

**Verknüpfung molekularphysiologischer und  
reaktionskinetischer Werkzeuge zum Studium der  
*in vivo* Regulation des Glukosetransports von  
*Saccharomyces cerevisiae***

von der Fakultät für Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart zur  
Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von  
**Stefan Buziol**  
aus Kempten im Allgäu

Hauptberichter: Prof. Dr.-Ing. Matthias Reuss  
Mitberichter: Prof. Dr. Christoph Syldatk

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2003

Institut für Bioverfahrenstechnik  
Universität Stuttgart  
2003

**Für Petra**

*Nichts kann rückgängig gemacht werden, was einmal gedacht wurde.*

Friedrich Dürrenmatt

## Danksagung

Herrn Prof. Dr.-Ing. M. Reuss möchte ich für die Betreuung sowie das Interesse am Fortschreiten der Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. C. Syldatk danke ich für die Übernahme des Co-Referats.

Herrn Prof. Dr. E. Boles danke ich für die Versorgung mit den nötigen Stämmen und Antikörpern sowie für die ständige Diskussionsbereitschaft.

Ich bedanke mich beim Team in Hohenheim für eine schöne Zeit im ersten Jahr meiner Arbeit.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) möchte ich für die finanzielle Förderung der Arbeit danken.

Frau Dr. G. Wildner, Biologielehrerin des Bayernkollegs in Augsburg, danke ich besonders für die Eröffnung der „Welt der Biologie“.

Ich danke den zugehörigen Institutionen für die Möglichkeit zur beruflichen Neuorientierung über den „Zweiten Bildungsweg“.

Bei Lydia und Salah möchte ich mich für ihren Einsatz im Rahmen ihrer Diplom- bzw. Studienarbeit, sowie auch für die schönen Stunden während Unternehmungen ausserhalb des Labors bedanken.

Bei Anna und Ivana bedanke ich mich für ihr hohes Engagement und die gute Stimmung während ihrer Praktikumszeit in Deutschland.

Bei den gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern und Freunden am IBVT möchte ich mich herzlich für eine sehr angenehme Atmosphäre (während und nach der Arbeitszeit) bedanken. Es war eine schöne Zeit am IBVT.

Frau Moser möchte ich für Ihre ständige Hilfsbereitschaft danken.

Gerne hätte ich Herrn Prof. Dr.-Ing. M. Rizzi persönlich für die Bereitstellung des Themas gedankt.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für ihre Unterstützung und Toleranz nicht nur während meines Zweiten Bildungswegs bedanken. Meinem Bruder Enrico danke ich für die Einheiten „Allgäuer Mentalität“, die ich durch ihn immer wieder erfuhr. Meinen Grosseltern möchte ich ebenfalls für Ihre Unterstützung danken.

Den grössten Dank schulde ich Petra - für ihr Verständnis sowie ihre moralische Unterstützung - und im Besonderen für ihren uneingeschränkten Rückhalt! Die Vorfreude auf unsere Anna hat mich während des schriftlichen Teils der Arbeit sehr motiviert!

# Abstract

The topic of the present work is the investigation of the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae* at the level of reaction kinetics and molecular physiology.

The transport of hexoses in *S. cerevisiae* is based on the mechanism of carrier mediated facilitated diffusion and consists of a multifactorial uptake system. The glucose-dependent modulation in the affinity of wild-type cells results from differential expression of 20 hexose transport-related proteins with significantly different affinities to the sugar. The regulation of this transport system at the level of transcription and posttranslational modification is not yet fully understood. The thesis aims at linking fermentation technology, efficient analytics and flexible simulation tools for mathematical modelling of the transport step with tools from molecular biology to elucidate the regulation and kinetics of the transport system.

First the transcriptional regulation and the kinetic properties of the glucose transporters Hxt1, Hxt5, and Hxt7 were investigated using single expression strains. In addition the wild-type strain was characterized. Aerobic fed-batch cultures of these strains under quasi steady-state conditions were used for the estimation of kinetic properties of the individual transporters under *in vivo* conditions. Employing fed-batch cultivations instead of the routinely used chemostat cultivation a quasi steady-state can be reached more quickly than the steady-state of a chemostat. This allowed the characterization of the different strains in a shorter time. The quasi steady-state cultures were perturbed by a pulse of glucose and the dynamic responses of the strains to the changes in extracellular glucose concentration were investigated.

For estimation of the kinetic parameters of each of the single expression strain and the wild-type strain the measured glucose concentrations were compared with the result obtained from the numerical integration of the dynamic balance equation for the glucose assuming irreversible Michaelis-Menten kinetics.

Hxt1 was confirmed to be a low-affinity and Hxt7 a high-affinity glucose transporter. Surprisingly, the wild-type strain showed the highest affinity. Actually, the Hxt7-protein is the glucose transporter with the highest affinity, therefore an additional modulation of the transport system in the wild-type strain would appear. Hxt5, recently recognized as a starvation-induced transporter, was successfully characterized by performing additional pulse experiments using anaerobic and aerobic chemostat cultivations. This transporter turned out to be of intermediate affinity. The results of this investigation agree well with literature data.

For a complete description of the transport step it is necessary to include intracellular glucose and glucose-6-phosphate (G6P). To this end, it is important to measure the initial rate of transport because during uptake measurements intracellular glucose accumulates which in turn can lead to an efflux of glucose. This efflux of intracellular glucose superimposes the uptake measurements.

Whilst for the measurements of G6P it was possible to resort upon existing methods for cell disruption and extraction, new methods had to be developed for the measurement of intracellular glucose. A protocol for the measurement of intracellular glucose based on the boiling-water method was adapted and validated.

Establishment of a stopped-flow sampling system allowed measurements of metabolite dynamics on the time-scale of milliseconds. This system was applied to follow the dynamic signal of intracellular glucose and G6P. Based on this data it will be possible to validate a

model of glucose transport resting on a reversible influx-efflux kinetic considering G6P inhibition. This will be the first complete characterization of the transport step and yield insight into the role of G6P (inhibition) and intracellular glucose (accumulation). Preliminary results point to a role of G6P as inhibitor of the transport step.

To elucidate the dynamics of expression of three characteristic glucose transport proteins in parallel in *S. cerevisiae*, their expression was followed after changes in the concentration of extracellular glucose. Antibodies against the hexose transport proteins Hxt1 (low-affinity), Hxt5 (intermediate-affinity) and Hxt7 (high-affinity) were used to monitor their expression levels before and after the perturbations. The concentrations of glucose, ethanol and biomass was correlated with the expression of the transporters measured via Western analysis.

After a shift from glucose-limited continuous cultivation to batch-mode under glucose excess an induction of Hxt1 expression and a decrease in the expression of Hxt5 was observed. The cells adapt their uptake system to the new conditions. Expression of Hxt7 also declined after an initial increase in the abundance of this protein. This initial increase of the Hxt7 expression may reflect a cellular mechanism to ensure a rapid uptake of the additional available glucose.

In a second approach multiple glucose pulses to a chemostat cultivation under glucose limitation were applied to simulate concentration gradients in large-scale production bioreactors. No changes were observed in the expression of Hxt1 and Hxt5 upon multiple stimuli. In contrast, expression of Hxt7 showed a clear response to the multiple pulses. A correlation between the expression of Hxt7 and the specific rates for uptake of glucose and the excretion of ethanol could be demonstrated.

Metabolic control analysis of a dynamic model describing anaerobic growth of *S. cerevisiae* has shown that the overwhelming control of glycolytic flux resides with the sugar uptake step. It was thus concluded that an enhancement of the transport capacity should lead to an increased glycolytic flux.

To test this hypothesis the glycolytic flux of a strain overexpressing *HXT5* were compared with a *HXT5* single expression strain, and a wild-type strain. To this end, the specific rates of glucose uptake and ethanol excretion of the different strains were measured in anaerobic chemostat cultures.

The enhancement of the specific uptake and excretion rates by the overexpression strain was rather modest and not satisfying. This could be due to the “protein burden” resulting from overexpression or because of the great change in metabolite pool concentrations. Substantial changes in metabolite concentrations may be cytotoxic or lead to unwanted flux diversion.

Therefore a future approach to enhance the glycolytic flux has to ensure a minimum of “protein burden” and the maintenance of homeostasis should also be considered. As further simulation results showed, also enzymes need to be considered which counteract the increasing pool concentrations.

# Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Glukosetransport von *Saccharomyces cerevisiae* auf reaktionskinetischer und molekularphysiologischer Ebene untersucht. Der Transport von Hexosen beruht bei *S. cerevisiae* auf dem Prozess der carriervermittelten erleichterten Diffusion. Durch die Expression geeigneter Transportproteine aus einem Set von 20 Genen kann sich die Zelle auf die Umgebungsbedingungen einstellen. Die dafür notwendige Regulation auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene ist noch nicht vollständig verstanden. Durch den kombinierten Einsatz moderner Fermentationstechnologie, leistungsfähiger Analysemethoden, flexibler Simulationswerkzeuge zur mathematischen Modellierung des Transportschrittes und nicht zuletzt moderner molekularbiologischer Methoden wurden in dieser Arbeit neue Erkenntnisse in der Regulation und Kinetik des Glukosetransportsystems gewonnen.

Zunächst wurden die kinetischen Parameter für die Transportproteine Hxt1, Hxt5 und Hxt7 anhand von Einzelexpressionsmutanten *in vivo* geschätzt. Zusätzlich wurde der Wildtyp charakterisiert. Durch den Einsatz der aeroben fed-batch Kultivierung wurde der quasi-stationäre Zustand, der die Grundvoraussetzung für diese Untersuchungen ist, im Gegensatz zum steady-state bei Chemostat-Kultivierung nach kürzerer Zeit erreicht. Dies ermöglichte es, die Experimente zur reaktionskinetischen Charakterisierung der verschiedenen Stämme in schnellerer Abfolge durchzuführen, als es unter Einsatz der dafür üblichen Chemostat-Kultivierung möglich gewesen wäre.

Ausgehend von Zellpopulationen unter physiologisch definiertem Zustand wurden Glukosepulsversuche durchgeführt, und die Abnahme der extrazellulären Glukose verfolgt. Dieses Signal wurde mit dem Resultat einer numerischen Integration der dynamischen Bilanzgleichung verglichen, um unter Verwendung einer irreversiblen Michaelis-Menten Kinetik die kinetischen Parameter für die Einzelexpressionsmutanten und den Wildtyp abzuschätzen.

Dabei wurde Hxt1 als niedrigaffiner und Hxt7 als hochaffiner Glukosetransporter bestätigt. Überraschenderweise wies der Wildtyp die höchste Affinität auf. Da allerdings Hxt7 der Transporter mit der höchsten Affinität ist, muss im Wildtyp eine Modulierung des Transportsystems stattgefunden haben. Die Charakterisierung des Hxt5-Proteins, dem kürzlich eine wichtige Rolle in *S. cerevisiae* als „Hungertransporter“ zugesprochen wurde, gelang durch zusätzliche Pulsversuche unter Einsatz anaerober und aerober Chemostat-Kultivierung. Demnach weist dieser Transportertyp eine intermediäre Affinität auf. Die erzielten Ergebnisse stimmen gut mit den Literaturdaten überein.

Um den Transportschritt vollständig beschreiben zu können, ist es nötig, die Konzentrationen von intrazellulärer Glukose und Glukose-6-Phosphat (G6P) miteinzubeziehen. Es ist hierbei von Bedeutung, die initiale Aufnahmerate zu erfassen, da es während der Glukoseaufnahmemessungen zu einem Anstau intrazellulärer Glukose und infolgedessen einem Efflux derselben kommen kann. Dieser Efflux überlagert dann die Aufnahmemessungen.

Während für die Messung von G6P geeignete Zellaufschluss und Extraktionsverfahren zur Verfügung standen, musste zur Erfassung des Signals intrazellulärer Glukose eine neue

Methode etabliert werden. Ein auf der boiling-water Methode basierendes Protokoll wurde den Anforderungen entsprechend angepasst und validiert.

Durch die Etablierung einer stopped-flow Probenahmetechnik wurde es möglich, die Dynamik der Konzentrationen intrazellulärer Glukose und von G6P im Millisekundenbereich zu erfassen. Die experimentellen Daten für die Dynamik von intrazellulärer Glukose und G6P können nun eingesetzt werden um ein Modell des Glukosetransports zu validieren, das auf einer reversiblen Influx-Efflux Kinetik basiert und eine Inhibition durch G6P berücksichtigt.

Auf der Basis der dabei zu schätzenden kinetischen Parameter kann der Transportschritt dann erstmalig vollständig charakterisiert werden. Dies wird die Rolle des G6P (Inhibition) und der intrazellulären Glukose (Akkumulation) weiter beleuchten. In ersten Modellierungsansätzen zeichnete sich schon eine Rolle von G6P als Inhibitor des Transportschrittes ab.

In weiteren Untersuchungen wurde durch den Einsatz von Western blot Analysen die Dynamik der Hexosetransportproteine (Hxt1, Hxt5 und Hxt7) parallel als Antwort auf Veränderungen in der Glukosekonzentration verfolgt. Die gemessenen Konzentrationen für extrazelluläre Glukose, Ethanol und Biomasse wurde mittels Western blot Analyse mit der Expression der Transportproteine korreliert.

Zuerst wurde eine glukoselimitierte Chemostat-Kultivierung auf einen batch-Prozess unter Glukoseüberschuss umgeschaltet. Dabei wurde eine Reprimierung des intermediärraffinen Hxt5-Proteins und eine Induktion von Hxt1, dem niedrigaffinen Transporter beobachtet. Die Zelle passt somit das Aufnahmesystem für Glukose an die veränderten Umweltbedingungen an. Die Expression des hochaffinen Hxt7-Transporters wird nach dem Umschalten zunächst verstärkt, um dann stark abzunehmen. Dies könnte einen Mechanismus der Zelle darstellen, auf die erhöhten Glukosekonzentrationen schnell zu reagieren.

Beim zweiten Ansatz wurde eine Chemostat-Kultur durch multiple Glukosepulse dynamisch angeregt. Es konnte kein Einfluss der multiplen Stimuli auf die Expression der Transporter Hxt1 und Hxt5 nachgewiesen werden. Hxt7 hingegen zeigte deutliche Änderungen im Expressionsprofil. Es wurde eine Korrelation zwischen der Expression von Hxt7 und den spezifischen Raten für die Glukoseaufnahme und die Ethanolbildung beobachtet.

Die Anwendung des Konzepts der „Metabolic control analysis“ (Sensitivitätsanalyse) auf ein dynamisches Modell zur Beschreibung des anaeroben Wachstums von *S. cerevisiae* zeigte, dass die überwiegende Kontrolle des glycolytischen Flusses auf dem Transportschritt liegt. Somit sollte eine Erhöhung der Transportkapazität zu einem höheren glycolytischen Fluss führen.

Unter Verwendung einer *HXT5*-Überexpressionsmutante (*HXT5*-Multicopyplasmid), der *HXT5*-Einzelexpressionsmutante sowie des Wildtyps wurden vergleichende Messungen des glycolytischen Flusses durchgeführt. Dazu wurden anaerobe Chemostat-Kulturen eingesetzt und die spezifischen Glukoseaufnahme- und Ethanolbildungsraten gemessen. Die Erhöhung der spezifischen Raten war unbefriedigend. Dies könnte an der durch die Überexpression verursachten „protein burden“ liegen oder das Resultat von stark veränderten Poolkonzentrationen sein. Somit sollte ein zukünftiger Ansatz zur Steigerung der glycolytischen Leistung die Minimierung des „protein burden“ sowie die Aufrechterhaltung der Homöostase berücksichtigen. Wie sich aus weiteren Simulationsergebnissen ergab, müssen dabei auch Enzyme berücksichtigt werden, die der Erhöhung der Poolkonzentrationen entgegenwirken.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungs- und Symbolverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : Produktions- und Modellorganismus.....	1
1.2 Zuckertransport bei Hefen .....	2
1.3 Glukosetransport bei <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	2
1.3.1 Biochemische und biophysikalische Untersuchungen .....	4
1.3.2 Transportkinetik .....	6
1.3.3 Komponenten des multifaktoriellen Aufnahmesystems .....	10
1.3.4 Regulation des Glukosetransports.....	13
1.3.4.1 Transkriptionsregulation der Hexosetransportergene.....	14
1.3.4.2 Posttranslationale Regulation des Hexosetransports .....	22
1.3.4.3 Abbau der Hexosetransportproteine .....	22
1.3.5 Bedeutung von intrazellulärer Glukose, Glukose-6-Phosphat und ATP.....	23
1.3.6 Versuche zur Erhöhung der Transportleistung.....	26
<b>2 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>27</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>
3.1 Verwendete Stämme von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	28
3.2 Medienherstellung.....	28
3.2.1 Glycerinkultur .....	28
3.2.2 Anzuchtmedien.....	29
3.2.3 Fermentationsmedien .....	29
3.2.4 Medien für die anaerobe Kultivierung .....	31
3.3 Fermentation .....	31
3.4 Pulsversuche .....	36
3.5 Probenahmesysteme.....	36
3.5.1 Manuelles Probenahmeventil .....	36
3.5.2 Stopped-flow - Probenahmesysteme .....	37
3.6 Extraktion intrazellulärer Metabolite.....	41
3.6.1 Extraktion von Glukose-6-Phosphat und der Adeninnukleotide (PCA-Methode).....	41
3.6.2 Extraktion intrazellulärer Glukose (boiling-water Methode).....	42
3.7 Western blot Analysen .....	43
3.7.1 Zellaufschluss und Präparation der Membranfraktion .....	43
3.7.2 SDS-Gelelektrophorese .....	44
3.7.3 Silberfärbung der SDS-Gele.....	45

