATP4	YPL078C	726±97 / 785±76	1043±95 / 1153±32	0,53 / 0,56
ATP5	YDR298C	488±17 / 571±107	849±6 / 972±14	0,80 / 0,78
ATP7	YKL016C	776±79 / 816±79	1325±77 / 1041±53	0,43 / 0,70
ATP10	YLR393W	31±4 / 34±9	61±1 / 45±2	0,98 / 0,42
ATP11	YNL315C	144±5 / 150±7	234±12 / 273±6	0,70 / 0,86
ATP12	YJL180C	87±0 / 96±8	101±10 / 121±1	0,22 / 0,34
ATP14	YLR295C	333±26 / 389±35	528±46 / 660±32	0,66 / 0,77
STF2	YGR008C	559±253 / 855±214	191±40 / 266±23	-1,5 / -1,7

Der erhöhte Energiebedarf von 7,5% konnte bei einer Wachstumsrate von 0,1 h^{-1} durch einen rein respiratorischen Metabolismus gedeckt werden (siehe Tab. 6.1). Die Transkription von Untereinheiten der ATP-Synthase wurde dabei verdoppelt (Tab. 7.4). Bei einer Durchflussraten von 0,2 h^{-1} scheiterte die Rückführung des CO_2-induzierten respiro-fermentativen Metabolismus in ein rein respiratives Wachstum. Das erschien plausibel, da der Crabtree-Effekt bei einer Durchflussraten von 0,25 h^{-1} einsetzte [350]. CO_2 reduzierte die maximale Wachstumsrate des respiratorischen Metabolismus zugunsten eines respiro-fermentativen Stoffwechselprofils. Der Vergleich mit unlimitiertem Wachstum in *batch*-Prozessen zeigte durch die Ethanol-, Acetat- und Succinat-Synthese ebenfalls einen erhöhten fermentativen Metabolismus bei reduzierter Wachstumsrate (Kapitel 4).

7.2 DGE bei CO_2-Langzeitbelastung

Die messbaren Veränderungen bei hohem CO_2-Level verringerten sich über die Anzahl der Generationen einer Kultur. Nach der zellulären Stressantwort sank die Anzahl differentiell transkribierter Gene über mehrere Generationen um 70-95%. Die Energiekosten stiegen bei 27 mM CO_2 und 176 mM HCO_3^- in der Zelle um etwa 7,5%. Die finale Produktionsrate von Succinat lag bei ca. 0,01 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$. Das limitierte Glukoseangebot wurde vom respirativen Metabolismus vermehrt zu CO_2 oxidiert.

Es ließ sich feststellen, dass in dieser Studie die Anzahl veränderter Gene mit der Generationszeit (abhängig von D), der Summe der Generationszeiten (abhängig von Kultivierungsdauer bei D) bei CO_2-Belastung und der Intensität der CO_2-Belastung variiert. Aguilera u. a. identifizierten bei limitiertem Glukoseangebot unter aeroben Bedingungen (D=0,1 h^{-1}), höherer CO_2-Belastung (79% CO_2) und höheren Energiekosten ($Y_{X/S}$=0,382 $g_{DW}g^{-1}$) 104 differenziell transkribierte Gene ($|log_2FC| \geq 1$) [9]. Die Summe der Generationszeiten unter CO_2-Belastung wurde nicht angegeben.

In der hier vorliegenden Studie wurden bei zwei Generationszeiten, geringerer CO_2-

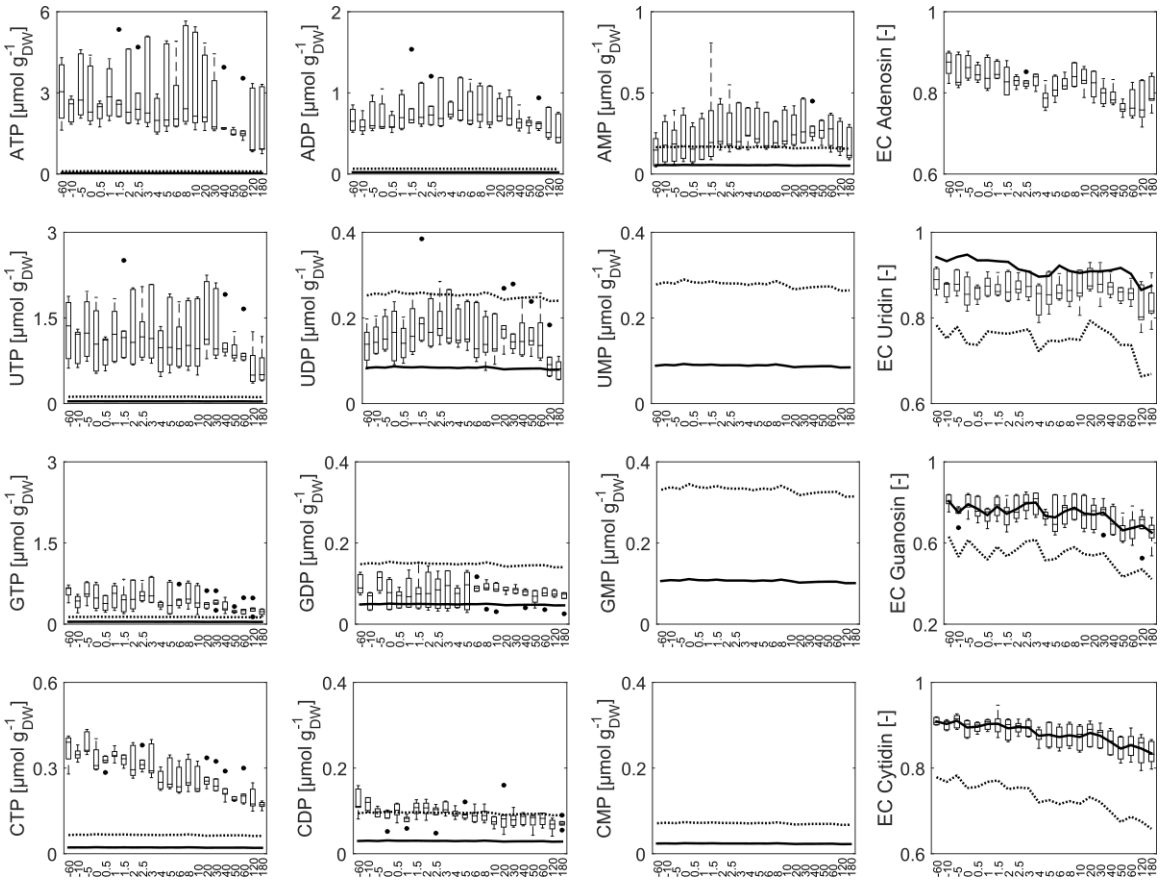


ABBILDUNG 7.4: Der zelluläre Gehalt der Phosphonukleotide (AMP, UMP, GMP, CMP, ADP, UDP, GDP, CDP, ATP, UTP, GTP und CTP) wurde analytisch bestimmt (siehe Kapitel 3). Jede Kultur (D=0,1 h^{-1}) wurde im Fließgleichgewicht vor CO_2-Anstieg (-60 bis 0) und bis zu drei Stunden (0,5-180) nach CO_2-Anstieg beprobt. Ein *Box-Whisker-Plot* repräsentiert die Verteilung von sechs Messungen aus drei biologischen Replikaten mit je zwei Proben (siehe Abs. 3.10.2). Die zelluläre Energieladung (EC) wurde aus dem Mono-, Di- und Triphosphat-Level wenn möglich beim Überschreiten des LOQ innerhalb einer Probe berechnet (siehe Gl. 3.21). Alternativ wurde bei geringem Gehalt (UMP, GMP und CMP) LOD (Nachweisgrenze: volle Linie) und LOQ (Quantifizierungsgrenze: gepunktete Linie) zur Schätzung des EC verwendet.

Belastung (D=0,1 h^{-1}, 50% CO_2) und identischer Definition der DGE ($|\log_2 FC| \geq 1$) 301 Gene identifiziert. Die Zeit der Adaptation an CO_2 betrug dabei 5 Verweilzeiten (VZ). Nach 10 VZ verblieben 87 differentiell transkribierte Gene (D=0,1 h^{-1}). Für die vorliegende Arbeit wurde angenommen, dass die Summe der Generationszeit in der Vergleichsstudie auch etwa bei 5 bis 10 VZ gelegen hatte.

Bei doppelter Generationszeit (D=0,05 h^{-1}, 5 VZ) und gleicher CO_2-Belastung wurden 395 differentiell transkribierte Gene identifiziert. Diese sind zu 77% mit den 301 Genen identisch, was bedeutet, dass nahezu jedes der 301 Gene auch bei doppelter Generationszeit verändert exprimiert wurde. Der Datensatz wurde vereinfacht und die Prozesse beider Generationszeiten zusammengefasst (Tab. 7.1). Ein unteres Limit für die CPMs schloss gering exprimierte Gene aus. Danach verblieben 182 DEGs ($|\log_2 FC| \geq 1$) bzw. 493 ($|\log_2 FC| \geq 0,6$) aus allen Prozessen.

Die DEGs mit $|\log_2 FC| \geq 2$ stimmten mit Aguileras Expressionsprofil (siehe Tab. 7.5) großteils nicht überein. Lediglich 7 der 104 Gene wurden auch bei 50% CO_2 identifiziert. 83 der hier identifizierten Gene traten im Zusammenhang mit CO_2 erstmalig auf (Tab. 7.5). Viele der von Aguilera u. a. identifizierten Gene, beispielsweise Gene der oxidativen Phosphorylierung (Tab. 7.4) und der Elektronentransportkette (Tab. 7.6) blieben bei 50% CO_2 unter dem festgelegten Grenzwert ($|\log_2 FC| \geq 1$). Eine Verdopplung ihres Expression-Levels ($|\log_2 FC| \geq 0,6$) war bei 50% CO_2 dennoch nachweisbar.

30% der Gene mit erhöhter Transkription kodieren mitochondrielle und peroxisomale Proteine (Tab. 7.5). Dabei wurde das Charnitin-*shuttle* und der Acetyl-CoA-Stoffwechsel, der TCC und Gene der Elektronentransportkette induziert, während die mitochondrielle Fettsäureaufnahme und der peroxisomale Fettsäureabbau reprimiert wurden. Die peroxisomale Citrat-Synthase blieb zusammen mit Genen des TCC induziert. Von drei Proteinen unbekannter Funktion wurde eines induziert.

21% der Gene kodierten für Funktionen der Periplamamembran und der Zellwand (Tab. 7.5). Reguliert wurden Transporter zur Aufnahme von Glukose, Ammonium, Amino- und Carbonsäuren. Auch Gene von Transportern an intrazellulären Membranen wurden bei CO_2-Belastung anders reguliert. Dip5p beispielsweise dient bei DNA-Replikationsstress auch der vakuolären Speicherung von Alanin, Serin und Glycin. Die Protonenpumpe Pma1p blieb, wie in Kapitel 5 simuliert, durch die Repression von Hsp30p entkoppelt und die Exportrate damit erhöht. Die Chitin-, Zellwand- und Mannoproteinsynthesen wurden ebenfalls dauerhaft reguliert.

29% der Gene kodieren für Proteine des Cytoplasmas (Tab. 7.5). Induziert wurde die Carboxylierung von PEP und Pyruvat, während die Decarboxylierung von Pyruvat und Glutamat sowie die Oxidation von Acetaldehyd zu Acetat reprimiert wurde. Die Reduktion alternativer Kohlenstoffquellen durch den Pentosephosphatweg wurde reprimiert. Einige Gene der zellulären Stressantwort bleiben dauerhaft reprimiert. Die Regulation von Gre1p und Sip18p beispielsweise steht unter der Kontrolle des HOG-Signalwegs zur Regulation des Wasserhaushalts bei Osmo-, Ionen-, Hitze- und Schwermetallstress. Die Repression von Chaperonen und Mechanismen zur Proteinfaltung könnte eine weitere Stressreaktion bei knappen Energieressourcen verhindern.

10% der Gene kodieren für Proteine des Zellkerns, des Endoplasmatischen Reticulums und für ribosomale Proteine (Tab. 7.5). Scheinbar blieben Proteine der Ribosomenbiogenese insbesondere bei kürzeren Generationszeiten überexprimiert. Bei höheren Wachstumsraten besteht auch hier die Möglichkeit, dass die Leistungsgrenze mit zunehmender Verkürzung der Generationszeit früher erreicht wurde. Die maximale Wachstumsrate könnte daher bei CO_2-Belastung niedriger liegen. Beinahe 17% der Genprodukte in Tabelle 7.5 sind in ihrer zellulären Funktion und ihrer Lokalisation noch unbekannt.

TABELLE 7.5: Gene, deren Transkription bei 50% CO_2 (t_∞) verglichen mit 0,05% CO_2 (t_0) eine Änderung von $|\log_2 FC| \geq 2$ im genomweiten Transkriptionsprofil zeigt, sind angegeben. Pasmamembran (PM), Zellwand (CW), Cytoplasma (CP), Mitochondrium (M), Peroxisom (PO), Nukleus (N), Endoplasmatisches Reticulum (ER), Ribosom (R), Ascuswand (AW), pre-Sporenmembran (SM), keine Angaben (kA)

Gen	**ORF**	**Funktion**	**L**	**0,05% CO_2**	**50% CO_2**	**$\log_2$FC**
				D: 0,05 / 0,1	**D: 0,05 / 0,1**	**D: 0,05 / 0,1**
HXT6	YDR343C	Glukose Transporter (hohe Affinität)	PM	38±10 / 107±48	375±121 / 2615±507	3,29 / 4,67
DIP5*	YPL265W	Dicarboxy-Aminosäure Permease	PM	44±2 / 35±4	167±19 / 591±19	2,27 / 3,75
GIC2*	YDR309C	rho-ähnlicher GTPase-Cdc42p Effektor	PM	63±4 / 83±29	295±50 / 193±29	2,21 / 1,26
MEP2	YNL142W	Ammonium Permease	PM	114±19 / 101±7	104±8 / 273±61	-0,14 / 1,41
HXT2	YMR011W	Glukose Transporter (hohe Affinität)	PM	1729±71 / 2659±297	2723±318 / 772±70	0,65 / -1,78
JEN1	YKL217W	Monocarboxylate/H^+ Symporter	PM	4829±1001 / 5645±690	5529±1110 / 2736±245	0,20 / -1,04
HXT5	YHR096C	Hexose Transporter (moderate Glk.-Affinität)	PM	2277±415 / 1446±593	322±90 / 911±5	-1,31 / -2,13
HBT1	YDL223C	Shmoo tip Protein	PM	800±80 / 454±166	173±6 / 95±19	-2,20 / -2,23
SHC1	YER096W	Chs3p Aktivator (Chitin Synthase III)	PM	101±5 / 65±12	18±1 / 10±0	-2,51 / -2,73
HSP12*	YFL014W	HOG-reguliertes Membranprotein	PM	4976±505 / 2768±693	379±47 / 844±203	-3,72 / -1,71
	YNL194C	Sporulation, Sphingolipid Regulation	PM	241±14 / 173±50	43±23 / 80±19	-1,61 / -2,09
PST1	YDR055W	Zellwandprotein mit GPI-Bindestelle	PM	816±136 / 795±47	310±62 / 354±3	-1,40 / -1,16
HSP30	YCR021C	Negative Regulator der H^+-ATPase Pma1p	kA	1860±617 / 785±308	88±21 / 92±0	-4,38 / -3,04
ATO3	YDR384C	möglicher Ammonium Transporter	PM	868±38 / 183±72	1113±168 / 494±24	-0,28 / -1,16
TOS6	YNL300W	Zellwand-Protein	CW	43±14 / 62±1	179±17 / 125±21	2,09 / 1,01
SRL1	YOR247W	Mannoprotein	CW	120±20 / 254±38	494±30 / 496±17	2,05 / 0,97
PIR3	YKL163W	O-glykosyliertes Zellwandprotein	CW	879±273 / 426±177	62±21 / 39±7	-3,84 / -3,40
TIR4	YOR009W	Zellwand Mannoprotein	CW	127±56 / 77±36	25±0 / 19±2	-2,27 / -1,96
PCK1*	YKR097W	Phosphoenolpyruvate Carboxykinase	CP	67±2 / 132±60	885±129 / 2078±303	2,82 / 4,95
IMD2*	YHR216W	Inosine-Monophosphate Dehydrogenase	CP	76±2 / 77±25	538±7 / 201±52	2,83 / 1,40
PYC1	YGL062W	Pyruvate Carboxylase, Isoform	CP	478±36 / 522±69	1953±237 / 1195±13	2,03 / 1,20
DLD3	YEL071W	2-Hydroxyglutarat Transhydrogenase (und LDH)	CP	383±52 / 429±46	1307±150 / 1430±20	1,77 / 1,74

Fortsetzung

Tabelle 7.5 – *Fortsetzung*

Gen	ORF	Funktion	L	0,05% CO_2	50% CO_2	log_2FC
				D: 0,05 / 0,1	D: 0,05 / 0,1	D: 0,05 / 0,1
GDH1	YOR375C	Glutamat Dehydrogenase ($NADP^+$)	CP	1358±235 / 1889±545	2510±361 / 3872±561	0,89 / 1,06
VID24	YBR105C	GID Complex Regulator UE	CP	74±6 / 76±16	123±30 / 172±26	0,71 / 1,19
PAU7	YAR020C	Mitglied der seripauperin Multigenfamilie	kA	70±27 / 41±22	6±1 / 5±0	-3,57 / -3,02
PAU2	YEL049W	Mitglied der seripauperin Multigenfamilie	CP	146±39 / 214±123	10±2 / 8±1	-3,89 / -4,56
SSA3	YBL075C	ATPase (Proteinfaltung und Stressantwort)	CP	3321±252 / 1065±599	115±8 / 93±4	-4,86 / -3,39
HSP26*	YBR072W	kleines HSP mit Chaperonaktivität	CP	15327±1159 / 6173±2862	541±23 / 1265±156	-4,82 / -2,21
SSE2*	YBR169C	Mitglied HSP70 Familie	CP	790±122 / 394±117	148±2 / 108±29	-2,41 / -1,86
TSA2	YDR453C	Stressinduzierbare Thioredoxin-Peroxidase	CP	126±34 / 107±50	22±2 / 25±4	-2,47 / -2,04
PDC6	YGR087C	Pyruvat Decarboxylase Isoform	CP	322±11 / 116±35	47±2 / 25±5	-2,78 / -2,20
CTT1	YGR088W	Katalase T	CP	433±83 / 248±59	38±1 / 41±12	-3,48 / -2,59
THI4	YGR144W	Thiazole Synthase	CP	234±35 / 89±31	51±7 / 19±3	-2,20 / -2,21
	YJR096W	Xylose und Arabinose Reduktase	CP	418±39 / 224±79	78±4 / 73±18	-2,43 / -1,59
ALD3	YMR169C	Aldehyd Dehydrogenase	CP	198±6 / 116±28	48±0 / 28±6	-2,05 / -2,06
PAI3	YMR174C	Proteinase A (Pep4p) Inhibitor	CP	528±28 / 232±86	53±0 / 81±10	-3,32 / -1,48
DDR2	YOL052C-A	Multi-Stressantwort Protein	CP	1178±533 / 941±122	114±19 / 153±38	-3,30 / -2,64
PMA2	YPL036W	Plasmamembran H^+-ATPase	CP	840±59 / 478±248	43±5 / 84±7	-3,32 / -3,39
OYE3*	YPL171C	Oxidoreduktase (NADPH; FMN)	CP	233±34 / 81±38	8±0 / 8±1	-4,80 / -3,20
SIP18	YMR175W	Phospholipid-bindendes Hydrophilin	CP	2831±552 / 908±521	163±10 / 212±24	-4,11 / -1,97
GRE1	YPL223C	Hydrophilin essentiell für Wasserhaushalt	CP	4248±525 / 1337±810	43±5 / 58±0	-6,18 / -4,82
VSH1	YDR247W	Serine/Threonin Protein Kinase	CP	147±5 / 147±27	91±10 / 69±6	-0,70 / -1,09
GRE2	YOL151W	3-CH_3-Butanal und CH_3-Glyoxal Reduktase	CP	293±38 / 183±23	76±20 / 77±12	-1,98 / -1,26
GAD1	YMR250W	Glutamat Decarboxylase	CP	339±12 / 174±48	81±0 / 86±23	-2,07 / -1,01
ACH1	YBL015W	Protein mit CoA Transferase Aktivität	M	479±14 / 521±113	1940±94 / 1281±68	2,02 / 1,32
YAT1	YAR035W	Carnitin-Acetyltransferase	M	102±5 / 135±16	754±152 / 289±32	2,83 / 1,10

Fortsetzung

Tabelle 7.5 – *Fortsetzung*

Gen	ORF	Funktion	L	0,05% CO_2	50% CO_2	log_2FC
				D: 0,05 / 0,1	D: 0,05 / 0,1	D: 0,05 / 0,1
CRC1	YOR100C	Carnitin-Transporter	M	57±1 / 71±2	132±6 / 150±2	1,21 / 1,08
CYC1	YJR048W	Cytochrom c, Isoform 1	M	509±118 / 681±145	1588±85 / 1646±59	1,66 / 1,29
	YJL133C-A	mögliches Protein mit unbekannter Funktion	M	167±17 / 166±45	567±14 / 551±60	1,77 / 1,75
NUC1	YJL208C	Nuklease	M	51±1 / 60±6	89±11 / 125±10	0,80 / 1,07
MAE1	YKL029C	Malat-Enzym	M	105±31 / 134±12	269±54 / 411±93	1,38 / 1,60
IDH1	YNL037C	Isocitrat-Dehydrogenase-UE (NAD^+)	M	394±27 / 536±146	1279±114 / 1317±79	1,70 / 1,32
IDH2	YOR136W	Isocitrat-Dehydrogenase-UE (NAD^+)	M	312±1 / 435±131	981±146 / 1001±79	1,65 / 1,23
CIT1	YNR001C	Citrate Synthase	M	1334±110 / 1431±279	3958±146 / 2903±69	1,57 / 1,03
FMP45	YDL222C	Integrales Membranprotein	M	426±22 / 301±121	71±2 / 52±23	-2,59 / -2,54
	YJL045W	Succinat-Dehydrogenase-Isozym	M	239±15 / 111±47	22±0 / 32±1	-3,41 / -1,74
FAT3	YKL187C	Protein zur Fettsäureaufnahme	M	301±16 / 252±69	54±10 / 85±23	-2,49 / -1,58
SHH4	YLR164W	mögliche alternative SDH UE	M	112±11 / 59±23	21±4 / 17±3	-2,45 / -1,73
SPG1	YGR236C	überleben bei hoher Temperatur	M	264±63 / 153±51	45±1 / 59±31	-2,53 / -1,45
MSC1	YML128C	Protein unbekannter Funktion	M	2182±6 / 1318±509	344±38 / 497±146	-2,67 / -1,38
SHH3	YMR118C	Protein unbekannter Funktion	M	463±13 / 172±82	34±2 / 27±1	-3,76 / -2,59
CIT2	YCR005C	Citrat-Synthase	PO	243±4 / 244±48	2200±164 / 1355±37	3,18 / 2,49
POT1	YIL160C	3-Ketoacyl-CoA Thiolase	PO	420±70 / 342±32	207±25 / 154±14	-1,01 / -1,15
SFG1	YOR315W	möglicher Transkriptionsfaktor	N	102±13 / 170±49	486±77 / 427±1	2,25 / 1,36
VHR2	YER064C	nicht-essentielles Protein	N	37±2 / 38±5	88±4 / 90±0	1,25 / 1,22
TMA23	YMR269W	Nukleoläres Protein zur Ribosomenbiogeneses	N	32±4 / 27±1	27±1 / 65±13	-0,26 / 1,23
PXR1	YGR280C	rRNA und snoRNA Reifung	N	65±5 / 70±4	58±10 / 151±40	-0,18 / 1,08
NRG2	YBR066C	Transkriptioneller Repressor	N	265±102 / 205±58	38±3 / 53±4	-2,74 / -1,92
	YJL213W	Protein mit unbekannter Funktion	R	27±1 / 48±11	135±12 / 167±1	2,63 / 1,52
BUD20	YLR074C	C2H2-Typ Zinkfinger (Ribosomengruppierung)	R	54±5 / 52±6	57±6 / 116±29	0,08 / 1,13

Fortsetzung

Tabelle 7.5 – *Fortsetzung*

Gen	**ORF**	**Funktion**	**L**	**0,05% CO_2**	**50% CO_2**	**log_2FC**
				D: 0,05 / 0,1	**D: 0,05 / 0,1**	**D: 0,05 / 0,1**
RTN2	YDL204W	Reticulon Protein	ER	798±60 / 428±199	92±13 / 148±49	-3,12 / -1,49
ERG25	YGR060W	C-4-Methyl-Sterol Oxidase	ER	3627±1690 / 2894±1090	457±6 / 851±4	-2,91 / -1,71
GTT1	YIR038C	Glutathione S-Transferase	ER	728±117 / 330±118	70±2 / 135±11	-3,37 / -1,24
HES1	YOR237W	Ergosterol Biosynthese Regulator	kA	81±38 / 60±35	3±0 / 1±1	-4,84 / -6,34
SPO24	YPR036W-A	Sporulation, 67 Aminosäuren	SM	496±69 / 695±154	1699±114 / 2172±76	1,78 / 1,66
SPS100	YHR139C	Protein zur Reifung der Sporenwand	AW	582±249 / 253±183	11±0 / 8±2	-5,71 / -4,70
NQM1	YGR043C	Transaldolase unbekannter Funktion	kA	811±102 / 538±97	128±16 / 135±34	-2,66 / -2,01
	YKL107W	mögliche Kurzketten Dehydrogenase/Reduktase	kA	159±11 / 69±29	16±1 / 21±1	-3,35 / -1,69
HEF3	YNL014W	Translationaler Elongationsfaktor EF-3	kA	275±33 / 134±54	50±7 / 29±1	-2,47 / -2,14
	YNL134C	Aldehyde Reduktase (NADH), detox. von Furfural	kA	439±84 / 219±100	47±0 / 71±14	-3,21 / -1,55
YRO2	YBR054W	mögliche Rolle in der Antwort auf Säurestress	kA	2223±470 / 1015±441	472±43 / 223±9	-2,22 / -2,11
	YGR201C	mögliches Protein mit unbekannter Funktion		342±48 / 165±73	43±1 / 40±5	-2,97 / -1,97
	YCL048W-A	mögliches Protein mit unbekannter Funktion	kA	105±38 / 56±28	2±0 / 3±1	-5,61 / -4,10
	YDL218W	mögliches Protein mit unbekannter Funktion	kA	607±34 / 195±119	17±2 / 14±2	-5,15 / -3,68
	YKL065W-A	mögliches Protein mit unbekannter Funktion	kA	385±128 / 215±123	21±4 / 39±2	-4,14 / -2,33
	YMR175W-A	mögliches Protein mit unbekannter Funktion	kA	156±13 / 56±32	10±0 / 10±2	-4,11 / -1,97
	YNL195C	Protein unbekannter Funktion	kA	352±39 / 178±71	78±15 / 34±13	-2,19 / -2,39
PBI1	YPL272C	mögliches Protein unbekannter Funktion	kA	526±239 / 384±182	26±4 / 34±1	-3,89 / -3,82
	YML058W-A	mögliches Protein unbekannter Funktion	kA	135±80 / 104±56	5±1 / 5±1	-4,63 / -4,29

* bereits bei CO_2-Stress identifiziert [9]

7.2.1 Transkriptionelle Regulation von Komplex IV der MRC

Die Expression respiratorischer Gene, darunter auch die Untereinheiten des Cytochrom-c-Oxidase-Komplexes, wurde durch den CCAAT-Bindekomplex (Hap2p/3p/4p/5p) reguliert [474]. Dieser wurde durch Glukose reprimiert, was in den ersten Minuten des CO_2-Anstiegs (t_{10}) die Repression von HAP2 (YGL237C) und HAP5 (YOR358W) erklärt. Freies Häm könnte im Folgezeitraum ($t_{30-\infty}$) durch die Induktion der Häm-Gene HEM1/2/3/13 und durch die Co-Regulation mit dem Schwefelmetabolismus vermehrt vorliegen und den Komplex aktiviert haben. Eine Induktion von HAP3 (YBL021C) und HAP4 (YKL109W) fand in diesem Zeitraum statt ($t_{30-\infty}$). Die Expression des TF Hap4p könnte auch in direktem Zusammenhang mit der Repression des TF Cst6p (YIL036W) stehen. Der CO_2-abhängige TF wurde unmittelbar vor der Induktion von HAP4 reprimiert (t_{10-30}) [227]. Der Cytochrom-c-Oxidase-Komplex besteht aus 3 mitochondriell kodierten Kernuntereinheiten (Cox1/2/3p) und 8 weiteren Untereinheiten (Cox4/5A(B)/6/7/8/9/12/13p), die von chromosomaler DNA abgelesen werden. Phänotypen bei der Mutation der Untereinheiten oder von regulatorischen Genen gehen mit vermindertem oder blockiertem respirativem Wachstum einher. Zur Auflösung der Transkription mitochondriell kodierter Gene reichte die verwendete Tiefe der Sequenzierung nicht aus. Die im Zellkern kodierten Gene des Komplexes gaben trotzdem ein Beispiel, um regulatorische Einflüsse auf die MRC zu betrachten.

Eine Anpassung an niedrige Sauerstoffkonzentrationen (Hypoxie) erfolgt durch den Austausch von Cox5Ap durch Cox5Bp. Hypoxische Gene (z.B. COX5B) unter der Kontrolle des TF Hap1p (YLR256W) wurden in dieser Studie nicht induziert (Tab. 7.6). Die Expression von HAP1 war rückläufig, während sein Repressor Rox1p (YPR065W) transkriptionell induziert wurde. Die Expression von Cox6p ist ebenfalls Sauerstoffabhängig. Bei CO_2-Anstieg erfolgte die Induktion unabhängig vom O_2-Level. Die Regulation des Gens COX6 durch UA-Sequenz 6 (*upstream activation sequence*) enthält Glukose- und Häme- (HDS2: *heme activation protein*-Komplex, HDS1: *heme dependent sequence*) -responsive Regionen [412]. Wie bei HAP2/5 trat zunächst eine Repression der Transkription – vermutlich durch Glukose (t_{10}) – ein. Die Induktion erfolgte anschließend dauerhaft ($t_{30-\infty}$). Möglich, dass es sich bei der Induktion von COX6 um die direkte Folge der Induktion von HAP3/4 und der Aktivität des CCAAT-Bindekomplex handelte. Die Expression von COX6 korrelierte auch mit der Phosphorylierung des TF Abf1p (YKL112W). Dessen Bindung an die UA-Sequenz 6 ist generell schwach [412]. Bei N-Limitierung und beim Wachstum auf nicht-fermentierbaren C-Quellen dominieren phosphorylierte Formen von Abf1p [383]. Zum Referenzzeitpunkt (t_0) war demnach die dephosphorylierte Form vorherrschend. ABF1 wurde anschließend (t_{10-60}) transkriptionell reprimiert und nimmt damit wahrscheinlich eine untergeordnete Funktion ein. Neben Hap1/4p sind 4 weitere Regulatoren, deren Expression im Experiment unverändert (Tfc7p, YOR110W), reprimiert (Wtm1p, YOR230W) und induziert (Yap6p, YDR259C) war, bekannt [427, 244]. Ihr konkreter Einfluss auf die Expression von COX6 war mir nicht bekannt. COX7 wird durch Hap1/4p und Sfp1p reguliert [244]. Der Regulator SFP1 wurde kurzzeitig induziert (t_{10}). Er vermittelt Stresssignale und Nährstoffverfügbarkeit zur Transkription von ribosomalen Proteinen beim G_2/M-Phasenübergang der Mitose. COX8 reagiert neben Hap1/4p auf 3 weitere Regulatoren [427, 244, 167]. Sin4p und Cyc8p

waren in der Expression ihrer Gene unauffällig, während Hms1p (YOR032C) permanent reprimiert wurde ($t_{10-\infty}$). Die Induktion erfolgte wahrscheinlich durch den CCAAT-Bindekomplex. COX9 hatte außer Hap4p einen temporär induzierten Regulator Yap6p (t_{10-60}) und 5 Regulatoren mit unverändertem mRNA-Level (YAP1, RTG3, MED2, GCN4, FKH1). Cox12p ist bei der Assemblierung des Cytochrom-c-Oxidase-Komplexes nicht für dessen Aktivität notwendig. COX12 wird durch Hap4p und Gcr1p reguliert [244, 167]. Gcr1/2p sind transkriptionelle Aktivatoren von Genen der Glykolyse. Durch den CCAAT-Bindekomplex war die direkte Induktion aller Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheiten plausibel.

7.2.2 Transkriptionelle Regulation von NDE1/2 und GUT2 der MRC

Die NADH-Dehydrogenasen Nde1p/2p und die Glycerin-3P-Dehydrogenase Gut2p sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Nde1p und Nde2p oxidieren cytosolisches NADH und übertragen Elektronen auf den Quinon-*pool* der MRC. Gut2p reduziert ebenfalls Quinon und oxidiert dabei Glycerin-3-Phosphat zu Dihydroxyacetonphosphat DHAP. Zusammen mit Gpd1p, welches cytosolisches NADH als Co-Faktor zur Reduktion von DHAP nutzt, ist neben Nde1p/2p eine zweite Möglichkeit zur Regeneration von NAD^+ unter aeroben Bedingungen gegeben.

Abbildung 7.5 zeigt den zellulären Gehalt von NAD(H) und NADP(H) als Summe der oxidierten und reduzierten Form. Innerhalb der ersten drei Stunden nach CO_2-Anstieg zeigten sich keine signifikanten Änderungen (Abs. 3.12.3; $p \leq 0{,}05$). Pahlmann u.a. haben 2002 vermutet, dass Gut2p, Nde1p und Nde2p in der inneren Mitochondrienmembran in Interaktion treten und gezeigt, dass die Stöchiometrie ihres Auftretens einen regulatorischen Effekt auf die Affinität für NADH aus dem Cytosol ausübt [308]. Die zellulären Gehalte von 4 $\mu mol_{NAD(H)}\ g_{DW}^{-1}$ und 0,3-0,5 $\mu mol_{NADP(H)}\ g_{DW}^{-1}$ stimmen mit den Gehalten früherer Arbeiten überein [24, 372, 468].

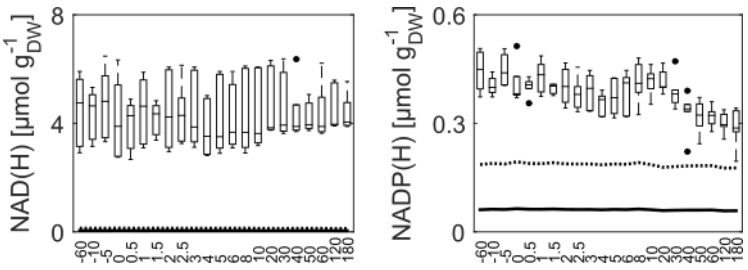


ABBILDUNG 7.5: Der zelluläre Gehalt der Reduktionsäquivalente NAD(H) und NADP(H) wurde analytisch bestimmt (siehe Kapitel 3). Die Kultivierung (D=0,1 h^{-1}) befindet sich eine Stunde vor CO_2-Anstieg (-60 bis 0) im Fließgleichgewicht. Die Gehalte wurden drei Stunden (0 bis 180) unter CO_2-Einfluss bestimmt. Ein *Box-Whisker-Plot* repräsentiert die Verteilung von sechs Messungen aus drei biologischen Replikaten mit je zwei Proben (siehe Abs. 3.10.2). Nachweisgrenze (volle Linie) und Quantifizierungsgrenze (gepunktete Linie) der Metaboliten sind eingetragen.

Bekers, Heijnen und Gulik (2015) zufolge liegt der Reduktionsgrad von freiem cytosolischem NAD(H) bei etwa 35% [24], während Zhang u. a. (2015) den von freiem cytosolischem NADP(H)

über 90% bestimmten [468]. Bei homogener Verteilung über die Kompartimente ergab sich eine zelluläre Substratkonzentration für die Dehydrogenasen Nde1p und Nde2p von ca. 0,22 mM NADH und 0,06 mM NADPH. Das entsprach in etwa dem K_m-Wert von 0,27$\pm$0,09 mM für NADH [308].
Im stöchiometrischen Reaktionsnetzwerk (siehe Kapitel 6) wurden die Reaktionen von Gpd1p und Gpp2p zur Synthese von Glycerin berücksichtigt (siehe 6.8). Der Beitrag von Gut2p zur Reduktion des Quinon-*pools* erfolgte im Modell zusammen mit den Reaktionen von Nde1p und Nde2p durch die Oxidation von NADH. Aus den Daten von Pahlmann u. a. (2002) lässt sich für Nde1p/Nde2p ein v_{max} von ca. 2,5 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$ abschätzen [308]. Das Modell bestimmte die Reduktion des Quinon-*pools* durch die Übertragung von Elektronen aus dem Cytosol bei t_0 mit 1,5 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$. Berücksichtigt man die Substratkonzentration von Nde1p/Nde2p, ist das ein realistischer Wert. Bei t_{10} und t_{30} erhöhte sich die Elektronenübertragung in der Simulation um 60% 6.9. Die Umstellung von respirativem auf respiro-fermentativen Metabolismus zeigte in der differentiellen Genexpression von GUT2 ein stimmiges Bild.
Die Expression von GUT2 (YIL155C) konnte durch Glukose und cAMP reprimiert werden. Es erfolgte eine deutliche Repression in den Zeitpunkten t_{10} und t_{30} verglichen mit dem Referenzzustand t_0. Die differentielle Genexpression durch Glukose und cAMP wurde bei zahlreichen weiteren sensitiven Genen im genannten Zeitraum beobachtet.
NDE1 (YMR145C) und NDE2 (YDL085W) stehen unter der transkriptionellen Kontrolle von 20 bekannten Regulatoren [55]. Aus der Rekonstruktion von Regulationsnetzwerken [167] und der genomweiten Protein-DNA-Interaktion [244, 427, 224] geht hervor, dass NDE1 (13) und NDE2 (7) keinen Regulator gemeinsam haben. Bei CO_2-Anstieg wurden beide Gene entgegengesetzt reguliert. Die Induktion von NDE1 erfolgte ab t_{30} nach dem Profil seiner Transkriptionsfaktoren Atf1p (YGL071W) und Rap1p (YNL216W) [167, 224]. Die Repression von NDE2 erfolgte wahrscheinlich durch den Tup1p/Cyc8p-Repressorkomplex, der vom transkriptionellen Repressor Rfx1p (YLR176C) rekrutiert werden kann [427]. Der Repressor wurde ab t_{10} induziert.

7.2.3 Transkriptionelle Regulation von Komplex II der MRC

Einige der bekannten Regulatoren der Untereinheiten von Komplex IV sind auch an der Regulation von Komplex II beteiligt. Die UE der Succinat-Dehydrogenase (Sdh1/2/3/4p und Sdh5p) sind ausschließlich im Zellkern kodiert und werden, soweit bekannt, nicht durch den CCAAT-Bindekomplex reguliert. Auch die beiden alternativen Untereinheiten der SDH (Sdh1Bp und Shh3/4p) sind kernkodiert. Die Expression von SDH1/2/3/4 ist bei Glukoselimitierung Co-reguliert [397]. Bei CO_2-Belastung wurde außerdem eine Co-Repression der Isogene SDH1B, SHH3 und SHH4 beobachtet (Tab. 7.6).
Für SDH1 sind 10 Regulatoren bekannt [427]. Transkriptionell induziert wurden Ume6p und Rap1p im Zeitraum der Stressantwort (t_{10-30}). Beide sind an der stressbedingten Remodulation der Chromationstruktur und der Zellteilung beteiligt. Reprimiert wurde der Repressor Xbp1p ($t_{10-\infty}$). Er ist an der Regulation von 15% des Genoms, darunter Gene der Stressantwort und des Arrests der G_1-Phase, beteiligt. Weitere Regulatoren von SDH1 (Bur6p, Fkh1p, Med2p, Spt3p, Spt6p, Sua7p) sind transkriptionell unauffällig.

Das Isogen SDH1B wurde reprimiert und hatte mit SDH1 die Regulatoren Ume6p und Sua7p gemeinsam. SDH1B steht unter der Kontrolle des transkriptionellen Repressors

TABELLE 7.6: DGE der mitochondriellen Elektronentransportkette (MRC) bei 50% CO_2 (t_∞) verglichen mit 0,05% CO_2 (t_0) aus den *counts per million* (CPM) als *fold change* (FC) für D=0,1 h^{-1} und D=0,05 h^{-1} nach Komplex Nr. (K. Nr.).

Gen	**ORF**	**K. Nr.**	**t_0** **D: 0,05 / 0,1**	**t_∞** **D: 0,05 / 0,1**	**log_2FC** **D: 0,05 / 0,1**
NDI1	YML120C		798±15 / 989±179	1717±73 / 1658±150	1,10 / 0,75
NDE1	YMR145C		1190±79 / 1493±251	2425±31 / 1904±101	1,03 / 0,36
NDE2	YDL085W		302±32 / 205±64	92±21 / 104±27	-1,73 / -0,96
GUT2	YIL155C		1267±39 / 1630±159	3698±553/ 1966±269	1,54 / 0,27
SDH1	YKL148C	II	857±24 / 1166±222	2421±46 / 1857±41	1,50 / 0,68
SDH1B	YJL045W	II	111±47/239±15	25±3/22±0	-1,41/-3,41
SDH2	YLL041C	II	963±37 / 1158±102	2042±83 / 2026±136	1,09 / 0,81
SDH3	YKL141W	II	542±40 / 660±37	703±95 / 1309±30	0,37 / 0,99
SHH3	YMR118c	II	172±82/463±13	23±2/34±2	-1,89/-3,76
SDH4	YDR178W	II	367±43 / 476±75	857±58 / 921±40	1,22 / 0,96
SHH4	YLR164w	II	59±23/112±11	10±0/21±4	-1,71/-2,45
SDH5	YOL071W	II	120±38 / 111±7	93±7 / 131±9	-0,34 / 0,24
COR1	YBL045C	III	942±17 / 1238±285	1976±145 / 2369±25	1,07/ 0,96
QCR2	YPR191W	III	747±59 / 994±195	1566±86 / 1713±38	1,07 / 0,80
QCR6	YFR033C	III	667±80 / 806±108	1138±86 / 1771±8	0,77 / 1,14
QCR7	YDR529C	III	704±22 / 881±32	944±118 / 1908±128	0,42 / 1,11
QCR9	YGR183C	III	390±5 / 433±34	482±56 / 540±32	0,30 / 0,32
COX4	YGL187C	IV	612±16 / 732±72	901±87 / 928±1	0,56 / 1,34
COX5A	YNL052W	IV	474±10 / 619±64	987±63 / 1319±0	1,06 / 1,09
COX5B	YIL111W	IV	33±5 / 24±8	17±2 / 19±2	-0,97 / -0,29
COX6	YHR051W	IV	458±41 / 545±72	790±63 / 885±18	0,79 / 0,70
COX7	YMR256C	IV	348±12 / 413±40	477±45 / 755±132	0,87 / 1,37
COX8	YLR395C	IV	387±9 / 437±45	604±49 / 818±66	0,64 / 0,90
COX9	YDL067C	IV	206±27 / 260±10	284±24 / 486±26	0,46 / 0,90
COX10	YPL172C	IV	69±9 / 89±11	133±6 / 102±11	0,96 / 0,20
COX11	YPL132W	IV	55±4 / 64±2	90±1 / 90±1	0,71 / 0,50
COX12	YLR038C	IV	408±31 / 487±76	765±32 / 825±54	0,91 / 0,77

Rfx1p, welcher die Repression durch den Tup1p/Cyc8p-Komplex vermittelt. RFX1 wurde induziert (t_{10-60}). Weitere Regulatoren (Tfc6p, Yap5p) waren transkriptionell unauffällig.
Der Repressor Xbp1p und das induzierte bZIP Protein Yap6p (t_{10-60}) regulieren auch die Gene SDH2 und SDH3. Weitere Regulatoren der beiden Gene (Bur6p, Fkh1p, Gcr1p, Stp1p, Spt3p, Sua7p, Yap1p, Tfc7p) zeigten unveränderte mRNA-Level.
SDH3 wurde außerdem durch den TF Aft1p induziert. Dieser war an der Metabolisierung von Eisen beteiligt und dauerhaft induziert ($t_{30-\infty}$). Ebenfalls an der Regulation von SDH3 beteiligt war Hsf1p. Es handelt sich um ein hitzeschock-sensitives-Element (HSE: *heat shock element*), das auch translationalen Stress vermittelt. HSF1 wurde bei CO_2-Belastung dauerhaft erhöht transkribiert (t_∞). Das *split-finger*-Protein Sfp1p wurde bereits im letzten Abschnitt vorgestellt und reguliert neben COX7 auch SDH3. Die bekannten Regulatoren der Expression von SDH4 (Gcn5p, Med6p, Rpd3p, Sua7p, Tfc7p) und SDH5 (Fkh1p, Spt10p) wurden nicht differentiell

exprimiert.
Die Isogene SHH3 (Regulatoren: Med6p, Sfp1p, Spt10p und Uga3p) und SHH4 (Regulatoren: Gcn4p, Ixr1p, Rsf2p, Spt10p und Yap6p) haben mit SDH1B die Histonacetylase Spt10p als transkriptionellen Regulator gemeinsam [258]. Der transkriptionelle Repressor Ixr1p reprimierte neben SHH4 auch COX5B. Sfp1p wurde transkriptionell indziert (t_{10}) und war an der Regulation der Ribosomenbiogenese, der Substratverfügbarkeit und der Stressantwort beteiligt. Diese drei Bereiche wurden bei steigender CO_2-Belastung akut angesprochen.
Die Isogene SDH1B, SHH3 und SHH4 veränderten Reaktionsrate und Affinität des Komplex II für sein Substrat Q_{10} [397]. Bei der Abstimmung der Reaktionsraten des TCC und der MRC war mit geringer Expression der drei Isogene eine gewisse Flexibilität möglich. CO_2 führte zu ihrer vollständigen Repression. Der Export des SDH-Substrats Succinat impliziert eine geringere Reaktionsrate des Komplex II verglichen mit der Succinyl-CoA-Synthetase und der α-Ketoglutarat-Dehydrogenase im TCC.

Kapitel 8

Diskussion

In den vergangenen zehn Jahren wurde der CO_2-induzierte Phänotyp von *S. cerevisiae* mit systembiologischen Methoden untersucht. Es gab bereits Versuche den transienten Einfluss von CO_2 quantitativ zu beschreiben [9, 347]. Auf zellulärer und molekularer Ebene sind die Wirkmechanismen nachwievor nicht vollständig aufgeklärt [31]. Quantitative Modelle zur Vorhersage CO_2-bedingter physiologischer Effekte gibt es noch wenige [183]. Daher wurden zunächst die zellulären CO_2-Mengen bilanziert (Kapitel 5), um das Potential von CO_2 zur Auslenkung zellulärer Homöostasen als Diskusionsgrundlage zu nutzen (Abs. 8.1 und 8.3). Durch die Anpassung seiner Physiologie kehrt der Organismus nach der Auslenkung mit CO_2 trotz der weiter andauernden Belastung in das zuvor ausgebildete oder in ein diesem ähnliches Fließgleichgewicht zurück (Kapitel 6). Der CO_2-Aufschlag induziert vorübergehend zellulären Stress, was die Anpassung beschleunigt (Kapitel 7). Die DGE der Stressantwort wird als temporäre molekulare Phänotypisierung diskutiert (Abs. 8.7). Aktuelle Studien sehen HCO_3^- auch als regulierte zelluläre Stellgröße [14, 155] weshalb die Signaltransduktion bei CO_2-Stress erörtert wird (Abs. 8.5). Die Parallelen der DGE bei anhaltender CO_2-Belastung werden im Kontext früherer Studien diskutiert.
Da die Belastung mit CO_2 beim *scale-up* von Produktionsprozessen auftritt und meist negative Auswirkungen hat [31], ist die molekularen Phänotypisierung auch von industriellem Interesse.

8.1 Bilanzierung von CO_2 und HCO_3^- innerhalb des Reaktors

Mithilfe von O_2- und CO_2-Sonden kann die Konzentration gelöster Gase in Medien bestimmt werden. Die intrazellulären Konzentrationen werden durch die Einhaltung von äußeren Grenzwerten auf akzeptablem Niveau gehalten. In aktuelle Studien wird berichtet, dass HCO_3^- die zelluläre Regulation in Eukaryoten beeinflusst [155]. Basierend auf dem Massenwirkungsgesetz wurde daher ein deterministisches Modell der physikochemischen Reaktorbedingungen zur Quantifizierung von HCO_3^- in der Hefezelle erstellt.
In Kapitel 5 wurde dieses Modell zur Berechnung der Verteilung von CO_2 zwischen der Gasphase und der Flüssigphase im Reaktor verwendet. Die Verteilung von CO_2 und HCO_3^- in Organismus und Mineralsalzmedium hat bei bekannten pH-Werten und Volumina eine analytische Lösung. Die Bilanzen dieser Arbeit gehen von einer neutralen Zelle (pH 7,08$\pm$0,05), was in etwa dem pH-Wert von neutralen Kompartimenten entspricht (Cytosol: pH 7,0; Mitochondrien: pH 7,2), und einem konstanten Zellvolumen ($\sim$113 fl) aus [301, 434]. Mit der Quantifizierung des anorganische Kohlenstoffgehalt (TIC_{GC}) wurde ein Summenparameter ermittelt,

der die Wiederfindung des Kohlenstoffs verbessert [40] und hier zur Modellvalidierung diente (TIC_{Modell}).
Das dynamische Modell ist geeignet, bei einer Änderung der CO_2-Belastung die Einstellung neuer chemischer Gleichgewichte in Flüssigkeiten zeitlich und pH-abhängig aufzulösen. Im Ungleichgewicht zeigte der pH-Wert im Experiment und in der Simulation eine hervorragende Übereinstimmung (Abb. 5.3), während der zeitliche Verlauf des Signals eines CO_2-Sensors im Abgasstrom nicht mit der Simulation in Übereinstimmung gebracht werden konnte (Abb. 5.3). Die Modelle A und B schließen die Richtigkeit beider Messungen aus (siehe Anhang Tab. B.1). Da die Ansprechzeit der pH-Sonde geringer ist als die des CO_2-Sensors im Abgas, ist der pH-Wert für die Validierung des Modells aussagekräftiger. Die Dynamik des CO_2-Eintrags in die flüssige Phase bei pH 5 wurde daher adäquat abgebildet.
Orij u. a. publizierten 2009 eine Methode zur *in vivo*-Bestimmung des zellulären pH-Werts mittels Fluoreszensmessung [302, 300, 301]. Um ein kompartimentiertes Modell des Organismus zu erstellen, können diese Mutanten daher kritische Parameter liefern. Die pH-Werte eines kompartimentierten Organismus umfassen einen Bereich von pH 5,2 in sekretorischen Vesikeln bis pH 8,2 in den Peroxisomen [300, 357]. Das hat erheblichen Einfluss auf das CO_2/HCO_3^--Gleichgewicht.
Die Physiologie der zellulären Ionenhomöostase ist ein Thema, das – nicht zuletzt mithilfe systembiologischer Ansätze [183, 189] – kürzlich bedeutende Beiträge zum Verständnis der zellulären Regulation liefern konnte. Simulationen der zellulären Ionenhomöostase sollten HCO_3^- wegen seines elektro-chemischen Einflusses berücksichtigen. Das vorgestellte Modell bietet dafür eine geeignete Basis. Die Parameter sind in Anhang B beschrieben und wurden von Eigenstetter und Takors 2017 publiziert [91].