3.7.4	Elektroblotting.....	46
3.7.5	Immunodetektion .....	46
3.8	Analytik.....	48
3.8.1	Bestimmung der Biomassekonzentration.....	48
3.8.2	Enzymtests (Glukose, Glycerin, G6P, Laktose).....	48
3.8.2.1	Bestimmung der Glycerinkonzentration.....	49
3.8.2.2	Bestimmung der Konzentration von Glukose-6-Phosphat .....	49
3.8.2.3	Bestimmung der Laktosekonzentration .....	49
3.8.2.4	Bestimmung der Glukosekonzentration.....	49
3.8.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	52
3.8.4	HPLC-Analytik .....	52
3.8.5	Gaschromatographie.....	53
3.8.6	Ionenchromatographie.....	53
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>55</b>
4.1	Bestimmung der <i>in vivo</i> Kinetik der Glukosetransporter von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	55
4.2	Messung intrazellulärer Glukose .....	56
4.2.1	Voruntersuchungen zur Messung intrazellulärer Glukose.....	57
4.2.2	Stopped-flow Messungen intrazellulärer Glukose .....	61
4.3	Dynamik der Hexosetransportproteine Hxt1, Hxt5 und Hxt7 .....	63
4.3.1	Voruntersuchungen zur Erfassung der Expressionslevel von Hxt-Proteinen .....	64
4.3.2	Shift vom Chemostat-Betrieb auf einen batch-Prozess.....	65
4.3.3	Multiple Stimuli .....	66
4.3.4	Effekt der Überexpression von Hxt7 auf die Glukoseaufnahmerate.....	67
4.4	Computergestütztes Design von metabolischen Netzwerken.....	68
<b>5</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>Originalartikel .....</b>	<b>82</b>

# Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

## Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	Bovine serum albumin
CD	Catalytic domain
cAMP	zyklisches AMP
COOH	Carboxylgruppe
CV	Cytoplasma Volumen
DH	Dehydrogenase
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DOT	Dissolved oxygen tension
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
$E_{e/p}$	Glukosecarrier in der Plasmamembran auf der extrazellulären Seite
$E_{p/i}$	Glukosecarrier in der Plasmamembran auf der intrazellulären Seite
ex	extrazellulär
G6P	Glukose-6-Phosphat
$G6P^{in}$	intrazelluläres G6P
G6P-DH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
Gal	Galaktose
GC	Gas Chromatograph
GFP	Green Fluorescence Protein
Glc	Glukose
$Glc^{ex}$	extrazelluläre Glukose
$Glc^{in}$	intrazelluläre Glukose
GRAS	Generally Regarded As Safe
HCl	Salzsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
$HXT^{+}$	Einzelexpressionsstamm
<i>HXT</i>	Hexosetransporter gen
Hxt	Hexosetransportprotein
<i>hxt</i>	Deletiertes Gen
IBVT	Institut für Bioverfahrenstechnik
IC	Ion Chromatography
in	intrazellulär
M	Motor
MTP	Multititerplatten
MW	Molekulargewicht
NAD(P)	Nikotinamidadenindinukleotid (-Phosphat) [oxidierte Form]
$NAD(P)H + H^{+}$	Nikotinamidadenindinukleotid (-Phosphat) [reduzierte Form]

NaOH	Natriumhydroxyd (-Lösung)
NH <sub>2</sub>	Aminogruppe
n.p.	nanopur (Wasserqualität)
OD	Optische Dichte
P	Phosphatgruppe
PAD	Pulsed Amperometric Detection
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCA	Perchloric Acid
PDR	pleiotropic drug resistance
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RD	Regulatory domain
SDS	sodium dodecyl sulfate
TCA	Trichloracetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Trockensubstanz
UAS	upstream activator sequence
v.e.	voll entsalzt (Wasserqualität)
WT	Wildtyp
Y2H	Yeast two-hybrid

## Symbole

$\alpha$	Permeationsrate (carrier-Substrat Komplex)	[h <sup>-1</sup> ]
$\beta$	Permeationsrate (unbelasteter carrier)	[h <sup>-1</sup> ]
$c_{\text{Glc}}$	Glukosekonzentration	[g/l], [mM]
$c_{\text{Glc}}^{\text{ex}}$	Glukosekonzentration (extrazellulär)	[g/l], [mM]
$c_{\text{Glc}}^{\text{in}}$	Glukosekonzentration (intrazellulär)	[mmol/l <sub>cv</sub> ]
$c_{\text{G6P}}^{\text{in}}$	G6P-Konzentration	[mmol/l <sub>cv</sub> ]
$c_{\text{P}}$	Produktkonzentration	[g/l], [mM]
$c_{\text{S}}$	Substratkonzentration	[g/l], [mM]
$c_{\text{S}}^0$	Substratkonzentration in der Medienvorlage (oder zum Zeitpunkt $t = 0$ im batch-Prozess)	[g/l], [mM]
$c_{\text{X}}$	Biomassekonzentration	[g <sub>TS</sub> /l]
$c_{\text{X}}^0$	Biomassekonzentration zum Zeitpunkt $t = 0$	[g <sub>TS</sub> /l]
D	Verdünnungsrate	[h <sup>-1</sup> ]
$K_{\text{Glc},1}$	Michaelis-Menten Konstante (Permease)	[mM]
$K_{\text{I-G6P},1}$	Inhibierungskonstante (Permease, unbelasteter carrier)	[mM]
$K_{\text{II-G6P},1}$	Inhibierungskonstante (Permease, belasteter carrier)	[mM]
$K_{\text{M}}$	Michaelis-Menten Konstante	[mM]
$K_{\text{S}}$	Monod Konstante	[mM]

$K_T$	Halbsättigungskonstante (Transport)	[mM]
$K_{T,1}$	Halbsättigungskonstante (Transport, Komponente 1)	[mM]
$K_{T,2}$	Halbsättigungskonstante (Transport, Komponente 2)	[mM]
$m$	Masse	[g]
$m_S$	Erhaltungskoeffizient	[h <sup>-1</sup> ]
$\mu$	spezifische Wachstumsrate	[h <sup>-1</sup> ]
$\mu^{SP}$	setpoint der spezifischen Wachstumsrate	[h <sup>-1</sup> ]
$p_F$	Überdruck im Bioreaktor	[bar]
$q_S$	spezifische Substrataufnahmerate	[mmol/(g <sub>TS</sub> ·h)]
$q_S^{\max}$	maximale spezifische Substrataufnahmerate	[mmol/(g <sub>TS</sub> ·h)]
$r_{\text{influx}}$	Glukoseaufnahmerate	[mmol/(l·h)]
$r_{\text{efflux}}$	Glukoseeffluxrate	[mmol/(l·h)]
$r_{\text{Perm}}^{\max}$	maximale Glukosetransportrate	[mmol/(l·h)]
$r_{\text{Perm}}^{\max,1}$	maximale Glukosetransportrate (Komponente 1)	[mmol/(l·h)]
$r_{\text{Perm}}^{\max,2}$	maximale Glukosetransportrate (Komponente 2)	[mmol/(l·h)]
$r_{\text{net}}$	Nettotransportrate (Glukose)	[mmol/(l·h)]
$t$	Zeit	[h]
$T$	Temperatur	[°C]
$v$	Glukoseaufnahmerate (Zero-Trans-Influx Kinetik)	[nmol/(min·mg <sub>(wet weight)</sub> )]
$v_{\max}$	maximale Glukoseaufnahmerate (Zero-Trans-Influx Kinetik)	[nmol/(min·mg <sub>(wet weight)</sub> )]
$V_F$	Arbeitsvolumen des Bioreaktors	[l]
$y_{O_2}$	Volumenfraktion O <sub>2</sub> in der Abluft	[ / ]
$y_{CO_2}$	Volumenfraktion CO <sub>2</sub> in der Abluft	[ / ]
$Y_{XS}$	Ausbeutekoeffizient (Biomasse bezogen auf das Substrat)	[g/g]

# 1 Einleitung

## 1.1 *Saccharomyces cerevisiae*: Produktions- und Modellorganismus

*Saccharomyces cerevisiae* bedeutet wörtlich übersetzt „Zuckerpilz des Bieres“, wobei die enge Verknüpfung dieser Hefeart mit der Zivilisation ersichtlich ist. Die Braukunst und das Backen von Brot ist so alt wie die Menschheit und findet sich in den ältesten Aufzeichnungen der Zivilisation wie Hyroglyphen und Keilschriftzeichen wieder [Jackson, 1977]. Schon im Mittelalter wurde die Bier- und Branntweinhefe in den Gärbottichen der Brauereien und Kornbrennereien abgeschöpft, abgepresst und in Leinwandbeuteln verkauft [Bronn, 1986]. Verbesserungen in der Technologie der Hefefabrikation halten bis heute an.

Umfangreiches Wissen im Bereich der Bakteriengenetik sowie der Fortschritt in der rekombinanten DNA-Technologie lieferten Werkzeuge zur genetischen Manipulation von *Escherichia coli*. Somit war 1977 erstmalig die Produktion eines heterologen Proteins möglich [Itakura et al., 1977]. Schon bald begann die Suche nach neuen Wirtssystemen zur Expression heterologer Proteine, da *E. coli* nicht in der Lage ist, die erforderliche posttranslationale Prozessierung eukaryontischer Proteine durchzuführen [Gellissen et al., 1992]. Missfaltung der Proteine und fehlende Glycosylierung stellten erhebliche Einschränkungen bei der Expression heterologer Proteine dar [Buckholz et al., 1991]. Aufgrund ihrer ähnlich einfachen Handhabung, der Fähigkeit zur Prozessierung eukaryontischer Proteine und nicht zuletzt aufgrund der verfügbaren Produktionstechnologie boten sich Hefen als Expressionssystem an [Buckholz et al., 1991]. *S. cerevisiae* wurde aufgrund umfangreicher genetischer und physiologischer Charakterisierung und der Einstufung als GRAS (Generally Regarded As Safe) Organismus bevorzugt zur Expression heterologer Proteine eingesetzt. 1981 wurde die erste rekombinante Proteinexpression in *S. cerevisiae* beschrieben [Hitzeman et al., 1981]. Die Fähigkeit, auch pflanzliche Gene funktionell zu exprimieren, wird bei Untersuchungen des pflanzlichen Stoffwechsels genutzt [Trueman, 1995].

Dennoch ergaben sich auch Probleme beim Einsatz dieser Hefeart zur Produktion von heterologen Proteinen. Eine der grössten Schwierigkeiten ist die zuweilen auftretende Hyperglycosylierung bei sekretierten Glycoproteinen [Moir et al., 1987]. Deshalb werden immer noch alternative Systeme zur Expression heterologer Proteine untersucht.

Doch war und ist *S. cerevisiae* nicht nur für die biotechnologische Produktion interessant, sondern hat längst den Status des „Modell-Eukaryonten“ erlangt. Ein überschaubares, in Chromosomen organisiertes Genom, komplex regulierte Genexpression, das Vermögen auf extrazelluläre Signale zu reagieren und nicht zuletzt die Fähigkeit zum „protein-trafficking“ zeichnen diesen Organismus dafür aus [Grivell et al., 1990]. Auch zum Verständnis der molekularen Grundlagen genetisch bedingter Krankheiten beim Menschen wird *S. cerevisiae* ein hoher Stellenwert zugesprochen [Foury, 1997]. Die Bedeutung dieses Organismus spiegelt sich auch in den verfügbaren Internetseiten über Themen aus dem Bereich der Hefeforschung [Henstock et al., 2002].

## 1.2 Zuckertransport bei Hefen

Zuckermoleküle können nicht frei durch die Plasmamembran permeieren, sondern benötigen Transportmoleküle, um in die Zelle zu gelangen. Zwei Mechanismen sind für den Zuckertransport bei Hefen verantwortlich: die carriervermittelte erleichterte Diffusion und das aktive Protonen-Zucker Symport System. Die erleichterte Diffusion ist ein energieunabhängiger Transportprozess, bei dem das Substrat entlang eines Konzentrationsgradienten transportiert wird. Dieser Prozess ist bei Hefen weit verbreitet. Doch erlaubt dieses Transportsystem nicht, Substratmoleküle entgegen eines Konzentrationsgradienten aufzunehmen. Beispiele hierfür sind der Transport von D-Glukose, D-Fruktose, D-Mannose und Galaktose [Lagunas, 1993].

Beim energieabhängigen System ist die Aufnahme des Substratmoleküls mit der Aufnahme eines Protons gekoppelt. Somit ist es möglich, Substratmoleküle entgegen eines Konzentrationsgradienten aufzunehmen. Dieser Transportprozess ermöglicht der Zelle eine Substrataufnahme bei sehr niedrigen Zuckerkonzentrationen. Intrazelluläre Akkumulation der Zuckermoleküle kann notwendig sein, um ausreichend Substrat für die Hexokinasen bereitzustellen. *S. cerevisiae* setzt diesen Transportertyp zum Beispiel für die  $\alpha$ -Glykoside Maltose und Isomaltose ein [Lagunas, 1993]. Beim Transport von Maltose wird zusätzlich zum Co-Transport mit einem Proton durch Efflux von  $K^+$ -Ionen die Elektroneutralität aufrechterhalten [Benito et al., 1992].

## 1.3 Glukosetransport bei *Saccharomyces cerevisiae*

Glukose ist die von *S. cerevisiae* bevorzugte Kohlenstoff- und Energiequelle. Zusätzlich regelt Glukose das Zellwachstum, den Metabolismus und die Entwicklung der Zellen. Im Hinblick auf diese Funktionen wurde Glukose schon als „Wachstumshormon“ für *S. cerevisiae* bezeichnet [Özcan et al., 1999]. Der Transport von Glukose wird durch carriervermittelte erleichterte Diffusion bewerkstelligt [Lagunas, 1993]. Die Carrierproteine werden auch Permeasen genannt und das gesamte Transportsystem für die Aufnahme von Glukose wurde schon als „die Permease“ bezeichnet. Es gab eine langanhaltende Diskussion darüber, welchen Einfluss die Zuckerkinasen auf den Transportschritt ausüben. Die Tatsache, dass Konzentrationen intrazellulärer Glukose in wachsenden Kulturen sehr niedrig oder nicht nachzuweisen waren [Becker et al., 1972; Kotyk et al., 1967], wurde unter anderem als Hinweis auf einen vektoriellen Phosphorylierungsprozess verstanden [van Steveninck, 1969]. Eine Ähnlichkeit mit dem bakteriellen PTS-System wurde daher diskutiert. Weitere Untersuchungen unter Miteinbeziehung von Stämmen, die unterschiedliche Zuckerkinase-Phänotypen aufwiesen, liessen ebenfalls auf eine Kopplung des Transports mit der Phosphorylierung schliessen [Franzsoff et al., 1982]. Der Befund, dass freier Zucker zuerst im intrazellulären Zuckerpool erscheint, spricht allerdings gegen einen vektoriellen Transport [Romano, 1982]. Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass 6-Deoxyglukose, ein nicht phosphorylierbares Analogon zur Glukose, auch von *S. cerevisiae* über die Plasmamembran transportiert wird [Bisson et al., 1983 (b)], was ebenfalls gegen eine vektorielle Phosphorylierung spricht. Doch wurde in diesen Untersuchungen auch festgestellt, dass der hochaffine Glukosetransport von der Anwesenheit der Zuckerkinasen abhängt, und die Kinasen den Carrier in einer unbekanntem Art und Weise beeinflussen. Der Nachweis, dass

der Glukosetransport in *S. cerevisiae* von den glukosephosphorylierenden Kinasen unabhängig ist, wurde kürzlich von Smits et al. [1996] geliefert. Diese Gruppe wies nach, dass die gemessene Affinität des Glukosetransports in den Deletionsmutanten von der Inkubationszeit der Glukoseaufnahmemessung abhängt. Bei den 5-Sekunden Aufnahmemessungen (siehe Kapitel 1.3.1) wird durch den Anstau intrazellulärer Glukose aufgrund der fehlenden phosphorylierenden Enzyme nicht mehr die initale Kinetik der Glukoseaufnahme betrachtet. Unter Einsatz einer quenched-flow Technik wurden Inkubationszeiten von 200 ms erreicht, womit die Initalkinetik gemessen wurde und somit die hochaffine Komponente erfasst werden konnte [Smits et al., 1996]. Somit ist ein Einfluss der Zuckerkinasen auf den Transportschritt wahrscheinlich auszuschliessen.

In Untersuchungen unter Anwendungen der Zero-Trans-Influx Technik (siehe Kapitel 1.3.1) konnten zwei kinetische Komponenten, eine hoch- und eine niedrigaffine, bei der Aufnahme von Glukose erfasst werden [Bisson et al., 1984, 1983 (a), 1983 (b)]. Es gab Untersuchungen die nahelegten, dass diese unterschiedlichen Komponenten keine eigenständigen Aufnahmesysteme darstellen, sondern ein System reflektieren, dessen Affinität modulierbar ist [Walsh et al., 1994]. Doch mit der Entdeckung der grossen Anzahl an Zuckertransportproteinen und deren unterschiedlichen Transportkinetiken wurde dieses Modell verworfen [Reifenberger et al., 1997]. Insgesamt umfasst die Familie der Zuckerpermeasen bei Hefen 34 Proteine, von denen 20 der Subfamilie der Hexosetransporter zugeschrieben werden [Wieczorke et al., 1999]. Der Transport von Glukose über die Plasmamembran beruht bei *S. cerevisiae* somit auf einem multifaktoriellen System von Permeasen, die unterschiedliche Affinität zu Hexosen besitzen [Boles et al., 1997; Reifenberger et al., 1997]. Die Expression der einzelnen Proteine wird durch Glukose, weitere Nährstoffe aber auch andere Umgebungsvariablen reguliert, die nicht direkt mit der Nährstoffversorgung in Verbindung stehen. Die glukoseabhängige Modulierung der Affinität des Glukosetransports in Wildtypzellen von *S. cerevisiae* setzt sich aus der regulierten Expression der einzelnen *HXT*-Gene, der unter bestimmten Bedingungen erfolgenden Inaktivierung sowie dem Abbau von Transportproteinen zusammen. Diese Modulierung wird durch posttranslationale Modifikation und vielleicht auch durch Interaktionen zwischen unterschiedlichen Transportproteinen erweitert [Boles et al., 1997]. Somit ist es *S. cerevisiae* möglich, einen sehr breiten Konzentrationsbereich an Glukose und Fruktose (wenige  $\mu\text{M}$  bis mehr als 1,5 M) effektiv in die Zelle zu transportieren [Bisson et al., 1993; Boles et al., 1997; Ciriacy et al., 1997], obwohl sie für diese Zucker kein aktives Transportsystem besitzt. Die Komponenten der Hxt-Subfamilie sind die Hexosetransporter Hxt1 bis Hxt17, die Glukose, Fruktose und Mannose transportieren, sowie der Galaktosetransporter Gal2, der auch Glukose transportiert. In der vorliegenden Arbeit werden, wie in einigen Publikationen (z.B. [Kruckeberg, 1996]), die Proteine mit Regulationsfunktion Snf3 und Rgt2 aufgrund ihrer Sequenzhomologie auch zur Familie der Hexosetransporter gezählt.

*S. cerevisiae* ist in der Lage extrazelluläre Glukose zu detektieren und zwischen „hohen“ und „niedrigen“ Glukosekonzentrationen zu unterscheiden. Die Angaben „hohe“ und „niedrige“ Glukosekonzentrationen werden zum Teil unterschiedlich interpretiert und führen zuweilen zu unübersichtlichen Informationen. Meist liegen „niedrige“ Konzentrationen im Bereich von 0,05 bis 0,2% Glukose, während von „hohen“ Konzentrationen ab 2% gesprochen wird.

### 1.3.1 Biochemische und biophysikalische Untersuchungen

Biochemische und biophysikalische Untersuchungen zum Glukosetransportsystem von *S. cerevisiae* begannen schon in den 1960er Jahren. Hierbei wurden grundlegende Mechanismen entdeckt und auch schon kinetische Modelle des Transportschritts erstellt. In frühen Untersuchungen beobachtete Kotyk [1967] unterschiedliche Mobilität für den beladenen bzw. unbeladenen Zuckercarrier.

Molekülstrukturen von Zuckermolekülen wurden indirekt mit ihrer Fähigkeit zur Bildung eines Zucker-Carrier Komplexes verglichen. Anhand der Eigenschaft dieser Zucker als Kompetitoren für die Aufnahme der nicht metabolisierbaren Substrate L-Sorbose und D-Xylose zu wirken, wurde die Aktivität der getesteten Zucker mit ihrer Struktur verglichen. Es wurden auch Zuckerstrukturen mit künstlich veränderten Substituenden eingesetzt. Der Pyranosering wurde dabei als aktive Struktur für den Transport erkannt [Cirillo, 1968].

Franzusoﬀ und Cirillo [1983] setzten Plasmamembranvesikel zum Studium des Glukosetransports ein. Mit der Verwendung von Plasmamembranvesikeln wurde auch eine Entkopplung des Transports vom Metabolismus erreicht. Ongjoco et al. [1987] verfolgten diesen Ansatz weiter und konnten Vesikel mit einzelnen Transportmolekülen herstellen. Der Einschluss von Zuckerphosphaten oder Hexokinase (plus ATP) in die rekonstituierten Vesikel diente zur Erfassung ihres potentiellen Effekts auf den  $K_M$ -Wert der Glukoseaufnahmekinetik. Unter diesen Bedingungen wurde kein Effekt der eingeschlossenen Moleküle festgestellt.

Die Verfügbarkeit von spezifischen Antikörpern zur Charakterisierung von Hxt-Proteinen hat sehr viel zum Verständnis des Glukosetransports in *S. cerevisiae* beigetragen [Krampe, 2001; Krampe et al., 2002; Krampe et al., 1998; Wendell et al., 1994, 1993].

Der Einsatz von Reportergenen zur Erfassung von Expressionsprofilen für unterschiedliche Hexosetransporter war ein Hinweis auf die Funktion der einzelnen Transportertypen. Hierbei kam vor allem das Reporterenzym  $\beta$ -Galaktosidase [Ko et al., 1993; Reifenberger et al., 1997] und GFP (Green Fluorescence Protein) [Ye et al., 2001] zur Anwendung. Bei der Verwendung von GFP konnte auch die Verteilung der Transportproteine in der Zelle erfasst werden. Krampe und Boles [2002] konnten somit den Abbau des Hxt7-Proteins unter Stickstoffmangel bei Verfügbarkeit hoher Konzentrationen an vergärbaren Kohlenstoffquellen verfolgen. Mit dieser Technik gelang es erstmalig die Aktivität des katalytischen Zentrums von einem Glukosetransportprotein zu bestimmen [Kruckeberg et al., 1999].

Bei Zero-Trans-Influx Experimenten wird Biosuspension mit radioaktiv markierter Glukoselösung vermischt und nach einer bestimmten Inkubationszeit metabolisch gequenched. Die extrazelluläre radioaktiv markierte Glukose wird von den Zellen gewaschen, um dann die aufgenommene Glukose im Szintillationszähler nachzuweisen. Typische Inkubationszeiten liegen zwischen 200 ms und 5 Sekunden. Ein Einfluss von metabolischen Effekten auf den Transportschritt (z.B. Glukoseefflux durch Rückstau von intrazellulärer Glukose) wurde in diesem Zeitfenster meist ausgeschlossen. Smits et al. kritisieren allerdings die Messungen im Zeitfenster von 5 Sekunden [Smits et al., 1996] (siehe auch vorheriges Kapitel).

Northern Analysen lieferten Expressionsprofile der Gene *HXT1-HXT7*, *SNF3* und *RGT2* unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Dabei wurde die extrazelluläre Glukosekonzentration und die jeweilige Zero-Trans-Influx Kinetik mit der Expression bestimmter Transportertypen in Zusammenhang gebracht [Diderich et al., 1999]. Hierbei wurden wichtige Zusammenhänge zwischen der Expression bestimmter *HXT*-Gene und ihrer *in vivo* Funktion erkannt.

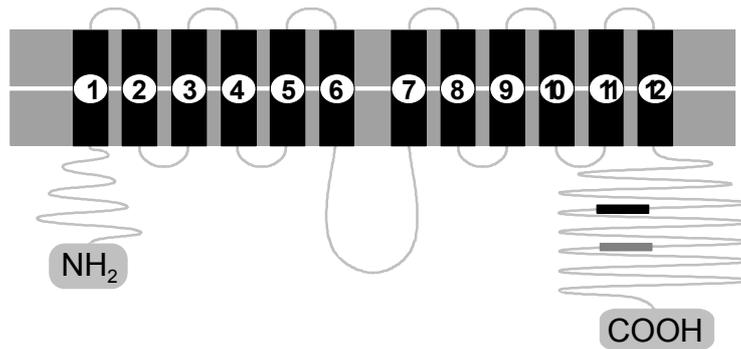
Um potentielle Interaktionen zwischen Proteinen zu erkennen, wurden verschiedenste Techniken eingesetzt wie die Koimmunopräzipitation oder die Kofraktionierung durch Chromatographie. Mit dem two-hybrid System für Hefen (Y2H) ist es möglich, Interaktionen zwischen Proteinen *in vivo* zu erfassen [Fields et al., 1989]. Dabei werden die DNA-Bindedomäne und die Aktivator-domäne eines Transkriptionsfaktors getrennt und jeweils mit einem der Proteine fusioniert, deren Interaktion erfasst werden soll. Interagieren diese Proteine miteinander, so entsteht ein Proteinkomplex mit einer Bindestelle an spezifische DNA-Sequenzen (UAS) und einer Domäne, die Komponenten des Transkriptionsapparates rekrutiert und somit eine Transkription eines Reportergens (z.B. *lacZ*) initiiert. Das Gal4 Protein von *S. cerevisiae* ist ein Transkriptionsaktivator für Gene die zur Galaktoseverwertung exprimiert werden. Dieses Protein besitzt zwei trennbare funktionelle Domänen und wurde erstmals zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen (Snf1 und Snf4, siehe Kapitel 1.3.4.1) eingesetzt. Ein weiteres System zur Erfassung von Protein-Protein Interaktionen stellt das induzierbare LexA System dar. Zum Nachweis von Interaktionen zwischen Membranproteinen wurde das split-ubiquitin System entwickelt [Stagljar et al., 1998]. Eine Interaktion zwischen zwei Membranproteinen führt zur proteolytischen Abspaltung eines fusionierten Transkriptionsfaktors, der ein Reportergen aktiviert. Eine Interaktion kann somit durch die Induktion des Reportergens nachgewiesen werden.

Mit Hilfe von „gel mobility shift assays“ können Interaktionen zwischen DNA und Proteinen nachgewiesen werden. Dieses System wurde z.B. eingesetzt, um nachzuweisen, dass der Transkriptionsfaktor Gcr1 an Bereiche der UAS-Region des *HXT4* Gens bindet [Turkel et al., 1999].

Kasahara et al. [1996] gelang es unter Einsatz von Transporterchimären zwischen Hxt2 und Gal2 das Transmembransegment 10 für die Substraterkennung verantwortlich zu machen.

Hydrographieplots und „multiple sequence alignments“ unter Verwendung der Daten aus dem „*Saccharomyces* Genom Projekt“ [Goffeau, 2000; Nelissen et al., 1997; Paulsen et al., 1998; Van Belle et al., 2001] weisen auf 12 potentielle transmembrane Domänen in den Hxt-Proteinen. Die amino- und carboxyterminalen Enden der Proteine sind wahrscheinlich auf der cytosolischen Seite der Membran lokalisiert [Kruckeberg, 1996].

Die molekulare Struktur der Hxt-Proteine wurde bis heute noch nicht aufgeklärt. Es wurden jedoch Vorhersagen [Özcan et al., 1999] für die Topologie der Sensorproteine Rgt2 und Snf3 getroffen. Diese Beruhen auf der Basis des Modells von Mueckler für das humane Glut1-Protein [Mueckler, 1994]. Danach besitzen diese Mitglieder der Hxt-Familie 12 Transmembrandomänen, die N- sowie C-terminalen Fortsätze zeigen ins Cytoplasma. Abbildung 1 zeigt schematisch das topologische Model des Sensorproteins Snf3. Es sind auch die zwei 25 Aminosäurereste langen Sequenzen im C-terminalen Fortsatz eingezeichnet, die mit der Signalweiterleitung in Verbindung gebracht werden (siehe Kapitel 1.3.4.1).



**Abbildung 1: Topologisches Model des Snf3-Proteins (nach [Mueckler, 1994; Özcan et al., 1999])**

Über die dreidimensionale Struktur der Transportproteine ist noch wenig bekannt. Strukturanalysen werden möglich sein, sobald qualitativ hochwertige Proteinkristalle zur Verfügung stehen. Nur für wenige Membranproteine ist dies bisher erfolgreich gelungen [Schertler et al., 2000]. Mueckler [1985] schlägt eine dreidimensionale Struktur vor, in der amphipathische Helixcluster in der Membran eine wässrige Pore formen. Seitenketten von Aminosäuren könnten mit dem Substrat Wasserstoffbrücken ausbilden. Es soll sich dabei aber nicht um einen kontinuierlichen Kanal für das Substrat über die Membran handeln. Vielmehr könnte die Substratbindestelle durch thermal induzierte Konformationsänderungen des Transportproteins alternierend der Membraninnenseite (Cytoplasma) bzw. der Membranaussenseite (externes Milieu) exponiert sein [Mueckler, 1994].

### 1.3.2 Transportkinetik

Die Diskussion, ob dem Transport von Glukose über die Plasmamembran von *S. cerevisiae* das Prinzip der erleichterten Diffusion zugrundeliegt, hielt bis vor wenigen Jahren an. Mittlerweile wird jedoch die carriervermittelte erleichterte Diffusion als Mechanismus zur Aufnahme von Glukose akzeptiert [Lagunas, 1993]. Mehrere Beobachtungen stützen diese Annahme [Rizzi et al., 1996]:

- Der Transport von Glukose erreicht ein Equilibrium
- Es wurde eine Substratspezifität und eine kompetitive Inhibition beobachtet
- Die Aufnahme der Glukose folgt einer Sättigungskinetik

Es wurden zahlreiche kinetische Ansätze formuliert, um den Transportschritt modellieren zu können. Von Barford und Hall wurde eine einfache Michaelis Menten Kinetik formuliert, um die Zuckeraufnahme im aeroben batch-Prozess und in kontinuierlicher Kultur von *S. cerevisiae* zu beschreiben [Barford et al., 1981; Hall et al., 1981].

$$r = r^{\max} \frac{c_{\text{Glc}}}{K_S + c_{\text{Glc}}} \quad (1)$$

Auch in jüngeren Untersuchungen findet dieser Ansatz Verwendung [Buziol et al., 2002; Diderich et al., 2001].

Unter Berücksichtigung der Konzentration intrazellulärer Glukose formulierten Wilkins und Cirillo [1965] die Nettotransportrate für den Glukosetransport über die Plasmamembran von *S. cerevisiae* als Differenz zwischen Influx und Efflux:

$$r_{\text{net}} = r_{\text{influx}} - r_{\text{efflux}} \quad (2)$$

$$r_{\text{net}} = r_{\text{Perm}}^{\max} \frac{c_{\text{Glc}}^{\text{ex}}}{K_T + c_{\text{Glc}}^{\text{ex}}} - r_{\text{Perm}}^{\max} \frac{c_{\text{Glc}}^{\text{in}}}{K_T + c_{\text{Glc}}^{\text{in}}} \quad (3)$$

Sie gingen dabei von einem symmetrischen Transportsystem aus, wobei die Maximalrate  $r_{\text{max}}$  und die Halbsättigungskonstante  $K_T$  für den Transport für beide Richtungen gleiche Werte annehmen. Kotyk [1967] fand unterschiedliche Permeationsraten für den freien und den mit dem Zuckermolekül beladenen Carrier.

Weiterführende kinetische Analysen am Wildtyp wiesen auf ein Aufnahmesystem, dass aus zwei Komponenten besteht [Bisson et al., 1983 (a)]. Die Nettotransportrate stellt somit einen zusammengesetzten Term dar [Rizzi et al., 1996]:

$$r_{\text{net}} = r_{\text{Perm}}^{\max,1} \frac{c_{\text{Glc}}^{\text{ex}}}{K_{T,1} + c_{\text{Glc}}^{\text{ex}}} + r_{\text{Perm}}^{\max,2} \frac{c_{\text{Glc}}^{\text{ex}}}{K_{T,2} + c_{\text{Glc}}^{\text{ex}}} \quad (4)$$

Der Einfluss der Konzentration an Gelöstsauerstoff auf den Transport von Glukose während eines batch-Prozesses [Peringer et al., 1973] erklären Rizzi et al. [1996] mit erhöhten G6P-Konzentrationen bei steigenden Konzentrationen an Gelöstsauerstoff. Weitere Ansätze berücksichtigten den Einfluss von G6P, ATP und auch des Antischaummittels auf den Transport von Glukose [Grosz, 1990].

Benthin et al. [1992] berücksichtigen in ihrem Modell die Existenz der beiden Anomere  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glukose, indem sie separate Bilanzgleichungen, eine Reaktionskinetik erster Ordnung für die Mutarotation und Konkurrenz zwischen den Anomeren ansetzen. Untersuchungen von Rizzi et al. [1996] zeigten allerdings, dass eine Reduktion des Modells für die Aufnahme der zwei Anomere zu einem einfachen Michaelis-Menten Ansatz mit einer leicht modifizierten Halbsättigungskonstante zu Abweichungen führt, die nur im Bereich der experimentellen Fehler liegen.

Die Analyse der Transportkinetik und die Bestimmung der kinetischen Parameter stützt sich häufig auf Messungen initialer Aufnahmezeiten. Hierzu wird oft die Zero-Trans-Influx Technik eingesetzt. Dabei wird Zellsuspension mit unterschiedlichen Konzentrationen an radioaktiv markiertem Zucker versetzt und nach einer bestimmten Inkubationszeit (meist 5 Sekunden) metabolisch gequ coastet. Nach Abwaschen des extrazellulären, markierten Zuckers wird die Radioaktivität gemessen und somit auf die Aufnahmezeit geschlossen (siehe auch Kapitel 1.3.1). Meist werden die kinetischen Parameter dann über eine Linearisierung nach Eadie-Hofstee bestimmt [Bisson et al., 1983 (a)]:

$$v = v_{\max} - K_M \cdot \left( \frac{v}{c_S} \right) \quad (5)$$

Fuhrmann und Völker [1993] hinterfragen die Anwendung des Eadie-Hofstee plots bei Annahme eines zweikomponentigen Michaelis-Menten Systems und fordern eine nichtlineare Regression zur Bestimmung der kinetischen Parameter. Sie stellen die Existenz des niedrigaffinen Systems [Bisson et al., 1983 (a)] in Frage und schlagen stattdessen als Arbeitshypothese vor, es handle sich um einen Diffusionsprozess mit einem  $K_M$ -Wert von einigen M.