8.2 CO_2 und HCO_3^- an sensitiven Enyzmen

Batch- und *chemostat*-Kultivierungen von *S. cerevisiae* wurden durch die Begasung mit CO_2 von etwa 1 mM auf 15 mM (20% CO_2) und 25 mM $CO_{2,L}$ (50% CO_2) angereichert (Abb. 4.2 und Tab. 5.1). Mit Modell C wurde die bei neutralem pH vorliegende Konzentration von $CO_{2,c}$ (>24 mM) und $HCO_{3,c}^-$ (>135 mM) in der Zelle berechnet.
Jones und Greenfield publizierten bereits 1982 eine Zusammenfassung CO_2- und HCO_3^--sensitiver Enzyme die zum Teil auch in Hefe vertreten sind (Tab. 2.1) [180]. Die Konzentrationen an CO_2 und HCO_3^- in der vorliegenden Studie übertreffen die *in vitro* wirksamen Konzentrationen von Jones und Greenfield um ein vielfaches. Selten sind CO_2 und HCO_3^- als Effektoren in Enzymdatenbanken aufgeführt, was eine Abschätzung der Effekte auf enzymatische Kinetiken erschwert.
Vakuoläre und ER-ständige Protonenpumpen können durch 10-100 mM $HCO_{3,c}^-$ allosterisch angeregt werden [180]. In Simulationen werden diese Konzentrationen in der Zelle zwischen 10-50 mmol $L^{-1}h^{-1}$ Q_{CO2} erreicht. In Prozessen mit hoher Zelldichte kann das 4-15 fache dieses Werts erreicht werden (200-750 mmol $L^{-1}h^{-1}$).
Die Inhibition der Malat-DH, der Glutamat-DH und der Cytochrom-C-Reduktase soll ab 10 mM

$HCO^-_{3,c}$ stattfinden. Die Glukose-6-P-DH ist *in vitro* ab 20 mM $HCO^-_{3,c}$, die Pyruvat-Kinase bei 30 mM $HCO^-_{3,c}$) und die Isocitrat-DH bei 40 mM $HCO^-_{3,c}$ messbar inhibiert. Diese Zahlen wurden nicht an Hefen erhoben. Es zeigt aber, dass Effekte im physiologischen Konzentrationsbereich stattfinden [31].
Bei 135 mM bis 176 mM $HCO^-_{3,c}$ wären die mitochondrielle Malat-DH, die Cytochrom-c-Reduktase und die Isocitrat-DH in dieser Studie stark inhibiert. Die messbare Erhöhung ihrer mRNA-Gehalte (YKL085W, YKL148C, YLL041C, YNL037C, YOR136W, YDL066W) könnte als Indikator einer Inhibition durch HCO^-_3 in Hefe gedeutet werden und diesen möglicherweise kompensieren. Dieser einfachen Logik folgend, wären im Cytosol die Malat-DH (YOL126C), die Pyruvat-Kinase (YAL038W), die Glutamat-DH (YOR375C, YAL062W, YDL215C) und die Glukose-6-P-DH (YNL241C) allosterisch durch HCO^-_3 inhibiert. Hier wurde keine Änderung bzw. ein Rückgang der Transkriptniveaus beobachtet. Diese Enzyme sind entweder nicht beeinträchtigt, eine Beeinträchtigung des Enzyms kann allosterisch kompensiert werden oder im Reaktionsnetzwerk durch die erhöhte Reaktionsrate weniger CO_2-sensitiver Reaktionen umgangen werden.
Jones und Greenfield sahen 1982 keine Möglichkeit mithilfe von Reaktionskinetiken die physiologischen Effekte von CO_2 auf den Metabolismus von Hefe zu beschreiben [180]. Eine derartige Charakterisierung wäre auch heute eine Herausforderung, die eine umfassende Datengrundlage CO_2-spezifischer enzymatischer Parameter und komplexe mathematische Modelle ihrer Reaktionskinetiken erfordern würde.
Es wird als zielführender erachtet, die Ursache der zellulären Veränderungen auf physikalisch-chemischer Ebene zu simulieren und die Reaktion des Organismus mit genomweiten Methoden zu erfassen. Diese Herangehensweise eignete sich bereits zur Aufklärung der zellulären Regulation bei osmotischem Stress [296, 201, 320].

8.3 Zelluläre Homöostasen bei transienter CO_2-Belastung

Mit einem Differentialgleichungsmodell zur Bilanzierung von CO_2 und HCO^-_3 ist es in dieser Studie gelungen, die Auswirkungen eines CO_2-Gradienten an der Periplasmamembran auf das elektrische Potential, die pH-Homöostase und die Kalium-Homöostase zu zeigen [91]. Die Anreicherung von HCO^-_3 verursacht ATP-Kosten beim Export von Protonen zur Stabilisierung des zellulären pH-Werts und durch den erhöhten zellulären Kaliumgehalt zum Ausgleich des elektrischen Potentials. CO_2 im zellulären Milieu wirkt sich auf die zelluläre pH-Homöostase, die Kalium-Homöostase und andere Mechanismen, die in den Kapiteln 6 und 7 vorgestellt wurden, aus.

8.3.1 Auslenkung des Systems durch CO_2

In dieser Studie wurden Hefezellen einem CO_2-Gradienten von 22 mM ausgesetzt, der zur massiven Diffusion von $CO_{2,L}$ über die Periplasmamembran führt. Die chemische Belastung ist einer Belastung durch WOAs ähnlich. Analog zu CO_2 werden sie durch Diffusion aufgenommen, dissoziieren in der Zelle und verursachen zur Aufrechterhaltung des zellulären pH den

ATP-abhängigen Export von Protonen [265]. Schlimmstenfalls verharren Hefezellen in Gegenwart schwacher Säuren mit abgesenktem intrazellulärem pH, bis geeignetere Umgebungsbedingungen vorliegen [417].
Solange kein Transporter für Bicarbonat identifiziert wurde, ist der Export von HCO_3^- unwahrscheinlich [469]. HCO_3^- müsste die Zelle über Diffusion oder Vesikeltransport (Exozytose) verlassen. Ein *futile cycle* aus Export und re-Import nach dem Beispiel schwacher organischer Säuren ist daher nicht realistisch. Stattdessen führen CO_2-Gradienten zum kontinuierlichen Anstieg, bis das Gleichgewicht eines neuen $HCO_{3,c}^-$-Niveaus in der Zelle ausgebildet wurde.
Theoretisch kann die Carboanhydrase-Aktivität (CAA) die Rate der HCO_3^--Akkumulation in der Zelle beeinflussen. Aber ihr Einfluss spielt Berechnungen zufolge nur eine untergeordnete Rolle weil die CAA bereits unter Referenzbedingungen gering sein sollte [14] und bei hohen CO_2-Niveaus dauerhaft reprimiert war. Außerdem kann der Bedarf an $HCO_{3,c}^-$ für die Enzyme Pyc1p und Acc1p in langsam wachsenden Zellen leicht durch die langsamere chemische Hydratisierung gedeckt werden (siehe Anhang B, Gl. B.11-B.18). Die Akkumulation von $HCO_{3,c}^-$ zieht sich daher über eine Stunde hin, obwohl die Gasphase in 30 Minuten abgesättigt ist. Ein Vorteil für die Zelle, da damit auch die Protonenentstehungsrate langsamer ist.
Intrazelluläre ATP-Gehalte blieben über 3 h nach dem CO_2-Anstieg nahezu konstant, was eine ausreichende Energieversorgung nahelegt. Es wurde daher angenommen, dass Pma1-vermittelter Export von Protonen nicht durch ATP limitiert war. Dennoch fluktuiert die Adenosin-Energieladung der Zelle zwischen 0,9 und 0,75 (Abb. 7.4). Die Fluktuation kann als Zeichen der temporären physiologischen Belastung betrachtet werden (Abs. 8.3.3).
In Simulationen erhöhte sich zelluläres Kalium K_c^+ nach dem Import von $CO_{2,L}$, was die Strategie der Zelle beim Anstieg von H_c^+ und dessen Kompensation durch Export zeigt. Der zeitgleiche Import von K^+ verhindert die weitere Hyperpolarisation der Zellmembran [239]. Kürzlich veröffentlichte experimentelle Studien zeigen, dass steigende zelluläre Kalium-Gehalte eine mögliche Reaktion auf extrazelluläre $CO_{2,L}$-Gradienten und damit die Akkumulation negativer Ladung in Form von $HCO_{3,c}^-$ darstellen [464, 347]. Die Simulationen dieser Arbeit bestätigen damit frühere experimentelle Beobachtungen.

8.3.2 Abgleich der Modellannahmen zum Transport von Ionen

Basierend auf dem derzeitigen Wissensstand des zellulären Ionentransports [239, 17, 289, 347, 434] wurde ein mathematisches Modell (Gl. 5.1-5.17) formuliert, um die Transportdynamiken in kurzen (<5 min) und längeren (120 min) Zeitperioden zu untersuchen. Pma1, Trk1,2 und Nha1 wurden als die wichtigsten Transporter für das Gleichgewicht von pH und Kalium in der Zelle identifiziert. Außerdem wurde die notwendige Menge an ATP zur Kompensation der CO_2-Belastung davon abgeleitet.
Pma1, der ATP-abhängige H^+-Exporter, wird in seiner enzymatischen Aktivität (v_{max}) und seiner ATP-Affinität (K_m) durch posttranslationale Modifikationen kontrolliert [379, 382]. Intrazelluläre Glukose aktiviert die H^+-ATPase [216]. Die vorliegende Arbeit zeigte den Abbau des Disaccharids Trehalose und des Glukose-Polymers Glykogen als unmittelbare Folge steigender CO_2-Niveaus. Selbiges wurde auch von Richard u. a. 2014 beobachtet [347]. Folglich kann vermehrt intrazellulär Glukose auftreten und Pma1p aktivieren [333, 96]. Experimentelle Studien

der Protonenpumpe haben gezeigt, dass die ATPase-Aktivität bei steigenden HCO_3^--Niveaus zwischen 10 und 100 mM erhöht wurde [180].
Kürzlich wurde von Volkov (2015) beschrieben, dass Hefen typischerweise 130 000 Pma1-Pumpen pro Zelle besitzen, die H^+ mit einer Rate von 2600 000 Protonen pro Sekunde exportieren. Bei der Zellzahl n_c und der Zelloberfläche A_c ergibt das eine H^+-Pumprate von 0,9 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$ oder 2,5 mM min^{-1}. Die simulierten Daten stimmen mit diesen Erwartungen überein.
Diese Exportraten wurden bei der gemeinsamen Aktivität von Pma1 mit dem Nha1 K^+/H^+-Antiporter und spezifischem Protonensymport ST erreicht. Nha1 ist essentiell für das zelluläre Kaliumgleichgewicht in saurer Umgebung [21, 17]. Volkov (2015) nimmt dafür 1500 Nha1-Antiporter pro Zelle an, die einen Ionentransport von bis zu 1,3 mM min^{-1} ermöglichen. Die hier simulierten Raten liegen etwas unter diesen Annahmen. Nha1 wird bei osmotischem Stress durch die HOG-Signalkaskade (HOG: *High Osmolarity Glycerol*) reguliert [299]. Diese reagiert auf Spannungen in der Periplasmamembran [381]. Ob CO_2-Gradienten solche Spannungen auslösen können, beantworten publizierte Modelle der HOG-Signalkaskade noch nicht [458, 189]. Erwähnenswert ist, dass eine Veränderung des Kaliumtransports als Antwort auf CO_2 von Richard, Guillouet und Uribelarrea (2014) gemessen und im Kontext von zellulärer Osmolarität diskutiert wurde [347]. Gründe, warum steigende CO_2-Niveaus den HOG-Signalweg aktivieren sollten, gibt Abschnitt 8.3.4.

8.3.3 ATP-Bedarf für die pH-Homöostase

Getrieben durch den CO_2-Gradienten, akkumulieren 114 mM HCO_3^- mit einer maximalen Importrate von 3 mM min^{-1} in der Zelle. Insgesamt stieg der K^+-Gehalt um 109 mM um das Membranpotential wiederherzustellen. Die verbleibende Differenz von 5 mM wurde hauptsächlich durch eine Erhöhung des Verhältnisses von $H_2PO_{4,c}^-$ zu $HPO_{4,c}^{2-}$ kompensiert. Folglich wurden nur 4,4% des Anstiegs von H_c^+ durch die steigende zelluläre Pufferkapazität ausgeglichen, während der Großteil aktiv von der Zelle ausgeschleust werden musste um den pH zu stabilisieren.
Die Ausbildung eines neuen Gleichgewichts benötigt für Zellen, die mit 0,1 h^{-1} wachsen (Tab. 5.2, Zeile 5), zusätzliche 0,89 mMATP min^{-1}, wie der Vergleich von r_{Pma1} mit den Ausgangsbedingungen zeigt (Tab. 5.2, Zeile 4). Bei 0,05 h^{-1} waren 0,62 mMATP min^{-1} notwendig (Tab. 5.2, Zeile 1 und 2). Der zusätzliche Verbrauch von ATP wurde hauptsächlich durch das negativere Membranpotential verursacht, welches $r_{Trk1,2}$, r_{ST} und r_{Nha1} erhöht. Der Großteil des importierten Kaliums wurde über r_{Nha1} gegen H^+ ausgetauscht (Tab. 5.2). Das Meiste davon (95,6%) wurde über die ATP-abhängige r_{Pma1} exportiert. Innerhalb der ersten zehn Minuten erhöhte sich r_{Pma1} auf das Maximum von 175% des Referenzzustands, was noch im operativen Rahmen liegt [379, 333, 216]. Die Zunahme von HCO_3^- verursacht temporäre Kostenmaxima von 1 $mmol_{ATP}$ $g_{DW}^{-1}h^{-1}$ und eine permanente Verschiebung des Membranpotentials um -37 mV. Zweiteres wird durch 3,7 µM nicht-kompensierte negative Ladung (Gl. 5.10) verursacht (Abb. 5.4.C9). Der zusätzliche ATP-Bedarf von 0,62 mMATP min^{-1} (bei D=0,05 h^{-1}) und 0,89 mMATP min^{-1} (bei D=0,1 h^{-1}) konnte dem *futile cycling* von K^+/H^+ zwischen Trk1,2 und Nha1 (58%) und dem direkten Import von H^+ über spezifischen Protonensymport ST (42%) zugeordnet werden.

Diese ATP-Menge mag verringert werden, wenn K_c^+ zum Teil durch alternative Kationen, die nicht Teil des *futile cycles* sind – z.B. Mg^{2+} – ersetzt wird. Alternativ könnte Hefe auch Anionen ins Medium abgeben um dem Druck der zusätzlichen negativen Ladung in Form von HCO_3^- zu entgehen. Ein letzter Ausweg besteht darin, die Absenkung des zellulären pH zu tolerieren, was geringere Wachstumsraten zur Folge hätte [300, 417].

8.3.4 Genetische Regulation von Transportvorgängen zur Ionenhomöostase

Die vorangegangenen Abschnitte (8.3.1-8.3.3) haben gezeigt, wie CO_2-Gradienten die zelluläre Ionen-Homöostase stören und dass in den gegebenen Zeitskalen eine post-translationale Regulation von Transportproteinen sehr wahrscheinlich ist. Die genomweite Transkriptanalyse ist ein Möglichkeit, die Beteiligung kurzfristig aktivierter Signalwege zu bestätigen und eine langfristige Beteiligung von Funktionen aufzeigen.
Hohe CO_2-Belastung destabilisiert die zelluläre pH-Homöostase in Hefezellen. Entsprechende Schlüsselgene wurden in pH-Studien an Deletionsstämmen bereits identifiziert. Orij u. a. führten 2012 eine genomweite Analyse an 4740 Mutanten der *S. cerevisiae*-Deletionsbank durch [301, 120]. Bei der aeroben Kultivierung auf Glukose (pH 5,0) wurde in Deletionsstämmen ein erhöhter (104 Einzelgenmutanten) bzw. erniedrigter (73 Einzelgenmutanten) pH_C im Bereich [7,13-7,63] und [6,73-7,03] identifiziert [301]. Beim Phänotyp des Wildtyps ergab sich eine Korrelation zwischen pH_C und der Wachstumsrate, wonach Orij u. a. Deletionsstämme mit verminderter Wachstumsrate in drei Kategorien einteilten [301].

I Die identifizierten Mutanten (92) folgen in pH_C und ihrer Wachstumsrate der Korrelation des Wildtyps [301]. Die mutierten Gene wirken daher durch den pH_C auf die Wachstumsrate und kontrollieren diese über den pH_C [301]. Bei CO_2-Belastung wurden davon 11 Gene dauerhaft überexprimiert (AFG3, CBP2, COR1, MEF2, PET111, PET112, ATP1, MRPL31, OCT1, MTG2, PIM1) und drei reprimiert (ERG28, GPM2, YGR131W).

II Die Mutanten (62) zeigen reduziertes Wachstum ohne entsprechende Senkung ihres pH_C. Die mutierten Gene wirken pH_C-unabhängig auf die Wachstumsrate [301]. Bei CO_2-Belastung wurden davon sieben Gene dauerhaft überexprimiert (MSY1, RML2, MSD1, HSL7, CYS3, CLN3, ISA1).

III Kategorie III (19) zeigte reduzierten pH_C und reduziertes Wachstum. Allerdings wurde das Wachstum von der Korrelation des Wildtyps entkoppelt. Eine generelle Limitierung, hohe Wachstumsraten auch bei niedrigem pH_C zu realisieren, scheint daher nicht gegeben [301]. Bei CO_2-Belastung wurde RSM24 dauerhaft überexprimiert.

Ein Abgleich der 177 mutierten Gene mit der DGE bei CO_2-Belastung ergibt insgesamt eine Trefferanzahl von 43%, was 76 Genen entspricht, wovon 18 dauerhaft (t_∞) induziert wurden. In jedem Fall hat die Anzahl der Treffer in der hypergeometrischen Verteilung (Gl. 3.26) eine geringe Zufallswahrscheinlichkeit (p<0,001), was andeutet, dass pH_C durch die CO_2-Belastung auch langfristig beeinträchtigt wird. Mit $|\log_2 FC| < 1$ (aber $|\log_2 FC| > 0,6$) sind diese Gene

nicht hinreichend ausgelenkt um in Tabelle 7.5 aufgeführt zu sein.
Brett u. a. isolierten 2011 aus 4606 Einzelgenmutanten 224 mit ungewöhnlich saurem [4,17-4,81] und 46 mit basischem [5,41-6,68] vakuolärem pH-Wert (pH_V) [36]. In 107 dieser Mutanten war pH_V unabhängig vom pH-Wert des Mediums [36]. Ein Abgleich der 107 mutierten Gene mit der DGE bei CO_2-Belastung ergab eine Übereinstimmung von fünf Genen (ERG4, ACB1, PMT2, STF2, und COS12). Aus der unterdurchschnittlichen Anzahl an Übereinstimmungen lässt sich keine Beeinträchtigung vakuolärer Funktionen durch CO_2 ableiten. Eine pH_V-μ-Korrelation ergab sich nicht.
Es sollte erwähnt werden, dass die pH_C-μ-Korrelation von Orij u. a. bei unlimitiertem Wachstum (μ_{max}=0,42 h^{-1}) sehr kleine Änderungen des pH_C bei beträchtlichem Rückgang von μvorsieht [301]. Um μvon 0,404 h^{-1} auf 0,377 h^{-1} bzw. 0,345 h^{-1} zu senken (Tab. 4.1), wäre lediglich ein ΔpH_C von etwa -0,1 bzw. -0,15 notwendig. Der Rückgang im Wachstum entsteht auch durch 16 mM bzw. 25 mM anorganischen Kohlenstoffs (TIC_{GC}), wie die *batch*-Prozesse in Kapitel 4 zeigten.
Ein pH_C-Bereich bis 6,6 erlaubt dem Wildtyp Wachstumsraten bis 0,1 h^{-1} [301]. Die in Kapitel 5 simulierte Ansäuerung der Zelle reicht demnach nicht aus, die Wachstumsrate unter die Durchflussrate (D=0,1 h^{-1}) zu senken. Es bleibt zu bedenken, dass die Simulationen auf Konzentrations- und Ladungsungleichgewichten beruhen. Mit zunehmender physiologischer Adaption des Organismus verliert die Simulation ihren prädiktiven Charakter für das System. Ob sich der zelluläre pH permanent verändert (ΔpH_C=-0,1), bleibt daher unklar (Abs. 5.3).
Da mit der Wachstumsrate μdie CO_2-Emission q_{CO2} und der CO_2-Gehalt ansteigen (vlg. Tab. 5.1, Zeile 1 und 3), deutet die pH_C-μ-Korrelation eine Steigerung des pH_C mit steigendem CO_2-Gehalt an. Die transkriptionelle Repression von Hsp30p, ein Repressor, der die Plasmamembranständige H^+-ATPase Pma1p inhibiert [327, 52, 255], und die erhöhte Expression von Pma1p, dem Hauptregulator von pH_C, unterstützen diese Überlegung (Tab. 5.4). Bei CO_2-Belastung werden außerdem die beiden Hsp30p-assoziierten Proteine Yro2p und Mrh1p transkriptionell reguliert. Sie sind zudem an der Resistenz gegen WOA-Stress durch Acetat beteiligt [451, 398]. Ihre genaue Funktion ist noch unklar [398]. Fest steht, dass ihre Expression bei gegebener CO_2-Belastung nach 100 Stunden immer noch inhibiert (YRO2) bzw. aktiviert (MRH1) war (Tab. 5.4). Die Stressantwort war zu diesem Zeitpunkt bereits abgeklungen (siehe Kapitel 6).
Die co-Regulation von Pma1p und anderen Transportern bedarf eines Netzwerks aus Regulatoren, deren Vernetzung und Funktionen nicht gänzlich aufgeklärt sind [434, 189, 163, 183]. Die Transportkapazitäten werden zum Einen dem periodischen Metabolismus des Zellzyklus angepasst [269, 237, 236] und zum Anderen auf Umgebungssignale abgestimmt [320, 266, 265, 401, 417]. Die Repression von HSP30 unterscheidet die Reaktion auf CO_2 von der Stressantwort auf Hitze-, Osmo- und WOA-Stress [327, 255].
Die MAP-Kinase Hog1p ist Teil des HOG-Signalwegs welcher die Antwort auf **hyper**-osmotischen Stress vermittelt [162]. Wasserverlust lässt die Zelle schrumpfen, führt zur Phosphorylierung von Hog1p, dessen Translokation vom Cytosol in den Zellkern und der vermehrten Synthese von Glycerol durch die Expression von Gpd1p und Gpp2p [303, 337]. Die Synthese von Glycerol bei geschlossenem Glycerol-Kanal Fps1p kann so den Unterschied im osmotischen

Potential kompensieren [201]. Für die schnelle und sensitive Reaktion bei Stress wird unter isoosmotischen Bedingungen eine basale Hog1p-Aktivität vorgehalten [381], 5-10 Minuten nach dem Stress-Signal Protein exprimiert [251] und nach 5-30 min das osmotische Gleichgewicht wieder hergestellt [381]. Mehrere *feedback*-Schleifen sorgen für eine effizienten Rückstellung des Phosphorylierungssignals an Hog1p [147, 381]. Ein **hyper**-osmotischer Schock mit 250 mM KCl_L führt in der Zelle zu 20% relativer Hog1p-Aktivität (5 min) [147].
Geringe Glycerol-Syntheseraten (0,02 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$) wurden beobachtet (Tab. 6.2), bis nach 20 Minuten der Export abbricht. Hohe Glykolyse-Raten im Cytosol und die transkriptionelle Induktion der 6-Phosphofrukto-2-Kinase (PFK27) durch phosphoryliertes Hog1p im Zellkern erhöhen die Verfügbarkeit von Dihydroxyacetonphosphat DHAP als Substrat der Glycerol-Synthese [83, 320]. Eine Veränderung des osmotischen Potentials zwischen Medium und Zellplasma durch $HCO_{3,c}^-$ (Δc=125 mM) und K_c^+ (Δc=100 mM) könnte als milder **hypo**-osmotischer Stress bezeichnet werden. Dabei führt eine Akkumulation von Glycerol das osmotische Potential nicht ins Gleichgewicht zurück, sondern verstärkt den osmotischen Effekt.
Steigende CO_2-Niveaus (t_{10-60}) veranlassen die Zelle, die Reaktionsrate der Glycolyse zu erhöhen (Abb. 6.8) und PFK27 zu induzieren (log_2FC=2,6$\pm$0,3). Der TF Hog1p vermittelt die transkriptionelle Induktion von GPP1 (t_{10}) und GPP2 (t_{10-60}). Induziert wurde außerdem Nmd5p ($t_{10\text{-}30}$) als nukleärer Importfaktor für Hog1p. CO_2 löst DGE durch den HOG-Signalweg aus.
Die Induktion erfolgt aber anders, als das bei **hyper**-osmotischem Stress beobachtet wurde [11, 338]. Das HOG-Signal zur Synthese und dem Import von Glycerol wurde mit der transkriptionellen Repression von Gpd1p, einer Glycerol-3-Phosphat-DH (Abb. 8.1), und Stl1p, einem Glycerol/H^+-Symporter (Tab. 5.5), blockiert. Alepuz u. a. waren 2001 der Auffassung, neben Hog1p sei auch der Aktivator Hot1p zur Induktion von GPD1 und GPP2 notwendig [11]. Da GPP2 im Gegensatz zu GPD1 induziert wurde, sind neben Hot1p zur Induktion von GPD1 entweder weitere Transkriptionsfaktoren notwendig oder die Expression durch einen Repressor blockiert. Proft u. a. beschrieben 2002 die Umwandlung des Tup1/Cyc8-Sko1-Repressor-Komplexes in einen Aktivator-Komplex durch die Interaktion mit der Kinase Hog1p [338, 66]. Es folgt die Bindung der SAGA Histonacetylase und des SWI/SNF Nucleosom-Komplex [338]. Bei CO_2-Belastung wurden cAMP-responsive Element (z.B. GRE2, ENA1, AHP1) oder Hypoxie-responsive Elemente (z.B. MOT3), die von diesem Proteinkomplex besetzt sind, nicht durch Hog1p induziert.
38 Gene von Transportern (Tab. 5.4 und 5.5), Kanälen (Tab. 5.6) und ihren Regulatoren (Tab. 5.4-5.6) zeigten DGE. Initial waren 95% (t_{10-30}), dann 32% (t_{60}) und schließlich noch 24% (t_∞) dieser 38 Gene in ihrer Expression verändert – darunter auch HOG1.

8.4 CO_2-induzierter Phänotyp

Der Phänotyp beschreibt das charakteristische Auftreten eines Organismus (Genotyp) in einer Umgebung (Reaktor). Nach dieser Auffassung wurde in Abschnitt 8.3 aus der primären Veränderung der Umgebung ein Teil des charakteristischen Auftretens, beispielsweise die Aktivierung der Protonenpumpe Pma1p, abgeleitet. Diese Ableitung ist aufgrund entsprechender Reaktorparameter zulässig und wurde anhand des Transkriptoms als Teil einer molekularen

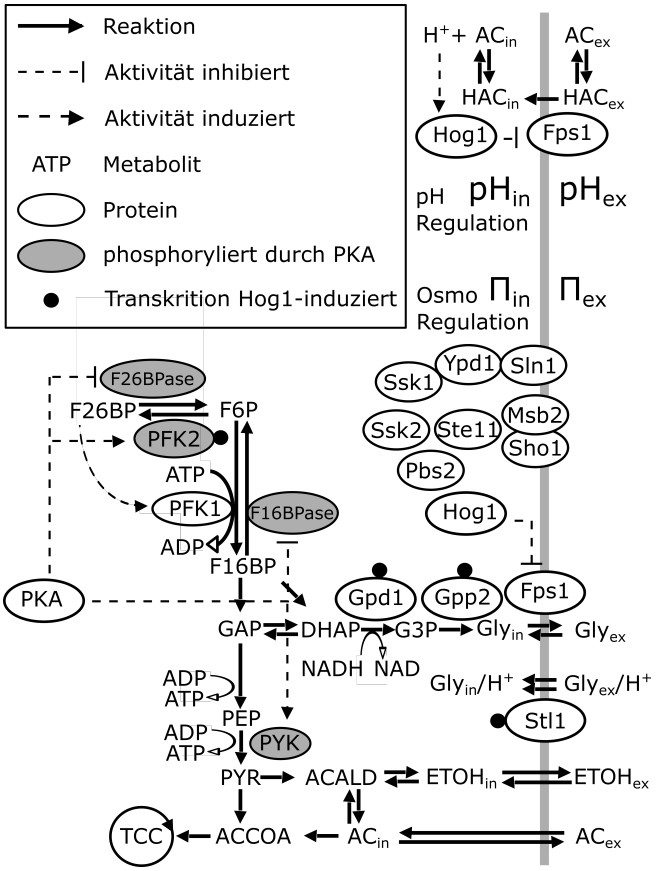


ABBILDUNG 8.1: Struktur des HOG-Signals als Antwort auf Acetat-Stress und osmotischen Stress mit Interaktionen zur Glykolyse und dem Glycerol-Transport. Gezeigt sind ausgewählte Interaktionen von Hog1 und PKA. Proteine sind nach Standardnamen oder wie folgt benannt. Kürzel: Π: osmotischer Druck, AC: Acetat, ACALD: Acetaldehyd, ACCOA: Acetyl-CoA, DHAP: Dihydroxyacetonphosphat, ETOH: Ethanol, F6P: Fruktose-6-Phosphat, F16BP: Fruktose-1,6-Bisphosphat, F26BP: Fruktose-2,6-Bisphosphat, G3P: Glycerol-3-Phosphat, Gly: Glycerol, HAC: Acetat protoniert, PFK1: Phosphofruktokinase 1, PFK2: Phosphofruktokinase 2, PYR: Pyruvat, PYK: Pyruvat Kinase, PKA: katalytische Untereinheit der PKA (Tpk1, Tpk2, Tpk3), TCC: Zitronensäurezyklus. [100, 272, 163, 381]

Phänotypisierung diskutiert.

Dieser Abschnitt diskutiert weitere Aspekte des Phänotyps, die sich aus der sekundären Veränderung der Umgebung durch den Organismus ableiten. Die mithilfe einer metabolischen Flussanalyse kombinierten Metabolomdaten werden auch hier anhand des Transkriptoms als Teil einer molekularen Phänotypisierung diskutiert.

Da die molekularen Phänotypisierung von *S. cerevisiae* alle Umgebungsparameter umfasst, ist die Beschreibung des CO_2-induzierten Phänotyps auf aerobe Umgebungen mit Glukose als wachstumslimitierender Kohlenstoffquelle beschränkt. Die Ergebnisse werden in diesem Rahmen diskutiert.

8.4.1 Genetische Regulation von Membran- und Zellwandkomponenten

Das Endoplasmatische Reticulum ER erstreckt sich als tubuläres Netzwerk in der Zelle [248]. Das ER steht im Kontakt mit der Periplasmamembran (cortikales ER), den Mitochondrien (cytoplasmatisches ER) und dem Zellkern (nukleäres ER) [248, 449]. Eine filamentöse Zellmorphologie wird von Veränderungen in der ER-Morphologie begleitet [449]. Nährstoffmangel und CO_2 können filamentöses Wachstum auslösen [318, 145, 449]. In dieser Studie wurde kein filamentöses Wachstum beobachtet. Stattdessen werden Gene, die filamentöses Wachstum unterstützen, durch CO_2/HCO_3^- reprimiert (ECM22, UPC2, NCE102, FHN1, GAT2, PRR2, ERG-Gene) [449].

CO_2 reprimiert Gene der Ergosterol-Biosynthese (Tab. 7.2, Cluster III). Dabei kann die Regulation einer temporären und einer permanenten Repression unterschieden werden. Es ist bekannt, dass hyper-osmotischer Stress die Ergosterol-Biosynthese durch Repression des Transkiptionsaktivators Ecm22p über Mot3p oder Rox1p reprimiert [275]. Wie STL1 wird MOT3 durch einen Tup1/Cyc8-Sko1-Repressor-Komplex reprimiert, solange keine Phosphorylierung von Sok1p durch Hog1p erfolgt [338, 275]. Die temporäre Repression von ECM22 (t_{10}) durch CO_2 wurde daher nicht durch Mot3p, sondern durch die Induktion von ROX1 ausgelöst. Die Expression von Rox1p ist selbstrepremierend und wird durch den Häm-Status sowie den CO_2/HCO_3^--abhängigen Repressor Cst6p reguliert [78, 473, 227]. ROX1 folgt in seiner temporären Induktion (t_{10-30}) daher der Repression seines Repressors Cst6p durch CO_2/HCO_3^-. Das Muster der DGE von ECM22, ROX1 und CST6 kann eine temporäre Repression der Ergosterol-Biosynthese erklären.

Die temporäre Repression der ERG-Gene (ERG1, ERG2, ERG3, ERG5, ERG6, ERG11, ERG24, ERG25 und ERG28) durch Repression von ECM22 (t_{10}) wurde von einer permanenten Repression durch Repression von UPC2 ($t_{60-\infty}$) abgelöst. Upc2p fungiert im Cytosol als Sterol-Sensor, indem es Ergosterol bindet oder bei Sterol-Mangel in den Zellkern wechselt [76, 455, 449]. Dort binden Ecm22p und Upc2p an sterolregulierende Elemente (SRE) in Promotoren von ERG-Genen und induzieren diese bei niedrigem Sterol-Gehalt [249, 76, 449]. Da Upc2p der Ergosterol-Sensor ist, stellt sich die Frage, ob CO_2 einfach das Signal stört oder, wenn keine Störung vorliegt, wie und warum es zur Repression der ERG-Gene kommt.

Der Gehalt von Ergosterol in verschiedenen zellulären Membranen ist spezifisch. Während die Periplasmamembran, sekretorische Vesikel und die nukleäre Membran hohe Verhältnisse von Ergosterol zu Phospholipiden aufweisen, sind die Anteile in der äußeren Mitochondrienmembran niedrig [471]. Upc2p kontrolliert auch Gene, die der Regulation durch den Häm-Status unterliegen. Es wird bei Kälteschock und unter anaeroben Bedingungen zur Expression von DAN/TIR-Genen induziert [5]. Diese kodieren für Mannoproteine, welche essentiell beim Wachstum unter anaeroben Bedingungen sind [5]. Unter aeroben Bedingungen ist die Expresssion von DAN/TIR-Genen hingegen gering. Der Induktion von ROX1 folgt dennoch die Repression von DAN2 und DAN4 (t_{10-30}). Die Repression von DAN1,3/TIR1,3,4 ($t_{60-\infty}$) folgt dem Muster der Repression von UPC2. Abramova u. a. wussten 2000 zu berichten, dass Upc2p unter aeroben Bedingungen reprimiert wird [5]. Durch die CO_2-Belastung wurde die Restexpression hypoxischer Isoenzyme strenger reprimiert (Tab. 7.6). Die strenge Ausrichtung auf respirative Bedingungen könnte daher auch zur Repression von UPC2 und den ERG-Gene

geführt haben.
Die Prozesse der Fusion und der Abschnürung von Mitochondrien bestimmen deren Morphologie innerhalb der Zelle [280, 16]. Die Repression der Ergosterol-Biosynthese könnte den Gehalt von Ergosterol in der äußeren Mitochondrienmembran senken und damit die Insertion von Proteinen mit Lipidanker wie Fis1p erleichtern [206]. Fis1p assoziiert bei der Spaltung eines mitochondriellen Tubulus mit der GTPase Dnm1p und Mdv1p [280]. Die Expression von FIS1 (t_{∞}), DNM1 ($t_{60-\infty}$) und MDV1 ($t_{60-\infty}$) wurde nach dem Abklingen der Stressantwort induziert. Die Fusion zweier Tubuli wird durch die integralen Membranproteine Fzo1p und Mgm1p mit der Membrankomponente Ugo1p vermittelt [16]. Im späteren Verlauf der Fusion kommt es durch die Ligase Mdm30p zur Ubiquitinierung an Fzo1p, dem Abbau der Proteinbrücken und der Fusion der äußeren Mitochondrienmembranen beider Tubuli [16]. Die Expression von FZO1 ($t_{60-\infty}$) und MGM1 (t_{∞}) wurde ebenfalls induziert. Ob eine Verdopplung der mRNA-Gehalte dieser Gene Änderungen der mitochondriellen Morphologie zur Folge hatten, wurde nicht beobachtet.
Fest steht, dass einige der ERG-Gene (ERG2, ERG6, ERG25, ERG28) und Gene, die Woods u. a. 2016 als Komponenten zur Regulation filamentösen Wachstums beschreiben (UPC2, ECM22, FHN1, PRR2, GAT2, Nce102, HAP4 und Sok2), zu den dosissensitiven Genen zählen (Abs. 5.6) [245, 449]. Die CO_2-Belastung reprimiert alle diese Gene dauerhaft, abgesehen von HAP4 ($t_{10-\infty}$). Dieser globale transkriptionelle Aktivator respiratorischer Gene (HAP2-5) induziert die Glukose- und Häm-abhängige Aktivität des HAP-CCAAT-Binde-komplex [55]. CO_2 reprimiert die Bildung von Filamenten, aber kann sich auf die Zusammensetzung der Zellwand und die Morphologie der Mitochondrien auswirken.

8.4.2 Zusammensetzung der Biomasse

Hefekulturen wurden durch die Begasung mit CO_2 von etwa 1 mM auf 15 mM (p_{CO2}=0,2), 25 mM (p_{CO2}=0,6) und 35 mM TIC (p_{CO2}=0,75) angereichert (Abb. 4.2 und Tab. 5.1). Die Ausbeute Y_{XS} auf Glukose sinkt im *batch* um 6,5% (p_{CO2}=0,2) und 12,5% (p_{CO2}=0,6) bei gleichzeitigem Rückgang der maximalen Wachstumsraten um 6,7% und 14,4% verglichen mit der Referenz bei niedriger CO_2 (Y_{XS}=0,16 g g^{-1} und μ_{max}=0,404 h^{-1}; Tab. 4.1). Im *chemostat* auf Glukose wurde nach fünf Verweilzeiten ein Rückgang der Ausbeute um 10,6% und 4,0% für D=0,05 h^{-1} und D=0,1 h^{-1} verglichen mit dem Referenzzustand gezeigt (Tab. 6.1). Diese Studie bestätigt frühere Beobachtungen von gestiegenem $q_{Glukose}$, $q_{Succinat}$ und q_{H+}, die von zahlreichen Autoren diskutiert wurden [53, 180, 9, 347].
Das elementare Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff Y_{CN} in der Biomasse reduzierte sich bei CO_2-Anstieg aufgrund der Degradation von Glykogen und Trehalose (Abb. 6.2). *Saccharomyces cerevisiae* speichert Trehalose und Glycogen während der G_1-Phase des Zellzyklus [382]. Demnach verringert sich ihr intrazellulärer Gehalt (D=0,05 h^{-1}: 11,0%$_{ww}$Gly; 6,1%$_{ww}$Tre), wenn die G_1-Phase kürzer ist (D=0,1 h^{-1}: 6,1%$_{ww}$Gly; 2,9%$_{ww}$Tre) was mit höheren Wachstumsraten einhergeht [382]. In CO_2-behandelten Zellen erfolgt ein schneller Abbau der Glycogen- und Trehalosespeicher (Abb. 6.2 und 6.3). Y_{CN} (mol_C mol_N^{-1}) fiel schnell auf 6,5 und weiter auf 6,17, was Werten entspricht, die bei μ=0,25 h^{-1} gemessen werden [212]. Der wachstumsratenspezifische Wert konnte nach 10 Verweilzeiten wiederhergestellt werden (Abb. 6.2).

Chen and Gutmanis (1976) berichteten ebenfalls ein Absinken des Y_{CN} von 5,98 auf 5,41 $mol_C\ mol_N^{-1}$ in *fed-batch*-Kultivierungen, die mit 0-80% $CO_{2,g}$ supplementiert wurden [53]. Eine CO_2-Erhöhung von 5 mM $CO_{2,l}$ führten bei Richard u. a. 2014 zur Degradation der Glycogen- und Trehalose-*pools* (D=0,15 h^{-1}: 7,4%$_{ww}$Gly; 7,8%$_{ww}$Tre) beim Wachstum auf Glukose und Ethanol im kontinuierlichen Prozess (D=0,15 h^{-1}: 4,3%$_{ww}$Gly; 2,6%$_{ww}$Tre) [347]. Die Beobachtungen stimmen daher mit früheren Studien überein, obwohl absolute Gehalte aufgrund verschiedener Genotypen und Prozessbedingungen abweichen können. Die Veränderung von Y_{CN} deutet auf Veränderungen im Metabolismus hin, die den Gehalt von RNA und Protein begünstigen. Aguilera u. a. (2005) haben die mRNA-Niveaus von CO_2-exponierten Kulturen bei Kohlenstoff- und Stickstofflimitierung gemessen. Die Expression vieler mitochondrieller Gene war erhöht, einige davon kodieren Proteine, die an der MRC und der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind [9]. Die Kombination dieser Effekte wurde als eine Entkopplung des Metabolismus vom Wachstum beschrieben [180, 346].

8.4.3 Mitochondrielle Aktivität

In den Experimenten zu dieser Arbeit wurden Oszillationen von q_{O2} und q_{CO2} mit einer Periodendauer von 70 Minuten bei erhöhter CO_2-Belastung beobachtet. Richards, Guillouets und Uribelarreas (2014) berichten von ähnlichen Beobachtungen [347]. Ein oszillierender q_{O2} kann als Indikator schwankender Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität verstanden werden. Hohe CO_2-Gehalte könnten dazu führen, dass die allosterische *feedback*-Regulation zwischen dem TCC und der MRC verlangsamt reagiert. Es könnte innerhalb der Kultur zu einer CO_2-abhängigen Synchronisation kommen, die dann leicht messbar wäre.
Bei normoxischen Bedingungen ist Cox5Ap eine regulatorische Untereinheit von Komplex IV der MRC (Tab. 7.6) [155]. Hess u. a. identifizierten 2014 zwei Phosphorylierungsstellen T65 und S43 an der ATP-Bindestelle zur allosterischen Regulation der Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität [155]. Phosphorylierung verhindert die Bindung des Cytochrom-c-Oxidase-Inhibitors ATP [155]. Hess u. a. zufolge hebt $HCO_{3,l}^-$ die Inhibition von Komplex IV durch den Effektor ATP auf. Die Arbeitsgruppe schlussfolgert aus ihren Daten, dass ein Signalosom die Aktivität des TCC in Form von $CO_{2,c}$/$HCO_{3,c}^-$ über eine sensitive Adenylatcyclase (z.B. Cyc1p) in Mitochondrien aufnimmt und die Inhibition der Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität mittels cAMP reguliert [421, 472, 155]. In vielen mehrzelligen Eukaryoten (*Cricetulus griseus*, *Homo sapiens*, *Aspergillus fumigatus*) reguliert eine lösliche Adenylatcyclase (sAC) das cAMP-Niveau in Mitochondrien. Die Regulation der Cyclase erfolgt über das Ca^{2+}/Calmodulin-Signal und über HCO_3^- [421]. Das lokale cAMP/PKA-Signal reguliert bei Stimulation mit HCO_3^- die aerobe ATP-Synthese durch die Phosphorylierung von Proteinen der MRC und des TCC [472, 155, 422].
Gibt es eine $HCO_{3,c}^-$-abhängige Adenylatcyclase, beeinflussen hohe CO_2-Gehalte die Regulation des basalen cAMP-Niveaus. Die Expression der Adenylatcyclase Cyr1p (YJL005W) war in dieser Arbeit nicht signifikant erhöht. Hess u. a. konnten im zellfreien System bei 50 mM HCO_3^- die dreifache Adenylatcyclase-Aktivität verglichen mit 2 mM HCO_3^- bestimmen [155]. Bei 150 mM $HCO_{3,c}^-$ kann daher auch in dieser Arbeit von einer höheren Syntheserate ausgegangen werden. Es ist daher zu erwarten, dass auch der Abbau von cAMP beschleunigt verläuft. Das

Basisniveau von cAMP wird durch die hochaffine Phosphodiesterase Pde2p (YOR360C) reguliert, während das cAMP-Signal durch Pde1p (YGL248W) zurückgestellt wird [242, 405, 269]. Die CO_2-Belastung verdoppelt die Expression von PDE2, nicht PDE1. Es ist daher wahrscheinlich, dass im Experiment die beiden Antagonisten Adenylatcyclase und Phosphodiesterase cAMP-Konzentration mit höherer *turnover*-Rate regulieren.
Das zelluläre ATP-Gehalt erscheint mit 4 µmol g_{DW}^{-1} stabil (siehe Abb. 7.4). Die mitochondrielle ATP-Konzentration als Effektor der Cytochrom-c-Oxidase wurde nicht bestimmt. Die erhöhte Expression des mitochondriellen ADP/ATP-Antiporter Pet9p (YBL030C) liefert ein Indiz für die erhöhte oxidative Phosphorylierung und Bestrebungen den mitochondriellen ATP-Gehalt niedrig zu halten.
Gleichzeitig ist die Expression der Carboanhydrase Nce103p (YNL036W) in ihrer Expression repremiert. Für das CO_2-sAC-cAMP-Signalosom bedeutet die Repression von Nce103p eine verzögerte Umsetzung von CO_2 in HCO_3^-. Eine längere Ansprechzeit des Signalosoms könnte für die Oszillation von q_{O2} und q_{CO2} verantwortlich sein. CO_2 agiert durch seine leichte Diffusion interzellulär und könnte in der Kultur einen leicht messbaren synchronisierenden Effekt begünstigen (siehe Kapitel 2,2.5.3).
Unabhängig von auftretenden Oszillationen wurde im Mittel ein höherer q_{O2} und q_{CO2} gemessen (Tab. 6.1). Konform dazu erhöht sich die Expression von Genen des TCC, der MRC und der ATP-Synthase (Kapitel 7). Aguilera u.a. publizierten 2005 ähnliche Beobachtungen für höhere CO_2-Belastung und schlussfolgerten eine höhere Aktivität der MRC, höhere ATP-Synthese und höheren Energiebedarf [9]. Der von Aguilera u.a. vorgestellte molekulare Phänotyp kann auch bei niedrigerer CO_2-Belastung identifiziert werden. Eine Entkopplung von Metabolismus und Wachstum durch CO_2 ist auf zwei Arten denkbar:

- Eine Entkopplung der ATP-Synthese von der TCC-Aktivität tritt beim Verlust des Protonengradienten auf. Schwache Säuren wie 2,4-Dinitrophenol werden daher auch als Entkoppler bezeichnet. Die Entkopplung durch Kohlensäure ist wegen des chemischen Gleichgewichts zu CO_2 gering (Apx. B).

- Der Membranübertritt von Protonen an bioenergetischen Membranen mit hohen Konzentrationsgradienten ist prinzipiell auch ohne Entkoppler möglich [39]. Die Präsenz von CO_2 mag die Fluidität und Permeabilität von Membranen erhöhen und diesen Effekt verstärken [180, 172]. Die Durchlässigkeit von Membranen für Ladungsträger ist trotzdem gering. Der Verlust von Protonen durch Membranen erscheint bei CO_2-Partialdrücken bis 750 mbar daher ungeeignet eine Erhöhung der Respiration von 10% bis 20% zu erklären [180, 172, 113].

- Wahrscheinlicher ist dagegen die Anpassung der respiratorischen Aktivität an die Aktivität der Glykolyse und des TCC zur Deckung eines insgesamt erhöhten Energiebedarfs.

Eine Möglichkeit der Anpassung der Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität durch CO_2/HCO_3^- wurde oben bereits erläutert. Eine weitere besteht mit der kurzzeitigen Anpassung der NADH-Dehydrogenase-Aktivität von Nde1p (YMR145C) und Nde2p (YDL085W) durch die Interaktion mit der Glycerol-3-Phosphate-Dehydrogenase Gut2p (YIL155C). Der CO_2-Anstieg erhöht die

Reaktionsrate der Glykolyse durch die Degradation der Kohlenhydratspeicher (siehe Tab. 6.2 q_{Gly} und q_{Tre}) und überfordert die Kapazität des TCC. Wird NAD^+ ausreichend schnell regeneriert, ersetzt die Synthese von Acetat (bis zu 1 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$) die von Ethanol, was Ubiquinon Q_{10} zu Ubiquinol $Q_{10}H_2$ reduziert (Abb. 6.9). Dafür reprimiert die Zelle die Expression von GUT2, was die Effizienz der NADH-Dehydrogenasen Nde1p und Nde2p zur Oxidation cytosolischen NADHs erhöht [308]. GUT2 ist daher in t_{10}, t_{30} und t_{60} repremiert.

Die Succinat-Dehydrogenase SDH ist auf die Regeneration oxidierten Flavin-Adenin-Dinukleotids FAD durch die Übertragung von Elektronen auf Q_{10} angewiesen [26]. In der Simulation wird ein Rückgang dieser Übertragung (t_{10}: 58%, t_{30}: 48%, t_{60}: 20%) zugunsten eines Anstiegs der NAD^+-Regeneration durch Nde1/2p (t_{10}: 146%, t_{30}: 160%, t_{60}: 128%) deutlich (Abb. 6.9). Die Produktion von Succinat (t_{10}: 0,06 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$, t_{30}: 0,13 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$, t_{60}: 0,05 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$) folgt der Kinetik der MRC. Die simulierte Reaktionsrate der SDH zeigt diese als Engpass im TCC (Abb. 6.9). Die kompetitive Inhibierung der SDH durch HCO_3^- in eukaryotischen Zellen wurde bereits diskutiert (siehe Abs. 8.2). Sdh1p und Sdh2p bilden die membranassoziierte katalytische Domäne, welche das Flavin und die Fe-S-Cluster des Komplexes trägt. Die Untereinheiten Sdh3p und Sdh4p bilden die membranintegrierte Domäne, welche mit Q_{10} interagiert. SDH1, SDH3 und SDH4 sind mit den Isogenen SDH1B, SHH3 und SHH4 vertreten [397]. Diese sind funktional, weisen aber eine 30-78% geringere spezifische Aktivität bei etwas höherer Affinität für Q_{10} auf [397]. Durch CO_2 wird ihr mRNA-Anteil (0,05 h^{-1}: 20% und 0,1 h^{-1}: 38%) auf 2% reprimiert. Die Expression der Untereinheiten Sdh1Bp, Shh3p und Shh4p bietet scheinbar keinen Vorteil in Umgebung mit erhöhter CO_2-Belastung.

Die Expression von Gut2p ist außerdem an einer reversiblen Steigerung des PO-Verhältnisses bei der Temperaturerhöhung bis 37°C beteiligt [334]. Hefe ist bei 38°C kein Wachstum auf nicht-fermentierbaren C-Quellen möglich [334]. Unter dieser Temperatur kann die ATP-Syntheserate pro Sauerstoffverbrauchsrate (PO-Verhältnis) durch Mitwirkung von Gut2p von 1,0 mol_{ATP} mol_O^{-1} (30°C) auf 1,4 mol_{ATP} $molO^{-1}$ (37°C) angehoben werden, während sich ohne Gut2p (Δ*gut2*) bei einer P/O-Ratio von 1,0 mol_{ATP} mol_O^{-1} (30-37°C) q_{O2} und q_{CO2} erhöhen [334]. Kurzfristig setzt die Zelle mit der Repression von GUT2 auf eine flexible Elektronenübertragung mittels NDE und NDI. Langfristig dominiert NDI als die effizientere Variante.