Rizzi et al. [1996] kritisieren ebenfalls die Anwendung radioaktiver Messungen, da diese oft an ruhenden Hefepopulationen durchgeführt wurden. Die Übertragung der unter diesen physiologisch undefinierten Bedingungen (Gelöstsauerstoffkonzentration, Konzentration intrazellulärer Adeninnukleotide, Enzymkonzentration) ermittelten kinetischen Parameter auf wachsende Zellen ist somit kritisch zu betrachten. Sie entwarfen einen kinetischen Ansatz, der auf einer reversiblen Influx-Efflux Kinetik unter Inhibition durch G6P basiert. Dafür wurden folgende Annahmen getroffen:

- Vernachlässigung der physikalischen Diffusion über die Plasmamembran
- Unterschiedliche Permeationsraten für den freien und den substratbindenden Carrier
- Permeation ist der limitierende Schritt
- Equilibrium auf beiden Seiten der Membran (carrier und Substrat)
- Zellmembran ist impermeabel für den carrier-Inhibitor und den carrier-Substrat-Inhibitor Komplex
- Die Gesamtkonzentration des Carriers ist während des Beobachtungszeitraums konstant

Abbildung 2 zeigt das Model für die Glukoseaufnahme nach Rizzi et al. [1996].



Für die Simulation wurden weitere Annahmen getroffen:

- Infolge sehr niedriger beobachteter Konzentrationen an intrazellulärer Glukose wird der Efflux vernachlässigt
- Freier und beladener Carrier permeieren mit gleichen Raten

Dieses Model wurde durch Messungen der *in vivo* Aufnahmekinetik von Glukose nach einem Glukosepuls und der Anwendung einer schnellen Probenahmetechnik getestet. Als Basis dieser Experimente dienten Chemostat-Kulturen unter steady-state Bedingungen. Es zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen dem Simulationsergebnis und den experimentellen Daten.

### 1.3.3 Komponenten des multifaktoriellen Aufnahmesystems

Es folgt eine Beschreibung der Komponenten des Glukosetransportsystems von *S. cerevisiae*. Wie in den vorherigen Abschnitten aufgezeigt wurde, handelt es sich hierbei um ein multifaktorielles System. Die Zelle kann sich durch die Auswahl der Komponenten oder Kombinationen dieser Komponenten des multifaktoriellen Systems an die Umgebungsbedingungen anpassen. Dies wird durch ein Set von Genen ermöglicht, die für Transportproteine unterschiedlicher Affinitäten kodieren und deren Expression differenziert reguliert wird [Boles et al., 1997; Reifenberger et al., 1997].

Das erste Gen der *HXT*-Familie, das isoliert wurde, war *SNF3* (Sucrose Non Fermenting). Mutanten, die ein defektes *SNF*-Gen besaßen, zeigten Wachstumsdefekte auf Sucrose und Maltose [Neigeborn et al., 1984]. Weitere Gene der *HXT*-Familie wurden entdeckt, da sie in der Lage waren, den Wachstumsdefekt der *snf3*-Mutante aufzuheben. Das *HXT4*-Gen war in Lage, eine Inaktivierung des niedrigaffinen Glukosetransport bei *Klyveromyces lactis* zu komplementieren [Prior et al., 1993]. Durch Anwendung der DNA-Hybridisierung wurden ebenfalls *HXT*-Gene entdeckt [Reifenberger et al., 1995]. Die restlichen Mitglieder der Subfamilie sind mit der vollständigen Sequenzierung des Hefegenoms aufgrund ihrer Sequenzhomologien mit den bekannten *HXT*-Genen entdeckt worden [Nelissen et al., 1997]. Die Sequenzhomologie der Proteine der Hxt-Familie reicht von 99,7% Identität zwischen Hxt6 und Hxt7, die sich nur in zwei Aminosäuren unterscheiden, bis zu 25% Identität zwischen Snf3 und Hxt16 bzw. Hxt17 [Kruckeberg, 1996]. Die Proteine sind auch ähnlich gross mit einem Bereich von 540 bis 592 Aminosäureresten. Zwei Ausnahmen stellen die Sensorproteine Snf3 und Rgt2 dar, die 300 bzw. 200 Aminosäurereste länger sind [Kruckeberg, 1996].

Den Glukosetransportproteinen Hxt1 bis Hxt4 sowie Hxt6 und Hxt7 der Hxt-Familie wurde bisher die grösste Bedeutung zugesprochen. In einer der *hxt*-Nullmutanten (*hxt1-7*) lag die Glukoseaufnahme unter der Nachweisgrenze, während die Expression jedes Einzelnen dieser Gene (*HXT1*, 2, 3, 4, 6 und 7) aerobes Wachstum erlaubte [Reifenberger et al., 1995]. Über die restlichen Mitglieder der Hxt-Familie liegen sehr lückenhafte Informationen vor.

Die Kinetik der Glukoseaufnahme des Transportproteins Hxt1, das in einem *hxt*-Nullstamm exprimiert wird weist auf einen Transporter mit sehr niedriger Affinität. Für Glukose beträgt

der  $K_M$ -Wert 100 mM und für Fruktose sogar mehr als 300 mM [Reifenberger et al., 1997]. Hxt1 kann auch Mannose transportieren. Bei Glukosekonzentrationen über 200 mM wird die Expression von Hxt1 ca. 300-fach induziert. In Abwesenheit von Glukose wird dessen Expression reprimiert [Özcan et al., 1995]. Darüberhinaus induziert auch hyperosmotischer Stress die Expression von Hxt1 [Hirayama et al., 1995; Rep et al., 2000]. Die biologische Bedeutung dieser Antwort der Zelle auf hypersomotischen Stress liegt in einem erhöhten Bedarf an Glukose, die unter diesen Bedingungen zur Synthese von Glycerol verwendet wird. Glycerol wird in diesem Zusammenhang als osmoprotektive Verbindung eingesetzt, um der osmotischen Dehydrierung und einem Verlust an Turgor/Volumen entgegenzutreten [Andre et al., 1991].

Das Protein Hxt2 wurde als hochaffiner Transporter für Glukose, Fruktose und Mannose erkannt [Kruckeberg et al., 1990; Reifenberger et al., 1997; Reifenberger et al., 1995; Wendell et al., 1993]. Die Kinetik dieses Transporters scheint allerdings von den Wachstumsbedingungen der Zellen [ $K_M(c_{Glc})$ ] abhängig zu sein. Nach Anzucht der *HXT2*-Einzel-expressionsmutante (vor dem Hintergrund eines *hxt1-7*-Nullstamms) auf 100 mM Glukose wurden  $K_M$ -Werte von ca. 10 mM gemessen. Bei Wachstum der Zellen auf niedrigen Glukosekonzentrationen weisen Eadie-Hofstee plots auf eine biphasische Kinetik mit einer hochaffinen ( $K_M = 1,5$  mM) und einer niedrigaffinen Komponente ( $K_M = 60$  mM) hin [Reifenberger et al., 1997]. Das Hxt2-Protein wird bei niedrigen Glukosekonzentrationen exprimiert. Abwesenheit oder hohe Konzentrationen von Glukose reprimieren dessen Expression [Wendell et al., 1993]. Jedoch ist für die Induktion der Expression von Hxt2 nicht nur eine niedrige Glukosekonzentration nötig, sondern auch Zellwachstum. Im Gegensatz zu Zellen, die von hohen Glukosekonzentrationen auf niedrige geschiftet wurden, exprimieren Zellen, welche im batch-Prozess ( $c_s^0 = 100$  mM) die stationäre Phase erreichen dieses Protein nicht [Wendell et al., 1993]. Auch eine posttranslationale Regulation wurde für diesen Transporter nachgewiesen. Unter bestimmten Bedingungen ist Hxt2 nachweisbar, trägt aber offensichtlich nicht zum hochaffinen Transport von Glukose bei [Wendell et al., 1994].

Das Protein Hxt3 weist einen  $K_M$ -Wert von 60 mM auf und wird somit zu den niedrigaffinen Transportern gezählt [Reifenberger et al., 1997]. Induziert wird dieser Transporter auf glukosehaltigen Medien unabhängig von der Konzentration [Özcan et al., 1995]. Das Regulationsmuster dieses Proteins lässt darauf schliessen, dass Hxt3 zusammen mit Hxt1 von der Zelle bei hohen Glukosekonzentrationen eingesetzt wird und im batch-Prozess bis zum Erreichen niedriger Glukosekonzentrationen an der Aufnahme des Nährstoffes beteiligt ist [Boles et al., 1997].

Ein weiteres Transportprotein der Hxt-Familie ist Hxt4. Es besitzt eine intermediäre Affinität für Glukose ( $K_M = 9$  mM) und eine niedrige für Fruktose ( $K_M = 50$  mM) [Reifenberger et al., 1997]. Die Expression des *HXT4*-Gens wird von niedrigen Glukosekonzentrationen induziert und bei hohen Konzentrationen vollständig reprimiert [Özcan et al., 1995; Reifenberger et al., 1995]. Das Regulationsmuster ähnelt stark dem des Hxt2-Transporters. Die Eigenschaften dieses Transportproteins weisen auf eine Rolle bei mittleren Glukosekonzentrationen hin [Boles et al., 1997].

Kürzlich wurde die Bedeutung des Proteins Hxt5 entschlüsselt, bei dem es sich um einen sogenannten „Hungertransporter“ handelt. Die Expression dieses Proteins wird durch Stickstoffmangel, Abwesenheit von Glukose und auch im Chemostaten unter Glukose-limitierung induziert [Buziol et al., 2002; Diderich et al., 2001]. Verwaal et al. [2002] beobachten eine Korrelation zwischen der Expression von Hxt5 und der Wachstumsrate der

Zellen. Untersuchungen von Rep et al. [2000] deuten darauf hin, dass seine Expression auch unter hyperosmotischen Bedingungen induziert wird. Dieser Transporter bietet der Zelle wahrscheinlich die Möglichkeit, Glukose aufnehmen zu können, sobald diese nach einer Hungerperiode wieder zur Verfügung steht. Inwieweit diese initiale Glukoseaufnahme eine regulatorische Funktion darstellt, wird sich vielleicht klären, sobald der Signalweg zwischen extrazellulärer Glukose und Transkription bzw. posttranskriptionaler Regulation aufgeklärt ist.

Die restlichen zwei Transporter, die für den wachstumsrelevanten Transport verantwortlich gemacht werden, sind Hxt6 und Hxt7. Beide sind hochaffine Glukosetransporter und besitzen  $K_M$ -Werte im Bereich von 1 - 2 mM. Die Transkriptionsregulation der beiden Proteine ist ähnlich [Reifenberger et al., 1997; Reifenberger et al., 1995]. Hxt7 wird jedoch stärker exprimiert als Hxt6, und das *HXT7*-Gen stellt das bei weitem am stärksten exprimierte *HXT*-Gen dar [Ciriacy et al., 1997]. Die Transkription von Hxt6 und Hxt7 wird von hohen Glukosekonzentrationen reprimiert. Für Hxt6 liegt dieser Wert bei 0,5% Glukose. Im Gegensatz zu den anderen *HXT*-Genen werden *HXT6* und *HXT7* auf nicht vergärbaren Kohlenstoffquellen stark exprimiert [Ciriacy et al., 1997]. Diese Transporter werden z.B. im Chemostat unter glukoselimitierten Bedingungen exprimiert. Die kontinuierliche Kultivierung von *S. cerevisiae* unter glukoselimitierten Bedingungen über einen längeren Zeitraum (450 Generationen) bewirkt die Bildung von multiplen chimären Genen, bestehend aus der Promotorregion von *HXT7* und der Struktursequenz von *HXT6*. Somit wird eine 1,8-fache Erhöhung der Transkriptlevel für *HXT6/7* erreicht, was eine verbesserte Substrataufnahme unter den glukoselimitierten Bedingungen ermöglicht [Brown et al., 1998].

Über die Funktion der Transporter Hxt8 bis Hxt17 *in vivo* kann momentan nur spekuliert werden. Einige charakteristische Eigenschaften dieser Proteine sind jedoch mittlerweile bekannt. In einer Untersuchung von Wieczorke et al. [1999] wurden die Transportproteine Hxt8 bis Hxt17 einzeln von einem Multicopyplasmid aus vor dem Hintergrund eines *hxt*-Nullstammes (*hxt1-17 gal2* Deletionsstamm) exprimiert. Alle der untersuchten Hxt-Proteine bis auf Hxt12 waren in der Lage zumindest eine der untersuchten Hexosen zu transportieren und vermittelten dem jeweiligen Stamm auch Wachstum.

Über die Funktion und Regulation von Hxt10 und Hxt8 ist nichts bekannt, jedoch findet sich in der Promotorregion des *HXT10*-Gens eine putative Bindestelle für Rgt1. Hxt9 und Hxt11 wurden mit dem Phänomen der „pleiotropic drug resistance“ (PDR) in Verbindung gebracht [Nourani et al., 1997]. Die Sequenz des *HXT12*-Gens ist vermutlich ein Pseudogen [Kruckeberg, 1996]. Über die restlichen Transportproteine Hxt14 - Hxt17 liegen nur lückenhafte Informationen vor.

Der Galaktosetransporter Gal2 wird aufgrund seiner Sequenzhomologie und seiner Eigenschaft, auch Glukose transportieren zu können, ebenfalls zur Hxt-Familie gezählt. Das Protein weist einen  $K_M$ -Wert von ca 2 mM für Glukose auf. Die Transkription des *GAL2*-Gens wird von Glukose reprimiert. Der Gal2-Transporter unterliegt zudem einer durch Glukose induzierten Katabolitinaktivierung [Horak et al., 1997; Lagunas, 1993].

Der grösste Teil der bestimmten kinetischen Daten für Glukosetransportproteine wurde anhand von *HXT*-Einzelexpressionsmutanten erhalten. Eine Modulierung der Affinität dieser Transporter im Wildtyp durch Interaktionen mit anderen Transportproteinen ist aber nicht auszuschliessen [Boles et al., 1997; Özcan et al., 1999], weshalb die unter Verwendung der Einzelexpressionsmutanten erhaltenen kinetischen Parameter durchaus auch kritisch zu betrachten sind.

Bei den Einzelexpressionsmutanten kommen die erwähnten *hxt*-Nullstämme zum Einsatz. Ein *hxt*-Nullstamm, der keinen funktionellen Glukosetransporter mehr aufweist, wäre für die Untersuchung heterologer Transportproteine von enormem Wert. Doch bis heute hält die Suche nach dem oder den verbliebenen Glukosetransporter/n an. Wieczorke et al. [1999] beobachteten bei einem *hxt*-Nullstamm von *S. cerevisiae*, dem Stamm EBY.VW1000 (*hxt1-17 gal2*), nach Wachstum auf Maltose eine Restkapazität zur Aufnahme von Glukose. Diese Aufnahme wurde bei weiterem Wachstum auf Glukose geringer, was auf eine Repression des Gens für das verantwortliche Protein durch Glukose schliessen lässt. Um das entsprechende Transportprotein zu identifizieren, wurden einzeln die 16 verbleibenden Mitglieder der Familie der Zuckerpermeasen im *hxt*-Nullstamm EBY.VW1000 von einem Multicopyplasmid aus überexprimiert. Bei der Überproduktion von dreien dieser Proteine, *Agt1*, *Mph2* und *Mph3*, die zur Subfamilie der Maltosepermeasen gehören, wurde Wachstum auf Glukose, nicht aber auf Fruktose, Mannose und Galaktose festgestellt. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde auch festgestellt, dass die Glukosesensoren *Snf3* und *Rgt2* nicht in der Lage sind Glukose, Fruktose, Mannose oder Galaktose zu transportieren.

Nachdem auch diese drei Transportproteine im bisherigen *hxt*-Nullstamm deletiert wurden, zeigte der resultierende Stamm mit der Bezeichnung EBY.VW4000 (*hxt1-17 gal2 stl1 agt1 mph2 mph3*) keinen Verbrauch von Glukose mehr. Dieser Stamm wird auch „kompletter *hxt*-Nullstamm“ genannt.

Überraschenderweise zeigte dieser *hxt*-Nullstamm (*hxt1-17 gal2 agt1 mph2 mph3*) nach der Deletion von *SNF3* wieder Wachstum auf Glukose, Fruktose und Mannose. Somit kommt *Snf3* in diesem Nullstamm eine Repressorfunktion für ein zusätzliches Hexosetransportprotein zu. Das Gen *STL1* wurde nach der Deletion von *SNF3* dereprimiert [Wieczorke et al., 1999]. Der Verdacht, das Produkt dieses Gens könne diesen Transport vermitteln, liess sich nach dessen Deletion ausschliessen. Der *hxt*-Nullstamm EBY.VW4000 (*hxt1-17 gal2 stl1 agt1 mph2 mph3*) wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Boles (Institut für Mikrobiologie, Goethe-Universität Frankfurt, Frankfurt am Main) zur Konstruktion der Stämme verwendet, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden.

### 1.3.4 Regulation des Glukosetransports

In Abschnitt 1.3.3 wurden die Komponenten des multifaktoriellen Aufnahmesystems von *S. cerevisiae* für Glukose beschrieben. Wie dieser Organismus Glukose erkennt, ein Signal erzeugt, über die Membran transferiert, von dort aus zum Wirkort leitet und dadurch das Glukoseaufnahmesystem an die Umgebungsbedingungen anpasst, ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Da *S. cerevisiae* ein wichtiges eukaryotisches Modellsystem darstellt, ist diese Regulation Gegenstand intensiver Forschungsaktivitäten. Die Hoffnung, mit dem Verständnis der Regulation des Glukosetransports bei *S. cerevisiae* auch schwerwiegende Krankheitsbilder wie Diabetis beim Menschen besser verstehen zu können, stellt eine grosse Motivation dar. Während die posttranslationalen Mechanismen noch weitgehend unverstanden sind, wurde über die Regulation der Expression und auch des Abbaus der Transportproteine in den letzten Jahren sehr viel publiziert. Im Folgenden wird der aktuelle Forschungsstand skizziert.

### 1.3.4.1 Transkriptionsregulation der Hexosetransportergene

Die Gene der 20 Mitglieder der *HXT*-Familie (*HXT1-17*, *SNF3*, *RGT2*, *GAL2*) dienen *S. cerevisiae* als Repertoire. Aus diesem kann sie durch Expression einzelner oder durch Kombination gleicher oder verschiedener Gene auf unterschiedliche Umgebungsbedingungen, im Besonderen hinsichtlich der Verfügbarkeit von Glukose (und weiteren Hexosen), reagieren. Modulierung der Affinität der Transporter und der Abbau von Transportkapazität dienen der Zelle ebenfalls dazu, sich an die Umgebungsbedingungen anzupassen. Die Veränderungen der Kinetik des Glukosetransport als Antwort auf Änderungen in der Verfügbarkeit extrazellulärer Glukose ist allerdings hauptsächlich auf die transkriptionale Regulation der *HXT*-Gene zurückzuführen [Özcan et al., 1999]. Hierbei spielen die Mechanismen der Repression und Induktion durch Glukose eine entscheidende Rolle.

Das Ziel dieser Regulation ist die im Hinblick auf die Verfügbarkeit von Glukose an die extrazelluläre Umgebung angepasste Expression von Genen. Dabei wird die Transkription bestimmter Gene durch die Anwesenheit von Glukose ermöglicht und die anderer Gene unterbunden. Abbildung 3 zeigt schematisch und stark vereinfacht die beiden Phänomene der Induktion und Repression durch Glukose. Ohne Glukose wird nur Gen X transkribiert, Gen Y wird nicht exprimiert (A). In Anwesenheit von Glukose wird die Expression von Gen X reprimiert während die von Gen Y induziert wird (B). Als Folge davon wird Gen X nur in Abwesenheit von Glukose und Gen Y nur in Gegenwart von Glukose exprimiert. Hierbei ist zu beachten, dass es auch Zwischenstufen gibt. Bei bestimmten Genen liegt ein Basallevel der Expression vor, und die Induktion dieser Gene führt dann zu einer höheren Expression. Umgekehrt muss eine Repression nicht bis zur vollständigen Einstellung der Transkription erfolgen, sondern kann auch nur zu einer verminderten Expression des betreffenden Gens führen.

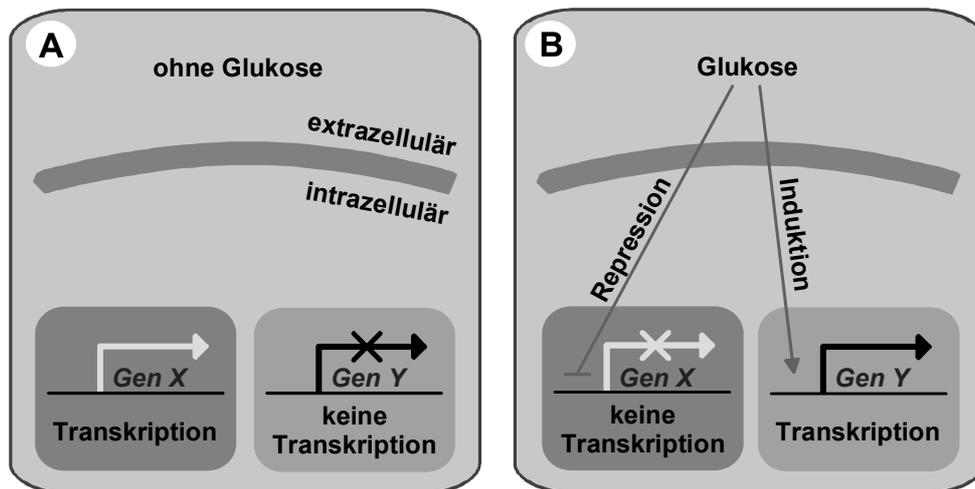


Abbildung 3: Induktion und Repression der Transkription

Die zentralen Komponenten des allgemeinen Glukoserepressionspfads sind Mig1 (Transkriptionsrepressor), der Snf1-Proteinkinasekomplex (Proteinkinase, bestehend aus Snf1, Snf4 und drei Mitgliedern der Sip Familie) und die Proteinphosphatase 1 (*GLC7* codiert

Proteinphosphatase PP1 und dessen regulatorische Untereinheit Reg1). Abbildung 4 zeigt das mögliche Zusammenspiel dieser Komponenten im Glukoserepressionspfad.

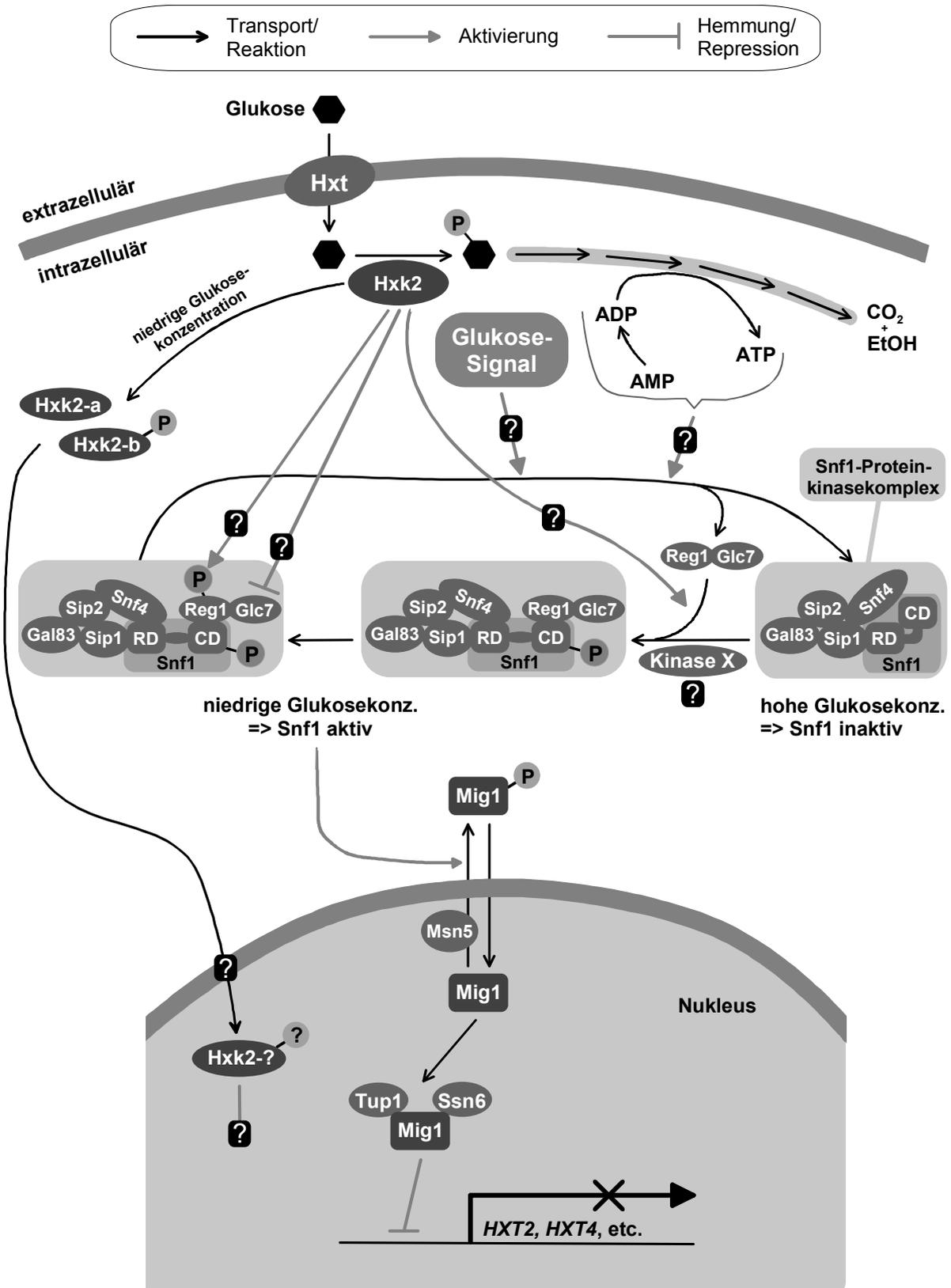


Abbildung 4: Hauptpfad der Glukoserepression (nach [Gancedo, 1998; Özcan et al., 1999; Rolland et al., 2002; Sanz et al., 2000])

Über das initiale Signal der Glukoserepression wird noch spekuliert. In einem Model wird AMP (bzw. das Verhältnis AMP/ATP) für die Aktivierung der Snf1-Proteinkinase verantwortlich gemacht [Johnston, 1999]. Dieser Ansatz basiert auf der Ähnlichkeit der Snf1-Proteinkinasekomponenten mit der AMP-aktivierten Proteinkinase in Säugerzellen [Stapleton et al., 1994]. Unter Glukoseüberschuss ist als Folge der ATP-Erzeugung über die Glykolyse der AMP-Level gering. Nachdem die Glukose verbraucht worden ist, steigt der AMP-Level wieder an. Dies stellt für die Zelle somit eine Möglichkeit dar, von der Glukosekonzentration ein initiales Signal abzuleiten. Ein alternatives Model beschreibt die Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Snf1-Proteinkinase durch eine weitere Proteinkinase. Dabei könnte es sich um die Proteinphosphatase 1 handeln, die aus einer regulatorischen Untereinheit (Reg1) und einer katalytischen Untereinheit (Glc7) besteht [Tu et al., 1994]. Reg1-Glc7 sorgt vielleicht als Antwort auf ein Glukosesignal durch Dephosphorylierung des Snf1-Proteinkinasekomplexes dafür, dass dieser wieder autoinhibiert wird [Rolland et al., 2002; Sanz et al., 2000]. Reg1 selbst wird auch unter glukoselimitierten Bedingungen phosphoryliert und wieder dephosphoryliert, wenn die Glukosekonzentration hoch ist. Die Phosphorylierung von Reg1 könnte von Snf1 selbst bewerkstelligt werden. Anscheinend stimuliert die Phosphorylierung von Reg1 die Glc7-Aktivität den Snf1-Komplex in den inhibierten Zustand zu überführen und gleichzeitig die Ablösung von Reg1-Glc7 vom Snf1-Kinase Komplex. Die Hexokinase 2 (Hxk2) scheint hierbei auch involviert zu sein, indem sie entweder die Phosphorylierung von Reg1 bewirkt oder die Dephosphorylierung von Reg1 durch Glc7 inhibiert. Dies könnte bedeuten, dass die Beteiligung der Hxk2 am Mechanismus der Glukoserepression durch Reg1-Glc7 vermittelt wird [Sanz et al., 2000].

Dass die Hexokinase 2 (Hxk2) bei der Generierung des initialen Signals auch eine wichtige Rolle spielt, wurde schon früh erkannt, da kein weiterer metabolischer Schritt nach der Zuckerphosphorylierung mehr nötig ist, um die Glukoserepression auszulösen [Rose et al., 1991]. Die Hexokinase 2 wurde als eines der ersten Gene identifiziert, die am Mechanismus der Glukoserepression beteiligt sind [Entian et al., 1980]. Ob Hxk2 das Signal erzeugt, während sie katalytisch aktiv wird und Hexosen phosphoryliert [Ma et al., 1989], oder ob sie eine separate regulatorische Funktion ausübt [Entian et al., 1984] wird allerdings noch kontrovers diskutiert. Die Feststellung, dass sich Hxk2 sowohl im Zytosol als auch im Nukleus aufhält, stützt die Hinweise auf eine von der katalytischen Aktivität unabhängigen regulatorischen Funktion [Randez-Gil et al., 1998 (a)]. Weitere Untersuchungen ergaben, dass Hxk2 *in vivo* sowohl als Dimer als auch als Monomer vorliegen kann. Auf nicht vergärbaren Kohlenstoffquellen wird anscheinend nur die monomere Form phosphoryliert und nach Glukosezugabe wieder dephosphoryliert. Somit wird, in Abhängigkeit von der verfügbaren Kohlenstoffquelle das Equilibrium zwischen der dimeren und monomeren Form verschoben. In einem davon abgeleiteten Model wird Hxk2 nicht mehr für die Generierung sondern für die Weiterleitung des initialen Signals verantwortlich gemacht [Randez-Gil et al., 1998 (b)]. Herrero et al. [1998] wiesen überdies die Beteiligung von Hxk2 an einem Protein-DNA Komplex nach, der in der Lage ist, eine Aktivierungssequenz (UAS) des *SUC2*-Gens zu erkennen.

Fest steht, dass der Einstrom von Glukose in die Zelle und deren Phosphorylierung bewirkt, dass der Snf1 Komplex inaktiviert wird. Snf1 ist eine Serin-Threonin Proteinkinase, die Transkriptionsrepressoren inhibiert (z.B. Mig1) und Transkriptionsaktivatoren stimuliert (z.B. Cat8) [Sanz et al., 2000]. Die Snf1-Proteinkinase ist mit der Aktivierungseinheit Snf4 (Cat3) und drei Gerüstproteinen (Sip1, Sip2 und Gal83) assoziiert [Rolland et al., 2002]. Die Aktivität der Snf1-Proteinkinase wird durch Glukose inhibiert und unter glukoselimitierten

Bedingungen stimuliert. Die Aktivierung wird von einer Konformationsänderung des Kinasekomplexes begleitet und könnte durch eine Aufhebung der Autoinhibition von Snf1 zustandekommen. Unter Bedingungen hoher Glukosekonzentrationen maskiert die regulatorische Domäne wahrscheinlich die katalytische Domäne von Snf1. In Abwesenheit von Glukose bindet die Snf4 Untereinheit an die regulatorische Domäne von Snf1, gibt vermutlich die katalytische Domäne frei und erlaubt somit die Phosphorylierung von Mig1 [Johnston, 1999].

In Abwesenheit von Glukose phosphoryliert Snf1 wahrscheinlich den Transkriptionsrepressor Mig1, der daraufhin ins Zytoplasma wandert. Der subzelluläre Aufenthaltsort von Mig1 ist demzufolge durch Glukose reguliert. Nach Glukosezugabe zum Medium wandert Mig1 schnell in den Nukleus und wird rasch wieder zurücktransportiert, sobald die Glukose aufgebraucht ist. Der Transport von Mig1 aus dem Nucleus wird vermutlich durch das Exportprotein (Exportin) Msn5 vermittelt. [DeVit et al., 1999]. Das Mig1-Protein enthält eine Zinkfinger-Domäne, bindet an den Promotoren vieler glukosereprimierter Gene und reprimiert unter Rekrutierung der allgemeinen Korepressor-Proteine Ssn6 und Tup1 die Transkription [Treitel et al., 1995].

Bei der Induktion der *HXT*-Gene durch Glukose spielen mehrere Regulationspfade eine Rolle (siehe auch Abbildung 4 zur Regulation der Expression von *HXT1*). Ein wichtiges Signal zur Steuerung der Induktion der Hexosetransportergene ist die extrazelluläre Glukose. *S. cerevisiae* besitzt zwei Sensorproteine, Snf3 und Rgt2, die das Signal in die Zelle weiterleiten [Özcan et al., 1996 (a)]. Snf3 wirkt als Sensor für niedrige und Rgt2 für hohe Glukosekonzentrationen. Damit sind die Expressionsmuster der beiden Sensorproteine in Einklang. Snf3 wird bei niedrigen Glukosekonzentrationen maximal transkribiert und durch hohe Glukosekonzentrationen reprimiert, während Rgt2 konstitutiv exprimiert wird [Özcan et al., 1996 (a)]. Auch die Tatsache, dass Snf3 und Rgt2 keine Glukose transportieren können, spricht für ihre Rolle als Sensorproteine [Dlugai et al., 2001; Özcan et al., 1998].

Snf3 wird für die Induktion von *HXT2* und *HXT4* durch niedrige Glukosekonzentrationen benötigt, während Rgt2 für die maximale Expression von Hxt1 bei hohen Glukosekonzentrationen verantwortlich ist [Özcan et al., 1996 (a)].

Der wichtigste Hinweis auf die Funktion von Snf3 und Rgt2 ging aus Untersuchungen an Stämmen hervor, die dominante Mutationen in Snf3 oder Rgt2 aufwiesen. Der Austausch von nur einer Aminosäure im jeweiligen Sensor führte zu konstitutiver Expression von *HXT1* bis *HXT4* [Özcan et al., 1996 (a)]. Özcan et al. [1999] folgern daraus, dass der Austausch der Aminosäure das Protein in eine Konformation überführt, die es beim unveränderten Protein mit gebundener Glukose annimmt. In Kapitel 1.3.1 wurde die vorhergesagte Topologie der Sensorproteine dargestellt. Die dort dargestellten C-terminalen Domänen der Sensorproteine Snf3 und Rgt2 sind an der Signalweiterleitung beteiligt, da diese bei deren Deletion ausbleibt [Özcan et al., 1998]. Außerdem konvertiert eine Transplantation der C-terminalen Domäne von Snf3 auf den Hxt1 oder Hxt2 Transporter diese in Glukosesensoren [Özcan et al., 1998]. Sequenzen von 25 Aminosäuren der C-terminalen Domänen, die in beiden Sensoren ähnlich sind, scheinen funktionelle Regionen zu sein, da spezifische Deletionen dieser Regionen die Signalwirkung der Proteine aufhebt [Özcan et al., 1999].