Fest steht, dass NDI, NDE, GUT2 und SDH zur Reduktion des Ubiquinon-Pools beitragen. Die Übertragung von Elektronen aus der mitochondriellen Matrix über NDI und SDH bindet Protonen auf Seiten der Matrix an Ubiquinon. Bei der Oxidation von Quinon werden diese in den Intermembranraum transferiert. Das erzeugt eine größere protonenmotorische Kraft als die Übertragung von Elektronen aus dem Intermembranraum und dem Cytosol, bei der dieser Transfer unterbleibt [334]. Eine Verlagerung der Ubiquinon-Reduktion von NDE auf NDI bedeutet daher eine Steigerung der Effizienz. Die CO_2-Belastung erhöht daher dauerhaft die Expression von NDI1 und SDH1-4 (Tab. 7.6). Durch die Expression von GUT2 wird die erhöhte Aktivität von NDE1 vermieden und mit der Repression von NDE2 vielleicht sogar reduziert. Der Elektronentransport aus dem Ubiquinon-Pool auf Sauerstoff über Komplex III und IV der MRC ist in der Expression erhöht. Die erhöhte Expression der COX-Gene wurde bereits 2005 von Aguilera beobachtet [9]. Eine dynamische Anpassung der MRC-Effizienz durch Anpassungen der Proteininteraktion an mitochondriellen Membran könnte auch durch CO_2/HCO_3^- ausgelöst

werden.

8.4.4 Energieausbeute des respiro-fermentativen Metabolismus

Vanrolleghem u.a. (1996) bestimmten die maximale Biomasse-ATP-Ausbeute Y_{XATP} mit 12,5 g_{DW} $mmol_{ATP}^{-1}$ bei einer minimalen P/O-Ratio von 1,1 mol_{ATP} mol_{O}^{-1} beim Wachstum auf Glukose durch die Supplementierung von Ethanol. In der Studie von Richard, Guillouet und Uribelarrea (2014) erzeugte CO_2 einen Rückgang der Ethanolaufnahmerate beim Wachstum auf Glukose und Ethanol. Bei einer konstanten P/O-Ratio von 1,15 mol_{ATP} mol_{O}^{-1} wurde bei steigendem $CO_{2,L}$ (1-22mM) ein sinkender Y_{XATP} geschlussfolgert (11,5-7,6 g_{DW} $mmol_{ATP}^{-1}$), was eine Erhöhung des zellulären *maintenance* bedeutet, die nicht allein durch eine pH-Änderung erklärt werden kann [347].
In Kapitel 6 wurde ein stöchiometrisches Netzwerk mit 121 Reaktionen, 126 Metaboliten und einer P/O-Ratio von 1,15 mol_{ATP} mol_{O}^{-1} zur Ermittlung von Y_{XATP} verwendet (Appendix C). Im Referenzzustand mit 1,6 mM $CO_{2,L}$ (Tab. 5.1) wurde Y_{XATP} bei 11,5 g_{DW} mol_{ATP}^{-1} ermittelt (Tab. 6.2), was mit publizierten Daten weitestgehend übereinstimmt [424, 347]. Bei CO_2-Anstieg wandelt sich der respirative zum respiro-fermentativen Metabolismus. Die Ausbeute sinkt zehn Minuten nach Atmosphärenwechsel bei 18 mM $CO_{2,L}$ auf 7,7 g_{DW} mol_{ATP}^{-1}. Die Umstellung des Metabolismus wurde durch CO_2-Anstieg induziert. Allerdings ist Y_{XATP} nicht direkt mit $CO_{2,L}$ korreliert, wie bei Richards, Guillouets und Uribelarreas 2014 dargestellt. Bei 23 mM $CO_{2,L}$ steigt Y_{XATP} bereits nach 60 Minuten auf 10,6 g_{DW} mol_{ATP}^{-1}. Demnach wirken sich Änderungen im CO_2-Gehalt stärker auf die Ausbeute aus als ein konstant hohes CO_2-Niveau.
Dabei liegt die ATP-Bildungsrate zehn Minuten nach Atmosphärenwechsel bei 12,9 $mmol_{ATP}$ $g_{DW}^{-1}h^{-1}$. Das entspricht einer Steigerung von 4,3 $mmol_{ATP}$ $g_{DW}^{-1}h^{-1}$ im Vergleich zum Referenzzustand mit 8,7 $mmol_{ATP}$ $g_{DW}^{-1}h^{-1}$ (Tab. 6.2). Das zusätzliche ATP stammt aus der Steigerung der Substratkettenphosphorylierung um etwa 150%, während die oxidative Phosphorylierung annähernd konstant nahe 6 $mmol_{ATP}$ $g_{DW}^{-1}h^{-1}$ (D=0,1 h^{-1}) bleibt. Dieser Wechsel zum respiro-fermentativen Metabolismus ermöglicht die Bereitstellung von ATP zur Stabilisierung des zellulären pH-Werts. Außerdem können die Syntheseraten von Protein-, DNA- und RNA-Bausteinen im Mittel aller notwendigen Reaktionen um bis zu 25% gesteigert werden (siehe Abb. 6.8). In einer Stresssituation wie dem schnellen Anstieg des CO_2-Gehalts mündet die Umstellung zum respiro-fermentativen Metabolismus in der gezielten Anpassung katalytischer Aktivität.
Dafür bedarf es der Wahrnehmung von CO_2 oder HCO_3^- bzw. CO_2-vermittelter Signale durch einen zellulären Sensor. Der folgende Abschnitt diskutiert Möglichkeiten der zellulären Signalgebung beim Anstieg von CO_2.

8.5 Transduktion eines (physiologischen) Signals durch CO_2-Gas

In Kapitel 6 wurden die Reaktionen auf CO_2 anhand von Metabolom- und Transkriptomdaten vorgestellt. Beides weist auf ein cAMP-vermitteltes Stresssignal hin. Es wurde die Möglichkeit einer cAMP-abhängige Regulation der MRC durch HCO_3^- diskutiert (Abs. 8.4.3). Dabei muss

es sich aber nicht zwangsläufig um eine Stressregulation handeln. Andererseits wurde eine direkte Wahrnehmung von CO_2/HCO_3^- durch die Adenylatcyclase (ACyc: Cyr1p, YJL005W, EC 2.4.2.31) an der Plasmamembran von *S. cerevisiae* nach dem Vorbild der humanpathogenen Hefe *C. albicans* in *S. cerevisiae* ausgeschlossen [380]. Aus der Simulation der Experimente in Kapitel 5 ergaben sich sekundäre Effekte, die ihrerseits geeignet sind um ein cAMP-vermitteltes Stresssignal auszulösen.

Ein Anstieg um 22 mM $CO_{2,L}$ erhöht zunächst das elektrische Potential ($\Delta E \approx 150$ mV; siehe Abb. 5.4), reduziert dann den cytosolischen pH-Wert ($\Delta pH_c \approx$-0,25; siehe Abb. 5.4) und erhöht durch Bicarbonat und Kalium ($\Delta HCO_{3,c}^- >$100 mM; siehe Tab. 5.1) den osmotischen Druck ($\Delta\Pi >$478 Pa) bzw. das osmotische Potential ($\Delta\mu <$-43,5 kJ mol^{-1}). Auch ohne die direkte Wahrnehmung von CO_2 oder HCO_3^- führen steigende CO_2-Gehalte zur Änderung von mindestens drei Parametern, die von der Zelle wahrgenommen und kontrolliert werden.

Unter diesen drei ist die H^+-Ionenkonzentration der sensibelste Parameter, weil die von der Zelle tolerierbaren Konzentrationsänderungen im nano- und nicht im millimolaren Bereich liegen. In der Simulation bleibt der pH_c dank erhöhter H^+-ATPase-Aktivität an der Periplasmamembran innerhalb vertretbarer Toleranzgrenzen (Abs. 8.3.4). Die Entkopplung zusätzlicher Pma1p-Aktivität muss durch ein zelluläres Signal ausgelöst werden. Die Repression des Pma1p-Regulatorproteins Hsp30p belegt diese gezielte Entkopplung. Bei CO_2-Belastung kann die Zelle weder kurz- noch langfristig auf diese Entkopplung verzichten (Tab. 8.1). CO_2-induzierter pH-Stress erklärt viele der innerhalb der ersten 60 Minuten induzierten zellulären Prozesse (siehe Kapitel 6 und 7). Das Auslösen und die Folgen eines cAMP-Signals durch einen fallenden cytosolischen pH-Wert wurde in Abschnitt 8.6 beschrieben.

Eine Depolarisation der Zellmembran wirkt nachweislich auf den Kaliumtransport [239, 189]. Da eine Konzentrationsänderung im mikromolaren Bereich zur vollständigen Depolarisation führen kann, ist auch die Repolarisation durch die Verschiebung geringer Stoffmengen möglich. Selbst bei einem Mangel an Kalium ist die zelluläre Konzentration ausreichend eine Repolarisation zu gewährleisten [183]. Studien, welche eine Depolarisation mit einem cAMP-Signal in Verbindung bringen, sind nicht bekannt.

Theoretisch entsteht im Experiment ein osmotisches Potential (-43,5 kJ mol^{-1}), das Spannungen in der Zellmembran erzeugt und als milder hypo-osmotischer Stress wahrgenommen werden könnte (Abs. 8.3.4). Die Stressantwort wurde aber in weniger als zehn Minuten ausgelöst. Das osmotische Potential zu diesem Zeitpunkt betrüge laut Simulation weniger als -10 kJ mol^{-1}, was vermutlich zu gering wäre die beobachtete Stressreaktion auszulösen. Sehr wahrscheinlich ist daher eine wie folgt geschilderte pH-induzierte Stressreaktion.

8.6 cAMP-abhängiges globales Stresssignal

Eine intrazelluläre Ansäuerung führt innerhalb von Sekunden zur Erhöhung des GTP/GDP-Verhältnisses am Ras-Protein, welches dann die Adenylat Cyclase an der Plasmamembran zur Synthese von cAMP anregt [62]. Obwohl eine Veränderung des zellulären GTP/GDP-Verhältnisses nicht bestimmt werden konnte (siehe Abb. 7.4), gibt es eindeutige Hinweise auf eine Ansäuerung des Cytosols (siehe Kapitel 5). Die Induktion der Plasmamembran-ATPase

Pma1p und ihres Regulatorproteins Hsp30p deutet auf massiven pH-Stress hin (siehe Tab. 5.4). Außerdem führt die Induktion eines cAMP-Signals zur raschen Aktivierung von Trehalasen und der Degradation von Trehalose (siehe Abb. 6.3). Trehalase wird durch die Phosphorylierung mittels cAMP-abhängiger Protein-Kinase A induziert [137]. In Stresssituationen setzt das in der Zelle Glukose frei (siehe Abs. 6.2) [61, 371], stabilisiert den zellulären pH-Wert (siehe Abs. 5.3) [216], sichert die Energiebereitstellung (siehe Abs. 6.5.3) und erhöht die Syntheseleistung anaboler Stoffwechselwege (siehe Abs. 6.3, 7.1.2, 7.1.5 und 7.1.6). Bei CO_2-Stress wurde die enzymatische Ausstattung der Mitochondrien für den respirativen Metabolismus verstärkt (siehe Abs. 7.2.1, 7.2.2 und 7.2.3).
Die cAMP-abhängige Proteinkinase cAPK besteht aus drei katalytischen Untereinheiten Tpk1p, Tpk2p, Tpk3p sowie einer regulatorischen Untereinheit Bcy1p [410, 411]. Bemerkenswert ist, dass Tpk1p, Tpk2p und Tpk3p verschiedene Zielproteine phosphorylieren [341] und damit durch das Verhältnis der katalytischen Untereinheiten die Möglichkeit zur Regulation der untergeordneten Prozesse besteht. CO_2 führt zur transkriptionellen Repression von BCY1, TPK1 und TPK2 (t_{10-30}), während TPK3 induziert wurde (t_{10-30}). Im Muster des DGE bei CO_2-Anstieg wurden Stoffwechselwege (Tab. 7.2) und GO-Termini (Apx. D) identifiziert, welche durch cAPK-Aktivität reguliert sind (siehe Kapitel 7).
Tpk1p hebt dabei die Repression zur Synthese verzweigtkettiger Aminosäuren auf, hat Einfluss auf die DNA-Stabilität und die Eisenaufnahme in Mitochondrien [353, 331]. Abbildung 7.2 zeigt eine Übersicht relevanter Reaktionen mit Expressionsprofil zur Synthese von Valin, Leucin und Isoleucin sowie der Synthese von Cystein zur dauerhaften Bindung von Eisen in Fe-S-Clustern (siehe Abs. 7.1.2 und 7.1.5).
Tpk2p hingegen bindet an Promotoren ribosomaler Proteine, reguliert ebenfalls Gene zur Eisenaufnahme, die Degradation von Trehalose und die Wasserhomöostase [353, 331]. Bei CO_2-Anstieg wurden GOs der Ribosomenbiogenese (siehe Apx. D Abb. D.1-D.6) und die Synthese des Elongationsfaktors eEF2 (Abb. 7.2) induziert (Abs. 7.1.4). Mit Aft1p ist ein Transkriptionsfaktor der Metabolisierung bzw. der zellulären Homöostase von Eisen dauerhaft induziert (siehe Abs. 5.6 Tab. 5.6 und Abs. 7.1.5). Auf Metabolitebene konnte die Degradation von Trehalose gezeigt werden (Abbildung 6.2 und 6.3).
Induziert wurde außerdem die Expression der MAP-Kinase Hog1p (Tab. 5.6). Zum Einen reguliert die HOG-Signalkaskade die Expression von ca. 600 Gene durch die Phosphorylierung osmosensitiver Transkriptionsfaktoren [163]. So gleicht bei osmotischem Stress ($\Delta\Pi$<0) die Synthese von Glycerin Potentialunterschiede aus und verhindert den Verlust von Wasser. Bei $HCO^-_{3,c}$-Anstieg ($\Delta\Pi$>0) muss die Transportleistung von Porinen reguliert werden um die Aufnahme von Wasser einzuschränken. Hog1p modifiziert dazu im Cytosol Transporter (z.B. Nha1p) und Kanäle (z.B. Tok1p) und interagiert im Zellkern auch direkt mit der RNA-Polymerase II [338, 196].
Über Tpk3p nimmt der RAS/cAMP Signalweg Einfluss auf die mitochondrielle Respiration. Es steuert die mitochondrielle Leistung bei sinkendem Energiebedarf [57]. Diese Beschreibung erscheint zunächst widersinnig, da der Energiebedarf durch die CO_2-Belastung eher steigen dürfte. Die Wirkmechanismen von Tpk3p sind nicht hinreichend bekannt den Konflikt an dieser Stelle aufzulösen.

Fest steht, dass eine Δ*tpk3*-Mutante bis zu 44% geringere respiratorische Aktivität in Übergangsphasen und einen Rückgang der Citrat-Synthase- (32%), Cytochrome-c-Oxidase- (43%) und ATPase-Aktivität (28%) in Speroblasten und isolierten Mitochondrien zeigte [57]. Abbildung 6.9 zeigt eine Übersicht relevanter mitochondrieller Reaktionen zur Energiesynthese mit der transkriptionellen Regulation ihrer kodierenden Gene.
Wird bei CO_2-Anstieg ein cAMP-Signal durch die Senkung des zellulären pHs induziert, können Tpk1p, Tpk2p und Tpk3p somit für die Induktion der in Gen-Cluster I, IV und VIII identifizierten Stoffwechselwege verantwortlich sein (Tab. 7.2).

8.7 CO_2-Adaption in *S. cerevisiae*

Bei stabiler CO_2-Belastung überwindet die Hefe den Stresszustand und passt sich der CO_2-Belastung an (Kapitel 7). Die Rückgewinnung der zellulären Glycogen- und Trehalosespeicher beweist die Kostenoptimierung des Organismus (Abb. 6.2). Dabei reduziert sich über 5 Verweilzeiten die Anzahl der differentiell exprimierten Gene auf ca. 182 ($|\log_2 FC|>1$) bzw. ca. 493 ($|\log_2 FC|>0{,}6$) (Tab. 7.5). Nach 10 Verweilzeiten fanden sich unter 90 DEGs ($|\log_2 FC|>1$) lediglich 7 Übereinstimmungen mit der Studie von Aguilera u. a., die 2005 unter ähnlichen Bedingungen (D=0,01 h^{-1}; ca. 22 mM CO_L; $|\log_2 FC|>1$) durchgeführt wurde [9].
In beiden Studien konnte bei Genen mit hoher Expressionsänderung (FC: *fold change*) oft kein logischer Zusammenhang zur Thematik hergestellt werden. Das kann diverse Gründe haben. Es stellt sich die Frage, welche quantitative Wirkung die Veränderung der Konzentration einer einzelnen mRNA im Metabolismus unter verschiedenen Bedingungen erbringt. Der Schwellenwert der DGE wurde daraufhin von 1 auf 0,6 gesenkt, da auch Y_{XS} und einige Raten ($q_{Glukose}$, $q_{Succinat}$, q_{O2} und q_{CO2}) in dieser Studie näher an der Referenz lagen. Der gesenkte Schwellenwert ermöglicht eine umfassendere Identifizierung der MRC-Gene (Tab. 7.6). Da die Anzahl der differentiell expremierten Gene letztendlich über die Identifikation eines GO-Terminus entscheidet, ist die Wahl des Schwellenwerts für diesen Prozess erheblich (siehe Abs. 3.11.2).

Abschließend wurden 16 GO-Termini identifiziert (Tab. 8.1). Demnach führte die CO_2-Belastung dauerhaft zur Repression der Biosynthese von Zellwandkomponenten wie Mannoproteinen (GO: 0005618, 0009277 und 0030312; siehe Abs. 8.4.1). Die Ergosterol-Biosynthese wurde aufgrund der geringen Anzahl reprimierter Gene nicht identifiziert (siehe Abs. 8.4.1). Einige ERG-Gene (ERG6, ERG25 und ERG28) und der Sterol-Sensor Upc2p blieben aber reprimiert (Tab. 5.6). Eine in Abschnitt 8.4.1 vorgestellte Möglichkeit zur Regulation der mitochondriellen Morphologie durch den Ergosterol-Gehalt der Mitochondrienmembran konnte durch Literatur nicht hinreichend gestützt werden. Mit Sicherheit sind die Zusammensetzung und Interaktion von Membranen in der Zelle aber eine Thematik, der in Eukaryoten zentrale Bedeutung für deren Morphologie bzw. der ihrer Organellen zukommt [318, 145, 449].
Der Prozess der zellulären Respiration (GO: 0045333) wurde induziert (siehe Abs. 8.4.3). Hierzu wurde die innere (GO: 0019866; siehe Abs. 7.1.3) und die äußere Membran (GO:

TABELLE 8.1: Im Organismus *S. cerevisiae* folgt auf erhöhte CO_2-Belastung (Bedingungen siehe Abs. 5.2.3) die DGE der eukaryotischen GOs (*gene ontology terms*) gelistet in der AmiGO Web Applikation[1] [43]

Kategorie	Identifikation	Name	Tendenz
Prozesse	0022618	*ribonucleoprotein complex assembly*	induziert
	0043038	*amino acid activation*	induziert
	0045333	*cellular respiration*	induziert
	1901575	*organic substance catabolic process*	induziert
Komponenten	0005618	*cell wall*	reprimiert
	0009277	*fungal-type cell wall*	reprimiert
	0019866	*organelle inner membrane*	induziert
	0030312	*external encapsulating structure*	reprimiert
	0031966	*mitochondrial membrane*	induziert
	0031967	*organelle envelope*	induziert
	0031975	*envelope*	induziert
	0044455	*mitochondrial membrane part*	induziert
	0098798	*mitochondrial protein complex*	induziert
Funktionen	0015075	*ion transmembrane transporter activity*	induziert
	0015077	*monovalent inorganic cation transmembrane transporter activity*	induziert
	0015078	*hydrogen ion transmembrane transporter activity*	induziert

0031967; siehe Abs. 7.2 und 5.6) der Mitochondrien mit den dafür notwendigen Proteinkomplexen ausgestattet (GO: 0098798). Die Funktion des Protonentransports durch den Succinat-Dehydrogenase-Komplex (Abs. 7.2.3), die Cytochrom-c-Oxidase (Abs. 7.2.1) und die ATP-Synthase (Tab. 7.4) wurde dadurch erhöht (GO: 0015075, 0015076 und 0015078). Außerdem wurde durch die Funktion der H^+-ATPase der Plasmamembran die pH-Homöostase aufrecht erhalten (GO: 0015075, 0015076 und 0015077). Die Prozesse der Ribosomen-Assemblierung (GO: 0022618) und der tRNA-Beladung (GO: 0043038) belegen einen erhöhten anabolen Metabolismus bei gleichbleibender Wachstumsrate. Andere Autoren beschreiben diese Effekte als eine Entkopplung von Metabolismus und Wachstum [180, 346, 347].
Sopko u. a. zeigten 2006 bei 15% der *S. cerevisiae*-Gene, dass eine Einzelgenüberexpression die Wachstumsrate signifikant senken kann [389]. Makanae u. a. identifizierten 2013 durch geringe Erhöhung einer mRNA-Kopienzahl im Wachstum reprimierte Expressionsmutanten [245]. Elf der so identifizierten dosissensitiven Gene wurden auch bei CO_2-Belastung in ihrer Expression permanent erhöht (Kapitel 5 Tab. 5.6). Es handelt sich um Gene des TCC (Aco1p), einen Transkriptionsfaktor (Aft1p), mitochondrielle Membranproteine (Pet9p, Por1p, Tom40p, Tom70p, Odc1), Effektoren der Actinstruktur (Gic2p, Myo4p, Pef1p) und einen Effektor des Zellzyklus (Far1p). Es zeigt, dass der mitochondrielle Metabolismus und damit die Zelle sensitiv auf die Veränderung dieser Genexpression reagiert.
Aguilera u.a. kamen 2005 zu dem Schluss, dass die Beinträchtigungen des Organismus durch CO_2 eher gering sind [9]. Das zeigt sich in der direkten Gegenüberstellung von Leistungsparametern (Tab. 6.1). Eine Steigerung des Glukosebedarfs von 10% aufgrund hoher CO_2-Gehalte,

die der Organismus selbst produziert, sind in *batch*- und *fed-batch*-Prozessen realistisch. Physiologische Effekte treten auch bei geringen Konzentrationsgradienten auf [347]. CO_2 wirkt dann als schwache Säure und kann ein Stresssignal auslösen (Kapitel 7). Die Exposition an CO_2 sollte daher vermieden werden. Der molekulare Phänotyp eines Produktionsstammes wird durch die Anwesenheit von CO_2 und die Adaption an das CO_2 beeinträchtigt.

Kapitel 9

Zusammenfassung und Ausblick

In Bioreaktoren mit mehreren Metern Höhe beschreibt das Strömungsbild die Ausbildung horizontaler Schichten bei geringer vertikaler Durchmischung. Hydrostatischer Druck erhöht die Konzentration von CO_2 in den unteren Schichten [31]. Bei ausreichender Höhe bildet sich in nicht ideal durchmischten Bioreaktoren ein CO_2-Gradient aus.
Diese Studie demonstriert i) wann CO_2-relevante ATP-Kosten zur Stabilisierung des zellulären pH-Werts verursacht (Kapitel 5), ii) welche Maßnahmen zur Kompensation steigender CO_2-Gehalte getroffen werden (Kapitel 6) und iii) wie *S. cerevisiae* ihr Transkriptionsprofil über die Zeit an CO_2 anpasst (Kapitel 7). Für viele der molekularen Wirkmechanismen von CO_2 – i) Modifikation der Zellmembran; ii) Senkung des zellulären pHs; iii) Inaktivierung des Metabolismus an Schlüsselenzymen durch niedrigen pH oder iv) durch CO_2 und/oder HCO_3^-; v) Störung des zellulären Elektrolyt-Haushalts; vi) Verlust vitaler Funktionen an zellulären Membranen [113] – konnten im Zuge der Arbeiten Belege und Beispiele angeführt werden. Der Abgleich von Transkriptionsprofilen mit den Expressionsstudien von Sopko u. a. 2006, Brett u. a. 2011, Orij u. a. 2012 und Makanae u. a. 2013 bestätigte generelle Annahmen über die HCO_3^--Belastung in zellulären Kompartimenten mit neutralem und saurem pH-Wert [36, 301] und wies auf CO_2-spezifische Gene, die an der Entkopplung von Metabolismus und Wachstum beteiligt sind, hin [389, 245].
Die transkriptionelle Stressantwort und die expressionelle Adaption bei und an CO_2 führte im Prozessverlauf zur DGE von 182-910 bzw. 493-1763 Genen ($|\log_2 FC| \geq 1,0$ bzw. $|\log_2 FC| \geq 0,6$). Danach waren 285 bzw. 790 Annotationen der Gen-Ontologie (GO)-Datenbank an der Anpassung der DGE beteiligt.

9.1 Regulation des Glukose-Metabolismus im CO_2-Gradienten

Eine vertikale Verschiebung von Zellen im CO_2-Gradienten kann das chemische Potential zwischen Zelle und Medium verschieben. Ladungsdifferenzen im mikromolaren Konzentrationsbereich lösten eine Depolarisation der Zellmembran aus. Das elektrochemische Potential der Membran ist essentiell für den Membrantransport organischer und anorganischer Nährstoffe und ermöglicht die Funktion von Kanälen und Transportern.
Ein CO_2-Gradient löste durch die Ansäuerung des Cytosols Stress aus. Um den pH-Wert zu stabilisieren, erhöhte die Zelle ihre Protonenexportrate durch die allosterische Entkopplung ruhender Protonenpumpen. Diese und weitere Maßnahmen der Stressantwort kosteten die Zelle

Energie. Da die Prozessstrategie das Primärsubstrat Glukose limitiert, griff die Zelle auf beträchtliche Kohlenhydratreserven – 15% der Zelltrockenmasse – zurück. Über 80% dieser Reserven wurden bei Stress innerhalb einer halben Stunde abgebaut und biochemisch zu Acetat, Succinat und Protein transformiert. Metabolische Flussanalysen des respiro-fermentativen Stoffwechsels zeigten eine zeitweise Entlastung des TCC. Verantwortlich waren CO_2-Schwankungen im ein- bis zweistelligen millimolaren Konzentrationsbereich.
S. cerevisiae akkumulierte Kohlenhydrate bei Kohlenstofflimitierung und setzte diese bei Stress wieder frei. Das Signalmolekül cAMP regulierte dabei den Stoffffluss der Glykolyse zusammen mit dem Abbau von Glykogen und Trehalose durch die Proteinkinase A. Ihre Untereinheit Tpk3p regulierte den Cytochrom-c- und den Proteingehalt der Mitochondrien [57]. O_2 diente nach wie vor als Elektronenakzeptor. Allerdings wurden Elektronen vermehrt aus dem Cytosol statt aus der mitochondriellen Matrix auf die MRC übertragen. Dadurch konnte die oxidative Phosphorylierung von ADP stabilisiert und die Substratkettenphosphorylierung gesteigert werden. Die Pyruvataufnahme sank und der Stoffffluss des TCC konnte von der Respiration entkoppelt werden. Y_{XATP} fiel für wenige Minuten von 11,5 g_{DW} mol_{ATP}^{-1} auf 7,7 g_{DW} mol_{ATP}^{-1}.
Obwohl keine metabolische Flussanalyse durchgeführt wurde, die den Austausch von Metaboliten zwischen dem Cytosol und der mitochondriellen Matrix hinreichend beschrieben hätte, konnte ein plausibles Bild zur Umverteilung des Kohlenstoffs während der Stressantwort erstellt werden. Für eine mathematische Beschreibung der allosterischen Regulation des mitochondriellen Metabolismus wären zusätzliche experimentelle Daten notwendig gewesen. Leider waren im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Experimente möglich.

9.2 Stressantwort und Adaption an CO_2

CO_2 kann in der Zelle pH-Stress auslösen. Eine CO_2-induzierte Stressantwort löst die Synthese, Prozessierung und den Transport von RNA und die Synthese von Ribosomen und tRNAs aus. Außerdem induzierte sie den Schwefelmetabolismus auch zur post-translationalen Modifikation des Elongationsfaktors 2. Dazu erhöhte sich die Synthese von Aminosäuren und Nukleotiden, was durch den Glukose-Metabolismus unterstützt wurde. Mitophagie, Autophagie, vakuoläre und peroxisomale Funktionen wie die Proteolyse, die Synthese von Polysacchariden und die β-Oxidation wurden unterdrückt. Die Synthese von Alkoholen, die Gluconeogenese und die Sterol-Synthese im Cytosol und dem Endoplasmatischen Reticulum wurde dabei reprimiert. Die transkriptionelle Stressantwort dauerte ca. 30 Minuten. Zeitgleich bzw. unmittelbar im Anschluss wurde der mitochondrielle Metabolismus durch den Einbau bzw. Austausch mitochondrieller Membrankomplexe und löslicher Proteine angepasst.
Nach zehn Generationen zeigte die bei Glukoselimitierung an CO_2 adaptierte Zelle erhöhte CO_2-, Succinat- und Protonenproduktion, sowie O_2- und Glukoseaufnahme bei gesenktem Y_{XS}. NCE103 wurde reprimiert, da eine ausreichende Sättigung mit HCO_3^- als Carboxylasesubstrat vorlag. Die Carboxylase PYC1 und die Carboxykinase PCK1 wurden ebenfalls induziert. In Kombination mit der Pyruvatkinase kam es möglicherweise zum *futile cycle*. Hohe CO_2-Sättigung induzierte HAP4 als Regulator der Respiration, das Malatenzym MAE1 und PET9 zur

ADP/ATP Translokation zwischen Cytosol und Mitochondrien. Induziert blieb IMD2 zur Katalyse des limitierenden Reaktionsschrittes der GTP-Synthese. Die Induktion von HOG1 bzw. die Repression von HSP12/26/30 deuten Stress durch zahlreiche Faktoren an und sind daher nicht CO_2-spezifisch. Die Repression der Ergosterol-Biosynthese in den Genen ERG6/25/28 durch den Regulator UPC2 war, so weit bekannt, eine CO_2-spezifische Reaktion. Zellulärer Stress durch CO_2 könnte über diese Markergene erkannt werden. Die geringe Anzahl übereinstimmender DEGs beim Vergleich mit der CO_2-Studie von Aguilera u. a. macht noch einmal deutlich, wie vielschichtig die zelluläre Adaption an CO_2 ist. Die eindeutige Zuordnung von Stimulus und zellulärer Reaktion wäre für alle am Prozess auftretende Stressfaktoren wünschenswert. Wegen der Menge gleichzeitig auftretender Einflussfaktoren ist das Verständnis für den Prozess nicht intuitiv und oft auch nicht berechenbar.
Ziel der Systembiologie ist das Verständnis komplexer biologischer Systeme, angefangen beim Genom eines Organismus. Die Genannotation und die Transkription keines eukaryotischen Organismus wurde bisher vollständig aufgeklärt. Die Wissenslücken systematisch zu schließen ist eine der Herausforderungen, um zu einem umfassenden Systemverständnis zu gelangen. Die Wirkung von CO_2 auf die metabolische und transkriptionelle Regulation wurde mit *Omics*-Methoden bisher kaum erforscht. Die Charakterisierung des molekularen Phänotyps in CO_2-Umgebung ergänzt die Information zur Wirkungsweise des essentiellen Metaboliten HCO_3^- und des ubiquitären Metaboliten CO_2. Die Informationen der *Saccharomyces Genome Database*, der AmiGO Web Applikation und der BioModel Database waren neben einigen anderen Datenbanken hervorragende Informations- und Literaturquellen. Unter zahlreichen mathematischen Modellen sollen hier das genomskalige stöchiometrische Modell iND750 und ein ODE-Modell der Kaliumhomöostase von Ke u. a. genannt werden. Die bereitgestellte Information waren für die Entwicklungen in der vorliegenden Arbeit entscheidende Einflüsse.

9.3 Ausblick

Weder die experimentellen Techniken zur Datenerhebung, noch die Möglichkeiten der Datenauswertung wurden im Rahmen dieser Arbeit vollständig ausgeschöpft. Weitere Information könnte aus den bereits erhobenen Daten durch die Verwendung verifizierter genomskaliger metabolischer Modelle GSMM generiert werden [406]. Mit dem Datensatz wurde ein Phänotyp beschrieben, der nach Pertubation seine Stoffflussverteilung an eine permanente Veränderung anpasst. Dabei wurde der ursprünglichen *steady state* mit Abweichungen angenähert. Der Datensatz könnte daher auch zur Validierung von GSMMs verwendet werden [238]. Die genetische Pertubation eines Organismus ist ein Standardverfahren zur Validierung metabolischer Netzwerke. In einem GSMM ist die genetische Pertubation allerdings viel leichter umzusetzen als eine Belastung durch CO_2. Verifizierte GSMMs werden für Flussvarianzanalysen (FVA: *flux variance analysis*) und Minimumvarianzanalysen (MOMA: *minimization of metabolic adjustment*; ROOM: *regulatory on/off minimization*) zum rationellen Stammdesign verwendet.
Die Bestimmung physiologisch relevanter Flussverteilungen in den GSMM eukaryotischer Organismen mithilfe von Flussbilanzanalysen FBAs benötigt i.d.R. eine zweite Netzwerkebene

[238]. Diese Multiskalenmodelle kombinieren die metabolische Ebene in Form eines stöchiometrischen Reaktionsnetzwerks mit der transkriptionellen Ebene in Form eines Boolschen Netzwerks. Mit 1150 Reaktionen, 945 Metaboliten und 750 Genen war iND750 2004 eines der ersten *S. cerevisiae*-Modelle dieser Art [88]. Das bisher umfassendste Modell *Yeast7* wurde 2013 publiziert und enthält 3498 Reaktionen, 2384 Metabolite und 910 Gene [18]. Aber die Größe des Netzwerks ist in diesem Zusammenhang nicht das einzige Kriterium. Auch für diesen hervorragend erforschten Modellorganismus kann derzeit kein vollständiges Netzwerk von Reaktionen, Metaboliten und Genen erstellt werden. Lopes und Rocha gaben 2017 einen kritischen Rückblick auf 15 Jahre der Konstruktion und Validierung von Multiskalenmodellen [238]. Die Bachelorarbeit von Sabrina Eßwein [101] und die Masterarbeit von Cornelia Beddies [23] haben sich am Institut für Bioverahrenstechnik in Stuttgart mit der Simulation von Stoffflussverteilungen in genomskaligen Multiskalenmodellen (GMSM) beschäftigt. Beide nutzten einen von van Berlo u. a. 2011 publizierten mathematischen Lösungsansatz (tFBA) [28]. Frau Beddies arbeitete mit dem Modell iND750 und verbesserte die FBA in GMSM mit NGS-Datensätzen. Für eine weitere Auswertung der hier vorgestellten Datensätze bieten diese Arbeiten einen Einstieg in die Handhabung von GMSM (Appendix C).
FBAs bzw. tFBAs auf MGSMMs beschreiben *steady states* ohne zeitlichen Verlauf. Wenn CO_2 die Elektrophysiologie der Zelle pertubiert und eine Stressantwort erzeugt, übergehen Analayseverfahren wie MOMA und ROOM die Auslenkung des Systems. Die Stressantwort und der Transport über Membranen sind aber dynamisch, überwiegend allosterisch bzw. posttranslational reguliert und passen nicht in das einfache Basiskonzept einer FBA.
Bottom-up-Ansätze verwenden nach wie vor ODE-Modelle zur Aufklärung funktioneller Fragestellungen. Die Reaktionskinetik von Signalkaskaden und Stoffwechselwegen werden nachwievor mithilfe von ODE-Modellen erforscht. Das in Kapitel 5 vorgestellte Modell liefert einen Rahmen für die Simulation von Prozessen im Labormaßstab. Der Einfluss von CO_2 und HCO_3^- auf die Elektrophysiologie von Zellen in Suspension kann fortan durch Standardmethoden in Prozess bilanziert werden. Der Detailgrad eines ODE-Modells wird letztendlich durch seine Lösbarkeit beschränkt. Mathematische Algorithmen zur Parametrisierung durch das *fitting* an experimentelle Daten sind verfügbar.
Weitere Fragestellungen finden sich auf der Liste von CO_2-vermittelten Effekten, die Garzia-Gonzalez u. a. 2007 erstellten:

- Die Modifikation der Zellmembran durch gelöstes CO_2 wirkt sich zum einen auf ihre Fluidität und Durchlässigkeit aus. Zum anderen zeigte diese Arbeit, dass auch ein Umbau, beispielsweise durch fehlendes Ergosterol, besonders die Prozesse an Organellen betreffen könnte.

- Die Senkung des zellulären pHs wurde in dieser Arbeit simuliert. Allerdings wurde der kompartimentierte Reaktionsraum der Zelle stark vereinfacht. In Zukunft werden nicht nur GSMMs sondern auch ODE-Modelle alle Kompartimente eukaryotischer Zellen beinhalten. Die pH-Werte von Kompartimenten sind bereits jetzt *in vivo* messbar.

- Die Inaktivierung des Metabolismus an Schlüsselenzymen durch niedrigen pH oder durch CO_2 und/oder HCO_3^- setzt voraus, dass die Konzentrationen von CO_2, HCO_3^- und H^+

an diesen Enzymen bestimmbar ist. Das Ergebnis von tFBAs in GSMMs könnte für die Identifizierung beeinträchtigter Enzyme genutzt werden. Die Voraussetzungen dafür sind gegeben, aber es bedarf einer automatisierten und systematischen Bestimmung dieser Sensitivitäten.

- Die Störung des zellulären Elektrolyt-Haushalts durch den Anstieg von CO_2 wurde ebenfalls in dieser Arbeit simuliert. Die Simulation der CO_2-Abreicherung in den Zellen war mit dem vorgestellten Modell nur bedingt möglich. Für Zellen, die im Produktionsmaßstab zirkulieren, ist auch der Vorgang der Abreicherung von Bedeutung.
- Verlust vitaler Funktionen an zellulären Membranen spielte in den Konzentrationsbereichen dieser Arbeit eine untergeordnete Rolle.

Eine Erläuterung von Modellen und Daten wurde in Anhang B-D dieser Arbeit beigelegt.

Anhang A

Abkürzungen, Übersichten und Parameter

A.1 Organisation des Appendix

Der Appendix besteht aus fünf Teilen (A-E). Der erste Teil A informiert über die Bezeichnungen der Prozessparameter (siehe Tab. A.2) wie sie bereits in Kapitel 3 erläutert wurden. Die Variablen und Abkürzungen aus der analytischen Methodik werden in Tab. A.3 noch einmal zusammengefasst. Die Matrizen und Vektoren welche bei der metabolischen Flussanalyse, der statistischen Auswertung der *Next Generation Sequencing*-Daten und der Stabilitätsanalyse des ODE-Modells zum Einsatz kamen wurden in Tabelle A.4 zusammengefasst.
Das von Eigenstetter und Takors 2017 publizierte ODE-Modell [91] wurde in Appendix B ausführlich dokumentiert. Eine Liste der physikalischen Parameter (siehe Tab. B.4), der chemischen und der enzymatischen Parameter (siehe Tab. B.5) wurde dort hinterlegt. Zur Simulation eines *steady states* wurde eine Tabelle mit geeigneten Startwerten hinterlegt (siehe Tab. B.3)
Appendix C enthält eine Liste der Metabolite C.1 und der Reaktionen C.1 des stöchiometrischen Reaktionsnetzwerks von *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D. Das verwendete Netzwerk und weitere Informationen zur elementaren Zusammensetzung der Biomasse bei C-limitiertem Metabolismus C.1 wurden dort erläutert (siehe C.3).
Appendix D enthält eine Aufzählung der identifizierten *Gene Ontology*-Termini. Vorgehensweise und der zeitliche Verlauf ihrer DGE ist in Abbildung D.1 bis D.6 abgelegt.
Appendix E enthält 17 Tabellen (Tab. E.1 bis E.17) mit allen in dieser Arbeit namentlich erwähnten Genen. Systematische Bezeichnung, Name und Funktion jedes Gens ist angegeben. Für nähere Informationen wird auf die *Saccharomyces Genome Database* (SGD) verwiesen.
Alle sonstigen Abkürzungen der vorliegenden Arbeit sind in diesem Teil des Appendix (siehe Tab. A.5) zusammengefasst.

A.2 Physikalische Konstanten

TABELLE A.1: Liste physikalischer Konstanten.

Bezeichnung	Kürzel	Wert	Einheit
Ideale Gaskonstante	R	8,314	kg m^2 s^{-2} mol^{-1} K^{-1}
Avogadro Konstante	N_A	$6{,}022 \cdot 10^{23}$	mol^{-1}
Elementarladung	e	$1{,}602 \cdot 10^{-19}$	C

A.3 Abkürzungen und Variablen

TABELLE A.2: Diese Tabelle deklariert die Variablen zur Bilanz im Prozess.

Kürzel	**Parameter**	**Einheit**
c_c	Konzentration von Zellen in Suspension	L^{-1}
c_i	Konzentration von i in V_{LR}	g L^{-1}
c_{i0}	Konzentration von i im Zulauf	g L^{-1}
$c_{k,c}$	Konzentration von k in der Zelle	g L_c^{-1}
c_X	Biomassekonzentration	g_{DW} L^{-1}
$c_{X,k}$	Konzentration der Biomassekomponente k in V_{LR}	g L^{-1}
CER	*Carbon Emission Rate* Q_{CO2}	mol $L^{-1}h^{-1}$
C *Recovery*	Wiederfindung des Kohlenstoffs	$mol_{C,DW}$ $mol_{C,Glc}^{-1}$
D	Durchflussrate	h^{-1}
F	Zulauf in das Reaktionsvolumen	L h^{-1}
F_p	Ablauf aus dem Reaktionsvolumen	L h^{-1}
G	Gibbs-Energie	J mol^{-1}
I	Ionenstärke	mol L^{-1}
k_La	Gastransferkoeffizient	h^{-1}
K_m	Affinität eines Enzyms für sein Substrat	mol L^{-1}
m_s	Unterhaltskosten der nicht-wachsenden Zelle *Maintenance*	mol_{ATP} $g_{DW}^{-1}h^{-1}$
m_X	Biomasse	g
M_X	Molare Masse der Biomasse	g_{DW} mol_X^{-1}
M_i	Molare Masse der Komponente i	g_{DW} mol_X^{-1}
n_c	Zellzahl	
OD_{600}	Optische Dichte bei 600 nm	
OUR	*Oxygen Uptake Rate* Q_{O2}	mol $L^{-1}h^{-1}$
p_{abs}	Absolutdruck am Messgerät für y_{O2} und y_{CO2}	Pa
p_{CO2}	Partialdruck von CO_2 in der Gasphase	Pa
p_{CO2}^D	Dampfdruck von CO_2	Pa
p_{C2H6O}^D	Dampfdruck von Ethanol	Pa
p_N	physikalischer Normdruck	Pa

Fortsetzung

Tabelle A.2 – *Fortsetzung*

Kürzel	**Parameter**	**Einheit**
PO	*Power-to-Oxygen*-Verhältnis	$mol_{ATP}\ mol_{O}^{-1}$
$\tilde{q}_i$	Änderung von i in der Biomasse	$mol\ mol_{DW}^{-1} h^{-1}$
q_{Acetat}	biomassespezifische Acetatbildungsrate	$mol\ g_{DW}^{-1} h^{-1}$
q_{ATP}	Rate der biomassespezifische ATP-Synthese	$mol\ g_{DW}^{-1} h^{-1}$
q_{ATP}^{OxP}	Rate der oxidativen Phosphorylierung	$mol\ g_{DW}^{-1} h^{-1}$
q_{ATP}^{SkP}	Rate der Subustratkettenphosphorylierung	$mol\ g_{DW}^{-1} h^{-1}$
q_{CO2}	biomassespezifische Kohlendioxidbildungsrate	$mol\ g_{DW}^{-1} h^{-1}$
$q_{Ethanol}$	biomassespezifische Ethanolbildungsrate	$mol\ g_{DW}^{-1} h^{-1}$
$q_{Glukose}$	biomassespezifische Glukoseaufnahmerate	$mol\ g_{DW}^{-1} h^{-1}$
q_{Gly}	Nettorate der Spaltung von Glykogen	$mol\ g_{DW}^{-1} h^{-1}$
$q_{Glycerol}$	biomassespezifische Glycerolbildungsrate	$mol\ g_{DW}^{-1} h^{-1}$
q_{H+}	biomassespezifische Protonenbildungsrate	$mol\ g_{DW}^{-1} h^{-1}$
q_i	Änderung von i pro Biomasse	$g\ g_{DW}^{-1} h^{-1}$
q_{Malat}	biomassespezifische Malatabgaberate	$mol\ g_{DW}^{-1} h^{-1}$
q_{O2}	biomassespezifische Sauerstoffaufnahmerate	$mol\ g_{DW}^{-1} h^{-1}$
q_{O}^{COX}	Sauerstoffverbrauch an Komlex-IV der MRC	$mol\ g_{DW}^{-1} h^{-1}$
$q_{Succinat}$	biomassespezifische Succinatbildungsrate	$mol\ g_{DW}^{-1} h^{-1}$
q_{Tre}	Nettorate der Spaltung von Trehalose	$mol\ g_{DW}^{-1} h^{-1}$
r_{max}	maximale *in silico* Rate einer Kinetik	$mol\ g_{DW}^{-1} h^{-1}$
Q_{CO2}	vol. Kohlenstoffdioxidbildungsrate CER	$mol\ L^{-1} h^{-1}$
Q_{O2}	vol. Sauerstoffaufnahmerate OUR	$mol\ L^{-1} h^{-1}$
Q_{vi}	Änderung der Konzentration von i in V_{LR}	$g\ L^{-1} h^{-1}$
$Q_{vX,k}$	Änderung der Konzentration von k in V_{LR}	$g\ L^{-1} h^{-1}$
RQ	Respirationsquotient aus CER und OUR	
$s(q_i)$	Standardabweichung der Rate q_i	$g\ g_{DW}^{-1} h^{-1}$
$s(Q_{vi})$	Standardabweichung der Rate Q_{vi}	$g\ L^{-1} h^{-1}$
$s(x_i)$	Standardabweichung der Messgröße x_i	$g\ L^{-1} h^{-1}$
T_N	physikalische Normtemperatur	K
vvm	Gasvolumenstrom pro Flüssigkeitsvolumen	$L\ L_{LR}^{-1} min^{-1}$
$\dot{V}_g$	Gasvolumenstrom	$L\ min^{-1}$
V_{BS}	Probenvolumen	L
v_{max}	maximale *in vitro* Rate eines Enzyms	$mol\ g_{DW}^{-1} h^{-1}$
$w_{X,k}$	Gewichtsfraktion von k an der Biomasse	$g\ g_{DW}$
y_{CO2}^{in}	Anteil der Stoffmenge von CO_2 in $\dot{V}_g^{in}$	-
y_{CO2}^{out}	Anteil der Stoffmenge von CO_2 in $\dot{V}_g^{out}$	-
y_{O2}^{in}	Anteil der Stoffmenge von O_2 in $\dot{V}_g^{in}$	-
y_{O2}^{out}	Anteil der Stoffmenge von O_2 in $\dot{V}_g^{out}$	-
Y_{CN}	molares Kohlenstoff-Stickstoff-Verhältnis	$mol_C\ mol_N^{-1}$
Y_{XATP}	Wachstum pro spezifischer ATP-Syntheserate	$g_{DW}\ mol_{ATP}$

Fortsetzung

Tabelle A.2 – *Fortsetzung*

Kürzel	Parameter	Einheit
Y_{XS}	Biomasse-Substrat-Ausbeute	$g_{DW}\ g_{Glc}^{-1}$
β	Pufferkapazität	mol L^{-1}
γ	Aktivitätskoeffizient	
η	dynamische Viskosität	Pa s^{-1}
μ	Wachstumsrate	h^{-1}
ρ_{BS}	Dichte der Biosuspension	g cm^{-3}

TABELLE A.3: Die Tabelle enthält die Bezeichnung von Variablen und Abkürzungen aus analytischen Methoden.

Kürzel	Definition	Einheit
ADP	Adenosindiphosphat	
AIBA	2-Aminoisobuttersäure	
Ala	Alanin A	
AMP	Adenosinmonophosphat	
Arg	Arginin R	
Asn	Asparagin N	
Asp	Aspartat D	
ATP	Adenosintriphosphat	
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	
c^*_{ATP}	Stoffmenge ATP pro extrahiertem Zellvolumen	mol L^{-1}
c_{Nva}	Konzentration des Standard Norvalin	mol L^{-1}
Cs	Index Rohextrakt der zellulären löslichen Fraktion	
CDP	Cytidindiphosphat	
CMP	Cytidinmonophosphat	
CTP	Cytidintriphosphat	
Cys	Cystein C	
DAD	UV-Detektor	
EC_A	Energieladung *Energy Charge* mit Index A (Adenin)	
$_f$AS	freie Aminosäuren	
FLD	Fluoreszenz-Detektor	
GC	Gaschromatographie	
GDP	Guanosindiphosphat	
Gln	Glutamin Q	
Glu	Glutamat E	
Gly	Glycin G	
GMP	Guanosinemonophosphat	
GTP	Guanosintriphosphat	
His	Histidin H	
HPCD	*High-Pressure Carbon Dioxide*	

Fortsetzung

Tabelle A.3 – *Fortsetzung*

Kürzel	Definition	Einheit
Ile	Isoleucin I	
K_s	Gleichgewichtskonstante	-
Leu	Leucin L	
LOD	Limit of Detection	mol L^{-1}
LOQ	Limit of Quantification	mol L^{-1}
Lys	Lysin K	
m_{BS}	Masse der produzierten Biosuspension	g
Met	Methionin M	
NAD^+	oxidiertes Nikotinadenindinukleotid	
NADH	reduziertes Nikotinadenindinukleotid	
$NADP^+$	oxidiertes Nikotinadenindinukleotidphosphat	
NADPH	reduziertes Nikotinadenindinukleotidphosphat	
Nra	Norvalin	
Orn	Ornithin	
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+-Aktivität	-
Phe	Phenylalanin F	
pK_s	negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtskonstante	-
Pro	Prolin P	
Qs	Index Quenching Solution	
RID	Refraktionsindex-Detektor	
RP	*Reverse Phase* Chromatographie	
Ser	Serin S	
TC	*Total Carbon*	mol L^{-1}
Thr	Threonin T	
TIC_{GC}	*Total Inorganic Carbon*	mol L^{-1}
TIC_{model}	*in silico Total Inorganic Carbon*	mol L^{-1}
TOC	*Total Organic Carbon*	mol L^{-1}
Trp	Tryptophan W	
Tyr	Tyrosin Y	
UDP	Uridindiphosphat	
UMP	Uridinmonophosphat	
UTP	Uridintriphosphat	
vv	Volumen pro Volumen	L L^{-1}
Val	Valin V	
V_{BS}	Probenvolumen der Biosuspension	L^{-1}
V_c	Extrahiertes intrazelluläres Volumen	L
V_{Cs}	Endvolumen nach der Probenaufarbeitung	L
V^*_{Cs}	Volumen vor der Probenaufarbeitung	L
V^0_{Cs}	Volumen zur Extraktion des Metaboliten	L

Fortsetzung

Tabelle A.3 – *Fortsetzung*

Kürzel	Definition	Einheit
V_E	Volumen des Acetataufschlusses	L
V_{Qs}^P	Rückstand von extrazellulärem Volumen	L
w_{ATP}	Stoffmenge ATP pro Zellmasse	mol g_{DW}^{-1}
ww	Gewicht pro Gewicht	g g^{-1}

TABELLE A.4: Diese Tabelle deklariert die Bezeichnung von Variablen, Vektoren und Matrizen zur differentiellen Genexpressionsanalyse, der metabolischen Flussanalyse und der Sensitivitätsanalyse.