Wie das Signal zur Induktion der *HXT*-Gene in Abhängigkeit von der extrazellulären Glukosekonzentration von Snf3 und Rgt2 generiert wird, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Binden von extrazellulärer Glukose könnte eine Konformationsänderung zur Folge haben, die sich über die Transmembrandomänen zur C-terminalen Region fortsetzt und somit eine

Interaktion dieser Domäne mit der/den nächsten Komponente/n des Signalwegs ermöglicht [Özcan et al., 1999].

Neuere Untersuchungen unter Einsatz der „two-hybrid screen“ Technologie wiesen auf eine Interaktion des Proteins Mth1 mit den cytoplasmatischen Domänen der Glukosesensoren Snf3 und Rgt2 hin [Lafuente et al., 2000]. Diese Interaktionen waren zudem von der extrazellulären Glukosekonzentration abhängig. In Abwesenheit von Glukose waren sie schwach, während starke Interaktionen in Anwesenheit extrazellulärer Glukose beobachtet wurden. Kürzlich wurde festgestellt, dass Snf3 auch ohne extrazelluläre Glukose in der Lage sein muss, ein Signal zu erzeugen [Dlugai et al., 2001]. Eine *snf3*-Mutante zeigte auf Medien, die Ethanol oder Raffinose als Kohlenstoffquelle enthielten, fast keine Aktivität des *HXT7*-Promotors mehr. Eine Aktivierung der Signalfunktion von Snf3 durch niedrige Glukosekonzentrationen wurde ebenfalls beobachtet. Somit liesse sich der hohe Basallevel der *HXT7*-Expression und dessen Induzierbarkeit unter niedrigen Glukosekonzentrationen erklären. Die Erzeugung eines intrazellulären Signals durch Binden eines extrazellulären Faktors an ein Membranprotein erinnert stark an den rezeptorvermittelten Prozess der Signalweiterleitung durch Hormone bei Säugerzellen.

Ein alternatives Modell zur Signalwirkung von Snf3 und Rgt2 ist das Binden intrazellulärer Glukose an die cytoplasmatische Domäne oder an den nach innen gewandten Teil des Proteins in der Plasmamembran [Kruckeberg et al., 1998]. Diese These unterstützen die Beobachtungen, dass auch freie, nicht membrangebundene cytoplasmatische Domänen von Snf3 ein Signal geben können.

Die Proteine Mth1 und Std1 interagieren mit den Sensorproteinen und sind auch an der Weiterleitung des Glukosesignals beteiligt [Lafuente et al., 2000; Schulte et al., 2000]. Es wurde eine Interaktion von Std1 und Mth1 mit den cytoplasmatischen Domänen der Sensorproteine nachgewiesen. Lafuente schlägt ein Modell vor, in dem die Sensorproteine Mth1 und Std1 an der Membran zurückhalten, und sie somit daran hindern, negative Effekte auszuüben, die sich direkt auf die Expression der *HXT*-Gene auswirken könnten [Lafuente et al., 2000]. In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, dass die beiden Proteine auch im Nukleus vorgefunden werden [Schmidt et al., 1999].

Die Details der Weiterleitung des Signals für hohe bzw. niedrige extrazelluläre Glukosekonzentrationen von den membranständigen Sensorproteinen auf Grr1, der nächsten Komponente im Regulationspfad, sind aber noch nicht bekannt. Grr1 ist Teil eines Multiproteinkomplexes und besitzt zwei Interaktionsdomänen für Proteine. Dies sind 12 leucinreiche Wiederholungssequenzen und eine sogenannte F-Box, die mit Skp1 interagiert [Li et al., 1997]. Skp1 ist Bestandteil einiger unterschiedlicher aber verwandter Enzymkomplexe, die an der Ubiquitinierung von Proteinen beteiligt sind [Bai et al., 1996; Skowyra et al., 1997]. Diese Proteinkomplexe (SCF-Komplexe) bestehen aus Skp1, Cdc53, Cdc34 und einem von verschiedenen F-Box-Proteinen. Vermutlich wird durch das beteiligte F-Box-Protein Substratspezifität vermittelt. Da Grr1 ein Teil eines SCF-Komplexes ist, scheint es wahrscheinlich, dass Grr1 über eine Ubiquitinierung die glukoseinduzierte Gen-expression reguliert [Özcan et al., 1999]. Es wäre daher möglich, dass SCF<sup>Grr1</sup> die Modifikation von Rgt1, der nächsten Komponente im Regulationspfad, vermittelt. Es könnte aber auch sein, dass der SCF<sup>Grr1</sup>-Komplex einen bis dato nicht identifizierten Regulator von Rgt1 modifiziert [Özcan et al., 1999]. Wie Rgt1 dabei verändert wird, ist unklar. Eine Degradation ist unwahrscheinlich, da Rgt1 bei hohen Glukosekonzentrationen als Aktivator agiert und in Abwesenheit von Glukose eine Repressorfunktion ausübt. Rgt1 ist ein Zinkcluster-Protein und bindet direkt an die Promotoren der *HXT*-Gene [Özcan et al., 1996 (c)]. Das Protein wirkt

in Abwesenheit von Glukose als Repressor der *HXT*-Gene, hat bei niedrigen Glukosekonzentrationen eine neutrale Funktion und agiert bei hohen Glukosekonzentrationen als Aktivator für das *HXT1*-Gen. Als Repressor rekrutiert Rgt1 wahrscheinlich die Korepressorproteine Ssn6 und Tup1 [Özcan et al., 1995], während die Aktivatorfunktion von den Korepressorproteinen unabhängig ist [Özcan et al., 1996 (c)]. Abbildung 5 zur Regulation des *HXT1*-Gens gibt einen schematischen Überblick über den Glukoseinduktionspfad (siehe unten).

Bei *S. cerevisiae* sind die Mechanismen der Glukoseinduktion und Glukoserepression an der Transkriptionsregulation der *HXT*-Gene beteiligt. Die einzelnen Regulationspfade führen in Kombination oder einzeln zur, an die jeweiligen Umgebungsbedingungen angepassten Expression der geeigneten Hexosetransporter. Zusätzlich wirken auch bisher unbekannte Regulationspfade auf die Expression der *HXT*-Gene ein. Die ersten Erkenntnisse zur Regulation der *HXT*-Gene wurden anhand der Transkriptionsregulation von *HXT1* bis *HXT4* gewonnen. Die Expression dieser Gene wird durch Glukose 10-300-fach induziert. Es wurden drei grundsätzliche Prinzipien der Transkriptionskontrolle erkannt:

- Induktion durch Glukose, unabhängig von der Zuckerkonzentration (*HXT3*)
- Induktion nur durch niedrige Glukosekonzentrationen (*HXT2*, *HXT4*)
- Induktion nur durch hohe Glukosekonzentrationen (*HXT1*)

Die Transkriptionsregulation von Hxt1 ist ein instruktives Beispiel für die Antwort der Zelle auf die Verfügbarkeit von Glukose. In Abbildung 5 ist die Regulation skizziert, die als Reaktion der Zelle auf unterschiedliche Glukosekonzentrationen zu Veränderungen in der Expression des Hxt1-Transportproteins führt. Abbildung 5 verdeutlicht außerdem die dreifache Rolle von Rgt1 bei der Transkription der *HXT*-Gene am Beispiel des *HXT1*-Gens und zeigt das Zusammenspiel einiger Faktoren des Glukoseinduktionspfads.

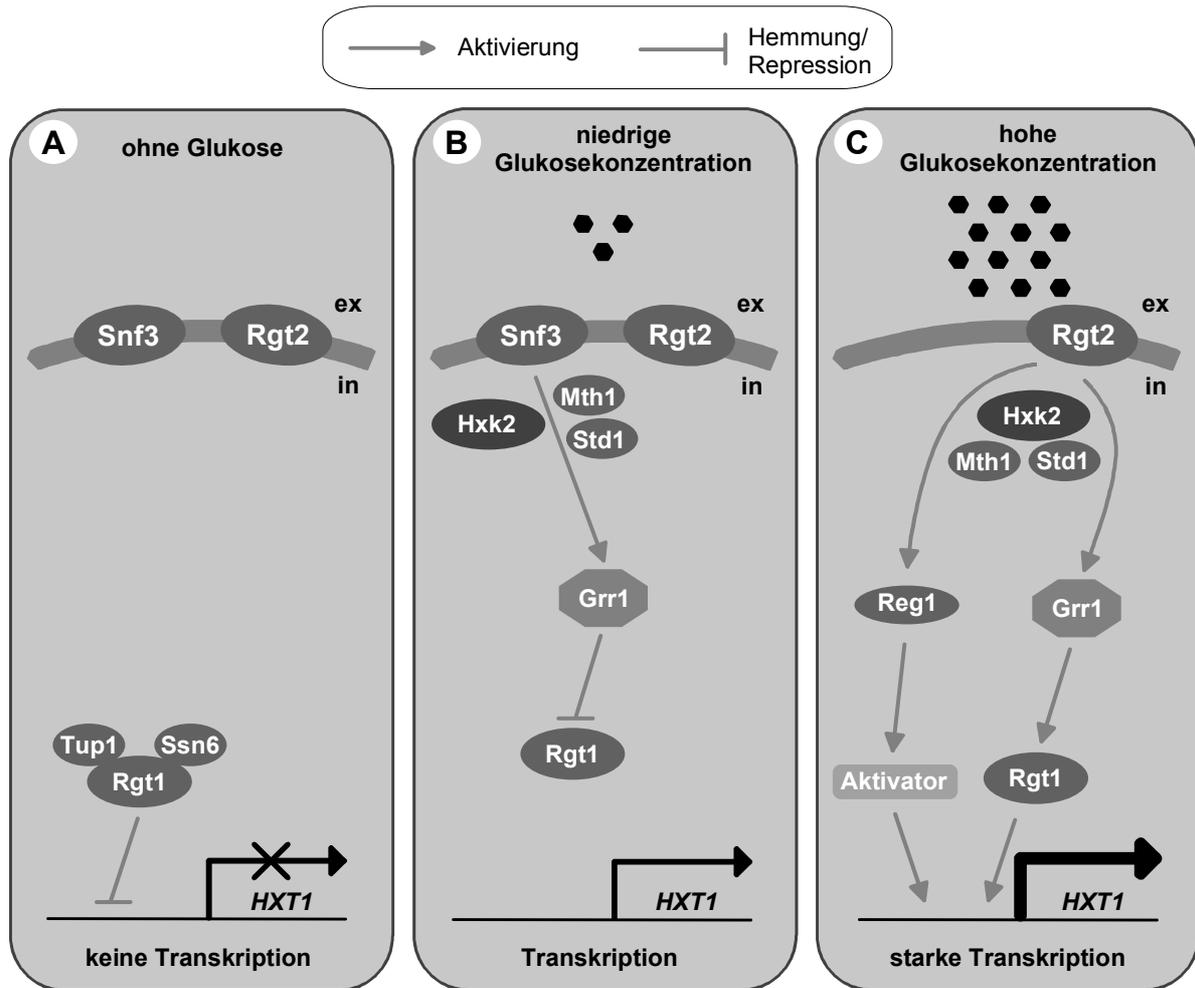


Abbildung 5: Transkriptionsregulation von Hxt1 (nach [Özcan et al., 1999; Rolland et al., 2002])

Ohne extrazelluläre Glukose bindet der Transkriptionsfaktor Rgt1 an den Promotor des *HXT1*-Gens und reprimiert dessen Expression (A in Abbildung 5). Niedrige Glukosekonzentrationen werden vom Sensorprotein Snf3 detektiert. Über Grr1 wird Rgt1 inaktiviert (B).

Liegen im Medium hohe extrazelluläre Glukosekonzentrationen vor, so wird die Expression von *HXT1* ca. 300-fach induziert. Die Anwesenheit hoher extrazellulärer Glukosekonzentrationen wird von Rgt2 erfasst, weitergeleitet und dadurch Rgt1 in einen Transkriptionsaktivator überführt. Somit wird eine etwa 20-fache Induktion des *HXT1*-Gens erreicht [Özcan et al., 1995]. Ein zweiter Regulationspfad unter Beteiligung von Reg1, Hxk2 und einem bislang unbekanntem Aktivatorprotein ist für ca. 15-fache Induktion des *HXT1*-Gens verantwortlich [Özcan et al., 1999], was zu einer maximalen Expression des *HXT1*-Gens führt (C). *HXT1* wird somit nur bei hohen Glukosekonzentrationen voll exprimiert und in Abwesenheit von Glukose reprimiert.

Die Expression des *HXT3*-Gens wird bei Abwesenheit extrazellulärer Glukose durch Rgt1 reprimiert. Eine ca. 10-fache Induktion wird bei niedrigen und hohen Glukosekonzentrationen beobachtet. Bei diesem Gen scheint nur der Rgt1-vermittelte Regulationsweg beteiligt zu sein.

Die Transkription der Gene für die Hexosetransporter Hxt2 und Hxt4 werden nur durch niedrige Glukosekonzentrationen ca. 10-fach induziert. Bei Abwesenheit und hohen Konzentrationen von Glukose werden diese Gene schwach exprimiert. Wie in Abbildung 6 dargestellt ist, sind die zwei Repressionsmechanismen über Mig1 bzw. Rgt1 für dieses Expressionsmuster verantwortlich. Zum einen wirkt Rgt1 wieder als Repressor der Transkription beider Gene in Abwesenheit von Glukose (Abbildung 6, A). Niedrige Glukosekonzentrationen werden von Snf3 erfasst und in die Zelle weitergeleitet. Dies führt zu einer Aufhebung der Repression durch Rgt1. Die Gene werden transkribiert (B). Bei hohen Glukosekonzentrationen spielt der allgemeine Repressionsweg eine Rolle (C). An der Reprimierung vieler Gene unter hohen Glukosekonzentrationen beteiligt, hat Mig1 auch auf die Gene *HXT2* und *HXT4* einen negativen Einfluss. Die Promotoren dieser Gene weisen Mig1 Bindestellen auf [Özcan et al., 1996 (b)].

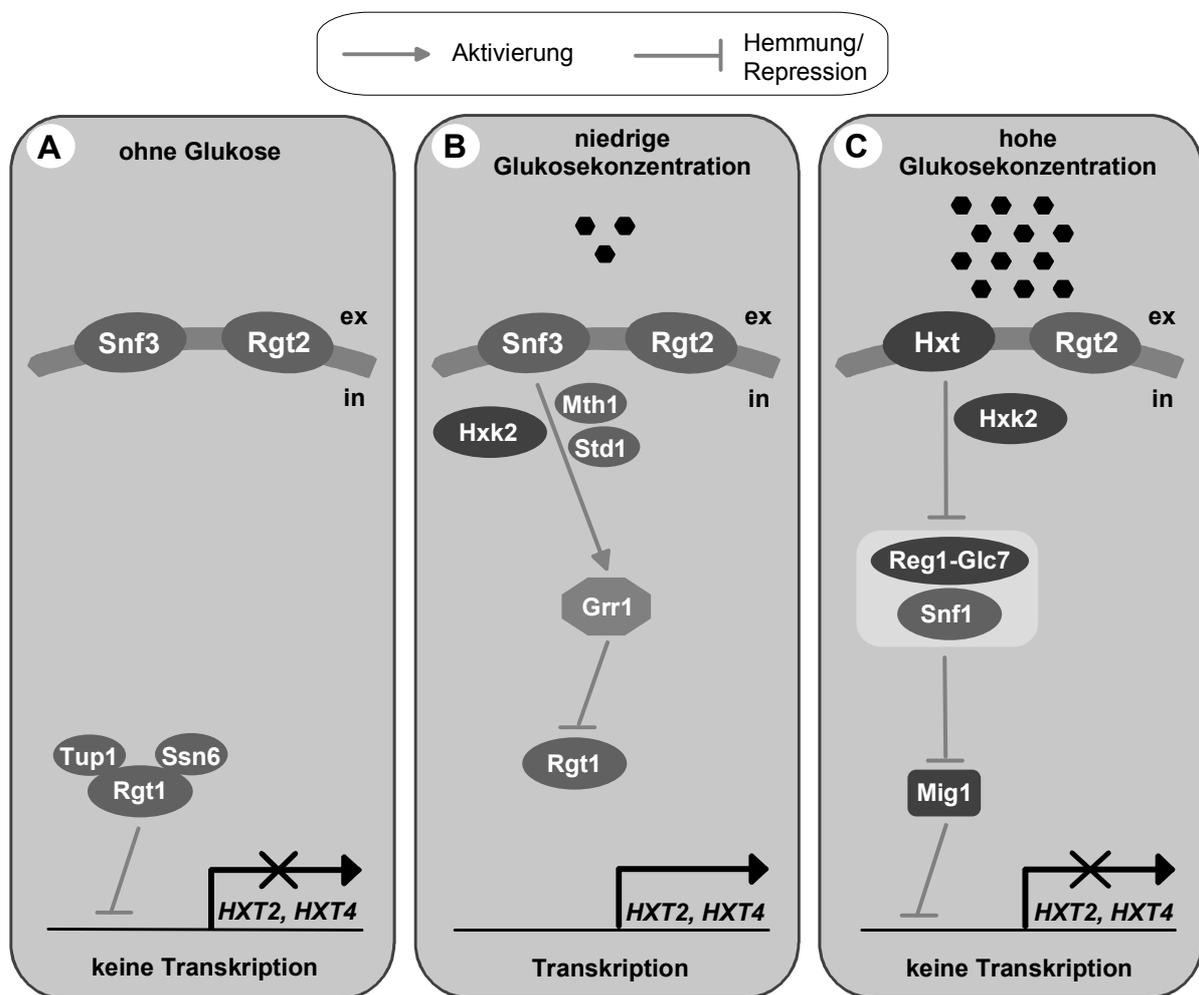


Abbildung 6: Regulation der Gene *HXT2* und *HXT4* (nach [Özcan et al., 1999; Rolland et al., 2002; Sanz et al., 2000])

Die beiden Gene *HXT6* und *HXT7* werden ähnlich reguliert. Der Basallevel der Expression dieser beiden Gene liegt höher als bei *HXT1*, *HXT2* und *HXT3*. *HXT7* ist das am stärksten exprimierte *HXT*-Gen [Ciriacy et al., 1997] und wird höher exprimiert als *HXT6* [Reifenberger et al., 1997; Reifenberger et al., 1995]. Hohe Glukosekonzentrationen

reprimieren die Expression dieser Gene [Ciriacy et al., 1997; Liang et al., 1996]. *HXT6* wird auf Raffinose, niedrigen Glukose- und Fruktosekonzentrationen sowie nichtvergärbaren Kohlenstoffquellen stark exprimiert. Die Repression von *HXT6* (vielleicht auch *HXT7*) scheint zumindest teilweise unter der Kontrolle des allgemeinen Glukoserepressionspfades zu sein. An der Expressionsregulation von *HXT7* ist wahrscheinlich Snf3 und Grr1 beteiligt [Schulte et al., 2000]. Überraschenderweise ist Snf3 auch an der Repression von *HXT6* (vielleicht auch *HXT7*) beteiligt, obwohl Snf3 selbst bei hohen Glukosekonzentrationen reprimiert wird. Es muss somit ein zusätzliches Signal geben, das die Repression auslöst [Liang et al., 1996]. Zusätzlich zur Repression der Transkription wird für *HXT6* auch eine posttranskriptionale Regulation postuliert [Liang et al., 1996].