Kürzel	Definition
$()^{-1}$	Inverse einer Matrix
$()^{T}$	Transponierte Matrix
α_0	α-Fehler von H_0
ε_{ij}	normalverteilter Fehler konstanter Varianz
cluster	Gruppe von Elementen $m_{0i,j}$ aus der Matrix M
b	Anzahl der Gruppen
CPM	Wert für das relative Expressionsniveau einer mRNA (CPM: *counts per million*)
d	Abstand zwischen $m_{0i,j}$ und dem Zentrum Z
DEG	differentiell expremierte(s) Gen(e)
DGE	differentielle Genexpression
EC	*Enzyme Commission*-Nummer
F_{ij}	Fisher-Snedecor-Verteilung
FC	Wert der Relation der Expression einer mRNA in zwei Proben (FC: *fold change*)
FDR	*false discovery rate*
g	Anzahl der unabhängigen Messwerte einer Gruppe
G	Anzahl aller unabhängigen Messwerte
h	Übereinstimmung in n mit H
H	Anzahl der Gene innerhalb eines GO-Terms
H_0	Null-Hypothese
k	Anzahl der *cluster* aus M
K	Nullraummatrix der MFA
$m_{0i,j}$	Variable zur Deklaration eines FCs
M	Datensatz aus der Menge aller $m_{0i,j}$
MFA	Metabolische Flussanalyse
n	Gruppe differentiell expremierter Gene in N
N	Grundgesamtheit aller Gene des Genoms
O	Parametervektor der Sensitivitätsanalyse des ODE-Modells
ODE	*Ordinary Differential Equation*
p	Signifikanzniveau
$p_{M,h}$	Wahrscheinlichkeit für die Übereinstimmung von h in H

Fortsetzung

Tabelle A.4 – *Fortsetzung*

Kürzel	**Definition**
$p_{(X,m,Z)}$	Wahrscheinlichkeit das $m_{0i,j}$ Teil eines *clusters* um das Zentrum Z ist
P_F	Wahrscheinlichkeit innerhalb der Fisher-Snedecor-Verteilung
q	Vektor der Eingabeparameter q_i
q_i	Eingangsparameter mit Standardabweichung $s(q_i)$ [mol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$]
r_i	vorhergesagten Flussraten [mol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$]
rpm	Umdrehung pro Minute
R	Hilfsmatrix zur Beschreibung des Minimierungsproblems
$s(q_i)$	Standardabweichung der Rate q_i
S	Stöchiometrische Matrix zur MFA
SSE	Fehlerquadratsumme innerhalb einer Gruppe
SSR	Residuenquadratsumme
SST	Gesamtabweichungsquadratsumme
u	Anzahl der Freiheitsgrade von S
v	Lösungsvektor der Reaktionsraten r_i in der MFA
W	Wichtungsmatrix von $s(q_i)$
X	Hilftsmatrix zur Beschreibung des Minimierungsproblems
y_{ij}	Zufallsvariable in Abhängigkeit von i und j
$\bar{y}_{..}$	arithmetisches Mittel
$\bar{y}_{.j}$	arithmetisches Mittel
$\bar{y}_{ij}$	arithmetisches Mittel der Zufallsvariable
Z	Zentrum eines *clusters*

TABELLE A.5: Diese Tabelle deklariert die Definition diversen Buchstabenkürzeln in der vorliegenden Arbeit.

Kürzel	Definition
ABC	*ATP binding cassette*
ACyc	Adenylatcyclase
ATPase	ATP spaltendes Enzym
BHK-21-Zellen	Nierenzellen eines eintägigen Hamsters
cDNA	komplementäre DNA
cR	circadiane Rhythmik
CAA	Carboanhydrase-Aktivität
CCG	*Clock-Controlled Gene*
CHO-Zellen	Ovarzellen des chinesischen Hamsters
CIA	*cytosolic iron-sulfur-protein assembly*
CMD	Calmodulin
CN	Calcineurin
CRE	cAMP *Responsive Elemente*
DH	Dehydrogenase

Fortsetzung

Tabelle A.5 – *Fortsetzung*

Kürzel	Definition
DW	Biotrockenmasse (*Dry Weight*)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	oxidiertes Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBA	Flussbilanzanalyse
FMN	Flavinmononukleotid
FVA	*Fluss Varianz Analyse*
GAP	GTP aktiviertes Protein
GEF	*Guanine exchange factor*
GO	*Genome Ontology* Term, Gruppe von Genen
GMSM	genomskaliges Multiskalenmodell
GSMM	genomskaliges metabolisches Modelle
HAT	Histon-Acetylasen
HDS1	*heme dependent sequence 1*
HDS2	*heme activation protein*-Komplex
HOG	MAPK des *High Osmolarity Glycerol* Signalwegs
HSE	*Heat Shock Element*
IUBMB	Internationale Vereinigung für Biochemie und Molekularbiologie
JNCL	juvenile neuronale Ceroid-Lipofuszinose
lncRNA	*long non-coding*-RNA
mRNA	*messenger*-RNA
micRNA	*micro*-RNA
mtDNA	*mitochondrial*-DNA
MAPK	Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinase
MATa	Paarungstyp a
MATα	Paarungstyp α
MCA	Metabolische Kontrollanalyse
MDR	*Multi Drug Resistenz*
MDS	*Multi Dimensional Scaling*
MOMA	*Minimization Of Metabolic Adjustment*
MRC	*Mitochondrial Respiration Chain*
ncRNA	*non-coding*-RNA
NCR	*Nitrogen Catabolit Repression*
NGS	*Next Generation Sequencing*
NSC	nicht-spezifische Kaliumkanäle
NSO	Myelomzellen der Maus
ORF	*Open Reading Frame*
piRNA	*PIWI-interacting*-RNA
pIK	prä-Initiationskomplex
PDRE	*Pleitropic Drug Resistenze Elements*

Fortsetzung

Tabelle A.5 – *Fortsetzung*

Kürzel	Definition
PKA	Protein Kinase A
PM	Plasmamembran
ROOM	*Regulatory On/Off Minimization*
siRNA	*small interfering*-RNA
SACE	sub-telomere ATF/CREB Element
SAGA	Histonacetylase Komplex (Spt-Ada-Gcn5-Acetyl)
SBML	*Systems Biology Markup Language*
SE	Spurenelemente
Seq	Sequenz
tFBA	transkriptgeführte Flussbilanzanalyse
ST	spezifische Transporter
STRE	*Stress Responsive Element*
tRNA	*transfer*-RNA
TAF	*Transkription Activation Factor*
TCC	*Tri Carboxylic acid Cycle*
TF	Transkriptionsfaktor(en)
TFIID	Transkriptionsfaktor II D
TRAC	*Transcriptional Redox Attractor Cycle*
UAS	*Upstream Activator Sequence*
UE	Untereinheit eines Proteins oder Proteinkomplexes
URS	*Upstream Repressor Sequence*
VZ	Verweilzeiten
WOA	*Weak Organic Acids*
YPG	*Yeast-Extrakt Pepton Glukose*

Anhang B

ODE-Modell zur Transduktion eines CO_2-Signals

Tabelle B.1 beschreibt die Rahmenbedingungen der Modelle A bis C. In Experiment A wurde die offene Gasphase mit 45 L L^{-1} h^{-1} durchströmt während der stehende Puffer (0,2 M Phosphatpuffer, pH 5, 30°C, D=0) gerührt wurde. Modell A umfasste die Gasphase G und die Flüssigphase L (0,2 M Phosphatpuffer, pH 5, 30°C, D=0). Die Änderung des pH-Werts und der Abgaszusammensetzung des physikochemischen Systems wurden bestimmt (Abb. 5.3 A1-A3). Für Experiment B wurde der Puffer durch inaktive aber lebende *S. cerevisiae* Kultur (11 gDW L^{-1} intakte Zellen) ersetzt. Die Restbestandteile des definierten Mediums wurde abgeschätzt. Das Modellsystem wurde um eine zelluläre Phase C (0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, 30°C, D=0) erweitert und die Koeffizienten der Phase L angepasst. Die Änderung des pH Werts und der Abgaszusammensetzung des physikochemischen Systems wurden bestimmt (Abb. 5.3 B1-B3).

TABELLE B.1: Entwicklungsstufen des Reaktor-Zell-Modells.

Modell	Phasen	Verhalten	pH	$\dot{V}_G^{in}$/D_L/D_c [L $L^{-1}h^{-1}$]	Material
A	G	mobil	-	45	Gas
	L	stationär	5,0	0	0,2 M PO_4-Puffer
B	G	mobil	-	45	Gas
	L	stationär	5,0	0	Medium ohne Glukose
	C	stationär	6,0	0	inaktive Zellen [300]
C	G	mobil	-	45	Gas
	L	mobil	5,0	0,092	Medium
	C	mobil	7,0	0,008	aktive Zellen [300]

Ein Parametersatz (Tabelle B.4) beschreibt das Gleichgewicht zwischen der strömenden Gasphase und der gerührten Flüssigphase. Die Systeme wurden bis zur Konstanz der Variablen bzw. Messwerte equilibriert. Die Änderung der Zusammensetzung des Gaseinstroms erfolgte dann sprunghaft zum Zeitpunkt Null. Das Volumen der Gasphase G verursacht eine theoretische Mischungszeit von ca. 3,5 min. Weitere zeitliche Verzögerungen werden u. a. durch Löslichkeiten und chemische Reaktionen von CO_2 mit der Flüssigphase verursacht. Abbildung 5.3 vergleicht den Verlauf der Variablen [$CO_{2,g}$], [$O_{2,g}$] und [H_L^+] mit dem Verlauf der drei Messwerte. Das System erreicht, abhängig von seinem Anfangszustand und seiner Auslenkung, hier einen stabilen Zustand nach ca. 30 Minuten.

Im direkten Vergleich verhalten sich Phosphatpuffer und eine Suspension inaktiver Zellen ähnlich. Die Dynamik des pH-Werts und des ausströmenden Sauerstoffs ist in den Modellen fast übereinstimmend mit der experimentellen Betrachtung abbildbar. Unterrepräsentiert erscheint hingegen die Geschwindigkeit des CO_2 Übertritts in die Flüssigphase. Da O_2, CO_2, N_2 und pH in Messung und Modell abhängige Größen sind und die Gasphase unterbestimmt ist, bleibt unklar ob das Messsignal zu langsam oder das Modell hier ungenügend ist. Die Sauerstoffdynamik und pH-Änderung bestätigen das Modell in der Dynamik der Gasphase und der Entstehung von H^+ bzw. HCO_3^- (Abb. 5.3).

B.1 Physiko-chemische Reaktorumgebung

Der CO_2-Puls wird in der Gasphase des Reaktors initiiert. Die Geschwindigkeit der Signalfortpflanzung des Puls in die Zelle hinein ist von diversen Faktoren abhängig. Die Löslichkeit des Gases CO_2 ist von physikalischen Faktoren wie Druck und Temperatur abhängig. Außerdem steht CO_2 in einem pH-abhängigen Gleichgewicht mit H_2CO_3, HCO_3^- und CO_3^{2-}. Der Reaktor wurde daher in drei Phasen, Gas **G**, Flüssigkeit **L** und Zellen **C**, eingeteilt. Für eine dynamische Bilanzierung der Signalfortpflanzung wurden die Einflussgrößen der CO_2-Verteilung an die experimentspezifizifischen Bedingungen angepasst.

B.1.1 Gasphase G

Bilanziert wird die Änderung der Stoffmenge n_{gas}^G in der Gasphase des Reaktors für die Komponenten CO_2, O_2 und N_2 (Gl. B.1). Große Änderungen der Gasvolumenanteile können aufgrund der veränderten Gaslöslichkeit zur Änderung des Gasstroms am Reaktorauslass führen. Gleichung B.2 bestimmt diese Änderung bei Erhaltung des Reaktordrucks.

$$\frac{dn_{gas}^G}{dt} = \frac{dn_{CO2}^G}{dt} + \frac{dn_{O2}^G}{dt} + \frac{dn_{N2}^G}{dt} = 0 \tag{B.1}$$

$$\dot{n}_{out}^G = \dot{n}_{in}^G + \frac{dn_{gas}^G}{dt} \tag{B.2}$$

$$\frac{dn_{gas}^G}{dt} = \frac{dn_{gas}^L}{dt} = \frac{dn_{CO2}^L}{dt} + \frac{dn_{O2}^L}{dt} + \frac{dn_{N2}^L}{dt} \tag{B.3}$$

B.1.2 Phasenübergang – Gasphase G und Flüssigphase L

Der Massentransfer von CO_2, O_2 und N_2 zwischen Gas- und Flüssigphase wurde mit Gleichung B.4 berechnet.

$$r_i^{G\to L} = k_L a_i \cdot (c_i^* - c_i^L) \cdot V_L \tag{B.4}$$

Die Konzentration an der Phasengrenze c_i^* wurde dabei über einen der Temperatur angepassten Henry-Koeffizienten $K_{H_{i(T)}}$ und dem Partialdruck der Komponente ausgedrückt (Gl.

B.5 und B.6).

$$ln\frac{K_{H_{O2}(T_2)}}{K_{H_{O2}(T_1)}} = \frac{\Delta H^\circ}{R}(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}) \quad \text{(B.5)}$$

$$c^*_{O2} = K_{H_{i(T)}} \cdot p_{abs} \cdot y_{O2} \quad \text{(B.6)}$$

Der k_La Wert für Sauerstoff konnte aus der so ermittelten Gelöstsauerstoffkonzentration und dem OUR experimentell bestimmt werden (Gl. B.7).

$$k_La_{O2} = \frac{Q_{O2}}{2 \cdot (c^{*in}_{O2} - c^{*out}_{O2})} \quad \text{(B.7)}$$

Nach Higbies Penetrationstheorie und Danckwerts Modell zur Beschreibung der Erneuerung von Oberflächen stehen die Massentransferkoeffizienten von CO_2 und N_2 über ihre Diffusionskoeffizienten in proportionalem Zusammenhang zum k_La von Sauerstoff (Gl. B.8 und B.9).

$$k_La_{CO2} = k_La_{O2} \cdot \sqrt{\frac{D_{O2(T)}}{D_{CO2(T)}}} = k_La_{O2} \cdot 1,046 \quad \text{(B.8)}$$

$$k_La_{N2} = k_La_{O2} \cdot \sqrt{\frac{D_{O2(T)}}{D_{N2(T)}}} = k_La_{O2} \cdot 1,057 \quad \text{(B.9)}$$

Die Diffusionskoeffizienten wurden auf Grundlage der Stokes-Einstein-Sutherland-Gleichung an die Kultivierungstemperatur angepasst. Die Temperatur T und die dynamische Viskosität der Flüssigkeit $\eta_{H2O(T)}$ wurden in Gleichung B.10 für die Temperaturanpassung der Diffusionskoeffizienten $D_{i(T)}$ verwendet.

$$\frac{D_{i(T_1)}}{D_{i(T_2)}} = \frac{\mathrm{T}_1 \cdot \eta_{H2O(T2)}}{\mathrm{T}_2 \cdot \eta_{H2O(T1)}} \quad \text{(B.10)}$$

B.1.3 CO_2/HCO_3^- Gleichgewicht in L und C

Das chemische Gleichgewicht zwischen CO_2 und HCO_3^- ist für die Zelle von Relevanz, da Bicarbonat auch als Substrat für anaplerotische Reaktionen dient. Das Gleichgewicht liegt allerdings bei CO_2 und führt zu wesentlich kleineren H_2CO_3-Konzentrationen. Die Hydratisierung von CO_2 ist damit die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion der Gleichung B.11.
Als allgemeine Vereinfachung wurde die H_2CO_3-Konzentration und ihre schnelle Deprotonierung vernachlässigt. Außerdem wurde aufgrund der niedrigen pH-Werte in Zelle und Medium (pH<8) die Bildung von CO_3^{2-} und Carbamat vernachlässigt. Das CO_2/HCO_3^- Gleichgewicht in **L** und **C** wurde über die Gleichgewichtskonstanten K_1, K_2 and K_w aus den Gleichungen

B.12-B.14 abgeleitet.

$$CO_2 + H_2O \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\longleftrightarrow}} H_2CO_3 \overset{schnell}{\longleftrightarrow} H^+ + HCO_3^- \overset{schnell}{\longleftrightarrow} 2H^+ + CO_3^{2-} \tag{B.11}$$

$$K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[CO_2] + [H_2CO_3]} \cong \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[CO_2]} \tag{B.12}$$

$$CO_2 + OH^- \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\longleftrightarrow}} +HCO_3^- \qquad K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}} = \frac{[HCO_3^-]}{[CO_2][OH^-]} \tag{B.13}$$

$$H_2O \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\longleftrightarrow}} H^+ + OH^- \qquad K_w = \frac{k_3}{k_{-3}} \cong [H^+][OH^-] \tag{B.14}$$

Die Raten der Hin- (Gl. B.15, B.16) und Rückreaktionen (Gl. B.17, B.18) ergeben sich aus den Konzentration von CO_2, HCO_3^- und H^+ in den Phase **L** und **C** und den beiden Reaktionskonstanten k_1 und k_2 [295].

$$r_1 = k_1 \cdot [CO_2] \tag{B.15}$$

$$r_2 = k_2 \cdot [CO_2][OH^-] \tag{B.16}$$

$$r_{-1} = \frac{k_1}{K_1} \cdot [H^+][HCO_3^-] \tag{B.17}$$

$$r_{-2} = \frac{k_2 \cdot K_w}{K_1} \cdot [HCO_3^-] \tag{B.18}$$

Beide Phasen beinhalten Salze, die aufgrund ihrer Ladung elektrostatische Wechselwirkungen verursachen und die Stabilität von gelösten Ionen wie HCO_3^- in der Lösung erhöhen [295]. Zahlreiche chemische Parameter können sensitiv auf die Ionenstärke I einer nicht-idealen Lösung reagieren (Gl. B.22). Die Theorie von Debye und Hückel (1923) bietet eine Möglichkeit den nicht-idealen Charakter der Lösung in die numerischen Größen K_1 und K_w einzubeziehen [295].
Das Debye-Hückel-Grenzgesetz setzt die Aktivitätskoeffizienten γ von Elektrolyten mit der Ionenstärke I der Lösung in Beziehung (Gl. B.20). Bei der Anwendung auf ein Hefe-Standardmedium (I>0,01 M) wurde das Gesetz um die experimentbasierte Davies-Gleichung erweiter [77, 295].

$$K_1 = \left(\frac{[H^+][HCO_3^-]}{[CO_2]}\right)\left(\frac{[\gamma_+][\gamma_-]}{[\gamma_C]}\right) = K_1'\left(\frac{[\gamma_+][\gamma_-]}{[\gamma_C]}\right) \tag{B.19}$$

$$log\gamma_{\pm} = -0.5 \cdot Z_+ \cdot Z_- \left(\frac{\sqrt{I}}{(1+\sqrt{I})} - 0.2 \cdot I\right) \tag{B.20}$$

$$\tag{B.21}$$

I wurde aus den Restkonzentrationen c_i der mit Z geladenen Mineralsalze NH_4^+, SO_4^{2-}, $H_2PO_4^-$, Mg^{2+}, K^+, nach Gleichung B.22 ermittelt.

$$I = 0,5 \sum_{i=1} c_i Z_i^2 \tag{B.22}$$

Die Restkonzentrationen dieser Ionen unterliegen der Elementarbilanz der Elemente N, S, P, Mg und K mit einem stöchiometrischen Faktor 1. Bei konstantem pH-Wert ist die Ladung der Ionen bekannt. Die Elementarbilanz aus der Zusammensetzung des Mediums (Tab. 3.6) und

der Elementarzusammensetzung des Organismus [212] definiert hier die Restkonzentration des Ions. Der Spurenelementanteile wurden dabei vernachlässigt. Nicht vernachlässigt werden darf dabei die Titration des Reakors.
Die Konzentration eines Ions (Tab. B.2) wurde aus seiner mit dem *feed* zugeführten molaren Konzentration c_i^F und der vom Organismus konsumierten molaren Menge berechnet. Die konsumierte Menge wurde aus der Biomassekonzentration c_x [g_{DW} L^{-1}] und dem Elementaranteil Y_{Xi} [g_{DW} mol_i^{-1}] des im Ion enthaltenen Elements bestimmt (Gl. B.24).

$$\frac{dc_i}{dt} = D \cdot (c_i^F - c_i) - \frac{\mu \cdot c_x}{Y_{Xi}} \tag{B.23}$$

$$\frac{dc_i}{dt} = 0 \qquad D = \mu \qquad \text{(steady state)}$$

$$c_i = c_i^F - \frac{c_x}{Y_{Xi}} \tag{B.24}$$

TABELLE B.2: Restkonzentration von Ionen des Mineralsalzmediums (Gl. B.24) und ihre Ionenstärken in der Flüssigphase (Gl. B.22) bei pH 5.

Ion	Medium [mM]	Z	I [mM]
NH_4^+	160	1	80
SO_4^{2-}	120	-2	240
$H_2PO_4^-$	60	-1	30
Mg^{2+}	5	2	10
K^+	66	1	33

B.1.4 Phasenübergang – Flüssigphase L und Zellphase C

Die Zellphase **C** wurde als Summe kugelförmiger Zellen mit dem mittleren Durchmesser von 6 µm definiert [434]. Die Zellzahl (n_c=$60 \cdot 10^9$ g_{DW}^{-1}) wurde experimentell bestimmt (Abs. 3.7.3). Das Volumen der Zellphase V_c wurde in Abhängigkeit vom Arbeitsvolumen V_{LR} und c_x ermittelt (Gl. B.25). Das Verhältnis von Volumen zu Oberfläche wurde als konstant betrachtet und beträgt 1 µm (Gl. B.26).

$$V_c = \frac{\pi d^3}{6} c_x V_{LR} n_c \tag{B.25}$$

$$\frac{V_c}{A_c} = \frac{\pi d^3}{6\pi d^2} \tag{B.26}$$

Die pH-Stabilität der Zellphase **C** wurde durch ihre Pufferkapazität β in einem Bereich von 30-60 mM bzw. 0,2-0,4 mmol·g_{DW}^{-1} [183, 204] beschrieben. β einer gepufferten Lösung ist durch die Änderung ihres pH-Werts bei Zugabe von Protonen oder Hydroxid-Ionen definiert. Die puffernden Komponenten sind Wasser, Hydrogenphosphat und Bicarbonat (Gl. B.27).

$$\beta = \frac{dn}{dpH} = 2.303 \left(\frac{K_w}{[H^+]} + [H^+] + \frac{c_{HPO4} K_4 [H^+]}{(K_4 + [H^+])^2} + \frac{c_{HCO_3} K_1 [H^+]}{(K_1 + [H^+])^2} \right) \tag{B.27}$$

Neben Phosphat und Bicarbonat sind die puffernden Substanzen teilweise noch unbekannt. Die Zuordnung der Substanzen in verschiedene Kompartimente mit unterschiedlichem pH ergibt eine komplexe Vorstellung. Bekannt ist, dass 30% der Kapazität auf Bicarbonat entfallen und damit flüchtig sind [335].

C wurde als homogene Phase, die von Phosphat und Bicarbonat bei pH 7 gepuffert wird, modelliert. Phosphat übernimmt dabei die Kapazitäten anderer Komponenten ausgenommen Bicarbonat. Dafür wurde die Dissoziation von Phosphat im physiologischen pH-Bereich durch die Gleichungen B.28 bis B.30 beschrieben.

$$H_2PO_4^- \underset{k_{-4}}{\overset{k_4}{\leftrightarrow}} H^+ + HPO_4^{2-} \qquad K_4 = \frac{k_4}{k_{-4}} = \frac{[H^+][HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} \tag{B.28}$$

$$r_4 = k_4 \cdot [H_2PO_4^-] \tag{B.29}$$

$$r_{-4} = k_{-4} \cdot [HPO_4^{2-}][H^+] = \frac{k_4}{K_4} \cdot [HPO_4^{2-}][H^+] \tag{B.30}$$

Gleichung B.31 beschreibt die eindimensionale Diffusion von CO_2 in der Zellmembran zwischen Flüssigphase **L** und Zellphase **C**. Ihre Konzentrationsdifferenz, die Phasengrenzfläche A_c, Membrandurchmesser d_m und der effektive Diffusionskoeffizient D^*_{CO2} bestimmen den Massentransfer.

$$r_{CO2}^{L \to C} = \frac{D^*_{CO2}}{d_M \cdot A_c}(c_{CO2,L} - c_{CO2,c}) \tag{B.31}$$

$$D^*_{CO2} = f_{(pH)} \tag{B.32}$$

$f_{(pH)}$ wurde von Donalds et al. 1974 übernommen (eq. B.33-B.35 [87]).

$$f_{(pH)} = D^M_{CO2} \frac{(1+\Lambda)}{1 + \left(\frac{\Lambda}{\phi}\right) tanh(\phi)} \tag{B.33}$$

$$\phi = 0.5 \sqrt{\frac{k_1 d_m^2}{D^M_{CO2}} \left(\frac{1+\Lambda}{\Lambda}\right)} \tag{B.34}$$

$$\Lambda = \frac{D^M_{HCO3}}{D^M_{CO2}} \frac{K_1}{[H_c^+]} \tag{B.35}$$

Der Ansatz berücksichtigt die Änderung der zellulären Protonenkonzentration $[H_c^+]$ und die Entstehung von Bicarbonat bei der Bestimmung des effektiven Diffusionskoeffizienten von CO_2 auf Basis der Koeffizienten D^M_{CO2} und D^M_{HCO3}, die in biologischen Membranbilayern bestimmt wurden [142]. Für die Verteilung von CO_2 ist Membrandiffusion unter zellulären Bedingungen kein limitierender Faktor.

Die Membrandiffusion von Bicarbonat ist vernachlässigbar [87] und ein Transporter wurde in *S. cerevisiae* bisher nicht identifiziert [469].

Um Engpässe der Verfügbarkeit von Bicarbonat als Substrat für anaplerotische (PYC) und anabole (ACC and CPA) Reaktionen bei niedrigen CO_2-Konzentrationen zu vermeiden wird die Hydratisierung von CO_2 durch die Carboanhydrase Aktivität (CA) enzymatisch beschleunigt.

Die Reaktionsrate r_{CA} wurde durch eine Michaelis-Menten-Kinetik (K_m=9,59 mM [173]) und einer non-kompetitiven Inhibition durch HCO_3 ($K_{I,HCO3}$=60 mM [87, 191]) beschrieben (Gl.

B.36). Die Maximalraten r_{CA}^{max} (8-167 mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$) für Gleichung B.36 wurden von Amoroso et al. 2005 durch die Korrelation der CER extrapoliert [14]. Der Einfluss der katalytischen Aktivität der CA konnte damit berücksichtigt werden.

$$r_{CA} = r_{CA}^{max} \frac{[CO_{2,c}]}{(K_{m,CO2} + [CO_{2,c}])} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{[HCO_{3,c}^-]}{K_{I,HCO3}}\right)} \tag{B.36}$$

Die Bedingungen für die Verteilung von CO_2 in den Phasen **G**, **L** und **C** wurde damit beschrieben. Der zelluläre Stoffwechsel wurde durch die zelluläre CO_2-Produktionsrate $r_{CO2,p}$ in **C**, einer O_2-Verbrauchsrate ($r_{O2,r}$) in **L** und einer H^+-Produktionsrate ($r_{H,p}$) in **C** berücksichtigt.

B.2 Ionen-Transporter und Ionen-Kanäle

Die gerichtete Diffusion und der aktive Transport geladener Moleküle über die Zellmembran wird durch Transporter und Kanäle erleichtert oder in energetischer Kopplung entgegen einem Konzentrationsgefälle betrieben. Die unvermittelte Diffusion geladener Moleküle stellt dagegen einen kleinen Anteil des Stoffflusses zwischen Flüssigphase **L** und Zellphase **C**.
Aufgrund des chemischen Reaktionsgleichgewicht in Gleichung B.11 ist die Konzentration von Bicarbonat und Carbonat bei der Anwesenheit von CO_2 maßgeblich vom pH-Wert abhängig. Daher wurde bereits die CO_2-Diffusion in Abhängigkeit vom zellulären pH beschrieben (Abs. B.1.4). Die Auswirkung eines CO_2-Gradienten auf die Stabilität des zellulären pH wiederum erfordert die Beschreibung des Transports von Protonen.
Der Protonengradient zwischen Flüssigphase **L** und Zellphase **C** wird für den passiven Sym- und Antiport geladener Moleküle genutzt. Der Transport dieser Moleküle ist damit energetisch an die pH-Homöostase gekoppelt. Gleichung B.37 bis B.69 beschreiben den Transport von H^+ und K^+.

B.2.1 Protonen-Transport

Biochemische Reaktionen in der Zelle produzieren Protonen $r_{H,p}$. Sie werden von einer Plasmamembran ATPase (Pma1) durch aktiven Transport, der an die exotherme Spaltung von ATP gekoppelt ist, ausgeschleußt. Spezifische Transporter (ST) nutzen das Konzentrationsgefälle für die passive Aufnahme von Nährstoffen mittels Ionensymport oder für den Export von Kalium durch Protonenantiport (Nha1).

Plasmamembran ATPase – Pma1

Die Stöchiometrie des Protonenexports kann allgemein nach Gleichung B.37 beschrieben werden. Der Transport in beide Richtungen unterliegt sowohl den Massenwirkungsgesetz (Gl. B.38) als auch der energetischen Kopplung von ATP-Hydrolyse und Protonentransport nach Gleichung.

$$H_c^+ + ATP_c \underset{k_{Pma1}^-}{\overset{k_{Pma1}^+}{\longleftrightarrow}} H_L^+ + ADP_c + P_{i,c} \tag{B.37}$$

Nach dem Massenwirkungsgesetz formuliert ergibt sich zunächst Gleichung B.38.

$$r_{Pma1} = k^{+}_{Pma1}[H_c][ATP_c] - k^{-}_{Pma1}[H_L][ADP_c][P_{i,c}] \tag{B.38}$$

Die thermodynamische Änderungen der chemischen Potentiale kann als die Summe der Gibbschen Energien nach Gleichung B.39 formuliert werden.

$$\Delta G = G_{ADP,c} + G_{Pi,c} + G_{H,L} - G_{ATP,c} - G_{H,c} \tag{B.39}$$

Die Gibbsche Standardenthalpie des Protons G_H bleibt durch den Transport unverändert (ΔG^0_H=0). Im Gleichgewicht der Kopplung von ATP Hydrolyse und Protonentransport ist ΔG=0. Die Hydrolyse von ATP liefert etwa ΔG^0_{ATP}=-36 kJ mol^{-1} (T=30°C, pH=7, I=0,25M) [10]. Im Gleichgewicht ergibt sich daraus Gleichung B.41, in der R die ideale Gaskonstante und T die absolute Temperatur ist.

$$\Delta G = \Delta G^0_{ATP} + \Delta G^0_H + RT \cdot ln\left(\frac{[ADP_c][P_{i,c}]}{[ATP_c]}\right) + RT \cdot ln\left(\frac{[H_L]}{[H_c]}\right) \tag{B.40}$$

$$\Delta G^0_{ATP} = -RT \cdot ln\left(\frac{[H_L][ADP_c][P_{i,c}]}{[H_c][ATP_c]}\right) \tag{B.41}$$

Sobald die Zellphase **C** ein elektrisches Potential E_c und die Flüssigphase **L** das Potential E_L besitzen und das transportierte H eine Ladung z trägt, erweitert sich die energetische Betrachtung aus Gleichung B.41. Statt Null entspricht ΔG^0_H der Ladungsverschiebung im elektrischen Feld (Gl. B.49). Dabei ist F die Faraday-Konstante, z die Ladung des transportierten Ions und E_m=E_c-E_L die Differenz des elektrischen Potentials zwischen Phase **L** und **C**.

$$\Delta G^0_H = -zF \cdot E_m \tag{B.42}$$

$$\Delta G = \Delta G^0_{ATP} - zF \cdot E_m + RT \cdot ln\left(\frac{[H_L][ADP_c][P_{i,c}]}{[H_c][ATP_c]}\right) \tag{B.43}$$

Die Gleichgewichtskonstante K^{eq} (Gl. B.50) des Transports kann nach Gleichung B.43 für das Gleichgewicht von Transport und ATP-Hydrolyse formuliert werden. Wird k^{-}_{Pma1} in Gleichung B.38 ersetzt führt das zu Gleichung B.51.

$$K^{eq} = \frac{k^{-}_{Pma1}}{k^{+}_{Pma1}} = \frac{[H^{+}_c][ATP_c]}{[H^{+}_L][ADP_c][P_{i,c}]} = \frac{1}{e^{\left(\frac{G^{\circ}_{ATP} - zF \cdot E_m}{RT}\right)}} \tag{B.44}$$

$$r_{Pma1} = k^{+}_{Pma1}\left([H^{+}_c][ATP_c] - [H^{+}_L][ADP_c][P_{i,c}] \cdot e^{\left(\frac{G^{\circ}_{ATP} - zF \cdot E_m}{RT}\right)}\right) \tag{B.45}$$

Spezifische Protonensymporter – ST

Das elektrochemische Potential nach Nernst ist die treibende Kraft der Protonenaufnahme durch spezifische Symporter. Die Aufnahmerate entspricht der Aufnahmerate von Ionen (NH^{+}_4, $H_2PO^{-}_4$, SO^{2-}_4) zur Biomassesynthese und ergibt sich aus der zellulären Elementarbilanz [212]. Die nach Gleichung B.23-B.24 bestimmte Konzentration c_i kann zur Bestimmung von Q_{vi} nach

Gleichung 3.31 verwendet werden. Der zelluläre Protonensymport r_{ST} ist auf das Volumen der Zellphase **C** bezogene und ergibt sich anschließend nach Gleichung B.46.

$$r_i = Q_{vi}\frac{V_{LR}}{V_c} \tag{B.46}$$

Die minimale Aufnahmerate von Nährstoffen und der dazu äquivalente spezifische Protonensymport r_{ST} für den Gleichgewichtszustand sind somit bekannt. Daraus kann die Symporteranzahl in Form von k^+_{ST} nach Gleichung B.48 ermittelt werden, wobei das Potential $E_m = -0,1$ V, pH_c=7 und pH_L=5 angenommen bzw. gemessen wurde [434].

$$H^+_L \underset{k^-_{ST}}{\overset{k^+_{ST}}{\longleftrightarrow}} H^+_c \qquad K^{eq} = \frac{k^-_{ST}}{k^+_{ST}} = \frac{H^+_L}{H^+_c} = e^{\frac{zF\cdot E_m}{RT}} \tag{B.47}$$

$$r_{ST} = k^+_{ST}\cdot\left(RT\cdot ln\left(\frac{[H^+_L]}{[H^+_c]}\right) - zF\cdot E_m\right) \tag{B.48}$$

Kation/Proton-Antiporter – Nha1

Der Kation/Proton-Antiporter Nha1 zeigt eine ähnliche Affinität $K_{m,Nha1}$ zu Kalium- und Natrium-Ionen. Die Wahrscheinlichkeit, welches Kation transportiert wird, ist abhängig vom Verhältnis der Konzentrationen [189]. Da im Medium K^+_L»Na^+_L, wurde die Komponente Natrium in **L** und **C** vernachlässigt.
Die Stöchiometrie von Kalium-Export und Protonen-Import führt netto zur Aufnahme positiver Ladung [299]. Daher wurden in Gleichung B.50 wieder chemisches und elektrisches Potential zur Beschreibung des energetischen Gleichgewichts berücksichtigt. Der Reaktionsparameter k^+_{Nha1} ist hier abhängig von der maximal verfügbaren Transportkapazität v_{Nha1}, der Affinität zum Ion $K_{m,Nha1}$ und seiner zellulären Konzentration K^+_c.

$$3H^+_L + 2K^+_c \underset{k^-_{Nha1}}{\overset{k^+_{Nha1}}{\longleftrightarrow}} 3H^+_c + 2K^+_L \qquad K^{eq} = \frac{k^-_{Nha1}}{k^+_{Nha1}} = e^{-\left(\frac{zF\cdot E_m}{RT}\right)} \tag{B.49}$$

$$r_{Nha1} = k^+_{Nha1}\left([H^+_L]^3[K^+_c]^2 - [H^+_c]^3[K^+_L]^2 e^{-\left(\frac{zF\cdot E_m}{RT}\right)}\right) \tag{B.50}$$

$$k^+_{Nha1} = \frac{v_{Nha1}\cdot[K^+_c]}{K_{m,Nha1} + [K^+_c]} \tag{B.51}$$

B.2.2 Kaliumtransport

Die Hefezelle reguliert ihre Kaliumkonzentration zwischen 200 und 300 mM [183]. Ab einer Konzentration von 1 mM Kalium im Medium ist die Zelle mit etwa 300 mM Kalium abgesättigt [183]. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen akkumuliert die Zelle Kalium und schafft damit einen Kaliumgradienten, dessen Gefälle dem des Protonengradienten entgegengesetzt ist. Ein Kalium-Symport kann damit zum gerichteten Export verwendet werden.
Die Kalium-Homöostase reagiert sensibel auf Ionenstress, der durch Natrium-, Chlorid- und Hydroxonium-Ionen oder Veränderungen des osmotischen Drucks verursacht wird. Die Kalium-Konzentration kann auch durch Änderungen des CO_2-Gehalts der Umgebung bzw. einer dadurch verursachten Änderung des Bicarbonatgehalts der Zelle beeinflusst werden [347].

Durch die Transportfunktionen Trk1/2, NSC und Tok1 soll hier eine vom Membranpotential und dem zellulären pH-abhängige Kaliumkonzentration eingeführt werden.

Kaliumimporter – Trk1/2

Die Kaliumaufnahme durch die Transporter Trk1p und Trk2p basiert auf der Unabhängigkeit des Imports von der Kaliumkonzentration in der Flüssigphase **L** [344] und einer quadratischen Zunahme der Aufnahmerate mit dem elektrischen Potential E_m der Zelle[208].
Die Gleichgewichtskonstante in Gleichung B.52 führt zu einem Gleichgewicht, das rein dem elektrischen Potential unterliegt [189]. Abgesehen davon wird die Aufnahmerate r_{Trk} vom Transportparameter k^+_{Trk} begrenzt (Gl. B.53). Wie bei Nha1 ergibt sich eine Abhängigkeit von der maximal verfügbaren Transportkapazität v_{Trk} und der Affinität des Transporters gegenüber Kalium $K_{m,Trk}$ (Gl. B.54).

$$K^+_L \underset{k^-_{Trk}}{\overset{k^+_{Trk}}{\longleftrightarrow}} K^+_c \qquad K^{eq} = \frac{k^-_{Trk}}{k^+_{Trk}} = E_m^2 \tag{B.52}$$

$$r_{Trk} = k^+_{Trk} \cdot E_m^2 \tag{B.53}$$

$$k^+_{Trk} = \frac{v_{Trk} \cdot [K^+_L]}{K_{m,Trk} + [K^+_L]} \tag{B.54}$$

Nicht-spezifische Kaliumkanäle – NSC

Eine weitere Möglichkeit der Kaliumaufnahme besteht durch nicht-spezifische Kaliumkanäle. Die Funktion der NSCs ist nicht unabhängig von der Kaliumkonzentration [189]. Wie schon bei der Funktion von Nha1 wirken chemisches und elektrisches Potential, was bei negativem Nernst-Potential der Zelle zur Kalium-Aufnahme entgegen des Konzentrationsgradienten führen kann.
Die Gleichgewichtskonstante ergibt sich dem entsprechend identisch zu Nha1 (Gl. B.55). Die Rate r_{NSC} wird durch den Reaktionsparameter k^+_{NSC}, begrenzt der sich — wie bereits für Gleichung B.51 und B.54 beschreiben — aus der maximal verfügbaren Transportkapazität v_{NSC} und der Affinität des Transporters gegenüber Kalium $K_{m,NSC}$ ergibt (Gl. B.57).

$$K^+_L \underset{k^-_{NSC}}{\overset{k^+_{NSC}}{\longleftrightarrow}} K^+_c \qquad K^{eq} = \frac{k^-_{NSC}}{k^+_{NSC}} = e^{\left(\frac{zF \cdot E_m}{RT}\right)} \tag{B.55}$$

$$r_{NSC} = k^+_{NSC} \left([K^+_L] - [K^+_c] e^{\left(\frac{zF \cdot E_m}{RT}\right)} \right) \tag{B.56}$$

$$k^+_{NSC} = \frac{v_{NSC} \cdot [K^+_L]}{K_{m,NSC} + [K^+_L]} \tag{B.57}$$

Kaliumkanal – Tok1

Neben dem Nha1 Antiporter und der Ena1-Kationenpumpe ist der Tok1-Kaliumkanal eine der am detailliertesten beschriebene Möglichkeit Kalium aus der Zelle zu transportieren. Das Transportverhalten von Tok1 basiert auf vier Zuständen (R_{O}, R_{IO}, R_{I}, O). Die drei R Zustände repräsentieren die geschlossene Konformation mit außen (O), doppelt (IO) und innen (I) gebundenen Kalium-Ionen. Nur eine Änderung des R_{I} Zustands führt zur leitenden Konformation O (Gl. B.58). Diese Wahrscheinlichkeit $P_{\mathrm{Tok1,O}}$ ist abhängig vom Nernst-Potential E_{m} und der Kalium-Konzentration in Flüssigphase **L** und Zellphase **C** (Gl. B.60 bis B.67).

$$R_O + K_c^+ \underset{k_{-7}}{\overset{k_7}{\leftrightarrow}} R_{IO} \underset{k_{-6}}{\overset{k_6}{\leftrightarrow}} R_I + K_L^+ \underset{k_{-5}}{\overset{k_5}{\leftrightarrow}} O \tag{B.58}$$

$$P_{Tok1,O} = \frac{O}{O + R_I + R_{IO} + R_O} \tag{B.59}$$

Im Gleichgewicht wird die relative Verteilung auf die vier Zustände mit Gleichung B.60 bis B.63 beschrieben.

$$O = \frac{k_5 R_I}{k_{-5}} \tag{B.60}$$

$$R_I = \frac{k_{-5} O + k_6 R_{IO}}{k_5 + k_{-6}[K_L^+]} \tag{B.61}$$

$$R_{IO} = \frac{k_{-6}[K_L^+] R_I + k_7 [K_c^+] R_O}{k_6 + k_{-7}} \tag{B.62}$$

$$R_O = \frac{k_{-7} R_{IO}}{k_7 [K_c^+]} \tag{B.63}$$

Der potentialabhängige R/O-Übergang dauert in jede Richtung 100 µs (k_5 und k_{-5}) [240]. Die potentialabhängige Bindung von Kalium an den Kanal wurde aufgrund der einheitlichen Leitfähigkeit von 20 pS (k_{-6}° und k_{-7}°) im elektrischen Feld zwischen den beiden Bindestellen der zellulären Membran (δ_1 and δ_2) als limitierender Schritt betrachtet [240]. Die Geschwindigkeit der Ionenbindung an den Kanal wurde in den Gleichungen B.64 bis B.67 beschreiben.

$$k_6 = k_{-6}^{\circ} e^{\left(-\delta_1 \frac{E_m}{RT}\right)} \tag{B.64}$$

$$k_{-6} = \alpha k_{-6}^{\circ} e^{\left(\delta_1 \frac{E_m}{RT}\right)} \tag{B.65}$$

$$k_7 = \beta k_{-7}^{\circ} e^{\left(-\delta_2 \frac{E_m}{RT}\right)} \tag{B.66}$$

$$k_{-7} = \beta k_{-7}^{\circ} e^{\left(\delta_2 \frac{E_m}{RT}\right)} \tag{B.67}$$

Die Transportrate von Kalium Ionen r_{Tok1} basiert auf der Goldman–Hodgkin–Katz (GHK) -Gleichung für Elektrodiffusion [190]. Der elektrische Strom I beschreibt hier einen eindimensionalen Fluss von Kalium über die permeable Membran (Gl. B.68). Die Permeabilität des Kanals $P_{s,Tok1}$, das Nernst-Potential E_m und die Kalium-Konzentrationen K_L^+ und K_c^+ bestimmen den maximal möglichen Strom im konstanten elektrischen Feld. Die volumetrische Transportrate r_{Tok1} berücksichtigt die Wahrscheinlichkeit der O-Konformation $P_{Tok1,O}$ (Gl. B.69). Das biophysikalische Modell wurde von Loukin und Saimi [240] vorgeschlagen und für die Bedingung

eines chemischen Potentials ungleich Null erweitert [189].

$$I_{Tok1} = P_{s,Tok1} \cdot E_m \cdot \frac{z^2F^2}{RT} \frac{[K_c^+] - [K_L^+]e^{\left(-\frac{zF \cdot E_m}{RT}\right)}}{1 - e^{\left(-\frac{zF \cdot E_m}{RT}\right)}} \tag{B.68}$$

$$r_{Tok1} = P_{Tok1,O} \frac{A_c}{V_c} \frac{I_{Tok1}}{F} \tag{B.69}$$

TABELLE B.3: Legende der Parameter für die Gleichungen 5.1-5.17 des ODE-Modells in Kapitel 5. Die Startwerte sind zur Simulation eines *steady state* geeignet.

Kürzel	**Parameter**	**Wert**	**Einheit**
D	Verdünnungsrate	0,1	h^{-1}
V_L	Volumen der flüssigen Phase	1,39	L
V_C	Volumen der zellulären Phase	0,11	L
V_{LR}	Reaktionsvolumen	1,5	L
V_{GR}	Gasraum im Reaktor	1,5	L
r_{Pma1}	Rate des Protonen-Export	0,24	mol $L^{-1}h^{-1}$
r_{ST}	Rate des Protonen-Import	0,12	mol $L^{-1}h^{-1}$
r_{Nha1}	Rate des Transport	0,006	mol $L^{-1}h^{-1}$
$r_{Trk1,2}$	Rate des Kalium-Import	0,012	mol $L^{-1}h^{-1}$
r_{NSC}	Rate des Kalium-Import	0	mol $L^{-1}h^{-1}$
r_{Tok1}	Rate des Kalium-Export	0	mol $L^{-1}h^{-1}$
r_1	Hinreaktion durch Hydratisierung/Dissoziation		mol $L^{-1}h^{-1}$
r_{-1}	Rückreaktion durch Protonierung/Dehydration		mol $L^{-1}h^{-1}$
r_2	Hinreaktion durch Hydroxylierung		mol $L^{-1}h^{-1}$
r_{-2}	Rückreaktion durch Dehydroxylierung		mol $L^{-1}h^{-1}$
r_4	Dihydrogenphosphat Deprotonierung		mol $L^{-1}h^{-1}$
r_{-4}	Hydrogenphosphat Protonierung		mol $L^{-1}h^{-1}$
r_{CA}	Reaktionsrate der Carboanhydrase		mol $L^{-1}h^{-1}$
$r_{CO2}^{L \to C}$	Membrandiffusion von Kohlendioxid		mol $L^{-1}h^{-1}$
$[K_c^+]$	Kalium-Konzentration in der Zelle	0,2	mol L^{-1}
$[H_c^+]$	Protonen-Konzentration in der Zelle	0,0000001	mol L^{-1}
$[OH_c^-]$	Hydroxonium-Konzentration in der Zelle	0,0000001	mol L^{-1}
$[HPO_{4,c}^{-2}]$	Hydrogenphosphat-Konzentration	0,043	mol L^{-1}
$[H_2PO_{4,c}^-]$	Dihydrogenphosphat-Konzentration	0,057	mol L^{-1}
$[HCO_{3,c}^-]$	Bicarbonat-Konzentration in der Zelle	0,005	mol L^{-1}
$[CO_{2,c}]$	Kohlendioxid-Konzentration in der Zelle	0,006	mol L^{-1}
K_w	Gleichgewichtskonstante von Wasser	4700	mol^2 L^{-2}
$r_{H,p}$	Rate der Protonenquelle in der Zelle	0,078	mol $L^{-1}h^{-1}$
$r_{CO2,p}$	Rate der CO_2-Quelle in der Zelle	1,082	mol $L^{-1}h^{-1}$
$r_{O2}^{G \to L}$	Rate des volumetrischen Sauerstofftransfers		mol $L^{-1}h^{-1}$ ppm h^{-1}

Fortsetzung

Tabelle B.3 – *Fortsetzung*

Kürzel	Parameter	Wert	Einheit
$r_{CO2}^{G\to L}$	Rate des volumetrischen Kohlendioxidtransfers		mol $L^{-1}h^{-1}$ ppm h^{-1}
$r_{N2}^{G\to L}$	Rate des volumetrischen Stickstofftransfers		mol $L^{-1}h^{-1}$ ppm h^{-1}
$r_{K,t}$	Rate der Titration mit KOH in der flüssigen Phase	0,078	mol $L^{-1}h^{-1}$
$[K_L^+]$	Kalium-Konzentration in der flüssigen Phase	0,15	mol L^{-1}
$[K_L^F]$	Kalium-Konzentration im Feed-Medium	0,07	mol L^{-1}
$[H_L^+]$	Protonen-Konzentration in der flüssigen Phase	0,00001	mol L^{-1}
$[HCO_{3,L}^-]$	Bicarbonat-Konzentration in der flüssigen Phase	0,00008	mol L^{-1}
$[CO_{2,L}]$	CO_2-Konzentration in der flüssigen Phase	0,001	mol L^{-1}
$[CO_{2,L}^F]$	CO_2-Konzentration im Feed-Medium	0,001	mol L^{-1}
$[O_{2,L}]$	O_2-Konzentration in der flüssigen Phase	0,00029	mol L^{-1}
$[O_{2,L}^F]$	O_2-Konzentration im Feed-Medium	0,00029	mol L^{-1}
$[N_{2,L}]$	N_2-Konzentration in der flüssigen Phase	0,0007	mol L^{-1}
$[N_{2,L}^F]$	N_2-Konzentration im Feed-Medium	0,0007	mol L^{-1}
$r_{O2,r}$	Rate der O_2-Senke im Reaktionsvolumen	1,038	mol $L^{-1}h^{-1}$
E_m	Elektrisches Potential der Membran	-0,07	V
F	Faraday Konstante	96485	A s mol^{-1}
A_c	Summe der Zelloberflächen	11	m^2
C_m	Elektrische Kapazität der Zelloberflächen	1,1	A s $V^{-1}m^{-2}$
T_0	Standardtemperatur	298	K
T_R	Reaktortemperatur	303	K
p_0	Standarddruck	1,0	bar
p_R	Reaktordruck	1,5	bar
$\dot{V}_g^{in}$	Zuluftrate	45	L h^{-1}
$\dot{V}_g^{out}$	Abluftrate	45	L h^{-1}
$[CO_{2,g}^{in}]$	CO_2-Konzentration in der Gasphase beim Eintritt	600	ppm
$[CO_{2,g}^{out}]$	CO_2-Konzentration in der Gasphase beim Austritt	34000	ppm
$[O_{2,g}^{in}]$	O_2-Konzentration in der Gasphase beim Eintritt	210000	ppm
$[O_{2,g}^{out}]$	O_2-Konzentration in der Gasphase beim Austritt	178000	ppm
$[N_{2,g}^{in}]$	N_2-Konzentration in der Gasphase beim Eintritt	789400	ppm
$[N_{2,g}^{out}]$	N_2-Konzentration in der Gasphase beim Austritt	788000	ppm

TABELLE B.4: Die physikalischen und chemischen Parameter beziehen sich abgesehen von $\eta_{H2O,25°C}$ auf 303 K.

	Parameter	Einheit	Referenz
physikalisch			
$\eta_{H2O,25°C}$	$8,94 \cdot 10^{-4}$	Pa · s	Kestin u.a. 1978 [193]
$\eta_{H2O,30°C}$	$7,89 \cdot 10^{-4}$	Pa · s	Kestin u.a. 1978 [193]
D_{CO2}	$1,74 \cdot 10^{-9}$	$m^2 \cdot s^{-1}$	Cussler 1997 [71]
D_{O2}	$1,91 \cdot 10^{-9}$	$m^2 \cdot s^{-1}$	Cussler 1997 [71]
D_{N2}	$1,71 \cdot 10^{-9}$	$m^2 \cdot s^{-1}$	Cussler 1997 [71]
D^M_{CO2}	$4,16 \cdot 10^{-4}$	$m^2 \cdot s^{-1}$	Gutknecht u.a. 1977 [142]
D^M_{HCO3}	$1,02 \cdot 10^{-6}$	$m^2 \cdot s^{-1}$	Gutknecht u.a. 1977 [142]
d_M	$8 \cdot 10^{-9}$	m	Hine 1999 [157]
$K_{H_{CO2}}$	$0,644$	–	Wilhelm u.a. 1977 [445]
$K_{H_{O2}}$	$0,027$	–	Wilhelm u.a. 1977 [445]
$K_{H_{N2}}$	$0,013$	–	Wilhelm u.a. 1977 [445]
R	$8,314$	$J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$	D. Meschede [262]
F	96485	$As \cdot mol^{-1}$	D. Meschede [262]
C_m	10^{-14}	$As \cdot V^{-1} \cdot \mu m^{-2}$	V. Volkov 2015 [434].
chemisch			
k_1	134	h^{-1}	Roughton und Booth [361]
K_1	$4,7 \cdot 10^{-4}$	$mol \cdot m^{-3}$	Harned und Owen [149]
k_2	$4,12 \cdot 10^4$	$m^3 \cdot mol^{-1} \cdot h^{-1}$	Pohorecki und Moniuk 1988 [330]
K_w	$1,47 \cdot 10^{-8}$	$mol^2 \cdot m^{-6}$	Harned und Owen [149]
k_4	$4,32 \cdot 10^4$	h^{-1}	Li 1944 [222]
K_4	$6,45 \cdot 10^{-5}$	$mol \cdot m^{-3}$	Mortimer und Müller [277]
$\Delta H°/R$	1700	K	R. Sander [370]

TABELLE B.5: Die biologischen Parameter der Enzyme beziehen sich auf neutrale pH-Werte und 303 K so weit bekannt.

	Parameter	Unit	Reference
Carboanhydrase			
$r_{CA}^{max_\circ}$	$6,1$	$U \cdot mg_{protein}^{-1}$	Amoroso u.a. 2005 [14]
$K_{m,CO2}$	$9,59$	mM	Isik u.a. 2010 [173]
$K_{i,HCO3}$	60	mM	Donalds u.a. 1974 [87]
Plasmamembran ATPase			
$K_{H,prod}$	$5 \cdot 10^{-18}$	$mol \cdot s^{-1}$	Ke u.a. 2014 [189]
k^+_{Pma1}	$1,728 \cdot 10^{-10}$	$mol \cdot h^{-1} \cdot mM^{-2}$	Ke u.a. 2014 [189]
G°_{ATP}	36030	$J \cdot mol^{-1}$	R. A. Alberty 2001 [10]
k^+_{Pma1}	$12,7 \cdot 10^6$	$M \cdot min^{-1} \cdot mM^{-2}$	Modell C
Nha1 Antiporter			
k^+_{Nha1}	$3,93 \cdot 10^{-10}$	$mol \cdot h^{-1} \cdot mM^{-5}$	Ke u.a. 2014 [189]
$K_{m,Nha1}$	1240	mM	Ke u.a 2014 [189]
k^+_{Nha1}	$8,45 \cdot 10^{13}$	$M \cdot min^{-1} \cdot mM^{-5}$	Modell C
Trk1 & Trk2 Transporter			
k^+_{Trk}	$1,944 \cdot 10^{-13}$	$mol \cdot h^{-1} \cdot V^{-2}$	Rodriguez-Navarro u.a. 1984 [355]
$K_{m,Trk}$	$0,4$	mM	Haro u.a. [150]
k^+_{Trk}	$8,3 \cdot 10^{-2}$	$M \cdot min^{-1} \cdot V^{-2}$	Modell C
Tok1 Kanal			
$P_{s,Tok1}$	$1,56 \cdot 10^{-13}$	h^{-1}	Ke u.a. 2014 [189]
$P_{s,Tok1}$	$4,28 \cdot 10^{-2}$	h^{-1}	Modell C
k_5	$3,6 \cdot 10^7$	h^{-1}	Loukin u.a. 1999 [240]
k_{-5}	$3,6 \cdot 10^7$	h^{-1}	Loukin u.a. 1999 [240]
k°_{-6}	$12,24 \cdot 10^{10}$	h^{-1}	Loukin u.a. 1999 [240]
k°_{-7}	$12,24 \cdot 10^{10}$	h^{-1}	Loukin u.a. 1999 [240]
α	$231,6$	–	Loukin u.a. 1999 [240]
β	$8122,7$	–	Loukin u.a. 1999 [240]
δ_1	$0,0$	–	Ke u.a. 2013 [189]
δ_2	$0,76875$	–	Ke u.a. 2013 [189]
Spezifischer Protonen Symporter			
k^+_{ST}	$3,6 \cdot 10^{-14}$	$mol \cdot h^{-1} \cdot V^{-1}$	Ke u.a. 2013 [189]
k^+_{ST}	$12,38 \cdot 10^{-8}$	$M \cdot min^{-1} \cdot V^{-1}$	Modell C
Unspezifischer Kanal			
k^+_{NSC}	$2,16 \cdot 10^{-18}$	$mol \cdot h^{-1} \cdot mM^{-1}$	Ke u.a.. 2013 [189]
$k_{m,NSC}$	60	mM	Ke u.a. 2013 [189]
k^+_{NSC}	$9,87 \cdot 10^{-6}$	$M \cdot min^{-1} \cdot mM^{-1}$	Modell C
Elementarzusammensetzung			
M_{XC}	26,4	$g \cdot mol_C^{-1}$	Lange u.a. 2001 [212]
Y_{XN}	6,7	$mol_C \cdot mol_N^{-1}$	Lange u.a. 2001 [212]
Y_{XS}	500	$mol_C \cdot mol_S^{-1}$	Lange u.a. 2001 [212]
Y_{XP}	111	$mol_C \cdot mol_P^{-1}$	Lange u.a. 2001 [212]

Anhang C

Stöchiometrische Reaktionsnetzwerke

Die Firma Insilico Biotechnology[1] liefert mit Ihrer Software Insilico Discovery (Version 3.6.0) auch stöchiometrische Reaktionsnetzwerke. Für die Anwendung in dieser Arbeit wurde eines dieser Netzwerke angepasst. Metabolite und Reaktionen sind in den folgenden Abschnitten aufgeführt und wurden mit dem aktuellen Wissensstand abgeglichen.

C.1 Liste der Metabolite mit Summenformel und Ladung

- 1,3-Bisphosphoglycerat: 3pgp, $C_3H_4O_{10}P_2{}^{4-}$
- 3-Phosphoglycerat: 3pg, $C_3H_4O_7P_1{}^{3-}$
- 5,10-Methylenetetrahydrofolate: 5,10-CH_2-THF, $C_{20}H_{22}N_7O_6{}^{-}$
- 5-Methyltetrahydrofolate: 5-CH_3-THF, $C_{20}H_{24}N_7O_6{}^{-}$
- 5,10-Methenyl-THF: 5,10-CH^+-THF, $C_{20}H_{21}N_7O_6$
- 10-Formyl-THF: 10-HCO-THF, $C_{20}H_{22}N_7O_7{}^{-}$
- 5-Formyl-THF: 5-HCO-THF, $C_{20}H_{22}N_7O_7{}^{-}$
- αKetoglutarat: akg, $C_5H_4O_5{}^{2-}$
- Acetaldehyd: ald, $C_2H_4O_1$
- Acetat: ace, $C_2H_3O_2{}^{-}$
- Acetyl-CoA: aca, $C_{23}H_{35}N_7O_{17}P_3S_1{}^{3-}$
- Adenosindiphosphat: ADP, $C_{10}H_{13}N_5O_{10}P_2{}^{2-}$
- Adenosinmonophosphat: AMP, $C_{10}H_{13}N_5O_7P_1{}^{-}$
- Adenosintriphosphat: ATP, $C_{10}H_{13}N_5O_{13}P_3{}^{3-}$
- Ammonium: NH_4, $H_4N_1{}^{+}$
- Arginin: arg, $C_6H_{15}N_4O_2{}^{+}$

[1] http://www.insilico-biotechnology.com

- Aspartat: asp, $C_4H_6N_1O_4^{-}$
- Asparagin: asn, $C_4H_9N_2O_3^{+}$
- Carbamoylphosphate: carp, $C_1H_3N_1O_5P_1^{-}$
- Co-Enzym A: CoA, $C_{21}H_{33}N_7O_{16}P_3S_1^{3-}$
- Chorismat: chor, $C_{10}H_8O_6^{2-}$
- Citrat: cit, $C_6H_5O_7^{3-}$
- Cystein: cys, $C_3H_7N_1O_2S_1$
- Cytidinmonophosphat: CMP, $C_9H_{13}N_3O_8P_1^{-}$
- Cytidintriphosphat: CTP, $C_9H_{13}N_3O_{14}P_3^{3-}$
- Cytochrom-c: Cyt, $C_{35}H_{51}N_4O_4S_2Fe_1$
- Dihydroxyacetonphosphat: dhap, $C_3H_5O_6P_1^{2-}$
- Erythrose-4-Phosphat: e4p, $C_4H_7O_7P_1^{2-}$
- Ethanol: etoh, $C_2H_6O_1$
- Flavinadenindinucleotid: FAD, $C_{27}H_{32}N_9O_{15}P_2^{-}$
- Flavinadenindinucleotid: $FADH_2$, $C_{27}H_{34}N_9O_{15}P_2^{-}$
- Fruktose-1,6-Bisphosphat: fbp, $C_6H_{10}O_{12}P_2^{4-}$
- Fruktose-6-Phosphat: f6p, $C_6H_{11}O_9P_1^{2-}$
- Fumarat: fum, $C_4H_2O_4^{2-}$
- Glukose: glu-D, $C_6H_{12}O_6$
- Glukose-6-Phosphat: g6p, $C_6H_{11}O_9P_1^{2-}$
- Glukose-1-Phosphat: g1p, $C_6H_{11}O_9P_1^{2-}$
- Glutamat: glu, $C_5H_8N_1O_4^{-}$
- Glutamin: gln, $C_5H_{11}N_2O_3^{+}$
- Glycin: gly, $C_2H_5N_1O_2$
- Glycerol: gol, $C_3H_8O_3$
- Glycerinaldehyde-3-Phosphat: g3p, $C_3H_5O_6P_1^{2-}$
- Glycerol-3-Phosphat: gol3p, $C_3H_7O_6P_1^{2-}$
- Glykogen: glyc, $C_6H_{10}O_5$

- Guanosinemonophosphate: GMP, $C_{10}H_{13}N_5O_8P_1\ ^{-}$
- Histidin: his, $C_6H_9N_3O_2$
- Homoserin: hser, $C_4H_9N_1O_3$
- Inosinemonophosphat: IMP, $C_{10}H_{11}N_4O_8P_1\ ^{2-}$
- Isocitrat: icit, $C_6H_5O_7\ ^{3-}$
- Isoleucin: ile, $C_6H_{13}N_1O_2$
- Ketoisovalerat: kiv, $C_5H_7O_3\ ^{-}$
- Kohlendioxid: CO_2, C_1O_2
- Leucin: leu, $C_6H_{13}N_1O_2$
- Lysin: lys, $C_6H_{15}N_2O_2\ ^{+}$
- Malat: mal, $C_4H_4O_5\ ^{2-}$
- Metalle: M, $Na_{0,04}Mg_{0,088}K_{0,864}Ca_{0,0016}Mn_{0,0016}Fe_{0,0016}Cu_{0,0016}Zn_{0,0016}\ ^{1,1-}$
- Methionin: met, $C_5H_{11}N_1O_2S_1$
- Nikotinadenindinukleotid: NAD, $C_{21}H_{28}N_7O_{14}P_2\ ^{+}$
- Nikotinadenindinukleotid: NADH, $C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2$
- Nicotinamidadenindinukleotidphosphat: NADP, $C_{21}H_{27}N_7O_{17}P_3\ ^{-}$
- Nicotinamidadenindinukleotidphosphat: NADPH, $C_{21}H_{28}N_7O_{17}P_3\ ^{2-}$
- Ölsäure: 18:1, $C_{18}H_{33}O_2\ ^{-}$
- Ornithin: orn, $C_5H_{13}N_2O_2\ ^{+}$
- Oxalacetat: oaa, $C_4H_2O_5\ ^{2-}$
- Palmitinsäure: 16:0, $C_{16}H_{31}O_2\ ^{-}$
- Palmitoleinsäure: 16:1, $C_{16}H_{29}O_2\ ^{-}$
- Phenylalanin: phe, $C_9H_{11}N_1O_2$
- Phosphat: HPO_4, $H_1O_4P_1\ ^{2-}$
- Phosphoenolpyruvat: PEP, $C_3H_2O_6P_1\ ^{3-}$
- Phosphoribosyl-5-amino-4-imidazolecarboxamide: aicar, $C_9H_{15}N_4O_8P_1$
- Phosphoribosyl-1-pyrophosphat: prpp, $C_5H_8O_{14}P_3\ ^{5-}$
- Prolin: pro, $C_5H_8N_1O_2\ ^{-}$; Proton: h, $H_1\ ^{-}$

- Pyruvat: pyr, $C_3H_3O_3^{-}$
- Ribose-5-Phosphat: r5p, $C_5H_9O_8P_1^{2-}$
- Ribulose-5-Phosphat: ru5p, $C_5H_9O_8P_1^{2-}$
- Sauerstoff: O_2, O_2
- Schwefelwasserstoff: H_2S, H_2S_1
- Sedulose-7-Phosphat: s7p, $C_7H_{13}O_{10}P_1^{2-}$
- Serin: ser, $C_3H_7N_1O_3$
- Stearinsäure: 18:0, $C_{18}H_{35}O_2^{-}$
- Struktur-Chitincore: SCC, $C_{14}H_{20}N_1O_{94}P_1^{2+}$
- Struktur-Mannocore: SMC, $C_{84}H_{138}N_3O_{70}P_1^{2-}$
- Struktur-Mannoprotein: SMP, $C_{744}H_{1248}N_3O_{663}P_{12}^{23-}$
- Struktur-Polysaccharid: SPS, $C_{66}H_{111}O_{59}P_1^{2-}$
- Succinat: suc, $C_4H_4O_4^{2-}$
- Succinyl-CoA: sca, $C_{25}H_{36}N_7O_{19}P_3S_1^{4-}$
- Sulfat: SO_4, $O_4S_1^{2-}$
- Tetrahydrofolat: THF, $C_{19}H_{22}N_7O_6^{-}$
- Threonin: thr, $C_4H_9N_1O_3$
- Trehalose: tre, $C_{12}H_{22}O_{11}$
- Trehalose-6-Phosphat: t6p, $C_{12}H_{21}O_{14}P_1^{2-}$
- Tryptophan: trp, $C_{11}H_{12}N_2O_2$
- Tyrosin: tyr, $C_9H_{11}N_1O_3$
- Ubiquinon: Q(H_2), $C_{14}H_{18}O_4$
- Uridindiphosphat: UDP, $C_9H_{11}N_2O_{12}P_2^{3-}$
- UDP-Glukose: UDPglu-D, $C_{15}H_{22}N_2O_{17}P_2^{2-}$
- Uridinmonophosphat: UMP, $C_9H_{11}N_2O_9P_1^{2-}$
- Uridintriphosphat: UTP, $C_9H_{11}N_2O_{15}P_3^{4-}$
- Valin: val, $C_5H_{11}N_1O_2$

- Wasser: H_2O, H_2O
- Xylulose-5-phosphat: x5p, $C_5H_9O_8P_1{}^{2-}$

C.2 Liste der Reaktionen mit EC-Nummer und Genen

TABELLE C.1: Reversible (=) und irreversible (=>) Reaktionen wurden mit ihrer Stöchiometrie, EC-Nummer und den kodierenden Gene für katalytische Enzyme aufgelistet. Das Netzwerk wurde für alle Bilanzen des Kapitels 6 verwendet.

Name	Stöchiometrie der Reaktion	EC	Gene
Transporter über die Systemgrenze zu Kompartiment I			
Glc_{Imp}	glu-D(e) = glu-D	**	
Gly_{Syn}	glyc => glyc(e)	**	
Tre_{Syn}	tre => tre(e)	**	
Gly_{Cle}	glyc(e) => glyc	**	
Tre_{Cle}	tre(e) => tre	**	
H_{Ex}	h = h(e)	**	PMA1
H_2O_{Ex}	H_2O = H_2O(e)	**	
$O_{2,Diff}$	O_2 = O(e)	**	
$CO_{2,Diff}$	CO_2 = CO_2(e)	**	
Suc_{Ex}	suc = suc(e)	**	
$Glyc_{Ex}$	glyc = glyc(e)	**	
EMD_{Diff}	etoh = etoh(e)	**	
AC_{Ex}	ace = ace(e)	**	
Asp_{Tr}	asp = asp(e)	**	AAS2
Ala_{Tr}	ala = ala(e)	**	
Glu_{Tr}	glu = glu(e)	**	
Gly_{Tr}	gly = gly(e)	**	
Thr_{Tr}	thr = thr(e)	**	
Ser_{Tr}	ser = ser(e)	**	
Gln_{Tr}	gln = gln(e)	**	
Val_{Tr}	val = val(e)	**	
Arg_{Tr}	arg = arg(e)	**	
Lys_{Tr}	lys = lys(e)	**	
Pro_{Tr}	pro = pro(e)	**	
$HPO_{4,Tr}$	3·HPO_4 + 2·h + 2·ADP = HPO_4(e) + 2·ATP + 2·H_2O	**	
$SO_{4,Tr}$	SO_4(e) + ATP + H_2O => SO_4 + h + ADP + HPO_4	**	SUL1/2
$NH_{4,Tr}$	NH_4(e) + ATP + H_2O => NH_4 + h + ADP + HPO_4	**	
$Metals_{Tr}$	M = M(e)	**	
$Biomasse_{Tr}$	Biomasse => Biomasse(e)	**	

Fortsetzung

Tabelle C.1 – *Fortsetzung*

Name	**Stöchiometrie der Reaktion**	**EC**	**Gene**
Glykolyse – Kompartiment I			
HEX1	glu-D + ATP => g6p + ADP + h	2.7.1.1	HXK1/2
PGMT	g6p = g1p	5.4.2.2	PGM1/2
PGI	g6p = f6p	5.3.1.9	PGI1
PFK	f6p + ATP => fbp + ADP+ h	2.7.1.11	PFK1/2
FBA	fbp = g3p + dhap	4.1.2.13	FBA1
TPI	g3p = dhap	5.3.1.1	TPI1
	dhap + NADH + h = gol3p + NAD	1.1.1.8	GPD1
	gol3p + H_2O = gol + HPO_4	3.1.3.21	GPP1/2
GAPD	g3p + NAD + HPO_4 = 3pgp + NADH + h	1.2.1.12	TDH1/2/3
PGK	3pgp + ADP = 3pg + ATP	2.7.3.2	PGK1
PGM	3pg = PEP + H_2O	5.4.2.1	GPM1
ENO		4.2.1.11	ENO1/2
PYK	PEP + ADP + h => pyr + ATP	2.7.140	CDC19/PYK2
Pentosephosphatweg – Kompartiment I			
PPP1	g6p + 2·NADP+ ·H_2O = ru5p + 2·NADPH+ CO2+ 2·h	1.1.1.49	ZWF1
		3.1.1.31	SOL3/4
		1.1.1.44	GND1/2
	ru5p = x5p	5.1.3.1	RPE1
	ru5p = r5p	5.3.1.6	RKI1
	r5p + x5p = s7p + g3p	2.2.1.1	TKL1/2
PPP2	s7p + g3p = f6p + e4p	2.2.1.2	TAL1
PPP3	x5p + e4p = f6p + g3p	2.2.1.1	TKL1
	e4p + dhap => s7p + HPO_4	4.1.2	
		3.1.3.37	
Glutamat- und Glutamin-Synthese – Kompartiment I			
GDH	NH_4 + akg + NADPH + h = glu + NADP + H_2O	1.4.1.4	GDH1/3
GLN	glu + NH_4 + ATP => gln + ADP + HPO_4	6.3.1.2	GLN1
Alanin-, Serin- und Glycin-Synthese – Kompartiment I			
PGCP	3pg + glu + NAD + H_2O = ser + akg + HPO_4 + h + NADH	1.1.1.95	SER3/33
		2.6.1.52	SER1
		3.1.3.3	SER2
ala	pyr + glu = ala + akg	2.6.1.2	ALT1
SHM	ser + THF = gly + 5,10-CH_2-THF + H_2O	2.1.2.1	SHM1/2
MTD	THF + ATP + NADH + CO_2 = 5-HCO-THF + ADP + HPO_4 + NAD		
	5,10-CH^+-THF + 2·NAD + 2·H_2O = THF + CO_2 + 2·NADH + 2·h	*	
	THF + CO_2 + 3·NADH + 3·h = 5-CH_3-THF + 3·NAD + 2·H_2O	*	

Fortsetzung

Tabelle C.1 – *Fortsetzung*

Name	Stöchiometrie der Reaktion	EC	Gene
Histidin-Synthese — Kompartiment I			
his	prpp + gln + ATP + 2·NAD + 5·H_2O	*	HIS1/2/3/4
	= his + aicar + akg + 2·NADH + 7·h+ 5·HPO_4	*	HIS5/6/7
Cystein- und Methionin-Synthese – Kompartiment I			
	SO_4 + 2·ATP + 4·NADPH + 3·h	*	MET3/5/10
	=> H_2S + 4·NADP + AMP + ADP + 3·HPO_4 + H_2O	*	MET14/16
HOM	asp + ATP + 2·NADPH + 2·h		
	= hser + ADP + HPO_4 + 2·NADP	*	HOM2/3/6
THR	hser + ATP + H_2O = thr + ADP + HPO_4 + h	*	THR1/4
CYS	ser + aca + H_2S = cys + CoA + ace + h	*	MET2/17, CYS3/4
MET	hser + sca + cys + 5-CH_3-THF + H_2O	2.1.1.13	
	= met + CoA + suc + pyr + NH_4 + THF + h	2.1.1.14	MET2/6/17
Ornithin- und Arginin-Synthese — Kompartiment I			
ORN	2·glu + aca + ATP + NADPH + H_2O	*	ARG2/5/6
	=> Orn + akg + CoA + ADP + HPO_4 + NADP + ace	*	ARG7/8
ARG	Orn + carp + asp + ATP + H_2O	*	ARG1/3/4
	= arg + fum + AMP + 3·HPO_4 + 4·h		
Leucin-, Isoleucin- und Valin-Synthese – Kompartiment I			
ILV	pyr + NADPH + 2·h => kiv + CO_2 + NADP + H_2O	*	ILV2/3/5/6
leu	kiv + glu + aca + H_2O + NAD	*	LEU1/2/4/9
	= leu + akg + CoA + NADH + h + CO_2	2.6.1.42	BAT1/2
val	pyr + glu + NADPH + 2·h	*	ILV2/3/5/6
	= val + akg + H_2O + NADP + CO_2	2.6.1.42	BAT1/2
ile	thr + pyr + NADPH + glu + 2·h	*	ILV1/2/3/5/6
	= ile + NH_4 + NADP + H_2O + CO_2 + akg	2.6.1.42	BAT1/2
Prolin- und Lysin-Synthese – Kompartiment I			
pro	glu + ATP + 2·NADPH + h		PRO1/2
	= pro + ADP + HPO_4 + H_2O + 2·NADP	*	PRO3
	2·glu + aca + ATP+ 2·NADPH + 2·NAD		LYS1/2/4
lys	+ 2·H_2O => lys + CO_2 + akg + CoA + AMP	*	LYS9/12
	+ 2·NADP + 2·HPO_4 + h + 2·NADH		LYS20/21
Pyruvat-Verzweigung – Kompartiment I			
PYC	pyr + ATP + H_2O + CO_2	6.4.1.1	PYC1/2
	=> oaa + ADP + HPO_4 + 2·h		
asp	oaa + glu = asp + akg	2.6.1.1	AAT1/2
MDHc	mal + NAD = oaa + NADH + h	1.1.1.37	MDH2
PDC	pyr + h => ald + CO_2	4.1.1.1	PDC1/5/6
ADH	ald + NADH + h = etoh + NAD	1.1.1.1	ADH1/2/3/4/5
ALD	ald + NADP + H_2O = ace + NADPH + 2·h	1.2.1.4	ALD4/5/6
ACOAH	ace + CoA + ATP + H_2O	6.2.1.1	ACS1/2
	=> aca + AMP + 2·HPO_4 + h		

Fortsetzung

Tabelle C.1 – *Fortsetzung*

Name	Stöchiometrie der Reaktion	EC	Gene
Phenylalainin-, Tyrosin- und Tryptophan-Synthese — Kompartiment I			
ARO	2·PEP + e4p + NADPH + ATP	*	ARO1/2
	=> chor + ADP + 4·HPO_4 + NADP	*	ARO3/4
TRP	chor + gln + prpp + ser => trp + 2·HPO_4	*	TRP1/2/3
	+ CO_2+ g3p + glu + 2·h + pyr + H_2O	*	TRP4/5
PHE	chor + glu + h => phe + akg + CO_2 + H_2O	*	ARO7/8/9, PHA2
TYR	chor + glu + NAD = tyr + akg + CO_2 + NADH	*	ARO7/8/9, TYR1
Nukleotid-Synthese – Kompartiment I			
	r5p + ATP= prpp + AMP + h	2.7.6.1	PRS1/2/3/4/5
CPS	2·ATP + NH_4 + CO_2 + H_2O	6.3.5.5	CPA1/2
	= carp + 2·ADP + 2·h + HPO_4	*	URA2
UMP	carp + asp + NAD + prpp	*	URA1/2/3
	= UMP + NADH + CO_2 + HPO_4 + 2·h		URA4/5
UDP	UMP + ATP = UDP + ADP	2.7.4.4	URA6
UTP	UDP + ATP = UTP + ADP		
CTP	UTP + gln + ATP + H_2O	6.3.4.2	URA7/8
	= CTP + ADP + HPO_4 + 2·h + glu		
	prpp + 2·gln + gly + 5·ATP + asp + 10-HCO-THF		ADE1/2/4
AICAR	+ 4·H_2O + CO_2 = aicar+ 5·ADP+ 7·HPO_4	*	ADE5/6/7
	+ 2·glu + THF + fum + 9·h		ADE8/13
IMP	aicar + 10-HCO-THF = THF + IMP + H_2O + 2·h	*	ADE16/17
AMP	IMP + asp + ATP = AMP + ADP + HPO_4 + fum + h	*	ADE12/13
ADP	AMP + ATP = 2·ADP		
GMP	IMP + NAD + 2·ATP + gln + 3·H_2O	1.1.1.205	IMD2/3/4
	= GMP + 2·ADP + 2·HPO_4 + glu + NADH + 4·h	6.3.5.2	GUA1
CMP	CTP + 2·ADP = CMP + 2·ATP	*	YNK1
Speicherstoff-Metabolismus – Kompartiment I			
	g1p + UTP + H_2O = UDPglu-D + 2· HPO_4	2.7.7.9	UGP1 YHL012W
	UDPglu-D + g6p + H_2O => t6p + UDP + h	2.4.1.15	TPS1
	T6P + H_2O => tre + HPO_4 + h	3.1.3.12	TPS2
		2.4.1.186	GLG1/2
	UDPglu-D = UDP + glyc + h	2.4.1.11	GSY1/2
		2.4.1.18	GLC3
	tre + H_2O => 2·glc-D	3.2.1.28	ATH1, NTH1
	glyc + H_2O => glc-D	3.2.1.3	SGA1
Lipid-Synthese – Kompartiment I			
16:0	8·aca + 7·ATP + 14·NADPH + 6·h + H_2O	*	FAS1/2
	= 16:0 + 8·CoA + 7·ADP + 14·NADP + 7·HPO_4		
18:0	16:0 + 2·NADPH + h + aca + ATP	*	FAS1/2
	= 18:0 + ADP + HPO_4 + 2·NADP + CoA		

Fortsetzung

Tabelle C.1 – *Fortsetzung*

Name	Stöchiometrie der Reaktion	EC	Gene
16:1	16:0 + NADH + O_2 + h = 16:1 + NAD + 2·H_2O	1.14.19.1	OLE1
18:1	18:0 + NADH + h + O_2 = 18:1 + NAD + 2·H_2O	1.14.19.1	OLE1
Zellwand-Synthese – Kompartiment I			
	11·g6p + 10·ATP + 10·H_2O = SPS + 20·HPO_4 + 10·ADP+ 10·h	**	
	2·f6p + gln + aca + 2·ATP + H_2O = glu + CoA + 2·ADP + SCC + 3·HPO_4 + 4·h	**	
	SPS + SCC + asn + 2·ATP = SMC + 2·ADP + 2·HPO_4 + 2·h	**	
	1·SMC + 10·SPS + 10·ATP + 10·H_2O = SMP + 10·ADP + 10·HPO_4 + 10·h	**	
Transporter zwischen Kompartiment I und II			
PYRm	pyr(m) + h(m) + ADP(m) + HPO_4(m) = pyr + ATP(m) + H_2O(m)	*	MPC1/2/3
AACm	ATP(m) = ATP	**	AAC1/2/3
	ADP(m) = ADP	**	AAC1/2/3
	H_2O(m) = H_2O	**	
	h(m) = h	**	
	3·HPO_4(m) + h(m) + 2·ADP(m) = HPO_4 + 2·ATP(m) + 2·H_2O(m)	**	
ODCm	akg(m) = akg	**	ODC1/2
	CoA(m) = CoA	**	
	sca(m) = sca	**	
	suc(m) = suc	**	SFC1
	fum(m) = fum	**	SFC1
	mal(m) = mal	**	OAC1
	O_2(m) = O_2	**	
	CO_2(m) = CO_2	**	
Atmungskette – Kompartiment II			
NDI	Q(m) + h(m) + NADH(m) = QH_2(m) + NAD(m)	1.6.5.3	Tab. 7.6
NDE	Q(m) + $FADH_2$(m) => QH_2(m) + FAD(m) NADH + h + Q(m) => QH_2(m) + NAD	* 1.6.5.3	Tab. 7.6
COR	QH_2(m) + 2·Cyt^{red}(m) + 4·h(m) = 2· Cyt^{ox}(m) + Q(m) + 4·h + 2·h(m)	*	Tab. 7.6
COX	2· Cyt^{ox}(m) + 1/2· O_2(m) + 4· h(m) = 2· Cyt^{red}(m) + H_2O(m) + 2·h	* 1.9.3.1	Tab. 7.6 COX1/2/3
ATPS	h + 0,33·ADP(m) + 0,33· HPO_4(m) + 0,33·h(m) = h(m) + 0,33·ATP(m) + 0,33·H_2O(m)	*	Tab. 7.4
Citratzyklus – Kompartiment II			
PDHm	pyr(m) + NAD(m) + CoA(m)	*	PDA1, PDB1
	=> aca(m) + NADH(m) + CO_2(m)	*	LAT1, LPD1

Fortsetzung

Tabelle C.1 – *Fortsetzung*

Name	Stöchiometrie der Reaktion	EC	Gene
CSm	oaa(m) + aca(m) + H_2O(m) => cit(m) + CoA(m) + h(m)	2.3.3.1	CIT1/3
ACO	cit(m) = icit(m)	4.2.1.3	ACO1/2
IDHm	icit(m) + NAD(m) => akg(m) + NADH(m) + CO_2(m)	1.1.1.41	IDH1/2
KGDm	akg(m) + CoA(m) + NAD(m) => sca(m) + NADH(m) + CO_2(m)	* *	KGD1/2 LDP1
SLCm	sca(m) + ADP(m) + HPO_4 = suc(m) + ATP(m) + CoA(m)	6.2.1.5	LSC1/2
SDHm	suc(m) + FAD(m) => fum(m) + $FADH_2$(m)	1.3.5.1	SDH1/2/3/4
FUMm	fum_M + H_2O_M = mal_M	4.2.1.2	FUM1
MDHm	mal(m) + NAD(m) = oaa(m) + NADH(m) + h(m) ATP(m) + H_2O(m) => ADP(m) + HPO_4,(m) + h(m)	1.1.1.37	MDH1
Polymer- und Biomassesynthese – Kompartiment I			
RNA	2300,23·AMP + 2300,23·GMP + 3100,31·UMP + 2300,23·CMP 10^3·(ATP + H_2O = ADP + HPO_4 + h)		=> RNA
SMP	SMC + 10·SPS 10^1·(ATP + H_2O = ADP + HPO_4 + h)		=> SMP
Lipid	0,29·16:0 + 0,62·c18:1 + 1,04·c16:1 + 0,07·18:1 + 0,97·gol		=> Lipid + 2·H_2O
Protein	8,08·glu + 2,83·gln + 4,34·pro + 4,44·arg + 7,68·lys + 4,85·ser + 0,81·trp + 8,08·gly + 0,2·cys + 8,28·asp + 2,83·asn + 5,25·thr + 1,41·met + 5,35·ile + 12,73·ala + 7,17·val + 8,18·leu + 3,74·phe + 2,83·tyr + 1,92·his		=> Protein
Biomasse	21,01·M + 71,21·H_2O + 0,65·SO_4 + 0,29·SMP + 1,16·Protein + 0,0006·RNA+ 2,42·SPS + 3,26·Lipid		=> Biomasse

*) EC-Nummer siehe Übersicht der Stoffwechselwege in *Saccharomyces cerevisiae* S288C (SGD)[2].
**) Keine EC-Nummer verfügbar, da der Transportmechanismus *in vivo* abweichen kann.

C.3 Fließgleichgewichte

Es wurden drei Referenzzustände mit unterschiedlichen Durchflussraten D im *chemostat* Prozess eingestellt. In der C-Limitierung auf Glukose bei D gleich 0,05 h^{-1}, 0,1 h^{-1} und 0,3 h^{-1} wurden im steady state die Raten in Tabelle C.2 bestimmt. Herr Simon Ringger führte die Prozesse in seiner Bachelorarbeit durch und stellte die Messdaten zusammen [350].
Im Fließgleichgewicht wird Glukose in die komplexe chemische Zusammensetzung der Biomasse umgewandelt. Anabole biochemische Reaktionen zur Synthese von Monomerbausteinen stehen mit katabolen Reaktionen über Energieträger im Gleichgewicht. Die Elementarbilanz kann dabei als algebraisches Gleichungssystem dargestellt werden. In Matrizenschreibweise entspricht es dem der stöchiometrischen Matrix S und dem Flussvektor v. Im Fließgleichgewicht entspricht die Summe der elementaren Zusammensetzung des Substrate der der Produkte. Das Skalarprodukt von S und v entspricht somit Null.

[2] http://www.yeastgenome.org/

Die Zusammensetzung der Substrate bleibt unverändert während sich die elementare Zusammensetzung der Biomasse mit D verändert. Bei höherem D sinkt der Kohlenhydratanteil in der Biomasse. Soll das Fließgleichgewicht mit einem stöchiometrischen Reaktionsnetz simuliert werden, sollte auch hier der Kohlenhydratanteil mit steigendem D gesenkt werden. Tabelle C.3 enthält die elementare Zusammensetzung von *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D und seiner Polymerbausteine bei verschiedenen D nach Lange u. a. [212].

TABELLE C.2: Chemostat Prozess bei 30°C und pH 5 unter aeroben Bedingungen auf Glukose. Eine Bilanzierung des Kohlenstoffs ist mit der gegebenen Wiederfindung in Biomasse und CO_2 gegeben. CEN.PK 113-7D weist im Mittel 26,4 g mol_C^{-1} auf [212].

D $[h^{-1}]$	Y_{XS} $[g\ g^{-1}]$	$q_{Glukose}$	q_{O2}	q_{CO2} $[mmol\ g_{DW}^{-1}\ h^{-1}]$	q_{H+}	m_S	C Recovery [-]
0,05	0,49±0,01	-0,57±0,04	-1,30±0,14	1,37±0,00	0,26±0.03	0,06	0,98±0,04
0,10	0,49±0,01	-1,14±0,03	-2,58±0,06	2,76±0,08	0,54±0.02	0,11	0,98±0,02
0,30	0,51±0,01	-3,28±0,16	-8,04±0,36	8,39±0,37	1,65±0.05	0,22	1,04±0,04

Drei stöchiometrische Modelle zur Berechnung Metabolischer Fluss Analysen (MFA) wurden von Herrn Ringger erstellt [350]. Die Systemgrenze wird von der Periplasmamembran gebildet. Neun Transporter öffnen das System für Glukose, Sauerstoff, Kohlendioxid, Wasser, Protonen, Sulfat, Ammonium, Phosphat und Biomasse. Das System enthält die Kompartimente Cytosol und Mitochondrium welche über 21 Transporter verbunden sind.

TABELLE C.3: Elementare Zusammensetzung der Biomasse und der Polymere in der Hefe *S. cerevisiae* CEN-PK 113-7D nach Lange u. a. (2001) [212] angepasst.

Polymer	Elementarzusammensetzung $[h^{-1}]$	$M_{Biomasse}$ $[g_{DW} mol_C^{-1}]$	Y_{CN} $[mol_C mol_N^{-1}]$
$Biomasse_{D=0,05}$	$CH_{1,749}O_{0,593}N_{0,137}P_{0,009}S_{0,002}Me_{0,018}$	26,2	7,3
$Biomasse_{D=0,1}$	$CH_{1,746}O_{0,597}N_{0,150}P_{0,009}S_{0,002}Me_{0,018}$	26,4	6,7
$Biomasse_{D=0,3}$	$CH_{1,750}O_{0,579}N_{0,159}P_{0,009}S_{0,002}Me_{0,018}$	26,3	6,3
Protein	$CH_{1,578}O_{0,314}N_{0,271}S_{0,003}$	22,5	3,7
RNA	$CH_{1,309}O_{0,854}N_{0,382}P_{0,106}S_{0,003}$	35,6	2,6
Mannoprotein	$CH_{1,677}O_{0,891}N_{0,004}P_{0,016}$	28,5	250
Lipid	$CH_{1,798}O_{0,135}$	15,9	-
Glycane	$CH_{1,682}O_{0,894}P_{0,015}$	28,4	-
Glycogen	$CH_{1,697}O_{0,848}$	27,3	-
Metalle (Me)	$Na_{0,04}Mg_{0,088}K_{0,864}Ca,Mn,Fe,Cu,Zn_{je\ 0,002}$	-	-

Im Cytosol sind die Stoffwechselwege der Glykolyse und die Synthesen von Aminosäuren, Lipiden, Nukleotiden und Kohlenhydraten implementiert. Das Mitochondrium enthält den TCC und die Elektronentransportkette. Die stöchiometrische Matrix umfasst insgesamt 126 Metaboliten in 121 Reaktionen und hat einen äußeren Freiheitsgrad (ODF) von 3 und einen inneren Freiheitsgrad (IDF) von 0 (siehe Anhang). Die Modelle ähneln dem oben vorgestellten Reaktionsnetzwerk.

Auf Basis dieser Informationsgrundlage und mit den experimentellen Raten D, $q_{Glukose}$, q_{O2}, q_{CO2}, q_{H+} und m_S in Tabelle 6.2 konnten die Reaktionsgleichungen C.1-C.3 von Herrn Ringger berechnet werden. Raten wurden dabei auf die Einheit [mmol $g_{DW}^{-1}h^{-1}$] normiert.

$$0,571 \cdot C_6H_{12}O_6 + 0,279 \cdot NH_4^+ + 0,019 \cdot HPO_4^{2-} + 0,004 \cdot SO_4^{2-} + 1,246 \cdot O_2 + 0,036 \cdot Me^{1,1+}$$

$$\xrightarrow{D=0,05\ h^{-1}} 0,00168 \cdot \text{Biomasse}_{D=0,05} + 2,048 \cdot H_2O + 1,372 \cdot CO_2 + 0,286 \cdot H^+ \quad \text{(C.1)}$$

Summenformeln in Gleichung C.1 (D=0,05 h^{-1}), C.2 (D=0,10 h^{-1}) und C.3 (D=0,30 h^{-1}) stehen für die Fließgleichgewichte bei den Durchflussraten D. Kürzel: $C_6H_{12}O_6$: Glukose, O_2: Sauerstoff, NH_4^+: Ammonium, HPO_4^{2-}: Phosphat, SO_4^{2-}: Sulfat, H_2O: Wasser und CO_2: Kohlendioxid. Summenformeln für $Me^{1,1+}$: Metall und Biomasse wurden in Tabelle C.3 beschrieben.

$$1,087 \cdot C_6H_{12}O_6 + 0,558 \cdot NH_4^+ + 0,038 \cdot HPO_4^{2-} + 0,008 \cdot SO_4^{2-} + 2,611 \cdot O_2 + 0,067 \cdot Me^{1,1+}$$

$$\xrightarrow{D=0,1\ h^{-1}} 0,00319 \cdot \text{Biomasse}_{D=0,1} + 4,119 \cdot H_2O + 2,792 \cdot CO_2 + 0,564 \cdot H^+ \quad \text{(C.2)}$$

Siehe Gleichung C.1

$$3,348 \cdot C_6H_{12}O_6 + 1,832 \cdot NH_4^+ + 0,118 \cdot HPO_4^{2-} + 0,032 \cdot SO_4^{2-} + 7,854 \cdot O_2 + 0,204 \cdot Me^{1,1+}$$

$$\xrightarrow{D=0,3h^{-1}} 0,0103 \cdot \text{Biomasse}_{D=0,3} + 1,2686 \cdot H_2O + 8,495 \cdot CO_2 + 1,852 \cdot H^+ \quad \text{(C.3)}$$

Siehe Gleichung C.1

Anhang D

Differentielle Genexpression

D.1 Identifizierte *Genome Ontology*-Termini bei CO_2-Belastung

Der analysierte Datensatz besteht aus 22 NGS-Messungen (Abs. 3.11.1). Jede der elf Bedingungen (D: 0,05 h^{-1}, 0,1 h^{-1}; Ref: t_0; X: t_{10} [min], t_{30} [min], t_{60} [min], t_{50} [h] und t_{100} [h]) wurde im biologischen Duplikat angefertigt. Zur Berechnung der DGE in neun Fällen wurden jeweils vier NGS-Messungen verwendet (2·Ref. und 2·X). Die Annotierung der Reads gegen das Referenzgenom identifizierte 6289 Gensequenzen aus 6476 derzeit erfassten *S. cerevisiae* Genen. Aus 4·6289 Count-Messungen (25156 CPMs) wurde die DGE bei einem *fold change* (FC) von 1 ermittelt. Eine signifikante Anzahl k an Genen eines *Genome Ontology*-Terms G_{GO} wurde in der Menge positiv regulierter Gene (G_p), negativ regulierter Gene (G_n) oder der Schnittmenge beider Mengen ($G \in \{G_p, G_n\}$) identifiziert (siehe Abs. 3.11.2). Das Verfahren wurde mit gesenktem FC wiederholt um die Anzahl identifizierter Gene zu steigern. Nachfolgend dargestellt wurden nur GO-Termini, die in mindestens einem Fall im ersten Durchlauf (FC>1) identifiziert wurden. Das steigert die Sensitivität zur Wiederfindung bereits identifizierter GO-Termini in anderen Fällen.

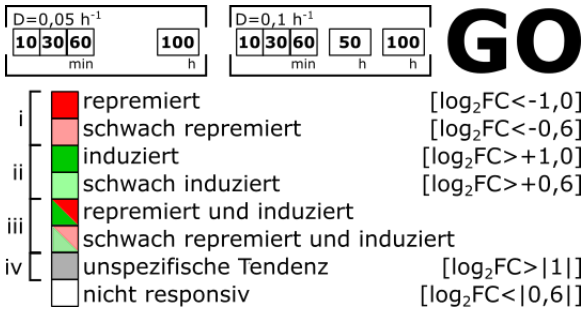


ABBILDUNG D.1: GO-Termini in denen die Anzahl der differentiell expremierten Gene (G_n und/oder G_p) das Signifikanzniveau (p<0,05) erreicht, sind in den Abbildungen D.2, D.3, D.4, D.5 und D.6 dargestellt. GO-Termini mit hellen Farben und Grau wurden in zweiter und dritter Identifikation erkannt. Es gilt: Rot) $G_{GO} \subseteq G_n$, Grün) $G_{GO} \subseteq G_p$, Rot/Grün) $G_{GO} \subseteq G_p \triangle G_n$, Grau) $G_{GO} \subseteq G$.

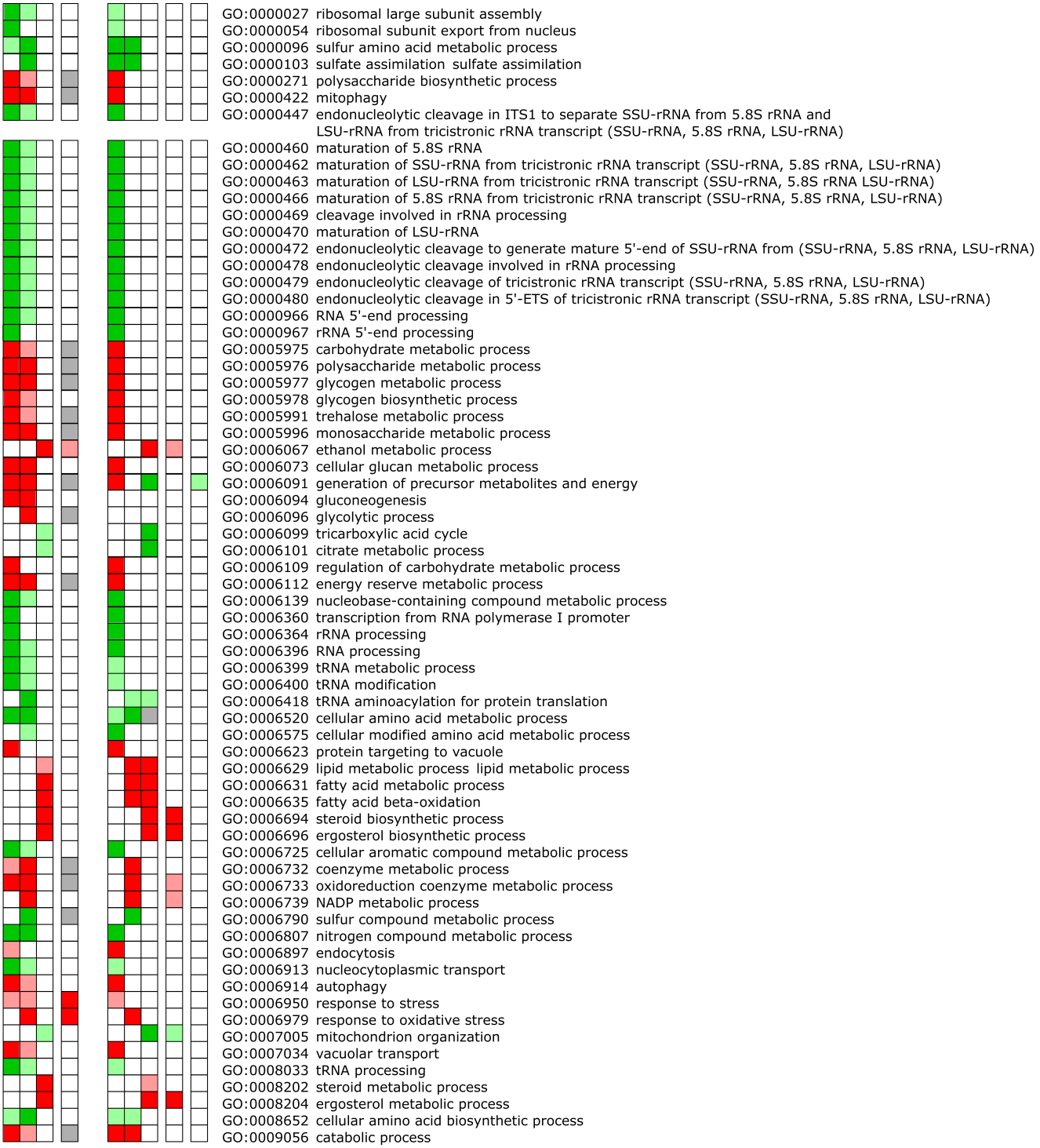


ABBILDUNG D.2: Durch NGS-Expressionsanalyse wurden bei der Bedrohung durch steigende CO_2-Gehalte und anhaltende CO_2-Belastung 200 biologische Prozesse (GO-Termini) als differentiell reguliert identifiziert. Die Farbkodierung ist der Legende (Abb. D.1) zu entnehmen.

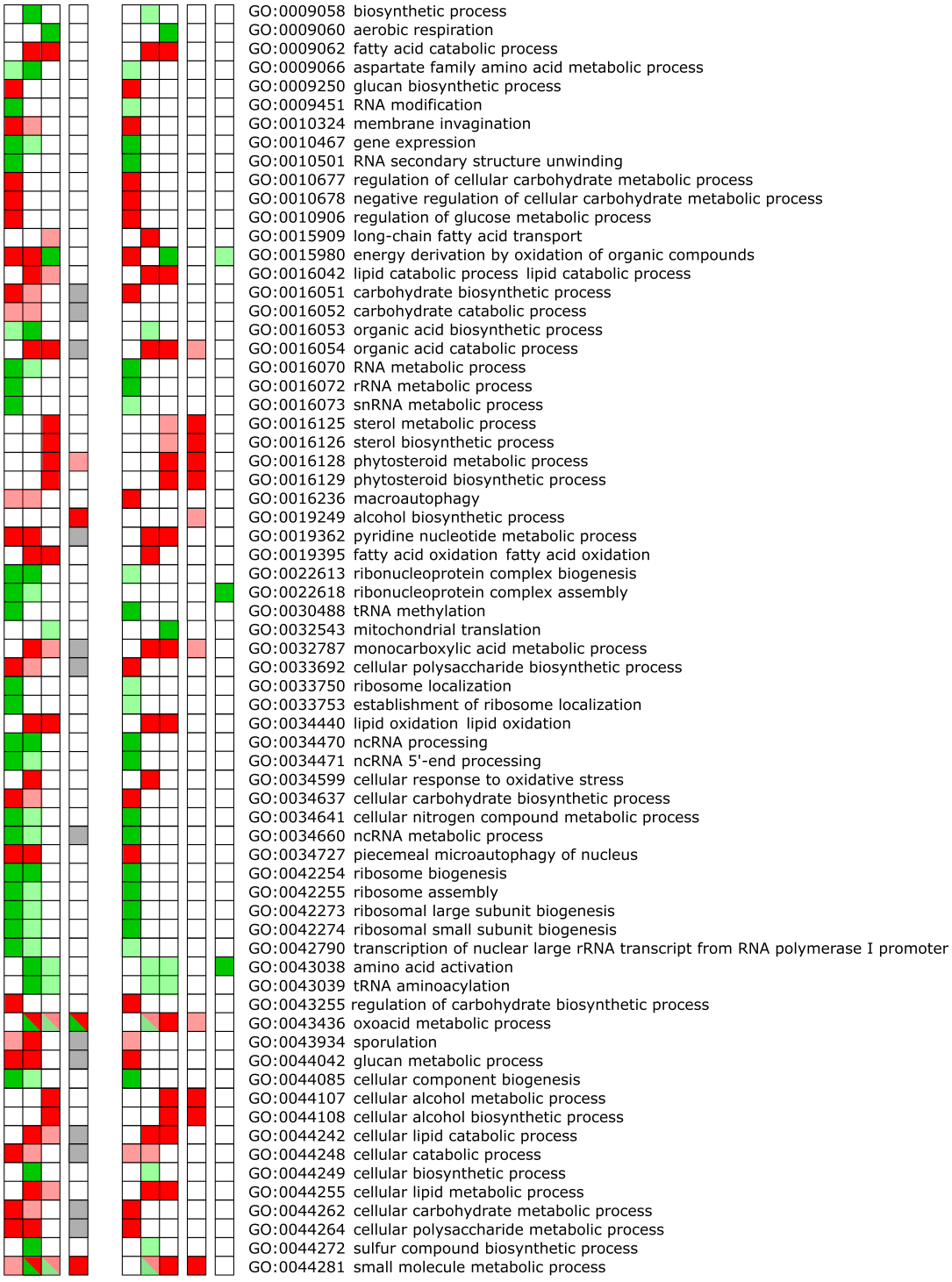


ABBILDUNG D.3: Durch NGS-Expressionsanalyse wurden bei der Bedrohung durch steigende CO_2-Gehalte und anhaltende CO_2-Belastung 200 biologische Prozesse (GO-Termini) als differentiell reguliert identifiziert. Die Farbkodierung ist der Legende (Abb. D.1) zu entnehmen.