### 1.3.4.2 Posttranslationale Regulation des Hexosetransports

Aus Untersuchungen von Wendell und Bisson [1994] geht hervor, dass die Aktivität des Glukosetransportproteins Hxt2 posttranslational reguliert sein muss. Auch Hxt6 scheint posttranslational modifiziert zu werden, da hohe Glukosekonzentrationen eine Abregelung der Transporteraktivität bewirken [Liang et al., 1996]. Beim Wildtyp von *S. cerevisiae* werden für die Glukoseaufnahme  $K_M$ -Werte von unter 0,5 mM gemessen [Buziol et al., 2002]. Unter gleichen Bedingungen werden für einen *HXT7*-Einzelexpressionsstamm  $K_M$ -Werte von 1,1 mM bestimmt [Buziol et al., 2002; Reifenberger et al., 1997]. Da Hxt7 die höchste Affinität aller charakterisierten Glukosetransporter besitzt, könnte es sein, dass auch dieser Transporter im Wildtyp einer posttranslationalen Modifikation unterliegt.

Darüber, wie eine posttranslationale Modifikation der Hxt-Proteine aussehen könnte, kann zur Zeit nur spekuliert werden. In Frage käme eine Phosphorylierung oder Glykosylierung der Proteine. Potentielle „consensus-sites“ für eine N-Glykosylierung und Phosphorylierung durch die PKA und andere Kinasen wurden für Hexosetransporter der Hefen schon nachgewiesen [Bisson et al., 1993]. Ebenso wird diskutiert, ob die Transporter miteinander interagieren. Für viele Mitglieder der Zuckertransportfamilie wurde die Existenz eines Leucin-Zipper Motivs nachgewiesen, das in der Lage ist, Protein-Protein Interaktionen zu vermitteln [Boles et al., 1997]. Für den Glut1 Transporter beim Menschen wurde vorgeschlagen, dass er in di- und tetrameren Formen existieren kann [Bisson et al., 1993]. Auch Wechselwirkungen der Transporter mit den Hexokinasen und der Glukokinase werden diskutiert [Bisson et al., 1983 (a); Clifton et al., 1993; Smits et al., 1996].

### 1.3.4.3 Abbau der Hexosetransportproteine

Die Transportkapazität und auch die Affinität des Hexosetransportsystems von *S. cerevisiae* wird auch durch einen Abbau der Transportproteine beeinflusst. Ein spezifischer Abbau von Zuckertransportern bei *S. cerevisiae* wird von Lagunas et al. [1982] beschrieben. Weitere Untersuchungen wiesen auf einen zuckerinduzierten Abbau von Transportproteinen hin, was somit einem der Katabolitinaktivierung analogen Prozess entsprechen würde [Busturia et al., 1986]. Dass hierbei von „Inaktivierung“ anstatt von „Abbau“ gesprochen wird, liegt in der geschichtlichen Entwicklung begründet. Als beim Glukosetransportsystem von *S. cerevisiae* nur zwischen zwei Komponenten, der hoch- und der niedrigaffinen, unterschieden wurde,

konnte unter bestimmten Umständen eine Inaktivierung der Komponenten beobachtet werden [Busturia et al., 1986]. Dabei wurde für die zuckerinduzierte Inaktivierung des Glukosetransportsystems erstmals der von Holzer [Holzer, 1976] geprägte Begriff „Katabolitinaktivierung“ verwendet. Heute wird in diesem Zusammenhang anstatt von „Katabolitinaktivierung“ von „glukoseinduzierter proteolytischer Degradation“ gesprochen [Krampe et al., 1998].

Die cAMP abhängige Proteinkinase wurde mit der Inaktivierung der Glukosetransporter in Verbindung gebracht, was auf eine Beteiligung der cAMP Kaskade an der Katabolitinaktivierung dieser Transportproteine schliessen lässt [Ramos et al., 1989]. Für die Glukosetransporter Hxt6 und Hxt7 wurde eine glukoseinduzierte Degradation in der Vakuole nach Endozytose nachgewiesen [Krampe et al., 1998]. Ubiquitinierung scheint bei diesem Prozess auch eine Rolle zu spielen. Für die Katabolitinaktivierung des Galaktosetransporters bei *S. cerevisiae* wurde ebenfalls eine Ubiquitinierung des Transportproteins beobachtet [Horak et al., 1997]. In weiteren Untersuchungen von Krampe und Boles [2002] wurde festgestellt, dass auch Autophagozytose am Abbau dieser Proteine beteiligt ist. Viele der Untersuchungen zum Abbau der Zuckertransportproteine sind unter stickstofflimitierten Bedingungen durchgeführt worden, weshalb einige der beobachteten Effekte auch auf einen allgemein erhöhten Proteinumsatz zurückzuführen sein könnten [Lucero et al., 2002]. Für den Abbau der Glukosetransporter Hxt6 und Hxt7 ist allerdings neben der Stickstofflimitierung eine vergärbare Kohlenstoffquelle nötig, um die Degradation auszulösen, was die Notwendigkeit eines spezifischen Signals reflektieren könnte. Allerdings könnte dies auch eine Folge des Energiebedarfs für den Abbauprozess sein. Doch hängt der Abbau des Hxt-Proteines zudem von einer spezifischen Aminosäuresequenz ab, weshalb neben einer Stimulation des allgemeinen Proteinumsatzes noch ein spezifischer Prozess am Abbau der Transportproteine beteiligt sein muss [Krampe et al., 2002]. Um den Abbau von Hxt2 [Kruckeberg et al., 1999] bzw. Hxt7 [Ye et al., 2001] zu verfolgen, wurden auch GFP-Fusionsproteine eingesetzt. Der Abbau der weiteren Hxt-Proteine ist noch nicht beschrieben.

### **1.3.5 Bedeutung von intrazellulärer Glukose, Glukose-6-Phosphat und ATP**

Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, wird Glukose von *S. cerevisiae* durch den Prozess der erleichterten Diffusion transportiert. Da Glukose somit nur entlang des Konzentrationsgradienten transportiert wird, kann ein effektiver Transport nur stattfinden, wenn die intrazelluläre Glukose durch die nachfolgenden Reaktionen im Stoffwechsel entfernt wird. Diese Interaktion des Metabolismus mit dem Transportschritt könnte durch Metabolite, Kometabolite oder Proteine vermittelt werden. Hierbei könnten die dem Transportschritt unmittelbar folgenden (Ko-)Metabolite intrazelluläre Glukose, Glukose-6-Phosphat und ATP eine Rolle spielen. Als Proteine, die mit dem Transporter interagieren, kämen die Zuckerkinasen in Frage.

Ein Nettotransport von Glukose in die Zelle setzt voraus, dass der Carrier unbeladen ist, wenn er in den extrazellulären Raum gerichtet ist. Sobald die intrazelluläre Glukosekonzentration die Bindekonstante für Glukose überschreitet, werden die meisten Carrier auch Glukose binden, sobald sie in den extrazellulären Raum gerichtet sind. Werden von der Zelle

hochaffine Glukosetransporter exprimiert, können signifikante Konzentrationen intrazellulärer Glukose somit einen erhöhten Efflux nach sich ziehen, was schliesslich zu einer niedrigeren Nettotransportrate führt. Unter Expression niedrigaffiner Glukosetransporter wären höhere Glukosekonzentrationen nötig, um einen signifikanten Efflux zu bewirken [Teusink et al., 1998].

Es wurden Unterschiede zwischen der errechneten Glukoseverbrauchsrate unter Einsatz der Zero-Trans-Influx Kinetik:

$$q_s = q_s^{\max} \frac{c_s}{K_M + c_s} \quad (9)$$

und der beobachteten Glukoseverbrauchsrate:

$$q_s = \frac{D(c_s^0 - c_s)}{c_x} \quad (10)$$

$q_s$  = spezifische Glukoseverbrauchsrate [mmol/(g<sub>TS</sub>·h)]

$q_s^{\max}$  = maximale spezifische Glukoseverbrauchsrate [mmol/(g<sub>TS</sub>·h)]

$c_s$  = Substratkonzentration [mM]

$c_s^0$  = Substratkonzentration in der Mediovorlage [mM]

$c_x$  = Biomassekonzentration [g<sub>TS</sub>/l]

$D$  = Verdünnungsrate [h<sup>-1</sup>]

$K_M$  = Michaelis-Menten Konstante [mM];

festgestellt [Diderich et al., 1999; Teusink et al., 1998]. In einem aeroben Chemostat lag die berechnete Glukoseverbrauchsrate bei niedrigen Verdünnungsraten über der gemessenen, was auf die Wirkung eines Inhibitors schliessen lässt. Ein Kandidat für diese Funktion ist intrazelluläre Glukose. Bei höheren Verdünnungsraten lag die berechnete Glukoseverbrauchsrate unter der gemessenen. Dies spricht für einen positiven Effektor des Transportschrittes oder liegt daran, dass die Zero-Trans-Influx Technik die gemessene Glukoseaufnahme systematisch unterschätzt [Diderich et al., 1999].

Die Anwendung einer Michaelis-Menten Kinetik ist somit nur gerechtfertigt, wenn signifikante Konzentrationen intrazellulärer Glukose ausgeschlossen werden können. Teusink et al. [1998] zeigten, dass auch sehr niedrige intrazelluläre Glukosekonzentrationen einen Einfluss auf den Transportschritt haben können. Dies resultiert aus der Tatsache, dass bei einem Carrier, der erleichterte Diffusion vermittelt, im Gegensatz zu einem Enzym, Substrat und Produkt nicht miteinander um dieselbe Bindestelle konkurrieren. Anhand einer Modellierung wurde gezeigt, dass bei hohen Substratkonzentrationen (100 x  $K_S$ ) im Fall des Enzyms, der relativ geringe Produktanteil nicht mit dem Substrat konkurrieren kann. Beim Carrier hingegen lag eine ausgeprägte Sensitivität für die Produktkonzentrationen vor [Teusink et al., 1998].

Die meisten Transportstudien unter Einsatz der Zero-Trans-Influx Technik durchgeführt worden, bei der aufgrund sehr kurzer Reaktionszeit (meist 5 Sekunden) ein „feedback“ des Metabolismus per Definition ausgeschlossen wird. Dass aber auch hier schon der Einfluss eines Anstaus intrazellulärer Glukose eine Auswirkung auf die Nettotransportrate hat, belegen

Untersuchungen an Stämmen, die Deletionen in den Zuckerkinasen aufweisen [Smits et al., 1996]. In früheren Untersuchungen wurde die Abhängigkeit des hochaffinen Transportsystems für Glukose von den Zuckerkinasen beschrieben [Bisson et al., 1983 (a); Lang et al., 1987]. Diese Ergebnisse führen Smits et al. [1996] auf die Anwendung der 5 Sekunden Aufnahmemessungen zurück. Hierbei wird nicht die initiale Kinetik des Transporters erfasst. Eine Akkumulation intrazellulärer Glukose aufgrund der fehlenden Kinasen führt in diesem Zeitfenster zu einer verminderten Nettotransportrate. Bei Reaktionszeiten von 200 Millisekunden konnte diese Gruppe den hochaffinen Transport nachweisen. Die Hypothese von der Abhängigkeit des Glukosetransports von den Zuckerkinasen wird durch diese Untersuchungen geschwächt.

Über den Einfluss von Glukose-6-Phosphat liegen sehr widersprüchliche Informationen vor. Aus frühen Untersuchungen an intakten Zellen und an Membranfraktionen schlossen Azam und Kotyk [1969], dass G6P ein Inhibitor des Transportschrittes ist und die Transportkapazität als auch die Affinität beeinflusst. Weitere Untersuchungen lassen ebenfalls auf eine Inhibition des Transportschrittes durch G6P schliessen [Becker et al., 1972]. Demgegenüber stehen Untersuchungen, bei denen Deletionsmutanten für die Phosphoglukoseisomerase eingesetzt wurde, die grosse Mengen an G6P akkumuliert [Maitra, 1971; Perea, 1978]. Hierbei konnte die vorgeschlagene Inhibition durch G6P nicht bestätigt werden. Desweiteren wurde die Inhibition durch G6P in ein mathematisches Modell integriert, womit eine sehr gute Beschreibung des Glukosetransportschrittes möglich war [Rizzi et al., 1996]. Bei umfassenden mathematischen Modellen zur Beschreibung des Stoffwechsels von *S. cerevisiae* wurde die Inhibition durch G6P ebenfalls berücksichtigt [Cortassa et al., 1997; Rizzi et al., 1997].

Ein Einfluss von ATP auf den Transportschritt von Hexosen bei Experimenten zur Erfassung der initialen Kinetik (5 Sekunden) wird ebenfalls beschrieben [Schuddemat et al., 1988]. Bei diesen Versuchen wurden durch den Einsatz von Respirationshemmern die intrazellulären ATP-Konzentrationen vermindert. Ein direkter Effekt von ATP wird jedoch von Walsh et al. [1994] ausgeschlossen und ebenfalls darauf zurückgeführt, dass mit den 5 Sekunden Messungen nicht die initiale Kinetik erfasst wird. Der Einfluss von ATP in diesem Zeitfenster wird mit der Reduktion der Aktivität der Hexokinase durch niedrige ATP-Konzentrationen in Verbindung gebracht. Dies zieht eine Akkumulation intrazellulärer Glukose nach sich, wodurch die Nettotransportrate vermindert wird. Die Gruppe wies dies anhand von quenched-flow Versuchen nach, die Reaktionszeiten von 200 Millisekunden erlauben und somit gewährleisten, dass die initiale Kinetik des Transportschrittes erfasst wird. Teusink et al. [1998] führen die vorgeschlagenen Effekte von ATP und von G6P auf die Glukoseaufnahme auch auf eine indirekte Wirkung dieser (Ko-)Metabolite über die Hexokinasereaktion auf die Konzentration intrazellulärer Glukose zurück. Diese Untersuchungen unterstreichen die bedeutende Rolle, die der intrazellulären Glukose vermutlich zukommt.

### 1.3.6 Versuche zur Erhöhung der Transportleistung

In der Vergangenheit wurden unterschiedliche Versuche unternommen, den glycolytischen Fluss von *S. cerevisiae* zu erhöhen. Meist wird mit „glycolytischem Fluss“ entweder die (spezifische) Glukoseverbrauchs- oder die Ethanolbildungsrate gleichgesetzt.

Die Überexpression von acht glycolytischen Enzymen, einzeln oder paarweise hatte nur einen vernachlässigbaren Effekt auf die Ethanolbildungsrate [Schaaff et al., 1989]. Die Anwendung des Konzepts der „Metabolic Control Analysis“ zeigte allerdings, dass die Flusskontrolle wahrscheinlich auf mehrere Enzyme verteilt ist [Fell, 1998]. Hierbei können unter bestimmten (physiologischen/extrazellulären) Bedingungen verschiedene Enzyme mehr oder weniger Kontrolle besitzen. In neueren Untersuchungen wurde deshalb eine Sequenz von Enzymen des unteren Teils der Glycolyse überexprimiert. Doch auch hiermit wurde kein erhöhter glycolytischer Fluss erreicht [Hauf et al., 2000]. Die weitere Charakterisierung dabei eingesetzter Stämme zeigte, dass unter Bedingungen, die einen vermehrten ATP-Bedarf nach sich ziehen, doch ein erhöhter glycolytischer Fluss erreicht werden konnte [Smits et al., 2000]. Die Strategie, eine Erhöhung des glycolytischen Flusses durch einen vermehrten Bedarf der Zelle am Endprodukt eines Stoffwechselweges zu erreichen, wurde schon von Cornish-Bowden et al. [1995] vorgeschlagen. Dieser Ansatz wurde inzwischen auch experimentell anhand eines künstlich erhöhten ATP-Bedarfs bei *E. coli* verifiziert [Koebmann et al., 2002] und ist Gegenstand aktueller Diskussionen [Oliver, 2002] (siehe auch Kapitel 4.3.4). Es wurden noch weitere Versuche unternommen, den glycolytischen Fluss durch Überexpression von Enzymen zu verstärken, doch wurden nur unbefriedigende Ergebnisse erzielt [Brambilla et al., 1999; Davies et al., 1992].