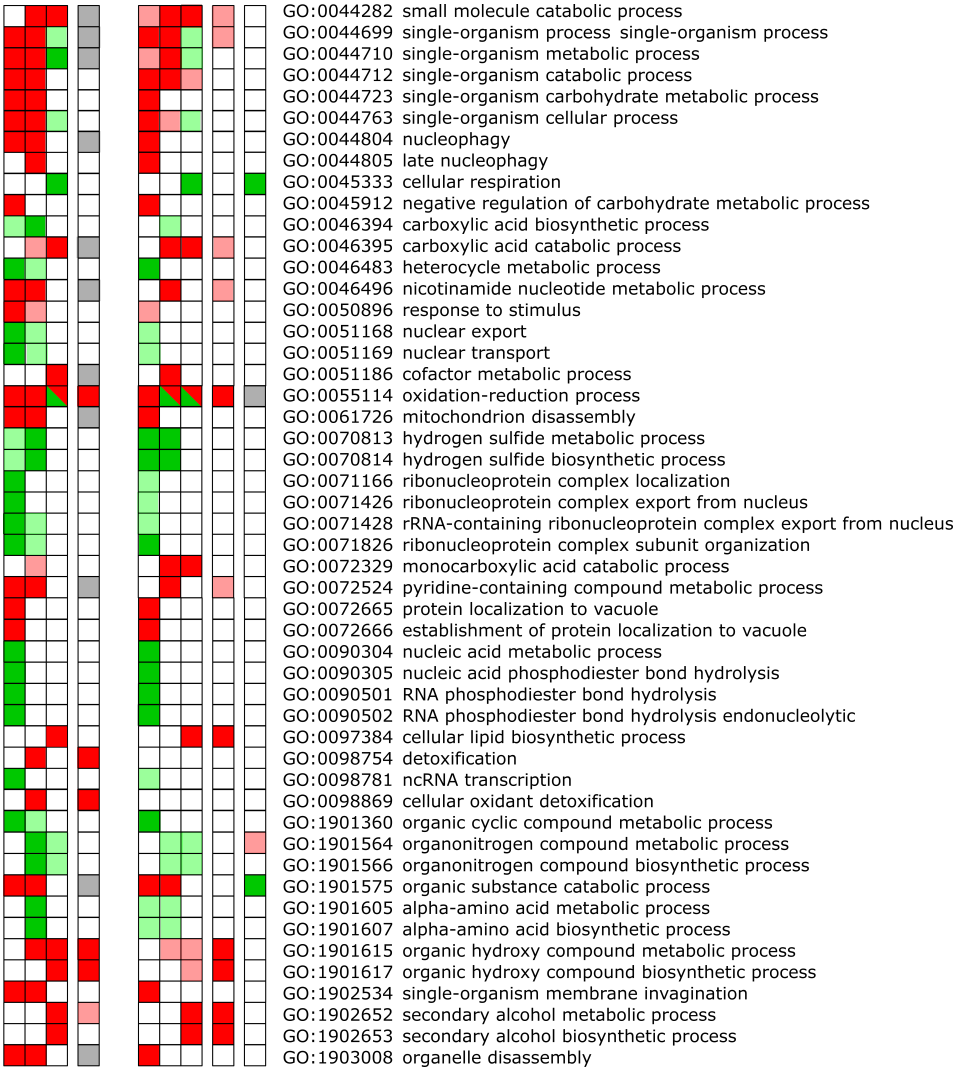


ABBILDUNG D.4: Durch NGS-Expressionsanalyse wurden bei der Bedrohung durch steigende CO_2-Gehalte und anhaltende CO_2-Belastung 200 biologische Prozesse (GO-Termini) als differentiell reguliert identifiziert. Die Farbkodierung ist der Legende (Abb. D.1) zu entnehmen.

Demnach können GO-Termini auf vier Arten identifiziert werden: i) $G_{GO} \subseteq G_n$, ii) $G_{GO} \subseteq G_p$, iii) $G_{GO} \subseteq G_p \triangle G_n$, iv) $G_{GO} \subseteq G$. Art i) und ii) zeigen einen klaren Trend zur Repression bzw. Induktion des GO-Terms. Art iii) weist für eine signifikante Anzahl unterschiedlicher Gene innerhalb des GO-Terms eine Repression und eine Induktion auf. Art iv) zeigt eine geringe Anzahl regulierter Gene und erreicht daher nur in der Summe von G_n und G_n die signifikane Anzahl erforderlicher Gene. Abbildung D.1 beschreibt den Aufbau der Resultate in den Abbildungen D.2 bis D.6.

ABBILDUNG D.5: Durch NGS-Expressionsanalyse wurden bei der Belastung von Hefe durch steigende CO_2-Gehalte 65 zelluläre Komponenten (GO-Termini) als differentiell reguliert identifiziert. Die Farbkodierung ist der Legende (Abb. D.1) zu entnehmen.

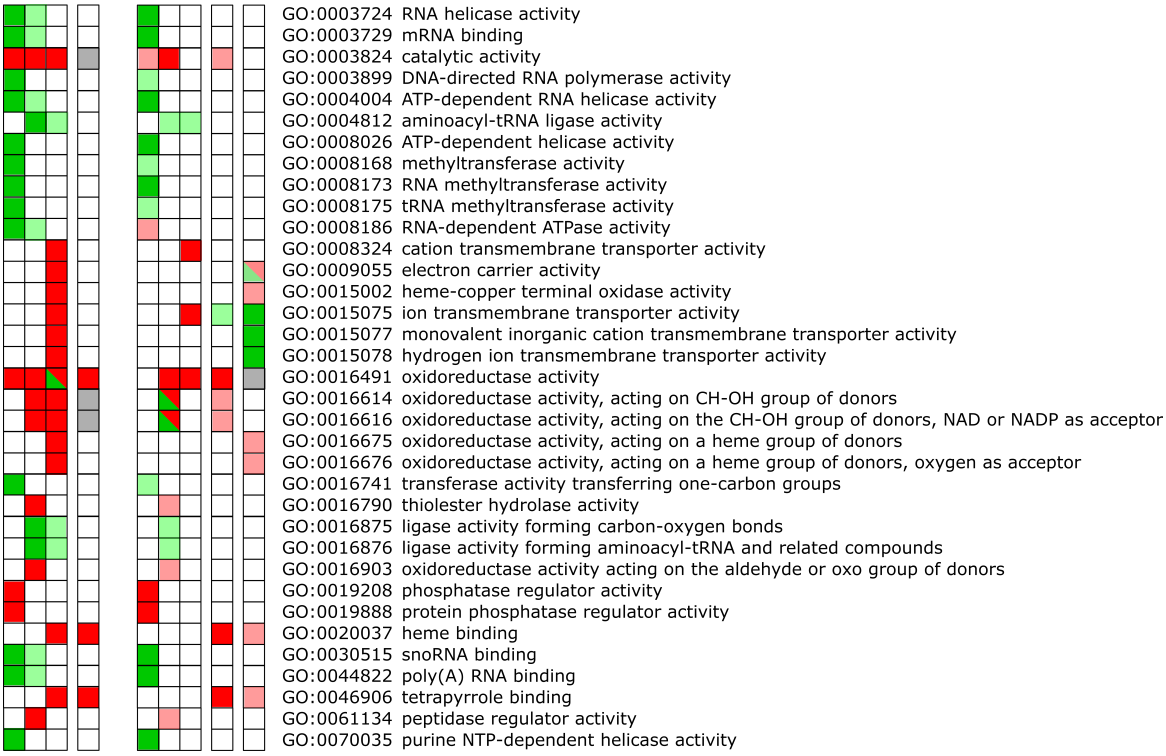


ABBILDUNG D.6: Durch NGS-Expressionsanalyse wurden bei der Bedrohung durch steigende CO_2-Gehalte und anhaltende CO_2-Belastung 35 molekulare Funktionen (GO-Termini) als differentiell reguliert identifiziert. Die Farbkodierung ist der Legende (Abb. D.1) zu entnehmen.

Anhang E

Gene

E.1 Liste der Gene

Die Gene wurden nach ihrer Position im Genom von CEN.PK113-7D geordnet. Eine ausführliche Beschreibung der Sequenz, Position, Funktion und Regulation der Gene findet sich in der Saccharomyces Genomdatenbank[1].

E.1.1 Chromosom I

TABELLE E.1: Liste der Gene in dieser Arbeit, die auf Chromosom I lokalisiert sind.

Sys. Name	Gen	Funktion
YAL040C	CLN3	G_1-Cyclin beteiligt am Zellzyklus
YAL029C	MYO4	Type V Myosinmotor zum actinvermittelten Transport
YAL030W	SNC1	Vesikel-Membranrezeptorprotein (v-SNARE)
YAL062W	GDH3	$NADP^+$-abhängige Glutamatdehydrogenase
YAL038W	CDC19	Pyruvatkinase
YAL054C	ACS1	Acetyl-CoA Synthetase
YAL012W	CYC3	Cystathionine γ-Lyase
YAL046C	BOL3	Transfer von Fe-S-*cluster*
YAL044W-A	BOL1	Fe-S-*cluster* Biogenese
YAR015W	ADE1	N-Succinyl-5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribotid Synthetase
YAL044C	GCV3	Untereinheit H des mitochondriellen Glycin-Decarboxylase-Komplex
YAR020C	PAU7	Mitglied der seripauperin Multigenfamilie
YAR035W	YAT1	Carnitin-Acetyltransferase
YAL012W	CYS3	Cystathionin γ-Lyase

[1] http://www.yeastgenome.org/

E.1.2 Chromosom II

TABELLE E.2: Liste der Gene in dieser Arbeit, die auf Chromosom II lokalisiert sind.

Sys. Name	Gen	Funktion
YBL005W	PDR3	Transkriptionsaktivator
YBR302C	COS2	Endosomales Protein beteiligt am Wechsel von Plasmamembranproteine
YBR112C	CYC8	Allgemeiner co-Repressor der Transkription
YBL099W	ATP1	α-Untereinheit der F1-Einheit der mitochondriellen ATP-Synthase
YBR039W	ATP3	γ-Untereinheit der F1-Einheit der mitochondriellen ATP-Synthase
YBL045C	COR1	Untereinheit 1 des Ubiquinol-Cytochrome-c-Reduktase-Komplex
YBL030C	AAC2	Haupt-ADP/ATP-Translokator in Mitochondrien
YBR085W	AAC3	Mitochondrieller ADP/ATP-Translokator
YBR140C	IRA1	GTPase-aktiviertes Protein
YBR066C	NRG2	Transkriptioneller Repressor
YBR235W	VHC1	Kation/Chlorid co-Transporter
YBR054W	YRO2	Beteiligung an der Antwort auf Säurestress
YBR286W	APE3	Vakuoläre Aminopeptidase Y
YBR230C	OM14	Rezeptor der äußeren Mitochondrienmembran für cytosolische Ribosomen
YBR293W	VBA2	Aminosäurepermease der Vakuole
YBR291C	CTP1	Mitochondrieller Citrattransporter
YBR104W	YMC2	Mutmaßlicher mitochondrieller Transporter
YBL089W	AVT5	Transporter
YBR196C	PGI1	Phosphoglucose-Isomerase
YBR221C	PDB1	E1 β-Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplex
YBR091C	TIM12	Protein der inneren Mitochondrienmembran
YBR294W	SUL1	Sulfatpermease
YBR213W	MET8	Dehydrogenase und Ferrochelatase
YBL071W-A	KTI11	Synthese von Diphthamid
YBR246W	RRT2	Synthese von Diphthamid
YBR207W	FTH1	Eisentransporter
YBR263W	SHM1	Mitochondrielle Serin-Hydroxymethyl-Transferase
YBR084W	MIS1	Mitochondrielle C1-Tetrahydrofolat Synthase
YBR248C	HIS7	Imidazolglycerol-Phosphat Synthase
YBL039C	URA7	CTP Synthase
YBL021C	HAP3	Untereinheit des Hap2p/3p/4p/5p CCAAT-bindenden Komplex
YBR105C	VID24	GID Komplex Regulator Untereinheit
YBL075C	SSA3	ATPase zur Proteinfaltung und Stressantwort
YBR072W	HSP26	kleines HSP mit Chaperonaktivität

Fortsetzung Chromosom II

Tabelle E.2 – *Fortsetzung Chromosom II*

Sys. Name	Gen	Funktion
YBR169C	SSE2	Mitglied der HSP70-Familie
YBL015W	ACH1	Protein mit CoA Transferase Aktivität
YBL103C	RTG3	Transkriptionsfaktor
YBL080C	PET112	Untereinheit des GatFAB-Amidotransferase-Komplex
YBL022C	PIM1	ATP-abhängige Lon Protease
YBR133C	HSL7	Arginin N-methyltransferase
YBR301W	DAN3	Zellwand Mannoprotein
YBR179C	FZO1	Mitochondrielle Fusion
YBR160W	CDC28	Cyclin-abhängige Kinase

E.1.3 Chromosom III

TABELLE E.3: Liste der Gene in dieser Arbeit, die auf Chromosom III lokalisiert sind.

Sys. Name	Gen	Funktion
YCR021C	HSP30	Negativregulator der H^+-ATPase Pma1p
YCR084C	TUP1	Allgemeiner co-Repressor der Transkription
YCL040W	GLK1	Glukokinase
YCL018W	LEU2	β-Isopropylmalat Dehydrogenase
YCL017C	NFS1	Cystein Desulfurase
YCL030C	HIS4	Phosphoribosyl-ATP-Pyrophosphatase
YCL048W-A		mögliches Protein mit unbekannter Funktion
YCR005C	CIT2	Citrat-Synthase
YCR008W	HAL4	Ser/Thr Proteinkinase für Salztoleranz

E.1.4 Chromosom IV

TABELLE E.4: Liste der Gene in dieser Arbeit, die auf Chromosom IV lokalisiert sind.

Sys. Name	Gen	Funktion
YDL022W	GPD1	NAD-abhängige Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase
YDR040C	ENA1	P-Typ ATPase Natriumpumpe
YDR436W	PPZ2	Ser/Thr Proteinphosphatase Z
YDR477W	SNF1	AMP-aktivierte Ser/Thr Proteinkinase
YDR490C	PKH1	Ser/Thr Proteinkinase
YDR423C	YAP2	Leucinzipper (bZIP)Transkriptionsfaktor
YDR259C	YAP6	Leucinzipper (bZIP)Transkriptionsfaktor
YDR298C	ATP5	Untereinheit 5 des Stator der mitochondriellen ATP-Synthase
YDL085W	NDE2	Mitochondrielle externe NADH-Dehydrogenase

FortsetzungChromosom IV

Tabelle E.4 – *Fortsetzung Chromosom IV*

Sys. Name	**Gen**	**Funktion**
YDR529C	QCR7	Untereinheit 7 des Ubiquinol-Cytochrome-c-Reduktase-Komplex
YDR044W	HEM13	co-Proporphyrinogen III Oxidase
YDR155C	CPR1	Cytoplasmatische Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerase
YDR001C	NTH1	Neutrale Trehalase
YDR043C	NRG1	Transkriptioneller Repressor
YDL042C	SIR2	Histondeacetylase der Sirtuin-Familie
YDR227W	SIR4	Assemblierung von ruhenden Chromatindomänen
YDR256C	CTA1	Katalase A
YDR223W	CRF1	Transkriptioneller co-Repressor
YDR335W	MSN5	Karyopherin
YDR456W	NHX1	Na^+/H^+ und K^+/H^+ Antiporter
YDL185W	VMA1	Untereinheit A der V1 Einheit der V-ATPase
YDR033W	MRH1	Plasmamembranprotein
YDR276C	PMP3	Plasmamembranprotein
YDR184C	ATC1	Nukleäres Protein
YDR525W-A	SNA2	Funktion unbekannt
YDR536W	STL1	Glycerol/H^+ Symporter
YDL137W	ARF2	Faktor zur ADP-Ribosylierung
YDR099W	BMH2	Reguliert die Exocytose, den Vesikltransport, die Ras/MAPK und Rapamycin-sensitive Signalgebung
YDR385W	EFT2	Elongationsfaktor 2
YDR309C	GIC2	Sproßinitioation und Zellpolarisation
YDR002W	YRB1	GTPase-Aktivität für nukleären Proteinimport und RNA-Export
YDL126C	CDC48	ATPase
YDL132W	CDC53	Cullin
YDR225W	HTA1	Histone H2A
YDR213W	UPC2	Sterolregulator
YDL171C	GLT1	NAD^+-abhängige Gultamatsynthase
YDL215C	GDH2	NAD^+-abhängige Glutamatdehydrogenase
YDL210W	UGA4	GABA Permease
YDR384C	ATO3	Mutmaßliche Ammoniumpermease
YDR148C	KGD2	Dihydrolipoyl-trans-Succinylase
YDL021W	GPM2	Phosphoglycerat-Mutase
YDR050C	TPI1	Triosephosphat-Isomerase
YDL066W	IDP1	Isocitratdehydrogenase
YDR502C	SAM2	S-Adenosylmethionin Synthetase
YDL217C	TIM22	Komponente des TIM22-Komplex
YDR253C	MET32	Transkriptionsfaktor
YDR534C	FIT1	Mannoprotein

FortsetzungChromosom IV

Tabelle E.4 – *Fortsetzung Chromosom IV*

Sys. Name	**Gen**	**Funktion**
YDR270W	CCC2	ATPase zum Cu^{2+}-Transport
YDL120W	YFH1	Eisen-Chaperon der mitochondriellen Matrix
YDR379C-A	SDH6	Assemblierung des Succinat-Dehydrogenase-Komplex
YDR511W	SDH7	Assemblierung des Succinat-Dehydrogenase-Komplex
YDR267C	CIA1	Komponente eines Komplex zur Assemblierung cytosolischen Fe-S-Protein
YDR098C	GRX3	Glutathion-abhängige Oxidoreduktase
YDL106C	BAS2	Transkriptionsfaktor
YDR019C	GCV1	UE T des mitochondriellen Glycin-Decarboxylase-Komplex
YDR343C	HXT6	Glukosetransporter mit hoher Affinität
YDL223C	HBT1	Shmoo tip Protein
YDR055W	PST1	Zellwandprotein mit GPI-Bindestelle
YDR453C	TSA2	Stressinduzierbare Thioredoxin-Peroxidase
YDL222C	FMP45	Integrales Membranprotein
YDL204W	RTN2	Reticulon Protein
YDL218W		mögliches Protein mit unbekannter Funktion
YDL067C	COX9	Untereinheit VIIa des Cytochrom-c-Oxidase-Komplex
YDL005C	MED2	Untereinheit des RNA-Polymerase-II-Vermittlerkomplex
YDR178W	SDH4	Membran-Anker-Einheit der Succinat Dehydrogenase
YDR392W	SPT3	Untereinheit des SAGA- und SAGA-*like*-Transkript-Regulator-Komplexes
YDR207C	UME6	Untereinheit des Rpd3L-Histon-Deacetylase-Komplex
YDR362C	TFC6	Untereinheit des RNA-Polymerase-III-Transkriptions-Initiationsfaktor-Komplex
YDR463W	STP1	Transkriptionsfaktor
YDL170W	UGA3	Transkriptioneller Aktivator von GABA-Genen
YDR175C	RSM24	Mitochondrielles ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YDL214C	PRR2	Ser/Thr Proteinkinase
YDL128W	VCX1	Ca^{2+}/H^{+} und K^{+}/H^{+} Antiporter
YDR216W	ADR1	Transkriptionsfaktor für alternative C-Quellen
YDR232W	HEM1	5-Aminolevulinat Synthase
YDL205C	HEM3	Porphobilinogen Deaminase
YDL227C	HO	HO-Rekombinase mit spezifischer Endonuklease Aktivität

E.1.5 Chromosom V

TABELLE E.5: Liste der Gene in dieser Arbeit, die auf Chromosom V lokalisiert sind.

Sys. Name	Gen	Funktion
YER045C	ACA1	Leucinzipper (bZIP)Transkriptionsfaktor der ATF/CREB-Familie
YEL009C	GCN4	bZIP Transkriptionsfaktor der Aminosäurebiosynthese
YEL039C	CYC7	Cytochrome-c Iso-Untereinheit
YEL034W	TIF51a	Translationselongationsfaktor eIF-5A
YER177W	BMH1	Reguliert die Exocytose, den Vesikltransport, die Ras/MAPK und Rapamycin-sensitive Signalgebung
YEL017C-A	PMP2	Proteolipid assoziiert mit der Plasmamembran-H^+-ATPase
YER026C	CHO1	Phosphatidylserine-Synthase
YER044C	ERG28	Membranprotein des Endoplasmatischen Retikulums
YER110C	KAP123	Karyopherin β
YEL060C	PRB1	Vakuoläre Proteinase B mit Endopeptidaseaktivität
YER073W	ALD5	Aldehyd-Dehydrogenase
YER178W	PDA1	E1 α-Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplex
YER081W	SER3	3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase und α-Ketoglutarat-Reduktase
YER052C	HOM3	Aspartatkinase
YER091C	MET6	Cobalamin-unabhängige Methionin Synthase
YER043C	SAH1	S-Adenosyl-L-homocystein Hydrolase
YER086W	ILV1	Threonin Deaminase
YEL065W	ARN3	Ferrioxamin B transporter
YER145C	FTR1	Eisenpermease
YER048W-A	ISD11	Cystein Desulfurase Aktivator
YER174C	GRX4	Glutathion-abhängige Oxidoreduktase
YER055C	HIS1	ATP Phosphoribosyltransferase
YEL021W	URA3	Orotidin-5-Phosphat Decarboxylase
YER096W	SHC1	Chs3p Aktivator (Chitin Synthase III)
YEL071W	DLD3	2-Hydroxyglutarat Transhydrogenase (und LDH)
YEL049W	PAU2	Mitglied der seripauperin Multigenfamilie
YER064C	VHR2	nicht-essentielles Protein
YER062C	GPP2	Glycerol-3-phosphat Phosphatase
YER159C	BUR6	Untereinheit des NC2-Transkript-Regulator-Komplex
YER017C	AFG3	mitochondrielle Protease-Komponente
YEL050C	RML2	Mitochondrielles ribosomales Protein der großen Untereinheit
YER011W	TIR1	Zellwand Mannoprotein

E.1.6 Chromosom VI

TABELLE E.6: Liste der Gene in dieser Arbeit, die auf Chromosom VI lokalisiert sind.

Sys. Name	Gen	Funktion
YFL062W	COS4	Endosomales Protein beteiligt am Wechsel von Plasmamembranproteine
YFR033C	QCR6	Untereinheit 6 des Ubiquinol-Cytochrome-c-Reduktase-Komplex
YFR053C	HXK1	Hexokinase
YFL054C	AQY3	Aquaporin
YFL018C	LPD1	Dihydrolipoamid-Dehydrogenase
YFR030W	MET10	α-Untereinheit der Sulfit-Rduktase
YFL014W	HSP12	HOG-reguliertes Membranprotein

E.1.7 Chromosom VII

TABELLE E.7: Liste der Gene in dieser Arbeit, die auf Chromosom VII lokalisiert sind.

Sys. Name	Gen	Funktion
YGL062W	PYC1	Pyruvate-Carboxylase
YGR138C	TPO2	Polyamintransporter
YGL013C	PDR1	Transkriptionsfaktor
YGL008C	PMA1	Plasmamembran P_2-Typ H^+-ATPase
YGL263W	COS12	Endosomales Protein beteiligt am Wechsel von Plasmamembranproteine
YGR140W	CBF2	Essentielles Kinetochorprotein
YGR183C	QCR9	UE 9 des Ubiquinol-Cytochrome-c-Reduktase-Komplex
YGL162W	SUT1	Transkriptionsfaktor der Zn2Cys6 Familie
YGL055W	OLE1	Δ9 Fettsäuredesaturase
YGL253W	HXK2	Hexokinase
YGR240C	PFK1	αUntereinheit der Phosphofruktokinase (Heterooktamer)
YGL248W	PDE1	cAMP-Phosphodiesterase mit niedriger Affinität
YGL184C	STR3	Peroxisomale Cystathioninlyase
YGR256W	GND2	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
YGL035C	MIG1	Transkriptionsfaktor
YGL209W	MIG2	Transkriptioneller Repressor mit Zinkfinger Motiv
YGL205W	POX1	Fettacyl-CoA-Oxidase
YGL073W	HSF1	Hitzeschock Transkriptionsfaktor
YGR020C	VMA7	Untereinheit F der V1 Einheit der V-ATPase
YGR142W	BTN2	v-SNARE Bindeprotein
YGR217W	CCH1	Spannungsabhängiger Ca^{2+}-Kanal mit hoher Affinität

Fortsetzung Chromosom VII

Tabelle E.7 – *Fortsetzung Chromosom VII*

Sys. Name	**Gen**	**Funktion**
YGR097W	ASK10	Regulator des Fps1p Glycerolkanals
YGL071W	AFT1	Transkriptionsfaktor der Eisenaufnahme und -Homöostase
YGR282C	BGL2	Endo-β-1,3-glucanase
YGR060W	ERG25	C4-Methylsterol-Oxidase
YGR284C	ERV29	Vesikelbildung und Eingliederung spezifischer sekretorischer Fracht
YGR243W	MPC3	Untereinheit des mitochondriellen Pyruvattransporters
YGL080W	MPC1	Untereinheit des mitochondriellen Pyruvattransporters
YGR159C	NSR1	pre-rRNA Prozessierung und Ribosomenbiogenese
YGR058W	PEF1	Polare Sproßbildung und Zellwandabtrennung
YGR086C	PIL1	Eisosomenkernkomponente
YGL147C	RPL9A	Protein L9A der ribosomalen 60S-Untereinheit
YGR192C	TDH3	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
YGR162W	TIF4631	Translationsinitiationsfaktor eIF4G
YGR082W	TOM20	Komponente des TOM-Komplex
YGR248W	SOL4	6-Phosphogluconolactonase
YGR096W	TPC1	Mitochondrieller Transporter
YGR121C	MEP1	Ammoniumpermease
YGR193C	PDX1	E3-Bindeprotein des Pyruvatdehydrogenase Komplex
YGR244C	LSC2	β-Untereinheit der Succinyl-CoA Ligase
YGR208W	SER2	Phosphoserin Phosphatase
YGR155W	CYC4	Cystathionin β-Synthase
YGL009C	LEU1	Isopropylmalat Isomerase
YGR033C	TIM21	Komponente des TIM23-Komplex
YGR181W	TIM13	Protein im Intermembranraum
YGL018C	JAC1	FE-S-*cluster* Biogenese
YGR029W	ERV1	Flavin-abhängige Sulfhydryl-Oxidase
YGL091C	NBP35	Fe-S-*cluster* Bindeprotein
YGL234W	ADE5,7	Purin Biosynthese
YGR061C	ADE6	Formylglycinamidin-Ribonukleotid Synthetase
YGR204W	ADE3	C1-Tetrahydrofolat Synthase
YGR208W	SER2	Phosphoserin Phosphatase
YGL125W	MET13	Isozyme der Methylentetrahydrofolat Reductase
YGR008C	STF2	Resistenz gegen Trockenstress, bindet F0 Einheit der ATPase
YGL237C	HAP2	Untereinheit des Hap2p/3p/4p/5p CCAAT-bindenden Komplex
YGR087C	PDC7	Pyruvat Decarboxylase Isoform
YGR088W	CTT1	Katalase T
YGR144W	THI4	Thiazole Synthase
YOL052C-A	DDR2	Multi-Stressantwort Protein

Fortsetzung Chromosom VII

Tabelle E.7 – *Fortsetzung Chromosom VII*

Sys. Name	Gen	Funktion
YGR236C	SPG1	überleben bei hoher Temperatur
YGR280C	PXR1	rRNA und snoRNA Reifung
YGR043C	NQM1	Transaldolase unbekannter Funktion
YGR201C		mögliches Protein mit unbekannter Funktion
YGL187C	COX4	Untereinheit IV des Cytochrom-c-Oxidase-Komplex
YGR116W	SPT6	Protein zur Remodulation des Nukleosoms
YGR252W	GCN5	Untereinheit der ADA- und SAGA-Histon-Acetyl-transferase-Komplexe
YGR131W	FHN1	Ketoconazol-induziertes Protein unbekannter Funktion
YGR175C	ERG1	Squalen Epoxidase
YGL191W	COX13	Untereinheit VIa des Cytochrom-c-Oxidase-Komplex
YGL040C	HEM2	Aminolevulinate Dehydratase

E.1.8 Chromosom VIII

TABELLE E.8: Liste der Gene in dieser Arbeit, die auf Chromosom VIII lokalisiert sind.

Sys. Name	Gen	Funktion
YHR162W	MPC2	Untereinheit des mitochondriellen Pyruvattransporters
YHR178W	STB5	Transkriptionsfaktor
YHR135C	YCK1	Palmitoylierte Plasmamembran-gebundene Casein-kinase I Isoform
YHR205W	Sch9	Proteinkinase der AGC-Familie
YHL009C	YAP3	Leucinzipper (bZIP)Transkriptionsfaktor
YHR206W	SKN7	Nukleärer Antwortfaktor und Transkriptionsfaktor
YHR007C	ERG11	Lanosterol 14-α-Demethylase
YHL008C		Beteiligt an der Aufnahme von Chloridionen
YHR084W	STE12	MAPK-Signal aktivierter Transkriptionsfaktor
YHR002W	LEU5	Mitochondrielles *Carrier*-Protein
YHR025W	THR1	Homoserinkinase
YHR208W	BAT1	Aminotransferase
YHR005C-A	TIM10	Protein im Intermembranraum
YHL040C	ARN1	Eisen-Chelat-Transporter
YHL047C	ARN2	Transporter
YHR216W	IMD2	Inosinmonophosphate-Dehydrogenase
YHR216W	IMD2	Inosinmonophosphat Dehydrogenase
YHR148W	IMP3	Komponent des SSU Prozessoms
YHR051W	COX6	Untereinheit VI des Cytochrom-c-Oxidase-Komplex
YHR096C	HXT5	Hexosetransporter mit moderater Affinität

Fortsetzung Chromosom VIII

Tabelle E.8 – *Fortsetzung Chromosom VIII*

Sys. Name	Gen	Funktion
YHR139C	SPS100	Protein zur Reifung der Sporenwand
YHR058C	MED6	Untereinheit des RNA-Polymerase-II-Vermittler-Komplex
YHL038C	CBP2	*Splicing* von prä-mRNA
YHR168W	MTG2	Mutmaßliche GTPase mit der großen ribosomalen UE assoziiert

E.1.9 Chromosom IX

TABELLE E.9: Liste der Gene in dieser Arbeit, die auf Chromosom IX lokalisiert sind.

Sys. Name	Gen	Funktion
YIL036W	CST6	Leucinzipper (bZIP)Transkriptionsfaktor der ATF/CREB-Familie
YIR018W	YAP5	Leucinzipper (bZIP)Transkriptionsfaktor
YIL155C	GUT2	Mitochondrielle Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase
YIR033W	MGA2	Membranprotein des Endoplasmatischen Retikulums
YIL111W	COX5b	Untereinheit Vb der Cytochrom-c-Oxidase-Komplex
YIL033C	BCY1	Regulatorische Untereinheit der PKA
YIL160C	POT1	3-Ketoacyl-CoA-Thiolase
YIL087C	AIM19	Funktion unbekannt
YIL101C	XBP1	Transkriptioneller Repressor
YIL125W	KGD1	Untereinheit des mitochondriellen αKetoglutarat-dehydrogenase-Komplex
YIL022W	TIM44	Komponente des TIM23-Komplex
YIR017C	MET28	Transkriptioneller Aktivator
YIL103W	DPH1	Synthese von Diphthamid
YIL003W	CFD1	Fe-S-*cluster* Bindeprotein
YIL020C	HIS6	Phosphoribosylformimino-5-Aminoimidazol-Carboxamid-Ribotid Isomerase
YIR038C	GTT1	Glutathione S-Transferase
YIL131C	FKH1	Transkriptionsfaktor
YIL011W	TIR3	Zellwand Mannoprotein
YIL065C	FIS1	Mitochondrielle Abschnürung und peroxisomale Anteile
YIL131C	GCR1	Transkriptionsaktivator von Genen der Glykolyse

E.1.10 Chromosom X

TABELLE E.10: Liste der Gene in dieser Arbeit, die auf Chromosom X lokalisiert sind.

Sys. Name	Gen	Funktion
YJL093C	TOK1	Kaliumkanal
YJL129C	TRK1	Komponente des Trk1p-Trk2p Kaliumtransportsystems
YJR059W	PTK2	Serin/Threonin Proteinkinase
YJL059W	YHC3	Protein zum ATP-anhängigen Arginintransport
YJL165C	HAL5	Putative Proteinkinase
YJR161C	COS5	Endosomales Protein beteiligt am Wechsel von Plasmamembranproteine
YJR121W	ATP2	β-UE der F1-Einheit der mitochondriellen ATP-Synthase
YJL180C	ATP12	Assemblierunfsfaktor der F1 Einheit der mitochondriellen ATP-Synthase
YJL176C	SWI3	UE des SWI/SNF Chromatinremodellierungskomplex
YJR048W	CYC1	Cytochrome-c Iso-Untereinheit
YJR047C	ANB1	Translationselongationsfaktor eIF-5A
YJL164C	TPK1	cAMP-abhängige Proteinkinase Untereinheit
YJL005W	CYR1	Adenylatzyklase
YJL141C	YAK1	Ser/Thr Proteinkinase
YJL212C	OPT1	Proton-gekoppelter Oligopeptidtransporter
YJR104C	SOD1	Superoxide Dismutase
YJL094C	KHA1	K^+/H^+-Antiporter
YJR040W	GEF1	Spannungsabhängiger Chloridkanal
YJL157C	FAR1	CDK inhibitor
YJR001W	AVT1	Vakuolärer Transporter
YJL052W	TDH1	Glycerinaldehyd-3-Phosphate-Dehydrogenase
YJR095W	SFC1	Succinat/Fumarat-Transporter
YJR137C	MET5	β-Untereinheit der Sulfit-Reduktase
YJR016C	ILV3	Dihydroxysäure Dehydratase
YJR148W	BAT2	Aminotransferase
YJR045C	SSC1	ATPase der Hsp70-Familie
YJL104W	TIM16	Untereinheit des Importmotors
YJL143W	TIM17	Komponente des TIM23-Komplex
YJR135W-A	TIM8	Protein im Intermembranraum
YJL054W	TIM54	Komponente des TIM22-Komplex
YJR060W	CBF1	Helix-*loop*-Helix-Protein
YJL101C	GSH1	γ-Glutamylcystein-Synthetase
YJR010W	MET3	ATP Sulfurylase

Fortsetzung Chromosom X

Tabelle E.10 – *Fortsetzung Chromosom X*

Sys. Name	Gen	Funktion
YJL133W	MRS3	Mitochondrieller Eisentransporter
YJR122W	IBA57	Einbau von Fe-S-*cluster* in Proteine
YJL130C	URA2	Carbamoylphosphat Synthetase und Aspartat Transcarbamylase
YJR096W		Xylose und Arabinose Reduktase
YJL133C-A		Funktion unbekannt
YJL208C	NUC1	Nuklease
YJL045W		Succinat-Dehydrogenase-Isozym
YJL213W		Protein mit unbekannter Funktion
YJL045W	SDH1b	Succinat Dehydrogenase Isoenzym
YJL127C	SPT10	Histon-H3-Acetylase, transkriptionelle Regulation
YJR127C	RSF2	Zinkfinger Protein
YJL102W	MEF2	Mitochondrieller translationaler Elongationsfaktor
YJR132W	NMD5	Karyopherin
YJR151C	DAN4	Zellwand Mannoprotein
YJR150C	DAN1	Zellwand Mannoprotein
YJL112W	MDV1	Peripheres Protein zur mitochondriellen Abschnürung

E.1.11 Chromosom XI

TABELLE E.11: Liste der Gene in dieser Arbeit, die auf Chromosom XI lokalisiert sind.

Sys. Name	Gen	Funktion
YKR097W	PCK1	Phosphoenolpyruvate-Carboxykinase
YKL103C	APE1	Aminopeptidase
YKL040C	NFU1	Transfer von Fe-S-*cluster*
YKR050W	TRK2	Komponente des Trk1p-Trk2p Kaliumtransportsystems
YKL109W	HAP4	Transkriptionsfaktor
YKL043W	PHD1	Transkriptionsaktivator für Pseudohyphenbildung
YKL016C	ATP7	Untereinheit d des Stator der mitochondriellen ATP-Synthase
YKL166C	TPK3	cAMP-abhängige Proteinkinase Untereinheit
YKL112W	ABF1	DNA-Bindeprotein mit Chromatinreorganisationsaktivität
YKR101W	SIR1	Protein beteiligt am Silencing der Mat-Loki
YKR009C	FOX2	3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und Enoyl-CoA-Hydratase
YKL217W	JEN1	Monocarboxylat/H^+ Symporter
YKL126W	YPK1	Ser/Thr Proteinkinase
YKL101W	HSL1	Septin-gebundene Proteinkinase, reguliert den Morphogeneseübergang
YKL120W	OAC1	Mitochondrieller Transporter
YKL148C	SDH1	Flavoprotein Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase

Fortsetzung Chromosom XI

Tabelle E.11 – *Fortsetzung Chromosom XI*

Sys. Name	Gen	Funktion
YKL029C	MAE1	Mitochondrielles Malatenzym
YKL060C	FBA1	Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase
YKL152C	GPM1	Phosphoglycerat-Mutase
YKL085W	MDH1	Malatdehydrogenase
YKL001C	MET14	Adenylylsulfatkinase
YKL191W	DPH2	Synthese von Diphthamid
YKR065C	PAM17	Kontituent des TIM23 Komplex
YKR069W	MET1	S-Adenosylmethionin-Uroporphyrinogen-III-Transmethylase
YKL220C	FRE2	Eisenreduktase
YKR052C	MRS4	Mitochondrieller Eisentransporter
YKR071C	DRE2	Cytosolische Fe-S-Protein Assemblierung
YKR099W	BAS1	Transkriptionsfaktor
YKR080W	MTD1	NAD-abhängige 5,10-Methylentetrahydrafolat Dehydrogenase
YKL216W	URA1	Dihydroorotat Dehydrogenase
YKL024C	URA6	Uridylat Kinase
YKL109W	HAP4	Transkriptionsfaktor
YKL163W	PIR3	O-glykosyliertes Zellwandprotein
YKL187C	FAT3	Protein zur Fettsäureaufnahme
YKL107W		mögliche Kurzketten Dehydrogenase/Reduktase
YKL065W-A	DPC7	mögliches Protein mit unbekannter Funktion
YKL141W	SDH3	UE der Succinat Dehydrogenase und der TIM22 Translokase
YKL032C	IXR1	Transkriptioneller Repressor hypoxischer Gene
YKL138C	MRPL31	Große Untereinheit des mitochondriellen ribosomalen Proteins
YKL134C	OCT1	Mitochondrielle Peptidase

E.1.12 Chromosom XII

TABELLE E.12: Liste der Gene in dieser Arbeit, die auf Chromosom XII lokalisiert sind.

Sys. Name	Gen	Funktion
YLR027C	AAS2	Aspartat-Aminotransferase
YLL028W	TPO1	Polyamintransporter
YLR113W	HOG1	Mitogen-aktivierte Proteinkinase zur Osmoregulation
YLL043W	FPS1	Aquaporin
YLR138W	NHA1	Na^+/H^+-Antiporter
YLR109W	AHP1	Thiol-spezifisches Peroxiredoxin
YLR393W	ATP10	Assemblierungsfaktor der F0 Einheit der mitochondriellen ATP-Synthase
YLR295C	ATP14	Untereinheit h der F0 Einheit der mitochondriellen ATP-Synthase

Fortsetzung Chromosom XII

Tabelle E.12 – *Fortsetzung Chromosom XII*

Sys. Name	Gen	Funktion
YLR256W	HAP1	Zinkfinger Transkriptionsfaktor
YLR450W	HMG2	HMG-CoA Reduktase
YLR310C	CDC25	Membrangebundener Guaninnukleotidaustauschfaktor
YLL016W	SDC25	Guaninnukleotidaustauschfaktor
YLR258W	GSY2	Glykogen-Synthase
YLR442C	SIR3	Silencing-Protein
YLL052C	AQY2	Aquaporin
YLR304C	ACO1	Aconitase
YLR293C	GSP1	GTP-Bindeprotein mit GTPase-Aktivität
YLR029C	RPL15A	Protein L15A der ribosomalen 60S-Untereinheit
YLR372W	ELO3	Elongase
YLR090W	XDJ1	Chaperon unterstützt den mitochondriellen Proteinimport
YLR044C	PDC1	Pyruvatdecarboxylase
YLR134W	PDC5	Pyruvatdecarboxylase
YLL041C	SDH2	Fe-S-Protein Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase
YLR038C	COX12	Untereinheit VIb der Cytochrom-c-Oxidase
YLR348C	DIC1	Dicarboxylat-*carrier*
YLR089C	ALT1	Alanin-Transaminase
YLR180W	SAM1	S-Adenosylmethionin Synthetase
YLR172C	DPH5	Synthese von Diphthamid
YLR355C	ILV5	Acetohydroxysäure-Reduktoisomerase
YLR008C	TIM14	Untereinheit des Importmotors
YLR092W	SUL2	Sulfatpermease
YLR303W	MET17	O-Acetylhomoserin-O-Acetylserin Sulfhydrylase
YLR214W	FRE1	Eisenreduktase
YLR034C	SMF3	Transporter für zweiwertige Kationen
YLL051C	FRE6	Eisenreduktase
YLR220W	CCC1	Vakuolärer Fe^{2+}/Mn^{2+}-Transporter
YLR369W	SSQ1	Mitochondrielles Chaperon des HSP70-Typ
YLL027W	ISA1	Reifung von Fe-S-*cluster* in Mitochondrien
YLL062C	MHT1	S-Methylmethionin-homocystein Methyltransferase
YLR359W	ADE13	Adenylosuccinat Lyase
YLR432W	IMD3	Inosinmonophosphat Dehydrogenase
YLR058C	SHM2	Serin-Hydroxymethyl-Transferase
YLR164W	SHH4	mögliche alternative SDH Untereinheit
YLR074C	BUD20	C2H2-Typ Zinknger (Ribosomengruppierung)
YLR395C	COX8	Untereinheit VIII des Cytochrom-c-Oxidase-Komplex
YLR038C	COX12	Untereinheit VIb des Cytochrom-c-Oxidase-Komplex
YLR403W	SFP1	Regulator der Transkription ribosomaler Proteine

Fortsetzung Chromosom XII

Tabelle E.12 – *Fortsetzung Chromosom XII*

Sys. Name	Gen	Funktion
YLR176C	RFX1	Vermittler von Tup1p/Cyc8p-Repressor-Komplex
YLR228C	ECM22	Sterol-Regulatorelement-Bindeprotein
YLR056W	ERG3	C5 Sterol Desaturase
YLR037C	DAN2	Zellwand Mannoprotein
YLL001W	DNM1	Dynamin-gekoppelte GTPase zur mitochondriellen Organisation

E.1.13 Chromosom XIII

TABELLE E.13: Liste der Gene in dieser Arbeit, die auf Chromosom XIII lokalisiert sind.

Sys. Name	Gen	Funktion
YMR037C	MSN4	Stress-responsiver Transkriptionsaktivator
YML132W	COS3	Endosomales Protein beteiligt am Wechsel von Plasmamembranproteine
YMR089C	YTA12	Mitochondrielle Proteaseuntereinheit
YMR037C	MSN2	Stress-responsiver Transcriptionsaktivator
YML076C	WAR1	Zn_2Cys_6 Zinkfinger Transkriptionsfaktor
YML016C	PPZ1	Ser/Thr Proteinphosphatase Z
YMR216C	SKY1	SR Proteinkinase (SRPK)
YML007W	YAP1	Leucinzipper (bZIP)Transkriptionsfaktor
YMR136W	GAT2	Protein mit Zinkfinger-Motiv der GATA-Familie
YMR016C	SOK2	Negativregulator der Pseudohyphendifferzierung
YMR282C	ATP13	Mitochondrielles Protein
YML120C	NDI1	NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase
YMR145C	NDE1	Mitochondrielle externe NADH-Dehydrogenase
YMR070W	MOT3	Transkriptioneller Repressor und Aktivator
YML075C	HMG1	HMG-CoA Reduktase
YMR056C	AAC1	Mitochondrieller ADP/ATP Translokator
YMR205C	PFK2	β-Untereinheit der Phosphofruktokinase (Heterooktamer)
YMR273C	ZDS1	Protein reguliert Swe1p-abhängige polarisiertes Wachstum
YML109W	ZDS2	Protein reguliert Swe1p-abhängige polarisiertes Wachstum
YMR054W	STV1	Untereinheit A der V0 Domäne der vakuolären ATPase
YMR104C	YPK2	Ser/Thr Proteinkinase
YMR202W	ERG2	C-8-Sterol-Isomerase
YML008C	ERG6	Δ-24-Sterol-cis-Methyltransferase
YMR307W	GAS1	β-1,3-Glucanosyltransferase
YML128C	MSC1	Funktion unbekannt
YMR308C	PSE1	Karyopherin interagiert mit dem Kernporenkomplex
YMR203W	TOM40	Komponente des TOM-Komplex

Fortsetzung Chromosom XIII

Tabelle E.13 – *Fortsetzung Chromosom XIII*

Sys. Name	Gen	Funktion
YMR277W	FCP1	Phosphatase für Domänen von Carboxytermini
YMR088C	VBA1	Aminosäurepermease der Vakuole
YMR105C	HEX2	Phosphoglucomutase
YMR170C	ALD2	Aldehyd-Dehydrogenase
YMR169C	ALD3	Aldehyd-Dehydrogenase
YMR105C	PGM2	Phosphoglucomutase
YMR108W	ILV2	Acetolactat Synthase
YMR058W	FET3	Ferro-O_2-Oxidoreduktase
YMR300C	ADE4	Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase
YMR120C	ADE17	Purin Biosynthese
YML056C	IMD4	Inosinmonophosphat Dehydrogenase
YMR217W	GUA1	GMP Synthase
YMR189W	GCV2	UE P des mitochondriellen Glycin-Decarboxylase-Komplex
YML106W	URA5	Orotat Phosphoribosyltransferase Isozyme
YMR150C	IMP1	Untereinheit des mitochondriellen Peptidase-Komplex
YMR035W	IMP2	Untereinheit des mitochondriellen Peptidase-Komplex
YMR175W	SIP18	Phospholipid-bindendes Hydrophilin
YMR011W	HXT2	Glukosetransporter mit hoher Affinität
YMR174C	PAI3	Proteinase A (Pep4p) Inhibitor
YMR250W	GAD1	Glutamat Decarboxylase
YMR118C	SHH3	Funktion unbekannt
YMR269W	TMA23	Nukleoläres Protein zur Ribosomenbiogeneses
YMR175W-A		mögliches Protein mit unbekannter Funktion
YML058W-A		mögliches Protein mit unbekannter Funktion
YMR256C	COX7	Untereinheit VII des Cytochrom-c-Oxidase-Komplex
YMR257C	PET111	Mitochondrieller translationaler Aktivator spezifisch für COX2 mRNA
YMR172W	HOT1	Transkriptionsfaktor für Glycerol-Biosynthese-Gene
YMR015C	ERG5	C22 Sterol Desaturase
YMR280C	CAT8	Transkriptioneller Aktivator

E.1.14 Chromosom XIV

TABELLE E.14: Liste der Gene in dieser Arbeit, die auf Chromosom XIV lokalisiert sind.

Sys. Name	Gen	Funktion
YNL315C	ATP11	Chaperon zur Assemblierung der αund βUntereinheit der F1 Einheit der mitochondriellen ATP-Synthase
YNL036W	NCE103	Carboanhydrase

Fortsetzung Chromosom XIV

Tabelle E.14 – *Fortsetzung Chromosom XIV*

Sys. Name	**Gen**	**Funktion**
YNL154C	YCK2	Palmitoylierte Plasmamembran-gebundene Caseinkinase I Isoform
YNL167C	SKO1	Leucinzipper Transkriptionsfaktor der ATF/CREB-Familie
YNR016C	ACC1	Acetyl-CoA Carboxylase
YNL178W	RPS3	Komponente der kleinen (40S) ribosomalen Untereinheit
YNL138W	SRV2	Zyklase-assoziiertes Protein (CAP)
YNL098C	RAS2	GTP-Bindeprotein
YNL330C	RPD3	Histondeacetylase
YNL216W	RAP1	Essentieller Transkriptionsregulator
YNL321W	VNX1	Ca^{2+}/H^{+} Antiporter
YNR013C	PHO91	Vakuolärer Phosphattransporter mit niedriger Affinität
YNL065W	AQR1	Stoff/H^{+} Antiporter der DHA1-Familie
YNL291C	MID1	Ca^{2+}-permeabler Kationenkanal
YNL055C	POR1	Spannungsabhängiger Anionenkanal in Mitochondrien
YNL121C	TOM70	Komponente des TOM-Komplex
YNL186W	UBP10	Ubiquitin-spezifische Protease
YNL003C	PET8	Mitochondrieller S-Adenosylmethionin Transporter
YNL142W	MEP2	Ammoniumpermease
YNL241C	ZWF1	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
YNR001C	CIT1	Citratsynthase
YNL037C	IDH1	Isocitratdehydrogenase
YNL052W	COX5a	Untereinheit Va des Cytochrom-c-Oxidase-Komplex
YNL071W	LAT1	Dihydrolipoamid Acetyltransferase Komponente (E2)
YNL104C	LEU4	α-Isopropylmalat Synthase
YNL070W	TOM7	Komponente des TOM-Komplex
YNR017W	TIM23	Komponente des TIM23-Komplex
YNL103W	MET4	Transkriptioneller Aktivator
YNL240C	NAR1	UE eines Komplex zur Assemblierung cytosolischer Fe-S-Proteine
YNL220W	ADE12	Adenylosuccinat Synthase
YNL075W	IMP4	Komponent des SSU Prozessoms
YNL194C		Sporulation, Sphingolipid Regulation
YNL300W	TOS6	Zellwand-Protein
YNL014W	HEF3	Translationaler Elongationsfaktor EF-3
YNL134C		Aldehyde Reduktase (NADH), detox. von Furfural
YNL195C		Protein unbekannter Funktion
YNL236W	SIN4	Untereinheit des RNA-Polymerase-II-Vermittlerkomplex
YNL199C	GCR2	Transkriptionsaktivator von Genen der Glykolyse
YNL280C	ERG24	C14 Sterol Reduktase

E.1.15 Chromosom XV

TABELLE E.15: Liste der Gene in dieser Arbeit, die auf Chromosom XV lokalisiert sind.

Sys. Name	Gen	Funktion
YOL119C	MCH4	Protein mit Ähnlichkeit zu tierischen Monocarboxylatpermeasen
YOR273C	TPO4	Polyamintransporter
YOR382W	FIT2	Mannoprotein
YOR128C	ADE2	Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase
YOL059W	GPD2	NAD-abhängige Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase
YOL136C	PFK27	6-Phosphofrukto-2-Kinase
YOL100W	PKH2	Ser/Thr Proteinkinase
YOR028C	YAP4	Leucinzipper (bZIP)Transkriptionsfaktor
YOL028C	YAP7	Leucinzipper (bZIP)Transkriptionsfaktor
YOR101W	RAS1	GTPase für das G-Protein-Signal zur Adenylatzyklaseaktivierung
YOL081W	IRA2	GTPase-aktiviertes Protein
YOR360C	PDE2	cAMP-Phosphodiesterase mit hoher Affinität
YOR270C	VPH1	Untereinheit A der V0 Domäne der vakuolären ATPase
YOR306C	MCH5	Riboflavintransporter
YOR087W	YVC1	Vakuolärer Kationenkanal
YOR133W	EFT1	Elongationsfaktor 2
YOR032C	HMS1	Transkriptionsfaktor mit Ähnlichkeit zur myc-Familie
YOR375C	GDH1	$NADP^+$-abhängige Glutamatdehydrogenase
YOR130C	ORT1	Mitochondrieller Ornithintransporter
YOR222W	ODC2	Mitochondrieller Transporter
YOR347C	PYK2	Pyruvatkinase
YOR374W	ALD4	Aldehyd-Dehydrogenase
YOL126C	MDH2	Malatdehydrogenase
YOR136W	IDH2	Isocitratdehydrogenase
YOR142W	LSC1	α-Untereinheit der Succinyl-CoA Ligase
YOR184W	SER1	3-Phosphoserin-Aminotransferase
YOR108W	LEU9	α-Isopropylmalat Synthase II
YOR232W	MEG1	co-Chaperon in der mitochondriellen Matrix
YOR297C	TIM18	Komponente des TIM22-Komplex
YOL064C	MET22	Bisphosphate-3-Nukleotidase
YOR383C	FIT3	Mannoprotein
YOR381W	FER3	Eisenreduktase
YOL158C	ENB1	Endosomaler Eisen-Enterobactin Transporter
YOR384W	FRE5	Eisenreduktase
YOL049W	GSH2	Glutathion Synthetase
YOR202W	HIS3	Imidazoleglycerolphosphat Dehydratase

Fortsetzung Chromosom XV

Tabelle E.15 – *Fortsetzung Chromosom XV*

Sys. Name	Gen	Funktion
YOR358W	HAP5	Untereinheit des Hap2p/3p/4p/5p CCAAT-bindenden Komplex
YOR247W	SRL1	Mannoprotein
YOR009W	TIR4	Zellwand Mannoprotein
YOL151W	GRE2	3-CH_3-Butanal und CH_3-Glyoxal Reduktase
YOR100C	CRC1	Carnitin-Transporter
YOR315W	SFG1	Mutmaßlicher Transkriptionsfaktor
YOR237W	HES1	Ergosterol Biosynthese Regulator
YOR230W	WTM1	Transkriptionsmodulator
YOL071W	SDH5	Protein zur Flavinylierung von Sdh1p
YOR110W	TFC7	UE des RNA-Polymerase-III-Transkriptions-Initiationsfaktor-Komplex
YOR211C	MGM1	GTPase für mitchondrielle Morphologie

E.1.16 Chromosom XVI

TABELLE E.16: Liste der Gene in dieser Arbeit, die auf Chromosom XVI lokalisiert sind.

Sys. Name	Gen	Funktion
YPR086W	SUA7	Allgemeiner Transkriptionsfaktor TFIIB
YPL058C	PDR12	ABC-Transporter
YPR008W	HAA1	Transkriptionsaktivator
YPR199C	YAP8	Leucinzipper (bZIP)Transkriptionsfaktor
YPL024W	RMI1	Untereinheit des RecQ(Sgs1p)-TopoIII(Top3p)-Komplex
YPR065W	ROX1	hämabhängiger Repressor hypoxischer Gene
YPL078C	ATP4	Untereinheit b des Stator der mitochondriellen ATP-Synthase
YPR191W	QCR2	Untereinheit 2 des Ubiquinol-Cytochrome-c-Reduktase-Komplex
YPL203W	TPK2	cAMP-abhängige Proteinkinase Untereinheit
YPR160W	GPH1	Glykogen-Phosphorylase
YPR001W	CIT3	Mitochondrielle Citrat- und Methylcitrat-Synthase
YPR005C	HAL1	Protein beteiligt an Salztoleranz
YPR115W	RGC1	Mutmaßlicher Regulator des Fps1p Glycerolkanals
YPR192W	AQY1	Sporenspezifisches Aquaporin
YPR149W	NCE102	Funktion unbekannt
YPL154C	PEP4	Vakuoläre Aspartylprotease
YPL106C	SSE1	ATPase des Hsp90-Chaperon-Komplex
YPR080W	TEF1	Translationselongationsfaktor EF-1α
YPR124W	CTR1	Kupfertransporter der Plasmamembran mit hoher Affinität
YPL134C	ODC1	2-Oxodicarboxylattransporter
YPR035W	GLN1	Glutaminsynthetase
YPL134C	ODC1	Mitochondrieller Transporter

Fortsetzung Chromosom XVI

Tabelle E.16 – *Fortsetzung Chromosom XVI*

Sys. Name	Gen	Funktion
YPR021C	AGC1	Mitochondrieller Aminosäuretransporter
YPR058W	YMC1	Mitochondrieller Glycintransporter
YPR138C	MEP3	Ammoniumpermease
YPL061W	ALD6	Aldehyd-Dehydrogenase
YPL262W	FUM1	Fumarase
YPR167C	MET16	3-Phosphoadenylsulfat-Reduktase
YPR133W-A	TOM5	Komponente des TOM-Komplex
YPL038W	MET31	Transkriptionsfaktor
YPL202C	AFT2	Transkriptionsfaktor der Eisenaufnahme und -Homöostase
YPL252C	YAH1	Ferredoxin der mitochondriellen Matrix
YPL135W	ISU1	Scaffoldprotein zur Assemblierung von Fe-S-*clustern*
YPL059W	GRX5	Glutathion-abhängige Oxidoreduktase
YPR067W	ISA2	Reifung von Fe-S-*cluster* in Mitochondrien
YPR048W	TAH18	Diflavin Reduktase
YPL273W	SAM4	S-Adenosylmethionin-homocystein Methyltransferase
YPL223C	GRE1	Hydrophilin zur Rehydratisierung
YPL036W	PMA2	Plasmamembran H^+-ATPase
YPL171C	OYE3	Oxidoreduktase (NADPH; FMN)
YPR036W-A	SPO24	Sporulation, 67 Aminosäuren
YPL272C	PBI1	mögliches Protein unbekannter Funktion
YPL172C	COX10	Häm A: Farnesyltransferase
YPL132W	COX11	Kupferübertragung auf Cox1p
YPL097W	MSY1	Mitochondrielle Tyrosyl-tRNA Synthetase
YPL104W	MSD1	Mitochondrielle Aspartyl-tRNA Synthetase

E.1.17 Mitochondrielle DNA

TABELLE E.17: Liste der Gene in dieser Arbeit, die auf mitochondrieller DNA lokalisiert sind.

Sys. Name	Gen	Funktion
Q0045	COX1	Untereinheit I der Cytochrom-c-Oxidase-Komplex
Q0080	ATP8	Untereinheit 8 der F0 Einheit der mitochondriellen ATP-Synthase
Q0085	ATP6	Untereinheit a der F0 Einheit der mitochondriellen ATP-Synthase
Q0130	ATP9	Untereinheit c der F0 Einheit der mitochondriellen ATP-Synthase
Q0250	COX2	Untereinheit II der Cytochrom-c-Oxidase-Komplex
Q0275	COX3	Untereinheit III der Cytochrom-c-Oxidase-Komplex

Literatur

[1] D.A. Abbott u. a. „Generic and specic transcriptional responses to different weak organic acids in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *FEMS Yeast Res* 7 (2009), S. 819–833.

[2] D.A. Abbott u. a. „Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of carboxylic acids: current status and challenges.“ In: *FEMS Yeast Res* 9 (2009), S. 1123–1136.

[3] D.A. Abbott u. a. „Physiological and transcriptional responses to high concentrations of lactic acid in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Appl Environ Microb.* 74 (2008), 5759–5768.

[4] F.O. Aboka u. a. „Identification of informative metabolic responses using a minibioreactor: a small step change in the glucose supply rate creates a large metabolic response in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Yeast* 29.3-4 (2012). doi: 10.1002/yea.2892, S. 95–100.

[5] N.E. Abramova u. a. „Regulatory mechanisms controlling expression of the DAN/TIR mannoprotein genes during anaerobic remodeling of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Genetics.* 157.3 (2001), S. 1169–77.

[6] R. Acin-Perez u. a. „A phosphodiesterase 2A isoform localized to mitochondria regulates respiration.“ In: *J Biol Chem.* 286.35 (2011). doi: 10.1074/jbc.M111.266379, S. 30423–32.

[7] R. Acin-Perez u. a. „Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation.“ In: *Cell Metab.* 9.3 (2009). doi: 10.1016/j.cmet.2009.01.012., S. 265–76.

[8] J. Aguilera u. a. „Carbonic anhydrase (Nce103p): an essential biosynthetic enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* at atmospheric carbon dioxide pressure.“ In: *Biochem J.* 391 (2005), S. 311–316.

[9] J. Aguilera u. a. „Physiological and genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to high carbon dioxide concentrations.“ In: *FEMS Yeast Research* 5.6-7 (2005), S. 579–593.

[10] Robert A. Albert. „Effect of Temperature on Standard Transformed Gibbs Energies of Formation of Reactants at Specified pH and Ionic Strength and Apparent Equilibrium Constants of Biochemical Reactions.“ In: *J. Phys. Chem. B.* 105.1 (2001), S. 7865–7870.

[11] P.M. Alepuz u. a. „Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes.“ In: *Mol Cell.* 7.4 (2001), S. 767–777.

[12] H. Alexandre, B. Mathieu und C. Charpentier. „Alteration in membrane fluidity and lipid composition, and modulation of H^+-ATPase activity in *Saccharomyces cerevisiae* caused by decanoic acid.“ In: *Microbiology* 142.3 (1996), 469–475.

[13] B. Almeida u. a. „Yeast protein expression prole during acetic acid-induced apoptosis indicates causal involvement of the TOR pathway.“ In: *Proteomics* 9 (2009), 720–732.

[14] G. Amoroso u. a. „The gene NCE103 (YNL036W) from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a functional carbonic anhydrase and its transcription is regulated by the concentration of inorganic carbon in the medium.“ In: *Molecular Microbiology* 56.2 (2005), S. 549–558.

[15] M. Anehisa. *Post-genome Informatics*. Oxford University Press, 2000, S. 160.

[16] F. Anton u. a. „Ugo1 and Mdm30 act sequentially during Fzo1-mediated mitochondrial outer membrane fusion.“ In: *J Cell Sci.* 124 (2011). doi: 10.1242/jcs.073080, S. 1126–35.

[17] J. Ariño, J. Ramos und H. Sychrová. „Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts.“ In: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74 (2010). doi:10.1128/MMBR.00042-09, 95–120.

[18] H.W. Aung, S.A. Henry und L.P. Walker. „Revising the representation of fatty acid, glycerolipid, and glycerophospholipid metabolism in the consensus model of yeast metabolism.“ In: *Ind Biotechnol.* 9 (2013), 215–28.

[19] Nienow A.W. „Reactor engineering in large scale animal cell culture.“ In: *Cytotechnology* 50 (2006). doi:10.1007/s10616-006-9005-8, S. 9–33.

[20] B.M. Bakker u. a. „Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in Saccharomyces cerevisiae.“ In: *FEMS Microbiol Rev* 25.1 (2001), S. 15–37.

[21] M.A. Banuelos u. a. „Role of the Nha1 antiport in regulating K^+ influx in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Yeast* 19 (2002), S. 9–15.

[22] M. Barbieri u. a. „Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans.“ In: *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285.5 (2003). doi: 10.1152/ajpendo.00296.2003, e1064.

[23] C. Beddies. „MFA und FBA Studien an niedrig- und hochskaligen stöchiometrischen Modellen unter Verwendung von NGS Expressionsdaten für *Saccharomyces cerevisiae*.“ Diss. Universität Stuttgart, Institut für Bioverfahrenstechnik (IBVT), 2015.

[24] K.M. Bekers, J.J. Heijnen und W.M. van Gulik. „Determination of the in vivo NAD:NADH ratio in *Saccharomyces cerevisiae* under anaerobic conditions, using alcohol dehydrogenase as sensor reaction.“ In: *Yeast* 32.8 (2015). doi: 10.1002/yea.3078, S. 541–57.

[25] T. Bender, G. Pena und J.C. Martinou. „Regulation of mitochondrial pyruvate uptake by alternative pyruvate carrier complexes.“ In: *EMBO J* 34.7 (2015). doi: 10.15252/embj.201490197, S. 911–24.

[26] J.M. Berg, L. Stryer und J.L. Tymoczko. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2007, S. 1224.

[27] S.R. Berger. „Gene regulation. Local or global?“ In: *Nature* 408 (2000), S. 412–413.

[28] R.J. van Berlo u. a. „Predicting metabolic fluxes using gene expression differences as constraints.“ In: *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform* 8.1 (2011). doi: 10.1109 /TCBB.2009.55., S. 206–216.

[29] P. Bhosale. „Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms.“ In: *Appl Microbiol Biotechnol* 63.4 (2004), S. 351–61.

[30] E. Bilsland u. a. „Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance.“ In: *Mol Microbiol.* 53.6 (2004), S. 1743–56.

[31] B. Blombach und R. Takors. „CO_2 - intrinsic product, essential substrate, and regulatory trigger of microbial and mammalian production processes.“ In: *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 3.108 (2015), S. 1–11. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00108.

[32] E. Boles und C.P. Hollenberg. „The molecular genetics of hexose transport in yeasts.“ In: *FEMS Microbiology Reviews* 21.1 (1997), S. 85–111.

[33] W.F. Boron. „Regulation of intracellular pH.“ In: *Adv Physiol Educ* 28 (2004), S. 160–179.

[34] M. J. Brauer u. a. „Coordination of growth rate, cell cycle, stress response, and metabolic activity in yeast.“ In: *Mol Biol Cell* 19 (2008). doi:10.1091/mbc.E07-08-0779, S. 352–367.

[35] S. Braun und S.E. Vecht-Lifshitz. „Mycelial morphology and metabolite production.“ In: *Trends Biotechnol.* 9 (1991), 63–68.

[36] C.L. Brett u. a. „Genome-Wide Analysis Reveals the Vacuolar pH-Stat of *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *PLoS ONE* 6.3 (2011), e17619.

[37] J.L. Brewster u. a. „An osmosensing signal transduction pathway in yeast.“ In: *Science* 259.5102 (1993), S. 1760–1763.

[38] N.K. Brewster u. a. „Regulation of pyruvate carboxylase isozyme (PYC1, PYC2) gene expression in Saccharomyces cerevisiae during fermentative and nonfermentative growth.“ In: *Arch Biochem Biophys* 311.1 (1994), S. 62–71.

[39] Guy C. Brown. „The leaks and slips of bioenergetic membranes.“ In: *FASEB* 6 (1992), S. 2961–2965.

[40] J. Buchholz u. a. „Improving the carbon balance of fermentations by total carbon analyses.“ In: *Biochemical Engineering Journal* 90 (2014), S. 162–169.

[41] K. Bych u. a. „The iron-sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly.“ In: *EMBO J* 27.12 (2008). doi: 10.1038/emboj.2008.98, S. 1736–46.

[42] A.B. Canelas u. a. „Quantitative Evaluation of Intracellular Metabolite Extraction Techniques for Yeast Metabolomics.“ In: *Anal Chem.* 81 (2009), S. 7379–7389.

[43] S. Carbon u. a. „AmiGO: online access to ontology and annotation data“. In: *Bioinformatics* 25.2 (2009), S. 288–289.

[44] V. Carmelo, H. Santos und I. Sá-Correia. „Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Biochim Biophys Acta* 1325 (1997), 63–70.

[45] M. Carnicer u. a. „Development of quantitative metabolomics for *Pichia pastoris*.“ In: *Metabolomics* 8 (2012), S. 284–298.

[46] C. Casado u. a. „Regulation of Trk-dependent potassium transport by the calcineurin pathway involves the Hal5 kinase.“ In: *FEBS Letters* 584 (2010), S. 2415–2420.

[47] J.I. Castrillo und S.G. Oliver. *Yeast Systems Biology: Methods and Protocols.* Heidelberg: Springer Press, 2011.

[48] P. Chambers, A. Issaka und Palecek S.P. „*Saccharomyces cerevisiae* JEN1 promoter activity is inversely related to concentration of repressing sugar.“ In: *Appl Environ Microbiol.* 70.1 (2004), S. 8–17.

[49] P. Chan, J. Lovrić und J. Warwicker. „Subcellular pH and predicted pH-dependent features of proteins.“ In: *Proteomics* 6.12 (2006), S. 3494–3501.

[50] D. Chasman u. a. „Pathway connectivity and signaling coordination in the yeast stress-activated signaling network.“ In: *Mol Syst Biol* 10.759 (2014), S. 1–23.

[51] D. Chasman u. a. „Signaling coordination in the yeast information processing by master regulator of gene expression“. In: *Mol Syst Biol.* 12.61 (2012), S. 239–42.

[52] S. Chattopadhyay u. a. „The Yeast Model for Batten Disease: Mutations in *btn1*, *btn2*, and *hsp30* Alter pH Homeostasis.“ In: *Journal of Bacteriology* 182.22 (2000), S. 6418–6423.

[53] S.L. Chen und F. Gutmanis. „Carbon dioxide inhibition of yeast growth in biomass production.“ In: *Biotechnology and Bioengineering* 18 (1976), S. 1455–1462.

[54] Y. Chen u. a. „Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor.“ In: *Science* 289.5479 (2000), S. 625–628.

[55] J. Michael Cherry u. a. „Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast“. In: *Nucleic Acids Research* 40.D1 (2012), S. D700–D705. DOI: 10.1093/nar/gkr1029.

[56] J.R. Cherry u. a. „Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates the yeast transcriptional activator ADR1.“ In: *Cell.* 56.3 (1989), S. 409–19.

[57] C. Chevtzoff u. a. „The yeast cAMP protein kinase Tpk3p is involved in the regulation of mitochondrial enzymatic content during growth.“ In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1706.1-2 (2005). doi:10.1016/j.bbabio.2004.10.001, 117–125.

[58] Brett C.L., Donowitz M. und Rao R. „Does the proteome encode organellar pH?“ In: *FEBS Lett.* 580.3 (2006), S. 717–719.

[59] C.R. Clapier und B.R. Cairns. „The biology of chromatin remodeling complexes.“ In: *Annu Rev Biochem* 78 (2009), S. 273–304.

[60] S.T. Coleman u. a. „Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *J Biol Chem* 276.1 (2001), S. 244–250.

[61] S. Colombo u. a. „Activation state of the Ras2 protein and glucose-induced signaling in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *J Biol Chem.* 279.45 (2004), S. 46715–46722.

[62] S. Colombo u. a. „Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast Saccharomyces cerevisiae.“ In: *EMBO J.* 15.7 (1998), S. 3326–3341.

[63] The Gene Ontology Consortium. „Gene ontology: tool for the unification of biology.“ In: *Nat Genet.* 25.1 (2000), S. 25–9. URL: http://www.nature.com/ng/journal/v25/n1/abs/ng0500_25.html.

[64] E.J. Conway und T.G. Brady. „Biological production of acid and alkali. I. Quantitative relations of succinic and carbonic acids to the potassium and hydrogen ion exchange in fermenting yeast.“ In: *Biochem. J.* 47 (1950), 360–369.

[65] E.J. Conway und E. O'Malley. „The nature of the cation exchanges during yeast fermentation, with formation of 0·02 $_N$-H ion.“ In: *Biochem. J.* 40.1 (1946), 59–67.

[66] K.E. Cook und E.K. O'Shea. „Hog1 controls global reallocation of RNA Pol II upon osmotic shock in Saccharomyces cerevisiae.“ In: *G3 (Bethesda)* 2.9 (2012), S. 1129–1136.

[67] I.M. Copi, C. Cohen und K. McMahon. *Introduction To Logic*. Prentice Hall, 2010, S. 688.

[68] F. Cottier u. a. „Carbonic anhydrase regulation and CO_2 sensing in the fungal pathogen *Candida glabrata* involves a novel Rca1p ortholog.“ In: *Bioorganic Medicinal Chemistry* 15.6 (2013). doi:10.1016/j.bmc.2012.05.053, S. 1549–1554.

[69] F. Cottier u. a. „The bZIP transcription factor Rca1p is a central regulator of a novel CO_2 sensing pathway in yeast.“ In: *PLoS Pathog.* 8.1 (2012). doi: 10.1371/journal.ppat.1002485, e1002485.

[70] A.J. Courey und S. Jia. „Transcriptional repression: the long and the short of it.“ In: *Genes Dev* 15.21 (2001). doi: 10.1101/gad.939601, S. 2786–2796.

[71] E.L. Cussler. „Diffusion“. In: *Mass Transfer in Fluid Systems.* Hrsg. von G Crane. 2nd. New York: Cambridge University Press, 1997.

[72] S.K. Dahod. „Dissolved carbon dioxide measurement and its correlation with operating parameters in fermentation processes.“ In: *Biotechnol. Prog.* 9 (1986), 655–660.

[73] C.K. Dalal u. a. „Pulsatile dynamics in the yeast proteome.“ In: *Curr Biol* 24.18 (2014). doi: 10.1016/j.cub.2014.07.076, S. 2189–2194.

[74] R.G. Dastidar u. a. „The nuclear localization of SWI/SNF proteins is subjected to oxygen regulation.“ In: *Cell Biosci.* 2.1 (2012). doi: 10.1186/2045-3701-2-30, S. 1–13.

[75] L. David u. a. „A high-resolution map of transcription in the yeast genome.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103.14 (2006), S. 5320–5.

[76] B.S. Davies, H.S. Wang und J. Rine. „Dual activators of the sterol biosynthetic pathway of Saccharomyces cerevisiae: similar activation/regulatory domains but different response mechanisms.“ In: *Mol Cell Biol.* 25.16 (2005), S. 7375–85.

[77] C.W. Davies. „Ion Association“. In: London: Butterworths, 1962, S. 37–53.

[78] J. Deckert u. a. „Mutational analysis of Rox1, a DNA-bending repressor of hypoxic genes in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Mol Cell Biol* 15 (1995), S. 6109–6117.

[79] A. Delahodde u. a. „Pse1/Kap121-dependent nuclear localization of the major yeast multidrug resistance (MDR) transcription factor Pdr1.“ In: *Mol Microbiol.* 39.2 (2001). doi:10.1074/jbc.M009258200, S. 304–12.

[80] J.L. DeRisi, V.R. Iyer und Brown P.O. „Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale.“ In: *Science.* 278.5338 (1997), S. 680–6.

[81] C. Desmoucelles u. a. „Screening the yeast “disruptome” for mutants affecting resistance to the immunosuppressive drug, mycophenolic acid“. In: *J Biol Chem* 277 (2002), S. 27036–27044.

[82] V.M. DeZengotita, A.E. Schmelzer und W.M. Miller. „Characterization of Hybridoma Cell Responses to Elevated pCO2 and Osmolality: Intracellular pH, Cell Size, Apoptosis, and Metabolism“. In: *Biotechnol. Bioeng.* 77 (2002). doi:10.1002/bit.10176, 369–380.

[83] H. Dihazi, R. Kessler und K. Eschrich. „High osmolarity glycerol (HOG) pathway-induced phosphorylation and activation of 6-phosphofructo-2-kinase are essential for glycerol accumulation and yeast cell proliferation under hyperosmotic stress.“ In: *J Biol Chem.* 279.23 (2004), S. 23961–23968.

[84] A. Dobin u. a. „STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner.“ In: *Bioinformatics* 29.1 (2013), S. 15–21.

[85] F. Doll u. a. „Visualization of Protein-Specific Glycosylation inside Living Cells.“ In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 55 (2016). doi:10.1002/anie.20150318, 2262–2266.

[86] K.M. Dombek und E.T. Young. „Cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits ADH2 expression in part by decreasing expression of the transcription factor gene ADR1.“ In: *Mol Cell Biol.* 17.3 (1997), S. 1450–8.

[87] T.L. Donaldson und J.A. Quinn. „Kinetic constants determined from membrane transport measurements: carbonic anhydrase activity at high concentrations“. In: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71.12 (1974), S. 4995–4999.

[88] N. C. Duarte, M.J. Herrgard und B. Palsson. „Reconstruction and Validation of Saccharomyces cerevisiae ind750, a Fully Compartmentalized Genome-Scale Metabolic Model“. In: *Genome Research* 14.7 (2004), S. 1298–1309.

[89] Z. Eelderink-Chen u. a. „A circadian clock in Saccharomyces cerevisiae.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 107.5 (2010). doi: 10.1073/pnas.0907902107, S. 2043–2047.

[90] D.J. Eide u. a. „Characterization of the yeast ionome: a genome-wide analysis of nutrient mineral and trace element homeostasis in Saccharomyces cerevisiae.“ In: *Genome Biol* 6.9 (2005), R77.

[91] G. Eigenstetter und R. Takors. „Dynamic modeling reveals a three-step response of *Saccharomyces cerevisiae* to high CO_2 levels accompanied by increasing ATP demands.“ In: *FEMS Yeast Res.* 17.1 (2017). DOI: 10.1093/femsyr/fox008.

[92] N. El-Sabbagh, L. M. Harvey und B. McNeil. „Effects of dissolved carbon dioxide on growth, nutrient consumption, cephalosporin C synthesis and morphology of *Acremonium chrysogenum* in batch cultures.“ In: *Enzyme Microb. Technol.* 42 (2008), 315–324.

[93] N. El-Sabbagh, B. McNeil und L. M. Harvey. „Dissolved carbon dioxide effects on growth, nutrient consumption, penicillin synthesis and morphology in batch cultures of *Penicillium chrysogenum*.“ In: *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006), 185–190.

[94] B. Enjalbert u. a. „Combinatorial control by the protein kinases PKA, PHO85 and SNF1 of transcriptional induction of the *Saccharomyces cerevisiae* GSY2 gene at the diauxic shift.“ In: *Mol Genet Genomics* 271.6 (2004). doi:10.1007/s00438-004-1014-8, S. 697–708.

[95] C.B. Epstein u. a. „Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction.“ In: *Mol Biol Cell* 12.2 (2001), S. 297–308.

[96] P. Eraso, M.J. Mazon und F. Portillo. „Yeast protein kinase Ptk2 localizes at the plasma membrane and phosphorylates in vitro the C-terminal peptide of the H^+-ATPase.“ In: *BBA* 1758 (2006), S. 164–170.

[97] M. Escobar-Henriques und B. Daignan-Fornier. „Transcriptional regulation of the yeast gmp synthesis pathway by its end products“. In: *J Biol Chem.* 276.2 (2001), S. 1523–1530.

[98] X. Escoté u. a. „Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1.“ In: *Nat Cell Biol.* 6.10 (2004). doi: 10.1038/ncb1174, S. 997–1002.

[99] E. Estrada u. a. „Phosphorylation of Yeast Plasma Membrane H+-ATPase by Casein Kinase I.“ In: *JBC* 271.50 (1996), S. 32064–32072.

[100] F. Estruch. „Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast.“ In: *FEMS Microbiol Rev.* 24.4 (2000), S. 469–486.

[101] S. Eßwein. „Implementation and Application of Transcriptional Controlled Flux Balance Analysis Using Next Generation Sequencing Expression Data as Constraints.“ Diss. Universität Stuttgart, Institut für Bioverfahrenstechnik (IBVT), 2014.

[102] A. R. Fernandes u. a. „*Saccharomyces cerevisiae* adaptation to weak acids involves the transcription factor Haa1p and Haa1p-regulated genes.“ In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337 (2005), 95–103.

[103] A.R. Fernandes u. a. „Activation and signicance of vacuolar H^+-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* adaptation and resistance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.“ In: *Biochem Biophys Res Commun.* 312 (2003), 1317–1324.

[104] L. Fernandes, C. Rodrigues-Pousada und K. Struhl. „Yap, a novel family of eight bZIP proteins in Saccharomyces cerevisiae with distinct biological functions.“ In: *Mol Cell Biol* 17 (1997), S. 6982–6993.

[105] C. Ferreira u. a. „A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H^+ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Mol Biol Cell.* 16.4 (2005), S. 2068–76.

[106] J. Forment u. a. „The yeast SR protein kinase Sky1p modulates salt tolerance, membrane potential and the Trk1,2 potassium transporter.“ In: *Biochim Biophys Acta* 1565.1 (2002), S. 36–40.

[107] J. François und J.L. Parrou. „Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *FEMS Microbiology Reviews* 25.1 (2001), S. 125–145.

[108] E.M. Froschauer, R.J. Schweyen und G. Wiesenberger. „The yeast mitochondrial carrier proteins Mrs3p/Mrs4p mediate iron transport across the inner mitochondrial membrane.“ In: *Biochim Biophys Acta* 1788.5 (2009). doi: 10.1016/j.bbamem.2009.03.004, S. 1044–50.

[109] B. Futcher. „Cyclins and the wiring of the cell cycle“. In: *Yeast* 12 (1996), S. 1635–1646.

[110] E. García-Ríos u. a. „Global phenotypic and genomic comparison of two Saccharomyces cerevisiae wine strains reveals a novel role of the sulfur assimilation pathway in adaptation at low temperature fermentations.“ In: *BMC Genomics* 15.1059 (2014). doi:10.1186/1471-2164-15-1059, S. 1027–1037.

[111] M.A. Garcia-Gimeno und K. Struhl. „Aca1 and Aca2, ATF/CREB activators in Saccharomyces cerevisiae, are important for carbon source utilization but not the response to stress.“ In: *Mol Cell Biol* 20.12 (2000), S. 4340–4349.

[112] E. Garre u. a. „Nonsense-Mediated mRNA Decay Controls the Changes in Yeast Ribosomal Protein Pre-mRNAs Levels upon Osmotic Stress.“ In: *PLoS One* 8.4 (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0061240, e61240.

[113] L. Garzia-Gonzalez u. a. „High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in food: The past, the present and the future.“ In: *International Journal of Food Microbiology* 117 (2007), S. 1–28.

[114] A.C. Gavin u. a. „Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes.“ In: *Nature.* 415.6868 (2002), S. 141–7.

[115] J.V. Geisberg u. a. „Global analysis of mRNA isoform half-lives reveals stabilizing and destabilizing elements in yeast.“ In: *Cell* 156.4 (2014). doi: 10.1016/j.cell.2013.12.026, S. 812–24.

[116] P. Gennemark u. a. „A simple mathematical model of adaptation to high osmolarity in yeast.“ In: *In Silico Biol* 6.3 (2006), S. 193–214.

[117] S.A. Gerber u. a. „Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS.“ In: *Proc Natl Acad Sci USA.* 100.12 (2003), S. 6940–5.

[118] S. Ghaemmaghami u. a. „Global analysis of protein expression in yeast.“ In: *Nature.* 425.6959 (2003), S. 737–41.

[119] G. Giaever und C. Nislow. „The yeast deletion collection: a decade of functional genomics.“ In: *Genetics.* 197.2 (2014), S. 451–65. DOI: 10.1534/genetics.114.161620.

[120] G. Giaever u. a. „Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome.“ In: *Nature.* 418.6896 (2002), S. 387–91. DOI: 10.1038/nature00935.

[121] P. A. Gibbs, R. J. Seviour und F. Schmid. „Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions.“ In: *Crit. Rev. Biotechnol.* 20 (2000). doi:10.1080/07388550091144177, 17–48.

[122] A. Goffeau. „1996: a vintage year for yeast and Yeast.“ In: *Yeast.* 12.16 (1996), S. 1603–5.

[123] B. Gonzalez, J. Francois und M. Renaud. „A Rapid and Reliable Method for Metabolite Extraction in Yeast using Boiling Buffered Ethanol.“ In: *Yeast* 13 (1997), S. 1347–1356.

[124] M.A. Gonzàlez-Meler u. a. „Direct inhibition of plant mitochondrial respiration by elevated CO_2.“ In: *Plant Physiol.* 112 (1996), S. 1349–1355.

[125] A. Goossens u. a. „Regulation of yeast H^+-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters.“ In: *Mol Cell Biol.* 20.20 (2000), S. 7654–7661.

[126] M Grabe und G. Oster. „Regulation of organelle acidity.“ In: *J Gen Physiol.* 117.4 (2001), S. 329–344.

[127] M.V. Granovskaia u. a. „High-resolution transcription atlas of the mitotic cell cycle in budding yeast.“ In: *Genome Biol.* 11.3 (2010). doi: 10.1186/gb-2010-11-3-r24, R24.

[128] D.R. Gray u. a. „CO2 in large-scale and high-density CHO cell perfusion culture.“ In: *Cytotechnology* 22 (1996). doi:10.1007/BF00353925, 65–78.

[129] C. Gregori u. a. „Weak Organic Acids Trigger Conformational Changes of the Yeast Transcription Factor War1 in Vivo to Elicit Stress Adaptation.“ In: *J Biol Chem.* 283.37 (2008). doi: 10.1074/jbc.M803095200, S. 25752–64.

[130] G. Griffioen, S. Swinnen und J.M. Thevelein. „Feedback inhibition on cell wall integrity signaling by Zds1 involves Gsk3 phosphorylation of a cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit.“ In: *J Biol Chem.* 278.3 (2003), S. 23460–23471.

[131] G. Griffioen und J.M. Thevelein. „Molekular mechanism controlling the localization of protein kinase A.“ In: *Curr. Genet.* 41.4 (2002), S. 199–207.

[132] G. Griffioen u. a. „Nutritional Control of Nucleocytoplasmic Localization of cAMP-dependent Protein Kinase Catalytic and Regulatory Subunits in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *J Biol Chem.* 275.2 (2000), S. 1449–1456.

[133] G. Griffioen u. a. „Stress-induced cytoplasmic localization of the protein kinase A (PKA) regulatory subunit Byc1 requires Sch9 and Yak1.“ In: *Yeast* 18 (2001), S174.

[134] G. Grossmann u. a. „Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast.“ In: *EMBO J.* 26.1 (2007), S. 1–8.

[135] R. Götz, A. Gnann und F.K. Zimmermann. „Deletion of the carbonic anhydrase-like gene NCE103 of the yeast Saccharomyces cerevisiae causes an oxygen-sensitive growth defect.“ In: *Yeast* 15.10A (1999), S. 855–64.

[136] Q. Guan u. a. „Cellular memory of acquired stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Genetics* 192 (2012), 495–505.

[137] E. Guerrero-Martin. „Dynamics of Trehalose Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.“ Diss. Universitat Autònoma de Barcelona, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria, 2005.

[138] van Gulik W. M. „Fast sampling for quantitative microbial metabolomics.“ In: *Curr Opin Biotechnol.* 21.1 (2010), S. 27–34.

[139] K. Gulshan und Moye-Rowley W.S. „Multidrug resistance in fungi“. In: *Eukaryot Cell* 6.11 (2007), S. 1933–1942.

[140] J. Guo, B.A. Bryan und M. Polymenis. „Nutrient-specific effects in the coordination of cell growth with cell division in continuous cultures of Saccharomyces cerevisiae.“ In: *Arch Microbiol* 182.4 (2004). doi: 10.1007/s00203-004-0704-2, S. 326–330.

[141] P.K. Gupta u. a. „The diphthamide modification on elongation factor-2 renders mammalian cells resistant to ricin.“ In: *Cell Microbiol.* 10.8 (2008). doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01159.x, S. 1687–94.

[142] J. Gutknecht, M.A. Bisson und F.C. Tosteson. „Diffusion of carbon dioxide throught lipid bilayer membranes.“ In: *J. Gen. Phys.* 69 (1977), S. 779–794.

[143] J.S. Hahn u. a. „Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor.“ In: *Mol Cell Biol* 24.12 (2004), S. 5249–5256.

[144] G. Haimovich u. a. „Gene expression is circular: factors for mRNA degradation also foster mRNA synthesis“. In: *Cell* 153.5 (2013). doi: 10.1016/j.cell.2013.05.012, S. 1000–11.

[145] R.A. Hall u. a. „CO_2 Acts as a Signalling Molecule in Populations of the Fungal Pathogen *Candida albicans*.“ In: *PLoS Pathogens* 6.11 (2010). doi.org/10.1371 /journal.ppat.1001193, e1001193.

[146] S.E. Hanlon u. a. „The stress response factors Yap6, Cin5, Phd1, and Skn7 direct targeting of the conserved co-repressor Tup1-Ssn6 in S. cerevisiae.“ In: *PLoS One* 6.4 (2011). doi: 10.1371/journal.pone.0019060, e19060.

[147] N. Hao u. a. „A Systems-Biology Analysis of Feedback Inhibition in the Sho1 Osmotic-Stress-Response Pathway.“ In: *Curr Biol* 17.8 (2007), S. 659–67.

[148] C.T. Harbison u. a. „Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome.“ In: *Nature* 431.7004 (2004), S. 99–104.

[149] H.S. Harned und B.B. Owen. „The physical chemistry of electrolyte solutions.“ In: 3. Aufl. New York: Reinhold Publ. Corp., 1958.

[150] R. Haro und A. Rodriguez-Navarro. „Moleculare analysis of the mechanism of potassium uptake through the TRK1 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Biochemica et Biophysica Acta* 1564 (2002), S. 114–122.

[151] L.H. Hartwell und M. W. Unger. „Unequal division in *Saccharomyces cerevisiae* and its inplications for the control of the cell division.“ In: *J Cell Biol* 75 (1977), S. 422–435.

[152] M. Hayashi und T. Maeda. „Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *J Biochem.* 139.4 (2006), S. 797–803.

[153] L.A. Hazelwood u. a. „Involvement of vacuolar sequestration and active transport in tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to hop isoalpha-acids.“ In: *Appl Environ Microbiol.* 76 (2010), 318–328.

[154] C.S. Hemenway und J. Heitman. „Lic4, a nuclear phosphoprotein that cooperates with calcineurin to regulate cation homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Mol Gen Genet.* 261.2 (1999), S. 388–401.

[155] K.C. Hess u. a. „A mitochondrial CO2-adenylyl cyclase-cAMP signalosome controls yeast normoxic cytochrome c oxidase activity.“ In: *FASEB J* 28.10 (2014), 4369–4380. DOI: 10.1096/fj.14-252890.

[156] D.E. Hill u. a. „Saturation mutagenesis of the yeast his3 regulatory site: requirements for transcriptional induction and for binding by GCN4 activator protein.“ In: *Science* 234 (1986), S. 451–457.

[157] R. Hine. In: *The Facts on File Dictionary of Biology*. Hrsg. von John Dainitith. 3nd. New York: Checkmark Books, 1999, S. 198.

[158] C.S. Ho und M.D. Smith. „Effect of dissolved carbon dioxide on penicillin fermentations: mycelial growth and penicillin production.“ In: *Biotechnol. Bioeng.* 28 (1986), S. 668–677.

[159] C.S. Ho und M.D. Smith. „Morphological alterations of Penicillium chrysogenum caused by carbon dioxide.“ In: *J. Gen. Microbiol.* 132 (1986), S. 3479–3484.

[160] Y. Ho u. a. „Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry.“ In: *Nature.* 415.6868 (2002), S. 180–3.

[161] E. Hofmann u. a. „6-Phosphofructo-2-kinase and fructose-2,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Adv Enzyme Regul.* 28 (1989), S. 283–306.

[162] S. Hohmann. „Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts.“ In: *Microbiol Mol Biol Rev* 66.2 (2002), S. 300–372.

[163] S. Hohmann, M. Krantz und B. Nordlander. „Methods in Enzymology“. In: *Yeast Osmoregulation*. Bd. 428. 2007, S. 29–45.

[164] S. Holm. „A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure.“ In: *Scand J Statist* 6 (1979), S. 65–70.

[165] C.D. Holyoak u. a. „Activity of the plasma membrane H^+-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid.“ In: *Appl Environ Microb* 62 (1996), 3158–3164.

[166] D. Hosiner u. a. „Impact of acute metal stress in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *PLoS ONE* 9 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0083330, e83330.

[167] Z. Hu, P.J. Killion und V.R. Iyer. „Genetic reconstruction of a functional transcriptional regulatory network.“ In: *Nat Genet.* 39.5 (2007), S. 683–7.

[168] J.E. Hughes Hallett, X. Luo und A.P. Capaldi. „State transitions in the TORC1 signaling pathway and information processing in Saccharomyces cerevisiae“. In: *Genetics* 198 (2014). doi:10.1534/genetics.114.168369, S. 773–786.

[169] W.K. Huh u. a. „Global analysis of protein localization in budding yeast.“ In: *Nature.* 425.6959 (2003), S. 686–91.

[170] P.K. Hwang, S. Tugendreich und R.J. Fletterick. „Molecular analysis of GPH1, the gene encoding glycogen phosphorylase in Saccharomyces cerevisiae.“ In: *Mol Cell Biol* 9.4 (1989), S. 1659–1666.

[171] T Ideker, T Galitski und L. Hood. „A new approach to decoding life: systems biology.“ In: *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2 (2001), S. 343–72.

[172] A. Isenschmid, I.W. Marison und U. von Stockar. „The influence of pressure and temperature of compressed CO_2 on the survival of yeast cells“. In: *Jorunal of Biotechnology* 39 (1995), S. 229–237.

[173] S. Isik u. a. „Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of the β-class enzyme from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* with sulfonamides and sulfamates.“ In: *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009), S. 1158–1163.

[174] T. Isoyama u. a. „Nuclear import of the yeast AP-1-like transcription factor Yap1p is mediated by transport receptor Pse1p, and this import step is not affected by oxidative stress.“ In: *J Biol Chem.* 276.24 (2001). doi:10.1074/jbc.M009258200, S. 21863–9.

[175] M. Jardon und A. Garnier. „pH, pCO2, and temperature effect on R-adenovirus production“. In: *Biotechnol. Prog.* 19 (2003). doi:10.1021/bp025585a, 202–208.

[176] M.L. Jennings und J. Cui. „Chloride homeostasis in Saccharomyces cerevisiae: high affinity influx, V-ATPase-dependent sequestration, and identification of a candidate Cl-sensor.“ In: *J Gen Physiol.* 131.4 (2008), S. 379–91.

[177] Aunins J.G., Glazomitsky K. und Buckland B.C. „Proc. 3rd int. conf. on bioreactor and bioprocess uid dynamics“. In: *Cell culture reactor design: known and unknown*. Hrsg. von Nienow A.W. ISBN 0 85298873 7. London: Mechanical Engineering Publications Ltd., 1993, 175–190.

[178] Y. Jiang u. a. „MGA2 is involved in the low-oxygen response element-dependent hypoxic induction of genes in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Mol Cell Biol* 21.18 (2001), S. 6161–6169.

[179] L.H. Johnston und A.L. Johnson. „Elutriation of Bubbing YeastCell Cycle Control.“ In: *Methods in Enzymology*. Hrsg. von W.G. Dunphy. Bd. 283. Academic Press, 1997, S. 342–350.

[180] R.P. Jones und P.F. Greenfield. „Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation.“ In: *Enzyme Microb. Technol.* 4 (1982), S. 210–223.

[181] M.A. Juanes u. a. „Budding yeast greatwall and endosulfines control activity and spatial regulation of PP2A(Cdc55) for timely mitotic progression.“ In: *PLoS Genet.* 9.7 (2013). doi: 10.1371/journal.pgen.1003575, e1003575.

[182] M. Jungbluth, H. Mösch und C. Taxis. „Acetate Regulation of Spore Formation Is under the Control of the Ras/Cyclic AMP/Protein Kinase A Pathway and Carbon Dioxide in *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Eukaryotic Cell* 11.8 (2012), S. 1021–1032.

[183] M Kahm. „A Mathematical Model of the Potassium Homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*.“ Diss. Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät, 2011.

[184] D. Kakhniashvili u. a. „Identification of a novel gene encoding the yeast mitochondrial dicarboxylate transport protein via overexpression, purification, and characterization of its protein product.“ In: *J Biol Chem.* 272.7 (1997), S. 4516–21.

[185] R.S. Kaplan u. a. „High level expression and characterization of the mitochondrial citrate transport protein from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *J Biol Chem.* 270.8 (1995), S. 4108–14.

[186] Gerald Karp. *Molekulare Zellbiologie*. Springer-Verlag, 2005, S. 1026.

[187] A.J. Kastaniotis und R.S. Zitomer. „Rox1 mediated repression. Oxygen dependent repression in yeast.“ In: *Adv Exp Med Biol* 475 (2000), S. 185–195.

[188] M. Kawahata u. a. „Yeast genes involved in response to lactic acid and acetic acid: acidic conditions caused by the organic acids in *Saccharomyces cerevisiae* cultures induce expression of intracellular metal metabolism genes regulated by Aft1pd.“ In: *FEMS Yeast Res* 6 (2006), S. 924–936.

[189] R. Ke, P. J. Ingram und Haynes K. „An Integrative Model of Ion Regulation in Yeast“. In: *PLOS Computational Biology* 9.1 (2013), e1002879. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002879.

[190] J. Keener und J. Sneyd. *Mathematical Physiology I: Cellular Physiology*. Heidelberg: Springer Press, 2009.

[191] J.C. Kernohan. „The activity of bovine carbonic anhydrase in imidazole buffers.“ In: *Biochemica et Biophysica Acta* 81 (1964), S. 346–356.

[192] R. Kessler u. a. „Fructose-2,6-bisphosphate increases the binding affinity of yeast phosphofructokinase to AMP.“ In: *Biochem Biophys Res Commun.* 107.2 (1988), S. 506–510.

[193] J. Kestin, M. Sokolov und W.A. Wakeham. „Viscosity of liquid water in the range -8°C to 150°C.“ In: *J. Phys. Chem. Ref. Data* 7.3 (1978), S. 941–948.

[194] R. Kimura und W.M. Miller. „Effects of elevated pCO2 and/or osmolality on the growth and recombinant tPA production of CHO cells.“ In: *Biotechnol. Bioeng.* 52 (1996), 152–160.

[195] O. Kinclová-Zimmermannová, H. Flegelová und H. Sychrová. „Rice Na^+/H^+-antiporter Nhx1 partially complements the alkali-metal-cation sensitivity of yeast strains lacking three sodium transporters.“ In: *Folia Microbiol (Praha)* 49.5 (2004), S. 519–525.

[196] O. Kinclova-Zimmermannova und H. Sychrova. „Functional study of the Nha1p C-terminus: involvement in cell response to changes in external osmolarity.“ In: *Curr Genet* 49 (2006), S. 229–236.

[197] T. Klengel u. a. „Fungal Adenylyl Cyclase Integrates CO2 Sensing with cAMP Signaling and Virulence.“ In: *Curr Biol.* 15.22 (2005). doi: 10.1016/j.cub.2005.10.040, S. 2021–2026.

[198] R.R. Klevecz und C.M. Li. „Evolution of the clock from yeast to man by period-doubling folds in the cellular oscillator.“ In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 72 (2007). doi: 10.1101/sqb.2007.72.040, S. 421–429.

[199] R.R. Klevecz u. a. „A genomewide oscillation in transcription gates DNA replication and cell cycle.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101.5 (2004), S. 1200–1205.

[200] R.R. Klevecz u. a. „Collective behavior in gene regulation: The cell is an oscillator, the cell cycle a developmental process“. In: *FEBS J* 275.10 (2008). doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06399.x, S. 2372–2384.

[201] E. Klipp u. a. „Integrative model of the response of yeast to osmotic shock.“ In: *Nat Biotechnol.* 23.8 (2005), S. 975–982.

[202] A. Kren u. a. „War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast.“ In: *Mol Cell Biol* 23 (2003), S. 1775–1785.

[203] M.T.A.P. Kresnowati u. a. „Energetic and metabolic transient response of *Saccharomyces cerevisiae* to benzoic acid“. In: *FEBS J* 275 (2008), S. 5527–5541.

[204] M.T.A.P. Kresnowati u. a. „Quantitative physiological study of the fast dynamics in the intracellular pH of *Saccharomyces cerevisiae* in response to glucose and ethanol.“ In: *Metabolic Engineering* 10 (2007), S. 39–54.

[205] D. Krook u. a. „Effect of dissolved carbon dioxide concentration on the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*.“ Diss. Technical University of Delft Stuttgart, 2004.

[206] K. Krumpe. „Ergosterol content specifies targeting of tail-anchored proteins to the mitochondrial outer membrane.“ Diss. Eberhard Karls Universität Tübingen, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, 2012.

[207] A. Kundaje u. a. „A predictive model of the oxygen and heme regulatory network in yeast.“ In: *PLoS Comput Biol* 4.11 (2008). doi: 10.1371/journal.pcbi.1000224, e1000224.

[208] T. Kuroda u. a. „Chloride channel function in the yeast TRK-potassium transporters.“ In: *J Membr Biol.* 198 (2004), S. 177–192.

[209] P.C. Kurtzman, J.W. Fell und T. Boekhout. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier B.V., 2011, 223–277.

[210] Chu L. und Robinson D.K. „Industrial choices for protein production by large-scale cell culture“. In: *Current Opinion in Biotechnology* 12.2 (2001), S. 180–187.

[211] L.C. Lai u. a. „Metabolic-state-dependent remodeling of the transcriptome in response to anoxia and subsequent reoxygenation in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Eukaryot Cell* 5.9 (2006), S. 1468–89.

[212] H.C. Lange und J.J. Heijnen. „Statistical reconciliation of the elemental and molecular biomass composition of *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Biotechnology and Bioengineering* 75.3 (2001), S. 334–344.

[213] B. Langmead u. a. „Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome.“ In: *Genome Biology* 10.3 (2009). doi:10.1186/gb-2009-10-3-r25, R25.

[214] M. Lapidot und Y. Pilpel. „Genome-wide natural antisense transcription: coupling its regulation to its different regulatory mechanisms.“ In: *EMBO Rep.* 7.12 (2006), S. 1216–22.

[215] C. L. Lawrence u. a. „Evidence of a New Role for the High-Osmolarity Glycerol Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Yeast: Regulating Adaptation to Citric Acid Stress“. In: *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 24.8 (2004), 3307–3323.

[216] S. Lecchi u. a. „Tandem Phosphorylation of Ser-911 and Thr-912 at the C Terminus of Yeast Plasma Membrane H^+-ATPase Leads to Glucose-dependent Activation.“ In: *JBC* 282.49 (2007), S. 35471–35481.

[217] P. Lee u. a. „Regulation of yeast Yak1 kinase by PKA and autophosphorylation-dependent 14-3-3 binding.“ In: *Mol Microbiol* 79.3 (2011). doi: 10.1111 /j.1365-2958.2010.07471.x, S. 633–646.

[218] T.A. Lee u. a. „Dissection of combinatorial control by the Met4 transcriptional complex.“ In: *Mol. Biol. Cell* 21.3 (2010), 456–469.

[219] T.I. Lee u. a. „Transcriptional regulatory networks in Saccharomyces cerevisiae.“ In: *Science* 298.5594 (2002). doi:10.1126/science.1075090, S. 799–804.

[220] E. Lenssen u. a. „*Saccharomyces cerevisiae* Ccr4–Not complex contributes to the control of Msn2p-dependent transcription by the Ras/cAMP pathway.“ In: *Mol Microbiol* 43.4 (2002), S. 1023–1037.

[221] B. Li u. a. „Infrequently transcribed long genes depend on the Set2/Rpd3S pathway for accurate transcription.“ In: *Genes Dev.* 21 (2007), S. 1422–1430.

[222] C.H. Li. „Catalytic effect of acetate and phosphate buffers on the iodination of tyrosine.“ In: *J. Am. chem. Soc.* 66.4 (1944), S. 228–230.

[223] C.M. Li und R.R. Klevecz. „A rapid genome-scale response of the transcriptional oscillator to perturbation reveals a period-doubling path to phenotypic change.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103.44 (2006), S. 16254–16259.

[224] C.R. Lickwar u. a. „Genome-wide protein-DNA binding dynamics suggest a molecular clutch for transcription factor function.“ In: *Nature.* 484.7393 (2012), S. 251–5.

[225] R. Lill. „Function and biogenesis of iron-sulphur proteins.“ In: *Nature* 460.7257 (2009). doi: 10.1038/nature08301, S. 831–8.

[226] K.A. Lipinski, A. Kaniak-Golik und P. Golik. „Maintenance and expression of the S. cerevisiae mitochondrial genome—From genetics to evolution and systems biology.“ In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1797.6-7 (2010). doi:10.1016/j.bbabio.2009.12.019, S. 1086–1098.

[227] G. Liu, D. Bergenholm und J. Nielsen. „Genome-Wide Mapping of Binding Sites Reveals Multiple Biological Functions of the Transcription Factor Cst6p in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *MBio.* 7.3 (2016), e00559–16. DOI: 10.1128/mBio.00559-16.

[228] J. Liu und A. Barrientos. „Transcriptional Regulation of Yeast Oxidative Phosphorylation Hypoxic Genes by Oxidative Stress.“ In: *Antioxid Redox Signal* 19.16 (2013). DOI: 10.1089/ars.2012.4589, S. 1916–1927.

[229] M. Liu, W.S. Brusilow und R. Needleman. „Activity of the yeast Tat2p tryptophan permease is sensitive to the anti-tumor agent 4-phenylbutyrate.“ In: *Curr Genet* 46 (2004), S. 256–268.

[230] P. Liu u. a. „Decreased fluidity of cell membranes causes a metal ion deficiency in recombinant Saccharomyces cerevisiae producing carotenoids“. In: *J Ind Microbiol Biotechnol* 43.4 (2016), S. 525–535.

[231] S. Liu u. a. „Dph3, a small protein required for diphthamide biosynthesis, is essential in mouse development.“ In: *Mol Cell Biol.* 26.10 (2006), S. 3835–41.

[232] S. Liu u. a. „Identification of the proteins required for biosynthesis of diphthamide, the target of bacterial ADP-ribosylating toxins on translation elongation factor 2.“ In: *Mol Cell Biol* 24.21 (2004), S. 9487–97.

[233] P.O. Ljungdahl und B. Daignan-Fornier. „Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Genetics.* 190.3 (2012), S. 885–929.

[234] D. Lloyd. „Effects of uncoupling of mitochondrial energy conservation on the ultradian clock-driven oscillations in Saccharomyces cerevisiae continuous culture“. In: *Mitochondrion* 3.3 (2003), S. 139–146.

[235] D. Lloyd und D. Murray. „Redox rhythmicity: clocks at the core of temporal coherence“. In: *Bioessays* 29.5 (2007), S. 465–473.

[236] D. Lloyd u. a. „Cycles of mitochondrial energization driven by the ultradian clock in a continuous culture of Saccharomyces cerevisiae.“ In: *Microbiology* 148.11 (2002), S. 3715–3724.

[237] D. Lloyd u. a. „Respiratory oscillations in yeast: clock-driven mitochondrial cycles of energization.“ In: *FEBS Lett* 519.1-3 (2002), S. 41–44.

[238] H. Lopes und I. Rocha. „Genome-scale modeling of yeast: chronology, applications and critical perspectives.“ In: *FEMS Yeast Res.* 17.5 (2017). DOI: 10.1093/femsyr/fox050.

[239] R. Lopez, E. Enriquez und A Pena. „Effects of weak acids on cation accumulation, Δ pH and $\Delta\Psi$ in yeast.“ In: *Yeast* 15.7 (1999), S. 553–562.

[240] S. Loukin und Y. Saimi. „K^+-Dependent Composite Gating of the Yeast K^+ Channel, Tok1." In: *Biophysical Journal* 77 (1999), S. 3060–3070.

[241] Kane P. M. „Yeast Membrane Transport". In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Hrsg. von J. Ramos, H. Sychrová und M. Kschischo. Bd. 892. Heidelberg: Springer-Verlag, 2016, S. 33–68.

[242] P. Ma u. a. „The PDE1-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling." In: *Mol Biol Cell.* 10.1 (1999), S. 91–104.

[243] C. MacDonald u. a. „A family of tetraspans organizes cargo for sorting into multivesicular bodies". In: *Dev Cell* 33.3 (2015), S. 328–42.

[244] KD MacIsaac u. a. „An improved map of conserved regulatory sites for *Saccharomyces cerevisiae*." In: *BMC Bioinformatics.* 7 (2006). doi: 10.1186/1471-2105-7-113, S. 113.

[245] K. Makanae u. a. „Identification of dosage-sensitive genes in Saccharomyces cerevisiae using the genetic tug-of-war method." In: *Genome Res.* 23.2 (2013), S. 300–311.

[246] V. Makrantoni u. a. „A novel role for the yeast protein kinase Dbf2p in vacuolar H^+-ATPase function and sorbic acid stress tolerance." In: *Microbiology* 153 (2007), 4016–4026.

[247] E.N. Maldonado und J.J. Lemasters. „ATP/ADP ratio, the missed connection between mitochondria and the Warburg effect." In: *Mitochondrion* 19 (2014), S. 78–84.

[248] A.G. Manford u. a. „ER-to-Plasma Membrane Tethering Proteins Regulate Cell Signaling and ER Morphology." In: *Dev Cell.* 23.6 (2012). doi: 10.1016/j.devcel.2012.11.004, S. 1129–40.

[249] C. Marie, S. Leyde und T.C. White. „Cytoplasmic localization of sterol transcription factors Upc2p and Ecm22p in *S. cerevisiae*." In: *Fungal Genet Biol.* 45.10 (2008). doi: 10.1016/j.fgb.2008.07.004, S. 1430–8.

[250] Marcel Martin. „Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads." In: *EMBnet.journal* 17.1 (2011), S. 10–12.

[251] G. Mas u. a. „Recruitment of a chromatin remodelling complex by the Hog1 MAP kinase to stress genes." In: *EMBO J.* 28.4 (2009). doi: 10.1038/emboj.2008.299, S. 326–36.

[252] M. McIntyre und B. McNeil. „Dissolved carbon dioxide effects on morphology, growth, and citrate production in Aspergillus niger A60." In: *Enzy. Microb. Technol.* 20 (1997), 135–142.

[253] M. McIntyre und B. McNeil. „Effect of carbon dioxide on morphology and product synthesis in chemostat cultures of Aspergillus niger A60." In: *Enzy. Microb. Technol.* 21 (1997), 479–483.

[254] M. McIntyre und B. McNeil. „Effects of elevated dissolved CO2 levels on batch and continuous cultures of Aspergillus niger A60: an evaluation of experimental methods." In: *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997), 4171–4177.

[255] R.C. Meena, S. Thakur und A. Chakrabarti. „Regulation of Saccharomyces cerevisiae Plasma membrane H^+-ATPase (Pma1) by Dextrose and Hsp30 during Exposure to Thermal Stress.“ In: *Indian J Microbiol.* 51.2 (2011), S. 153–158.

[256] A. Melber u. a. „Role of Nfu1 and Bol3 in iron-sulfur cluster transfer to mitochondrial clients.“ In: *Elife* (2016). doi: 10.7554/eLife.15991, e15991.

[257] M.D. Mendenhall und A.E. Hodge. „Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast Saccharomyces cerevisiae.“ In: *Microbiol Mol Biol Rev* 62.4 (1998), S. 1191–1243.

[258] G. Mendiratta u. a. „The DNA-binding domain of the yeast Spt10p activator includes a zinc finger that is homologous to foamy virus integrase.“ In: *J Biol Chem.* 281.11 (2006), S. 7040–8.

[259] I. Mendoza u. a. „The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *J Biol Chem.* 269.12 (1994), S. 8792–8796.

[260] S. Merchan u. a. „Response of the Saccharomyces cerevisiae Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway to increases in internal turgor pressure caused by loss of Ppz protein phosphatases.“ In: *Eukaryot Cell* 3.1 (2004), S. 100–107.

[261] M. Merrow, M. Brunner und T. Roenneberg. „Assignment of circadian function for the Neurospora clock gene frequency.“ In: *Nature* 399.6736 (1999), S. 584–586.

[262] D. Meschede. „Gerthsen Physik“. In: 21. Aufl. Berlin: Springer-Verlag, 2002, S. 818.

[263] U. Mühlenhoff u. a. „A specific role of the yeast mitochondrial carriers MRS3/4p in mitochondrial iron acquisition under iron-limiting conditions.“ In: *J Biol Chem* 278.47 (2003). doi: 10.1074/jbc.M307847200, S. 40612–20.

[264] T.P. Michael u. a. „Simple sequence repeats provide a substrate for phenotypic variation in the Neurospora crassa circadian clock.“ In: *PLoS One* 2.8 (2007), e795.

[265] N.P. Mira, M.C. Teixeira und I. Sa-Correia. „Adaptive Response and Tolerance to Weak Acids in *Saccharomyces cerevisiae*: A Genome-Wide View.“ In: *OMICS A Journal of Integrative Biology* 14.5 (2010), S. 525–540. DOI: 10.1089/omi.2010.0072.

[266] N.P. Mira u. a. „Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for tolerance to acetic acid.“ In: *Microbial cell factories* 9.79 (2010), S. 1–13.

[267] N.P. Mira u. a. „The RIM101 pathway has a role in *Saccharomyces cerevisiae* adaptive response and resistance to propionic acid and other weak acids.“ In: *FEMS Yeast Res* 9 (2009), 202–216.

[268] A.P. Mitchell. „Fungal CO_2 sensing: a breath of fresh air.“ In: *FEMS Microbiol Lett* 15.22 (2005), R934–R936.

[269] D. Müller u. a. „Cyclic AMP mediates the cell cycle dynamics of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Yeast* 20 (2003), S. 351–367. DOI: 10.1002/yea.967.

[270] L. Mohrmann und C.P. Verrijzer. „Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes.“ In: *Biochim Biophys Acta.* 1681.2-3 (2005), S. 59–73.

[271] S.E. Mole, H.M. Mitchison und P.B. Munroe. „Molecular basis of the neuronal ceroid lipofuscinoses: mutations in CLN1, CLN2, CLN3, and CLN5.“ In: *Hum. Mutat.* 14.3 (1999), S. 199–215.

[272] M. Mollapour und P.W. Piper. „Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast Fps1 aqua-glyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid.“ In: *Mol Cell Biol* 27 (2007), S. 6446–6456.

[273] M. Mollapour u. a. „Screening the yeast deletant mutant collection for hypersensitivity and hyper-resistance to sorbate, a weak organic acid food preservative“. In: *Yeast* 21 (2004), S. 927–946.

[274] M. Mollapour u. a. „Weak acid and alkali stress regulate phosphatidylinositol bisphosphate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Biochem J* 395 (2006), S. 73–80.

[275] F.M. Montañés, A. Pascual-Ahuir und M. Proft. „Repression of ergosterol biosynthesis is essential for stress resistance and is mediated by the Hog1 MAP kinase and the Mot3 and Rox1 transcription factors.“ In: *Mol Microbiol* 79.4 (2011). doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07502.x, S. 1008–1023.

[276] K.A. Morano, C.M. Grant und W.S. Moye-Rowley. „The response to heat shock and oxidative stress in Saccharomyces cerevisiae.“ In: *Genetics* 190.4 (2012). doi: 10.1534/genetics.111.128033, S. 1157–1195.

[277] C.E. Mortimer und U. Müller. „Chemie“. In: *Das Basiswissen der Chemie*. 8. Aufl. Stuttgart: Thieme Verlag, 2003, S. 307.

[278] S.S. Mostafa und G.S. Xuejun. „Strategies for Improved dCO2 Removal in Large-Scale Fed-Batch Cultures.“ In: *Biotechnol. Prog.* 19 (2003), S. 45–51.

[279] M.A. Moxley, D.A. Beard und Bazil J.N. „A pH-Dependent Kinetic Model of Dihydrolipoamide Dehydrogenase from Multiple Organisms.“ In: *Biophysical Journal* 107 (2014), S. 2993–3007.

[280] A.D. Mozdy, J.M. McCaffery und J.M. Shaw. „Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p.“ In: *J Cell Biol.* 151.2 (2000), S. 367–80.

[281] S. Mroczek und J. Kufel. „Apoptotic signals induce specic degradation of ribosomal RNA in yeast“. In: *Nucleic Acids Res* 36 (2008), S. 2874–2888.

[282] J.M. Mulet u. a. „A Novel Mechanism of Ion Homeostasis and Salt Tolerance in Yeast: the Hal4 and Hal5 Protein Kinases Modulate the Trk1-Trk2 Potassium Transporter.“ In: *Mol Cell Biol.* 19.5 (1999), S. 3328–3337.

[283] C. Stein N. Bansal K.R. Pruhs, Hrsg. *Proceedings of the eighteenth annual ACM-SIAM Symposium on discrete algorithms, SODA'07: New Orleans LA, USA; January 7-9*. New York : ACM, 2007, 2007, S. 1027–1035.

[284] U. Na u. a. „The LYR factors SDHAF1 and SDHAF3 mediate maturation of the iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase.“ In: *Cell Metab* 20.2 (2014). doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.014, S. 253–66.

[285] E. de Nadal und F. Posas. „Osmostress-induced gene expression – a model to understand how stress-activated protein kinases (SAPKs) regulate transcription.“ In: *FEBS J.* 282.17 (2015). doi: 10.1111/febs.13323, S. 3275–85.

[286] M. Nadal-Ribelles u. a. „Control of Cdc28 CDK1 by a stress-induced lncRNA.“ In: *Mol Cell.* 53.4 (2014). doi: 10.1016/j.molcel.2014.01.006, S. 549–61.

[287] O. Namy, G. Duchateau-Nguyen und J.P. Rousset. „Translational readthrough of the PDE2 stop codon modulates cAMP levels in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Mol Microbiol.* 43.3 (2002), S. 641–52.

[288] K. Nasmyth. „At the heart of the bubbing yeast cell cycle“. In: *Trends Genet* 12.10 (1996), S. 405–412.

[289] C. Navarrete u. a. „Lack of main K^+ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions.“ In: *FEMS Yeast Res* 10 (2010), S. 508–517.

[290] D.J. Netz u. a. „Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis.“ In: *Nat Chem Biol.* 6.10 (2010). doi: 10.1038/nchembio.432, S. 758–65.

[291] K. Nöh u. a. „Metabolic flux analysis at ultra short time scale: isotopically non-stationary 13C labeling experiments.“ In: *J Biotechnol.* 129.2 (2007), S. 249–267.

[292] S. Nicholls u. a. „Msn2- and Msn4-like transcription factors play no obvious roles in the stress responses of the fungal pathogen *Candida albicans*.“ In: *Eukaryot Cell* 3.5 (2004). doi:10.1128/EC.3.5.1111-1123.2004, S. 1111–1123.

[293] A. Nishimura, N. Kawahara und H. Takagi. „The flavoprotein Tah18-dependent NO synthesis confers high-temperature stress tolerance on yeast cells.“ In: *Biochem Biophys Res Commun.* 430.1 (2013). doi:10.1016/j.bbrc.2012.11.023, S. 137–43.

[294] H. de Nobel u. a. „Parallel and comparative analysis of the proteome and transcriptome of sorbic acid-stressed *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Yeast* 18 (2001), 1413–1428.

[295] H.J. Noorman u. a. „Modeling and experimental validation of carbon dioxide evolution in alkalophilic cultures.“ In: *Biotechnology and Bioengineering* 39 (1991), S. 162–169.

[296] J. Norbeck und A. Blomberg. „The level of cAMP-dependent protein kinase A activity strongly affects osmotolerance and osmo-instigated gene expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Yeast* 16.2 (2000), S. 121–137.

[297] B. Novák, J. Halbauer und E. László. „The effect of CO2 on the timing of cell cycle events in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*“. In: *J Cell Sci* 89 (1988), S. 433–439.

[298] S. Oeljeklaus u. a. „Regulation of peroxisome dynamics by phosphorylation.“ In: *Biochim Biophys Acta* 1863.5 (2016). doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.12.022, S. 1027–1037.

[299] R. Ohgaki u. a. „Characterication of the ion transport activity of the bubbing yeast Na^+/K^+ antiporter, Nha1p, using isolated secretory vesicles.“ In: *BBA* 1712 (2005), S. 185–196.

[300] R. Orij, S. Brul und G.J. Smits. „Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast.“ In: *Biochemica et Biophysica Acta* 1810 (2011), S. 933–944.

[301] R. Orij u. a. „Genome-wide analysis of intracellular pH reveals quantitative control of cell division rate by pH_c in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Genome Biology* 13.9 (2012), S. 1–15.

[302] R. Orij u. a. „In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth.“ In: *Microbiology* 155.1 (2009). doi: 10.1099/mic.0.022038-0, S. 268–278.

[303] S. M. O'Rourke und I. Herskowitz. „Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysise.“ In: *Mol. Biol. Cell* 15 (2004), 532–542.

[304] G. Orphanides und D. Reinberg. „A unied theory of gene expression.“ In: *Cell* 108 (2002), S. 439–451.

[305] I.I. Ouspenski, S.J. Elledge und B.R. Brinkley. „New yeast genes important for chromosome integrity and segregation identified by dosage effects on genome stability.“ In: *Nucleic Acids Res* 27.15 (1999), S. 3001–3008.

[306] A. Ozer und R.K. Bruick. „Non-heme dioxygenases: cellular sensors and regulators jelly rolled into one?“ In: *Nat Chem Biol.* 3.3 (2007). doi:10.1038/nchembio863, S. 144–53.

[307] S.S. Ozturk. „Engineering challenges in high density cell culture systems.“ In: *Cytotechnology* 22 (1996). doi:10.1007/BF00353919, 3–16.

[308] I.L. Pahlman u. a. „Kinetic regulation of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase by the external NADH dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *J Biol Chem* 277.31 (2002). DOI: 0.1074/jbc.M204079200, 27991–27995.

[309] F. Palmieri und M. Monné. „Discoveries, metabolic roles and diseases of mitochondrial carriers: A review.“ In: *Biochim Biophys Acta* 17822 (2016), S. 1–17. URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.03.007.

[310] L. Palmieri u. a. „Identification and functions of new transporters in yeast mitochondria.“ In: *Biochim Biophys Acta* 1459.2-3 (2000), S. 363–9.

[311] L. Palmieri u. a. „Identification of the yeast mitochondrial transporter for oxaloacetate and sulfate.“ In: *J Biol Chem* 274.32 (2000), S. 22184–90.

[312] L. Palmieri u. a. „The mitochondrial dicarboxylate carrier is essential for the growth of Saccharomyces cerevisiae on ethanol or acetate as the sole carbon source.“ In: *Mol Microbiol.* 31.2 (1999), S. 569–77.

[313] X. Pan und J. Heitman. „Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Mol. Cell. Biol.* 19.7 (1999), S. 4874–4887.

[314] M. Paoli, J. Marles-Wright und Smith A. „Structure-function relationships in heme-proteins.“ In: *DNA Cell Biol.* 21.4 (2002). doi:10.1089/104454902753759690, S. 271–80.

[315] J-I. Park, C.M. Grant und I.W. Dawes. „The high-affinity cAMP phosphodiesterase of Saccharomyces cerevisiae is the major determinant of cAMP levels in stationary phase: involvement of different branches of the Ras–cyclic AMP pathway in stress responses.“ In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 327 (2005), S. 311–319.

[316] R. Parker. „RNA degradation in *Saccharomyces cerevisae*.“ In: *Genetics* 191.3 (2012). doi: 10.1534/genetics.111.137265, S. 671–702.

[317] S. Paul und W.S. Moye-Rowley. „Multidrug resistance in fungi: regulation of transporter-encoding gene expression.“ In: *Front Physiol.* 5.143 (2014), S. 1–14.

[318] M.A. Peñalva und H.N. Jr. Arst. „Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts.“ In: *Microbiol Mol Biol Rev* 66.3 (2002), S. 426–446.

[319] A. Pena. „Studies on the mechanism of K^+ transport in yeast“. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 167 (1975), 397–407.

[320] E. Petelenz-Kurdziel u. a. „Quantitative analysis of glycerol accumulation, glycolysis and growth under hyper osmotic stress.“ In: *PLoS Comput Biol.* 10.5 (2013). doi: 10.1371/journal.pcbi.1003084, e1003084.

[321] C.L. Peterson und J.L. Workman. „Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex“. In: *Curr Opin Genet Dev* 10 (2000), S. 187–192.

[322] I. Petrovska u. a. „Filament formation by metabolic enzymes is a specific adaptation to an advanced state of cellular starvation.“ In: *Elife* (2014). doi: 10.7554/eLife.02409., e02409.

[323] C.C. Philpott und O. Protchenko. „Response to iron deprivation in Saccharomyces cerevisiae.“ In: *Eukaryot Cell.* 7.1 (2008). doi:10.1128/EC.00354-07, S. 20–7.

[324] C.C. Philpott u. a. „The response to iron deprivation in Saccharomyces cerevisiae: expression of siderophore-based systems of iron uptake.“ In: *Biochem Soc Trans.* 30.4 (2008), S. 698–702.

[325] P. Piper u. a. „The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast“. In: *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 17.15 (1998). doi:10.1093/emboj/17.15.4257, S. 4257–4265.

[326] P. Piper u. a. „Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives.“ In: *Microbiology* 147 (2001), S. 2635–2642.

[327] P.W. Piper u. a. „Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H^+-ATPase.“ In: *Cell Stress Chaperones* 2.1 (1997), S. 12–24.

[328] S. Pohlers u. a. „Lipid Signaling via Pkh1/2 Regulates Fungal CO2 Sensing through the Kinase Sch9.“ In: *MBio.* 8.1 (2017). 10.1128/mBio.02211-16, e02211–16.

[329] G. Pohlig und H. Holzer. „Phosphorylation and inactivation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase by cyclic AMP-dependent protein kinase from yeast.“ In: *J Biol Chem.* 260.25 (1985), S. 13818–13823.

[330] R. Pohorecki und W. Moniuk. „Kinetics of reaction between carbon dioxide and hydroxyl ions in aqueous electrolyte solutions.“ In: *Chemical Engineering Science* 43.7 (1988), S. 1677–1684.

[331] D. K. Pokholok u. a. „Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes.“ In: *Science* 313 (2006), 533–536.

[332] P. Portela u. a. „*In Vivo* and *in Vitro* Phosphorylation of Two Isoforms of Yeast Pyruvate Kinase by Protein Kinase A.“ In: *J Biol Chem.* 277.34 (2002). doi 10.1074 /jbc.M201094200, 30477–30487.

[333] F. Portillo, P. Eraso und R. Serrano. „Analysis of the regulatory domain of yeast plasma membrane H^+-ATPase by direct mutagenesis and intragenic suppression.“ In: *FEBS* 287.1 (1991), S. 71–74.

[334] J. Postmus u. a. „Dynamic regulation of mitochondrial respiration chain efficiency in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Microbiology* 157 (2011), S. 3500–3511.

[335] J. Poznanski u. a. „Proteins contribute insignificantly to the intrinsic buffering capacity.“ In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 430 (2013), S. 741–744.

[336] J.E. Pérez-Ortín, A. Jordán-Pla und V. Pelechano. „A genomic view of mRNA turnover in yeast.“ In: *C R Biol* 334.8-9 (2011). doi: 10.1016/j.crvi.2011.05.013, S. 647–54.

[337] M. Proft und Struhl K. „MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction.“ In: *Cell* 118.3 (2004), S. 351–361.

[338] M. Proft und K. Struhl. „Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress.“ In: *Mol Cell* 9.6 (2002), S. 1307–1317.

[339] M. Proft u. a. „Genomewide identification of Sko1 target promoters reveals a regulatory network that operates in response to osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Eukaryot Cell* 4.8 (2005), S. 1343–1352.

[340] M. Proft u. a. „The stress-activated Hog1 kinase is a selective transcriptional elongation factor for genes responding to osmotic stress.“ In: *Mol Cell* 23.2 (2006), S. 241–250.

[341] J. Ptacek u. a. „Global analysis of protein phosphorylation in yeast.“ In: *Nature* 438.7068 (2005). DOI: 10.1038/nature04187, S. 679–84.

[342] Cox P.W., Paul G.C. und C.R. Thomas. „Image analysis of the morphology of filamentous microorganisms.“ In: *Microbiology* 144 (1998), S. 817–827.

[343] M. Qi und E.A. Elion. „MAP kinase pathways“. In: *J Cell Sci* 118.16 (2005), S. 3569–3572.

[344] J. Ramos, R. Haro und A. Rodriguez-Navarro. „Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Biochim Biophys Acta* 1029 (1990), S. 211–217.

[345] A.R. Reddi und V. Culotta. „SOD1 Integrates Signals from Oxygen and Glucose to Repress Respiration.“ In: *FCell* 152 (2013), S. 224–235.

[346] R.S. Renger. „Carbon dioxide and its relevance to large-scale brewery fermentation.“ Diss. Technical University of Delft, 1991.

[347] L. Richard, S.E. Guillouet und J. Uribelarrea. „Quantification of the transient and long-term response of *Saccharomyces cerevisiae* to carbon dioxide stresses of various intensities.“ In: *Process Biochemistry* 49.11 (2014), S. 1808–1818.

[348] L. Riego u. a. „GDH1 expression is regulated by GLN3, GCN4, and HAP4 under respiratory growth.“ In: *Biochem Biophys Res Commun* 293.1 (2002), S. 79–85.

[349] N.A. van Riel u. a. „A structured, minimal parameter model of the central nitrogen metabolism in Saccharomyces cerevisiae: the prediction of the behavior of mutants.“ In: *J Theor Biol* 191.4 (1998), S. 397–414.

[350] S. Ringger. „Metabolische Flussanalyse ausgewählter Fließgleichgewichte zur Vorbereitung von Stimulus Response Experimenten in *Saccharomyces cerevisiae*.“ Diss. Universität Stuttgart, Institut für Bioverfahrenstechnik (IBVT), 2014.

[351] I. Rivals u. a. „Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes: which test?“ In: *Bioinformatics.* 23.4 (2007), S. 401–7.

[352] D.K. Ro u. a. „Induction of multiple pleiotropic drug resistance genes in yeast engineered to produce an increased level of anti-malarial drug precursor, artemisinic acid.“ In: *BMC Biotechnol* 8 (2008). doi: 10.1186/1472-6750-8-83, S. 83.

[353] L.S. Robertson u. a. „The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function.“ In: *Mol. Cell. Biol.* 97.11 (1999). doi: 10.1073/pnas.100113397, 5984–5988.

[354] A. Rodríguez-Navarro. „Potassium transport in fungi and plants.“ In: *Biochim Biophys Acta* 1469.1 (2000), S. 1–30.

[355] A. Rodriguez-Navarro und J. Ramos. „Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *J Bacteriol.* 159 (1984), S. 940–945.

[356] T. Roenneberg, Z. Dragovic und M. Merrow. „Demasking biological oscillators: properties and principles of entrainment exemplified by the Neurospora circadian clock.“ In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102.21 (2005), S. 7742–7747.

[357] C.W. van Roermund u. a. „The peroxisomal lumen in Saccharomyces cerevisiae is alkaline.“ In: *J Cell Sci* 117.18 (2004), S. 4231–4237.

[358] R.J. Rolfes. „Regulation of purine nucleotide biosynthesis: in yeast and beyond.“ In: *Biochem Soc Trans.* 34.5 (2006), S. 786–90.

[359] R.J. Rolfes, F. Zhang und A.G. Hinnebusch. „The transcriptional activators BAS1, BAS2, and ABF1 bind positive regulatory sites as the critical elements for adenine regulation of ADE5,7.“ In: *J Biol Chem.* 272.20 (1997), S. 13343–54.

[360] S. Roth, J. Kumme und H.J. Schüller. „Transcriptional activators Cat8 and Sip4 discriminate between sequence variants of the carbon source-responsive promoter element in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Curr Genet.* 45.3 (2004). doi: 10.1007/s00294-003-0476-2, S. 121–8.

[361] F.J.W. Roughton und V.H. Booth. „The catalytic effect of buffers on the reaction CO_2 + H_2O = H_2CO_3.“ In: *Chemical Engineering Science* 32.11 (1938), S. 2049–2069.

[362] A. Ruiz u. a. „The Ppz protein phosphatases regulate Trk-independent potassium influx in yeast.“ In: *FEBS Letters* 578 (2004), S. 58–62.

[363] C. Ruiz-Roig C. Viéitez, F. Posas und E. de Nadal. „The Rpd3L HDAC complex is essential for the heat stress response in yeast.“ In: *Mol Microbiol.* 76.4 (2010). doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07167.x, S. 1049–1062.

[364] R. Russnak, D. Konczal und S.L. McIntire. „A family of yeast proteins mediating bidirectional vacuolar amino acid transport.“ In: *J Biol Chem* 276.26 (2001), S. 23849–57.

[365] H. Ryan, J.P. Ryan und W.H. O'Connor. „The effect of diffusible acids on potassium ions uptake by yeast.“ In: *Biochem. J.* 125 (1971), 1081–1085.

[366] J.P. Ryan und H. Ryan. „The role of intracellular pH in the regulation of cation exchanges in yeast.“ In: *Biochem. J.* 128 (1972), 139–146.

[367] C. Saint-Marc u. a. „Phenotypic Consequences of Purine Nucleotide Imbalance in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Front Physiol.* 183.2 (2009). doi: 10.1534/genetics.109.105858, S. 529–538.

[368] F. Saint-Prix, L. Bönquist und S. Dequin. „Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP+-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation.“ In: *Microbiology* 150.7 (2004). doi: 10.1099/mic.0.26999-0, S. 2209–20.

[369] R.A. Saleem u. a. „Integrated phosphoproteomics analysis of a signaling network governing nutrient response and peroxisome induction.“ In: *Mol Cell Proteomics* 9.9 (2010). doi: 10.1074/mcp.M000116-MCP201, S. 2076–2088.

[370] R. Sander. „Henry's Law Constants“. In: *NIST Standard Reference Database*. Hrsg. von P.J. Linstrom und W.G. Mallard. Bd. 69. Gaithersburg MD: National Institute of Standards und Technology, 2016.

[371] G.M. Santangelo. „Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Microbiol Mol Biol Rev.* 70.1 (2006). doi: 10.1128/MMBR.70.1.253-282.2006, S. 253–282.

[372] M. Moreira dos Santos u. a. „Manipulation of malic enzyme in Saccharomyces cerevisiae for increasing NADPH production capacity aerobically in different cellular compartments.“ In: *Metab Eng* 6.4 (2004). doi: 10.1016/j.ymben.2004.06.002, S. 352–363.

[373] A.B. Sanz u. a. „Cooperation between SAGA and SWI/SNF complexes is required for efficient transcriptional responses regulated by the yeast MAPK Slt2.“ In: *Nucleic Acids Res.* (2016). DOI: 10.1093/nar/gkw324.

[374] F. Schädel und E. Franco-Lara. „Rapid sampling devices for metabolic engineering applications.“ In: *Appl Microbiol Biotechnol.* 83 (2009), S. 199–208.

[375] W. Schepers u. a. „In vivo phosphorylation of Ser21 and Ser83 during nutrient-induced activation of the yeast protein kinase A (PKA) target trehalase.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 287.53 (2012). DOI 10.1074/jbc.M112.421503, S. 44130–44142.

[376] C. Schüller u. a. „Global phenotypic analysis and transcriptional proling denes the weak acid stress response regulon in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Mol Biol Cell* 15 (2004), 706–720.

[377] S. Schmazriedt u. a. „Integration of physiology and fluid dynamics“. In: *Process Integration in Biochemical Engineering*. Hrsg. von U. von Stockar und L. A. M. van der Wielen. Bd. 80. New York: Springer-Verlag, 2003, S. 19–68.

[378] E.G. ter Schure, N.A. van Riel und C.T. Verrips. „The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *FEMS Microbiol Rev* 24.1 (2000), S. 67–83.

[379] R. Serrano. „In vivo glucose activation of the plasma membrane.“ In: *FEBS* 156.1 (1983), S. 11–14.

[380] E.R. Setiadi u. a. „Transcriptional response of Candida albicans to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks.“ In: *J Mol Biol.* 361.3 (2006), S. 399–411.

[381] H. Sharifian u. a. „Parallel feedback loops control the basal activity of the HOG MAPK signaling cascade.“ In: *Integr Biol (Camb)* 7.4 (2015), S. 412–22.

[382] H.H.W. Silljé u. a. „Function of Trehalose and Glycogen in Cell Cycle Progression and Cell Viability in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *J Bacteriol* 181.2 (1999), S. 396–400.

[383] S. Silve u. a. „ABF1 is a phosphoprotein and plays a role in carbon source control of COX6 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Mol Cell Biol.* 12.9 (1992), S. 4197–208.

[384] C.L. Smith u. a. „Structural analysis of the yeast SWI/SNF chromatin remodeling complex.“ In: *Nat Struct Biol* 10 (2003), S. 141–145.

[385] D.A. Smith, Morgan B.A. und Quinn J. „Stress signalling to fungal stress-activated protein kinase pathways“. In: *FEMS Microbiol Lett* 306.1 (2010). doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.01937.x, S. 1–8.

[386] R.L. Smith und A.D. Johnson. „Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes.“ In: *Trends Biochem Sci* 25.7 (2000), S. 325–330.

[387] C. Solé u. a. „A novel role for lncRNAs in cell cycle control during stress adaptation.“ In: *Curr Genet.* 61.3 (2015). doi: 10.1007/s00294-014-0453-y, S. 299–308.

[388] N. Soontorngun. „Reprogramming of nonfermentative metabolism by stress-responsive transcription factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Curr Genet* (2016), S. 1–7. DOI: 10.1007/s00294-016-0609-z.

[389] R. Sopko u. a. „Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression.“ In: *Mol Cell.* 21.3 (2006), S. 319–330.

[390] P.T. Spellman u. a. „Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization.“ In: *Mol Biol Cell.* 9.12 (1998), S. 3273–97.

[391] I. Spode u. a. „ATF/CREB sites present in sub-telomeric regions of Saccharomyces cerevisiae chromosomes are part of promoters and act as UAS/URS of highly conserved COS genes“. In: *J Mol Biol* 319.2 (2002), S. 407–420.

[392] V. Stolc, A. Shmygelska und Y. Griko. „Adaptation of organisms by resonance of RNA transcription with the cellular redox cycle.“ In: *PLoS One* 6.9 (2011). doi: 10.1371/journal.pone.0025270, e25270.

[393] S. Strahl-Bolsinger u. a. „SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast“. In: *Genes Dev* 11.1 (1997), S. 83–93.

[394] M. Stratford und P.A. Anslow. „Comparison of the inhibitory action on *Saccharomyces cerevisiae* of weak-acid preservatives, uncouplers, and medium-chain fatty acids“. In: *FEMS Microbiol Lett.* 142 (1996), S. 53–58.

[395] X. Su u. a. „YBR246W is required for the third step of diphthamide biosynthesis.“ In: *J Am Chem Soc.* 134.2 (2012). doi: 10.1021/ja208870a, S. 773–6.

[396] P. Sudarsanam u. a. „The nucleosome remodeling complex, Snf/Swi, is required for the maintenance of transcription *in vivo* and is partially redundant with the histone acetyltransferase, Gcn5.“ In: *The EMBO Journal* 18.11 (1999), 3101–3106.

[397] S.S.W. Szeto u. a. „Expression of Saccharomyces cerevisiae Sdh3p and Sdh4p parlogs results in catalytically active succinate dehydrogenase isoenzymes.“ In: *JBC.* 287.27 (2012), S. 22509–22520.

[398] A. Takabatake, N. Kawazoe und S. Izawa. „Plasma membrane proteins Yro2 and Mrh1 are required for acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Appl Microbiol Biotechnol.* 99.6 (2015). doi: 10.1007/s00253-014-6278-2., S. 2805–14.

[399] S. Takuma, C. Hirashima und J.M. Piret. „Dependence on glucose limitation of the pCO2 influences on CHO cell growth, metabolism and IgG production.“ In: *Biotechnol. Bioeng.* 97 (2007). doi:10.1002/bit.21376, 1479–1488.

[400] H. Tamaki. „Glucose-stimulated cAMP-protein kinase A pathway in yeast Saccharomyces cerevisiae“. In: *J Biosci Bioeng* 104.4 (2007). doi: 10.1263/jbb.104.245, S. 245–250.

[401] H. Taymaz-Nikerel, A . Cankorur-Cetinkaya und B. Kirdar. „Genome-Wide Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Stress-Induced Perturbations.“ In: *Front Bioeng Biotechnol.* 4.17 (2016), S. 1–19. DOI: 10.3389/fbioe.2016.00017.

[402] H. Taymaz-Nikerel u. a. „Development and application of a differential method for reliable metabolome analysis in *Escherichia coli*.“ In: *Anal Biochem.* 386.1 (2009), S. 9–19.

[403] J.J. Ter Linde und H.Y. Steensma. „A microarray-assisted screen for potential Hap1 and Rox1 target genes in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Yeast* 19.10 (2002), S. 825–840.

[404] B. Teusink u. a. „Can yeast glycolysis be understood in terms of in vitro kinetics of the constituent enzymes? Testing biochemistry.“ In: *Eur J Biochem.* 267.17 (2000), S. 5313–5329.

[405] J.M. Thevelein und J.H. de Winde. „Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Mol Microbiol.* 33.5 (1999), S. 904–918.

[406] I. Thiele und B.O. Palsson. „A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction.“ In: *Nature Protocols* 5 (2010). doi:10.1038/nprot.2009.203, S. 93–121.

[407] C.R. Thomas. „Image analysis: putting filamentous organisms in the picture.“ In: *Trends Biotechnol.* 10 (1992), S. 343–348.

[408] D. Thomas, A. Becker und Y. Surdin-Kerjan. „Reverse methionine biosynthesis from S-adenosylmethionine in eukaryotic cells.“ In: *J Biol Chem.* 275.52 (2000), S. 40718–24.

[409] M. Thorsen u. a. „The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast.“ In: *Mol Biol Cell.* 17.10 (2006), S. 4400–4410.

[410] T. Toda u. a. „Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Mol Cell Biol.* 7.4 (1987), S. 1371–1377.

[411] T. Toda u. a. „Three different genes in S. cerevisiae encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase.“ In: *Cell.* 50.2 (1987), S. 277–287.

[412] J.D. Trawick u. a. „Regulation of yeast COX6 by the general transcription factor ABF1 and separate HAP2- and heme-responsive elements.“ In: *Mol Cell Biol.* 12.5 (1992), S. 2302–14.

[413] F. Tsang u. a. „Reduced Ssy1-Ptr3-Ssy5 (SPS) signaling extends replicative life span by enhancing NAD+ homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *J Biol Chem.* 290.20 (2015), S. 12753–64.

[414] R. Ueta u. a. „Iron-induced dissociation of the Aft1p transcriptional regulator from target gene promoters is an initial event in iron-dependent gene suppression.“ In: *Mol Cell Biol.* 32.24 (2012). doi:10.1128/MCB.00726-12, S. 4998–5008.

[415] P. Uetz u. a. „A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Nature.* 403.6770 (2000), S. 623–7.

[416] A. Ullah. „The role of intracellular pH in environmental adaptation of yeasts“. Diss. FNWI: Swammerdam Institute for Life Sciences (SILS), 2015.

[417] A. Ullah u. a. „Yeast adaptation to weak acids prevents futile energy expenditure.“ In: *frontiers in microbiology* 4.142 (2013), S. 1–10.

[418] I. Uno u. a. „The functional domain of adenylate cyclase associated with entry into meiosis in Saccharomyces cerevisiae“. In: *J Bacteriol* 172 (1990), S. 102–109.

[419] M.A. Uzarska u. a. „Mitochondrial Bol1 and Bol3 function as assembly factors for specific iron-sulfur proteins.“ In: *Elife* (2016). doi: 10.7554/eLife.16673, e16673.

[420] G. Valley und L.F. Rettger. „The influence of carbon dioxide on bacteria“. In: *Journal of Bacteriology* 14 (1927), S. 101–137.

[421] F. Valsecchi, C. Konrad und G. Manfredi. „Role of soluble adenylyl cyclase in mitochondria.“ In: *Biochim Biophys Acta* 1842 (2014). doi: 10.1016/j.bbadis.2014.05.035, S. 2555–60.

[422] F. Valsecchi u. a. „cAMP and Mitochondria.“ In: *Physiology* 28.3 (2013). doi: 10.1152/physiol.00004.2013, 199–209.

[423] A. Van Ho, D.M. Ward und J. Kaplan. „Transition metal transport in yeast.“ In: *Annu Rev Microbiol.* 56 (2002), S. 237–261.

[424] P.A. Vanrolleghem u. a. „Validation of a metabolic network for *Saccharomyces cerevisiae* using mixed substrate studies.“ In: *Biotechnol Prog.* 12.4 (1996), S. 434–48.

[425] S. Vaseghi. „Modellgestützte Analyse der Dynamik des Phosphofructokinase-Systems in *Saccharomyces cerevisiae*.“ Diss. Universität Stuttgart, 2000.

[426] B.J. Venters und B.F. Pugh. „How eukaryotic genes are transcribed.“ In: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 44 (2009), S. 117–141.

[427] B.J. Venters u. a. „A comprehensive genomic binding map of gene and chromatin regulatory proteins in Saccharomyces.“ In: *Mol Cell* 41.4 (2011), S. 480–492.

[428] C. Verduyn u. a. „Effect of Benzoic Acid on Metabolic Fluxes in Yeasts: A Continuous-Culture Study on the Regulation of Respiration and Alcoholic Fermentation“. In: *Yeast* 8 (1992), S. 501–517.

[429] L. Vernis u. a. „A newly identified essential complex, Dre2-Tah18, controls mitochondria integrity and cell death after oxidative stress in yeast.“ In: *PLoS One* 4.2 (2009). doi: 10.1371/journal.pone.0004376, e4376.

[430] S. Vidan und A.P. Mitchell. „Stimulation of Yeast Meiotic Gene Expression by the Glucose-Repressible Protein Kinase Rim15p.“ In: *Molecular and Cellular Biology* 17.5 (1997), S. 2688–2697.

[431] C.A. Viegas und I. Sá-Correia. „Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid.“ In: *J Gen Microbiol* 137 (1991), S. 645–651.

[432] C.A. Viegas u. a. „Yeast adaptation to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid involves increased membrane fatty acid saturation degree and decreased OLE1 transcription“. In: *Biochem Biophys Res Commun* 330 (2005), S. 271–278.

[433] R. Viswanathan, J.D. True und D.T. Auble. „Molecular Mechanism of Mot1, a TATA-Binding Protein (TBP)-DNA Dissociating Enzyme.“ In: *J Biol Chem* (2016). doi: 10.1074/jbc.M116.730366, S. 1–24.

[434] V. Volkov. „Quantitative description of ion transport via plasma membrane of yeast and small cells.“ In: *Front. Plant Sci.* 6 (2015), S. 425. DOI: 10.3389/fpls.2015.00425.

[435] I.V. Volodyaev, E.N. Krasilnikova und R.N. Ivanovsky. „CO_2 mediated interaction in yeast stimulates budding and growth on minimal media.“ In: *PLoS One* 8.4 (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0062808, e62808.

[436] G. M. Walker. *Yeast - Physiology and Biotechnology*. Chichester: John Wiley Son, 1998, S. 350.

[437] T. Walther u. a. „Developmental stage-dependent metabolic regulation during meiotic differentiation in budding yeast“. In: *BMC Biol* 12.60 (2014). doi: 10.1186/s12915-014-0060-x, S. 1–22.

[438] R.J.A Wanders u. a. „Bicarbonate and the pathway of gultamate oxidation in isolated rat-liver mitochondria.“ In: *EJB* 133 (1983), S. 245–254.

[439] R. Waterland u. a. „The Isoforms of Yeast Cytochrome c Oxidase Subunit V Alter the in Vivo Kinetic Properties of the Holoenzyme.“ In: *J Biol Chem.* 266.7 (1991), S. 4180–4186.

[440] A.D. Watson u. a. „Ssn6-Tup1 interacts with class I histone deacetylases required for repression.“ In: *Genes Dev.* 14.21 (2000), S. 2737–2744.

[441] D.C. Watson und D.R. Berry. „Fluctuation in the levels of intracellular and extracellular cAMP during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *FEMS Microbiol Let* 1.2 (1977). doi:10.1016/0378-1097(77)90006-4, S. 83–86.

[442] T.R. Webb u. a. „Diphthamide modification of eEF2 requires a J-domain protein and is essential for normal development.“ In: *J Cell Sci.* 121.19 (2008). doi: 10.1242/jcs.035550, S. 3140–5.

[443] M. Werner-Washburne, D. Brown und E. Braun. „Bcy1, the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in yeast, is differentially modified in response to the physiological status of the cell.“ In: *J Biol Chem.* 266.19 (1991), S. 19704–19709.

[444] D.J. West. „Effects of pH and Biotin on a Circadian Rhythm of Conidiation in *Neurospora crassa*“. In: *J Bacteriol* 123.1 (1975), S. 387–389.

[445] E. Wilhelm, R. Battino und R.J. Wilcock. „Low-pressure solubility of gases in liquid water.“ In: *Chem. Rev.* 77.2 (1977), S. 219–262.

[446] C.L. Winder u. a. „Global metabolic profiling of *Escherichia coli* cultures: an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites.“ In: *Anal Chem.* 80.8 (2008), S. 2939–2948.

[447] J. Winderickx u. a. „From feast to famine; adaptation to nutrient availability in yeast“. In: *Yeast Stress Responses.* Hrsg. von S. Hohmann und P.W.H. Mager. Bd. 1. Berlin: Springer, 2003, S. 305–386.

[448] O Wolkenhauer. „Mathematical modelling in the post-genome era: understanding genome expression and regulation–a system theoretic approach.“ In: *Biosystems.* 65.1 (2002), S. 1–18.

[449] K. Woods und T. Höfken. „The zinc cluster proteins Upc2 and Ecm22 promote filamentation in *Saccharomyces cerevisiae* by sterol biosynthesis-dependent and -independent pathways.“ In: *Mol Microbiol.* 99.3 (2016), S. 512–27. DOI: 10.1111/mmi.13244.

[450] J. Wu u. a. „TUP1 utilizes histone H3/H2B-specific HDA1 deacetylase to repress gene activity in yeast.“ In: *Mol Cell* 7.1 (2001), S. 117–126.

[451] K. Wu, J.H. Dawe und J.P. Aris. „Expression and subcellular localization of a membrane protein related to Hsp30p in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Biochim Biophys Acta.* 1463.2 (2000), S. 477–82.

[452] P-Y.J. Wu u. a. „Molecular Architecture of the S. cerevisiae SAGA Complex“. In: *Molecular Cell* 15 (2004), S. 199–208.

[453] H. Xiao, J.M. Smeekens und R. Wu. „Quantification of tunicamycin-induced protein expression and N-glycosylation changes in yeast.“ In: *Analyst* (2016).

[454] P.H. Yancey. „Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses“. In: *The Journal of Experimental Biology* 208 (2005). doi:10.1242/jeb.01730, S. 2819–2830.

[455] H. Yang u. a. „Structural mechanism of ergosterol regulation by fungal sterol transcription factor Upc2.“ In: *Nat Commun.* 6 (2015). doi: 10.1038/ncomms7129, S. 6129.

[456] Z-F. Yang, K. Schügerl und L. Lucas. „The inhibitory mechanisms of glucose and carbon dioxide on the biosyntheses of penicillins and cephalosporins.“ In: *J. Biotechnol.* 51 (1996), 137–148.

[457] T. Ye, K. Elbing und S. Hohmann. „The pathway by which the yeast protein kinase Snf1p controls acquisition of sodium tolerance is different from that mediating glucose regulation.“ In: *Microbiology* 154.9 (2008). doi: 10.1099/mic.0.2008/020149-0, S. 2814–2826.

[458] T. You u. a. „A systems biology analysis of long and short-term memories of osmotic stress adaptation in fungi.“ In: *BMC Res Notes.* 5.258 (2012). doi: 10.1186/1756-0500-5-258.

[459] E.T. Young u. a. „Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8.“ In: *J Biol Chem.* 278.28 (2003), S. 26146–58.

[460] S. Zaman u. a. „How Saccharomyces responds to nutrients“. In: *Annu Rev. Genet* 42 (2008). doi: 10.1146/annurev.genet.41.110306.130206, S. 27–81.

[461] G.G. Zampar u. a. „Temporal system-level organization of the switch from glycolytic to gluconeogenic operation in yeast.“ In: *Mol Syst Biol* 9.651 (2013). doi: 10.1038/msb.2013.11., S. 1–13.

[462] G.G. Zampar u. a. „Temporal system-level organization of the switch from glycolytic to gluconeogenic operation in yeast.“ In: *Mol Syst Biol.* 9.651 (2013). doi: 10.1038/msb, S. 1–13.

[463] J.A. Zanghi u. a. „Bicarbonate concentration and osmolality are key determinants in the inhibition of CHO cell polysialylation under elevated pCO2 or pH.“ In: *Biotechnol. Bioeng.* 65 (1999), 182–191.

[464] R.M. Zelle u. a. „Key process conditions for production of C_4 dicarboxylic acids in bioreactor batch cultures of an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain.“ In: *Applied and environmental microbiology* 76.3 (2010), S. 744–750.

[465] R.M. Zelle u. a. „Malic Acid Production by Saccharomyces cerevisiae: Engineering of Pyruvate Carboxylation, Oxaloacetate Reduction, and Malate Export.“ In: *American Society for Microbiology* 74.9 (2008), S. 2766–2777.

[466] A.P. Zeng. „Effect of CO2 absorption on the measurement of CO2 evolution rate in aerobic and anaerobic continuous cultures.“ In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42 (1995), 688–691.

[467] W.P. Zeymaker u. a. „Studies on succinate dehydrogenase VI. Inhibition by monocarboxylic acids.“ In: *BBA.* 198 (1970), S. 415–422.

[468] J. Zhang u. a. „Determination of the Cytosolic NADPH/NADP Ratio in *Saccharomyces cerevisiae* using Shikimate Dehydrogenase as Sensor Reaction.“ In: *Sci Rep* 5 (2015). doi: 10.1038/srep12846, S. 12846.

[469] R. Zhao und R.A.F. Reithmeier. „Expression and characterization of the anion transporter homologue YNL275w in *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Am J Physiol Cell Physiol* 281 (2001), S. C33–C45.

[470] M.M. Zhu u. a. „Effects of elevated pCO2 and osmolality on growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: a case study.“ In: *Biotechnol. Prog.* 21 (2005). doi:10.1021/bp049815s, 70–77.

[471] E. Zinser u. a. „Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *J Bacteriol.* 173.6 (1991), S. 2026–34.

[472] J.H. Zippin u. a. „CO_2/HCO_3^- and Calcium-regulated Soluble Adenylyl Cyclase as a Physiological ATP Sensor.“ In: *Biol Chem.* 288.46 (2013), 33283–33291.

[473] R.S. Zitomer, P. Carrico und Deckert J. „Regulation of hypoxic gene expression in yeast.“ In: *Kidney Int.* 51.2 (1997), S. 507–513.

[474] R.S. Zitomer und C.V. Lowry. „Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Microbiol Rev* 56 (1992), S. 1–11.