Die Verbesserung der Stoffwechseleigenschaften von Mikroorganismen kann eine erhöhte Transportleistung eines Substrats über die Plasmamembran voraussetzen. Bei vielen Untersuchungen zur Erhöhung des Flusses durch Stoffwechselwege wurde der Transportschritt allerdings nicht beachtet. In einer Untersuchung von Ye et al. [2001] wurde eine Abhängigkeit der Wachstums- und der Glukoseaufnahme vom Expressionslevel des Glukosetransporters Hxt7 beobachtet. Auch weitere Untersuchungen weisen darauf hin, dass dem Glukosetransport eine hohe Flusskontrolle zukommt [Becker et al., 1972; Ciriacy et al., 1997; Diderich et al., 1999]. Die konstitutive Überexpression eines Transportgens (Hxt1) von *S. cerevisiae* führte allerdings im Vergleich zum Wildtyp nur zu einer ca. 10%igen Erhöhung der Ethanolbildungsrate [GIST-BROCADES, 1997]. Hierbei wurde der Glukosetransporter Hxt1 konstitutiv hinter einem ADH1-Promotor ins Genom integriert. Die anderen Gene für Glukosetransporter des eingesetzten Industriestammes blieben unverändert.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Die Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Boles (Institut für Mikrobiologie, Goethe-Universität Frankfurt, Frankfurt am Main) durchgeführt. Diese Gruppe konstruierte die in dieser Arbeit reaktionskinetisch charakterisierten Stämme von *S. cerevisiae* und stellte die für den molekularphysiologischen Arbeitsteil benötigten Antikörper gegen Hxt-Proteine zur Verfügung. Im gemeinsamen Projekt griff der Kooperationspartner Anregungen auf, die sich aus den Untersuchungen ergaben, um neue, den Anforderungen des Projekts entsprechende Stämme zu konstruieren.

Zunächst sollten die kinetischen Parameter für die Glukosetransporter Hxt1, Hxt5 und Hxt7 anhand von Einzelexpressionsmutanten unter Anwendung der Glukose-Pulstechnik mit nachfolgender mathematischer Modellierung geschätzt werden. Hierfür sollte zuerst ein fed-batch-Prozess implementiert werden, um die Einzelexpressionsstämme und den Wildtyp reproduzierbar im quasi-stationären Zustand ( $\mu$ ,  $c_S$ ,  $c_P$ ,  $RQ = \text{konstant}$ ) kultivieren zu können. Die Anpassung der am IBVT eingesetzten Software zur modellmässigen Beschreibung der Pulsexperimente und der Parameterschätzung sollte dem experimentellen Teil dieses Arbeitsabschnitts folgen.

Desweiteren sollte ein neuartiges, auf der stopped-flow Technik basierendes Probenahmeventil etabliert werden, um nach dynamischer Anregung einer Biosuspension durch Erhöhung der extrazellulären Glukosekonzentration die Signale intrazellulärer Metabolite im Millisekundenbereich zu erfassen. Hierbei sollte auch die bisher nur unzureichend beschriebene Dynamik intrazellulärer Glukose erfasst werden, weshalb die Entwicklung und Validierung einer Methode zur Bestimmung dieses Metaboliten auch ein wesentlicher Bestandteil dieses Projektabschnitts sein sollte.

Um die Dynamik der Expression von Hexosetransportern zu erfassen, sollten spezifische Antikörper gegen die Glukosetransportproteine Hxt1, Hxt5 und Hxt7 zum Einsatz kommen. Die Aufnahme der Expressionsprofile dieser Transportproteine während Veränderungen in extrazellulären Glukosekonzentrationen sollte einen Einblick in das Zusammenspiel der unterschiedlichen Transportertypen geben.

Durch gezielte Überexpression von Glukosetransportproteinen (Arbeitsgruppe Boles) sollte versucht werden, eine Erhöhung der glykolytischen Leistung (spezifische Raten für den Glukoseverbrauch bzw. der Ethanolbildung) zu erreichen. Der Vergleich der glykolytischen Leistung zwischen dem Überexpressionsstamm und den Kontrollstämmen sollte durch Aufnahme der spezifischen Raten unter anaerober Chemostat-Kultivierung der Mutantensämme durchgeführt werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Verwendete Stämme von *Saccharomyces cerevisiae*

In Tabelle 1 sind die bei den Untersuchungen eingesetzten Stämme von *S. cerevisiae* aufgeführt. Der Stamm CBS 7336 wird von Macherhammer [2001] und CEN.PK2-1C in Publikation 1 näher beschrieben. Der Stamm JBY20 wird in Publikation 1 beschrieben. Die Mutantenstämme JBY01, JBY19 und JBY02 gehen auf EBY.VW4000 (kompletter *hxt*-Nullstamm) zurück, bei dem alle Gene (*HXT1-17 GAL2 STL1 AGT1 MPH2 MPH3*) deletiert wurden, deren Produkte eine Glukoseaufnahme ermöglichen [Wieczorke et al., 1999] (siehe auch Kapitel 1.3.3). Vor diesem Hintergrund wurden die einzelnen Transportertypen wieder ins Genom integriert und konstitutiv exprimiert. Beim Stamm EBY.VW4000, YEpHXT5 handelt es sich um den *hxt*-Nullstamm, der ein Plasmid trägt, von dem konstitutiv der Hxt5-Transporter überexprimiert wird.

**Tabelle 1: Eingesetzte Stämme von *S. cerevisiae***

Stamm	Bezeichnung
CBS 7336	Wildtyp
JBY20	Wildtyp mit <i>HXT5::HA</i> ( <i>HA</i> -tag)
CEN.PK2-1C	Wildtyp
JBY01	<i>HXT1</i> -Einzelexpressionsmutante
JBY19	<i>HXT5</i> -Einzelexpressionsmutante
JBY02	<i>HXT7</i> -Einzelexpressionsmutante
EBY.VW4000- YEpHXT5	<i>HXT5</i> -Überexpressionsstamm Plasmid: YEpHXT5

### 3.2 Medienherstellung

Die Medien, die bei den Untersuchungen zur Etablierung und Anwendung der stopped-flow Technik A eingesetzt wurden (siehe Publikation 2), sind bei Macherhammer [2001] beschrieben. Im Folgenden werden die bei den weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Medien beschrieben. Die eingesetzten Volumina sind bei den entsprechenden Untersuchungen im jeweiligen Kapitel angegeben.

#### 3.2.1 Glycerinkultur

Die Stammhaltung erfolgte in 20 bzw. 30%igen Glycerinkulturen. Die dafür verwendeten Medien entsprechen den für den jeweiligen Stamm verwendeten Anzuchtmedien (siehe nächster Abschnitt).

### 3.2.2 Anzuchtmedien

Für die Anzucht der Gefrierkulturen wurde, mit Ausnahme des *HXT5*-Überexpressionsstammes, YEPM-Medium verwendet. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 2 dargestellt. Für den *HXT5*-Überexpressionsstamm wurde zur Anzucht ein definiertes Nährmedium hergestellt (siehe Tabelle 3 a und 3 b).

Medienkomponente	$c_i$ [%(w/v)]
Yeast Extract	1
Pepton (aus Casein)	2
Maltose	2

### 3.2.3 Fermentationsmedien

Das eingesetzte Medium basiert auf der von Verduyn [1992] vorgeschlagenen Zusammensetzung und den Zusätzen der Aminosäuren Histidin, Tryprophan und Leucin sowie der Base Uracil. Die Komponenten der Tabelle 3 a und 3 b sind bei einem Ausbeutekoeffizienten  $Y_{XS}$  von 0,5 g/g auf eine Biomasseproduktion von 15 gTS/l ausgelegt. Die Zusammensetzung des Nährmediums ist in Tabelle 3 a und b zusammengefaßt.

Medienkomponente	$c_i$ [g/l]
$(NH_4)_2SO_4$	15
$KH_2PO_4$	9
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5
Uracil (a)	0,660
L-Leucin (b)	0,975
L-Tryptophan (b)	0,135
L-Histidin (b)	0,250

- (a): Beim *HXT5*-Überexpressionsstamm wurde ein Uracil-Selektionsmarker zur Plasmidselektion eingesetzt. Deshalb mussten die Medien, die bei der Vermehrung dieses Stammes eingesetzt wurden, ohne Uracil hergestellt werden.
- (b): Der Stamm JBY20 besitzt nur den Uracil-Auxotrophiemarker. Das Medium zur Kultivierung dieses Stammes wurde somit ohne die Zugabe der Aminosäuren hergestellt.

**Tabelle 3 b: Zusammensetzung des Nährmediums**

Zugabe	$c_i$ [ml/l]
Spurenelementlösung (siehe Tabelle 4)	3
Vitaminlösung (siehe Tabelle 5)	3

Das Medium wurde mit NaOH auf pH = 5 eingestellt, autoklaviert und mit jeweils 3 ml Vitamin- und Spurenelementlösung auf einen Liter Nährmedium versetzt. Die Zusammensetzung der Vitamin- und Spurenelementlösung geht aus Tabelle 4 und 5 hervor. Die Vitaminlösung wurde sterilfiltriert und die Spurenelementlösung autoklaviert und lichtgeschützt aufbewahrt. Beide Lösungen wurden bei 4°C gelagert.

**Tabelle 4: Spurenelementlösung**

Spurenelementverbindung	$c_i$ [g/l]
EDTA (di sodium-)	15.0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4.5
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.0
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.3
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.4
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4.5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.0
KI	0.1

**Tabelle 5: Vitaminlösung**

Vitaminkomponente	$c_i$ [g/l]
d-Biotine	0.05
Ca-D(+)panthotenate	1.00
Nicotinic acid	1.00
myo-Inositol	25.00
Thiamine hydrochloride	1.00
Pyridoxol hydrochloride	1.00
p-aminobenzoic acid	0.20

Als Kohlenstoff- und Energiequelle diente beim Wildtyp Glukose und bei den Stämmen, die den *hxt*-Nullstamm als Hintergrund besitzen, wurde Maltose oder Glukose eingesetzt. Die eingesetzte Kohlenstoff- und Energiequelle wird bei den jeweiligen Versuchen genannt.

### 3.2.4 Medien für die anaerobe Kultivierung

Zur anaeroben Kultivierung wurden die in den vorigen Absätzen beschriebenen Medien eingesetzt und mit weiteren Supplementen versetzt [Verduyn et al., 1990]. Diese Komponenten wurden in ethanolischer Lösung hergestellt und in einem Druckgefäß autoklaviert. Tabelle 6 zeigt die Supplemente und ihre Konzentration im Nährmedium für den anaeroben Chemostat.

<b>Supplementkomponente</b>	<b><math>c_i</math> [mg/l]</b>
Ergosterol	10
Tween 80	420

## 3.3 Fermentation

Bei den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit kamen unterschiedliche Bioreaktoren zum Einsatz, die in verschiedenen Prozessführungen betrieben wurden. Die Fermentationen wurden, bis auf die kinetische Charakterisierung der Einzelexpressionsmutanten (siehe Publikation 1) unter Glukoselimitierung durchgeführt. Die Einzelexpressionsmutanten wurden im Zulaufverfahren (fed-batch) unter Maltoselimitierung vermehrt, um unabhängig von der Transporterausstattung standardisierte Wachstumsraten zu garantieren.

Bis auf die Chemostaten zur Charakterisierung des *HXT5*-Überexpressionsstammes und der Vergleichsstämme (*HXT5*<sup>+</sup>, Wildtyp) sowie der Bestimmung der kinetischen Parameter von *Hxt5* handelte es sich um aerobe Prozesse. Tabelle 7 gibt einen Überblick über die verwendeten Bioreaktorsysteme und deren Einsatz. Die in der Spalte „Prozessführung“ angegebene Aufzählung verweist auf detailliertere Beschreibungen des Prozesses im Anschluss an Tabelle 7.

**Tabelle 7: Reaktortypen, Arbeitsvolumina, Prozessführungen und deren Versuchseinsatz**

Reaktortyp	V <sub>F</sub> [l]	Prozessführung	Versuchsteil
Biostat E, Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland	1,5 - > 3 l	fed-batch (a)	Kinetische Charakterisierung ( <i>HXT1</i> <sup>+</sup> , <i>HXT5</i> <sup>+</sup> , <i>HXT7</i> <sup>+</sup> , Wildtyp);
	2 l	Chemostat (b)	Stopped-flow Messungen (G6P und AXP)
KLF2000, Bioengineering, Wald, Switzerland	1,5 l	Chemostat (c)	Kinetische Charakterisierung ( <i>HXT5</i> <sup>+</sup> ); Bestimmung intrazellulärer Glukose
Laboratory glass fermentor 2 l, Eigenbau, Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart	1,5 l	Chemostat (anaerob) (d)	Bestimmung der glycolytischen Leistung (Überexpressionsstamm); Kinetische Charakterisierung ( <i>HXT5</i> <sup>+</sup> )
	1,0 l - 1,7 l	Chemostat- batch (e)	Dynamik der Hxt-Proteine (Umschalten von Chemostat auf batch)
Pilot plant 30 l, Bioengineering, Wald, Switzerland	10 l	Chemostat (f)	Dynamik der Hxt-Proteine (Multiple Stimuli); stopped-flow Messungen (Dynamik intrazellulärer Glukose und G6P)

(a):

Bei den Untersuchungen an den Einzeldominanzmutanten (*HXT1*<sup>+</sup>, *HXT5*<sup>+</sup> und *HXT7*<sup>+</sup>) sowie dem Wildtyp (CEN.PK2-1C) wurden die Zellen mit Hilfe des Zulaufverfahrens (fed-batch) vermehrt. Der quasi-stationäre Zustand, der die Grundvoraussetzung für unsere Untersuchungen ist, wird im Gegensatz zum steady-state bei einer Chemostat-Kultivierung nach kürzerer Zeit erreicht. Dies ermöglicht Experimente zur reaktionskinetischen Charakterisierung mit verschiedenen Stämmen in schnellerer Abfolge. Die kurze Zeitdauer vom Beginn des Prozesses bis zum Zeitpunkt der Untersuchungen gewährleistet ferner, daß die Stabilität der genetisch veränderten Stämme auf jeden Fall ausreicht, um von einer bezüglich der Ausstattung mit den jeweiligen Glukosetransportern homogenen Population auszugehen. Für die Aufrechterhaltung einer konstanten spezifischen Wachstumsrate im fed-batch-Prozess wird eine, aus den Stoffbilanzen für Substrat und Biomasse errechnete, exponentiell mit der Zeit zunehmende Zulauftrate angewandt:

$$F = \left( \frac{\mu^{SP}}{Y_{XS}} + m_S \right) \frac{(c_X^0 \cdot V_F^0) \cdot e^{(\mu^{SP} \cdot t)}}{c_S^0} \quad (11)$$

Die Anzucht erfolgte über eine Anzuchtkultur (50 ml) und Vorkulturen (5 x 300 ml) in 1 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Der Setpoint für die spezifische Wachstumsrate lag bei  $\mu^{SP} = 0,1h^{-1}$  und wurde während des fed-batch durch Bestimmung des Biomassezuwachs kontrolliert (siehe auch Publikation 1, Material and methods).

(b):

Die Messung der Dynamik in den Konzentrationen von G6P und der Adeninnukleotide (ATP, ADP und AMP) im Millisekundenbereich unter Einsatz der stopped-flow Technik wurde an Chemostatkulturen von *S. cerevisiae* CBS 7336 durchgeführt. Dafür wurde zuerst ein fed-batch durchgeführt (wie in (a) beschrieben) und nach Erreichen des gewünschten Arbeitsvolumens ( $V_F = 2$  l) und der Biomassekonzentration ( $c_X = 15$  g<sub>TS</sub>/l) auf Chemostatbetrieb ( $D = 0,1h^{-1}$ ) umgeschaltet. Der Bioreaktor wurde unter einem Überdruck ( $p_F$ ) von 0,4 bis 0,5 bar betrieben (siehe auch Publikation 2, Material and methods).

(c):

Auch bei der weiteren Charakterisierung der *HXT5*-Einzelexpressionsmutante (*S. cerevisiae* JBY19) und bei den Vorversuchen zur Bestimmung intrazellulärer Glukose unter Verwendung des Wildtyps (*S. cerevisiae* CEN.PK2-1C) wurden kontinuierliche Kulturen verwendet. Die Stämme wurden im Chemostat bei einem Arbeitsvolumen von  $V_F = 1,5$  l und einer Verdünnungsrate von  $D = 0,1$  h<sup>-1</sup> kultiviert. Die Belüftungsrate lag bei  $Q = 120$  NI/h. Die Anzucht erfolgte über eine Anzuchtkultur (50 ml), eine Vorkultur (5 x 200 ml) und einen fed-batch bis zu einer Biomassekonzentration von  $c_X = 15$  g<sub>TS</sub>/l. Nach dem fed-batch wurde auf Chemostatbetrieb umgeschaltet (siehe auch Kapitel 4.2 sowie Publikation 1, Material and methods).

(d):

In den Versuchen zur Bewertung der glycolytischen Leistung des *HXT5*-Überexpressionsstammes (EBY.VW4000, YEpHXT5) im Vergleich mit dem Wildtyp (CEN.PK2-1C) und dem *HXT5*-Einzelexpressionsstamm (JBY19), sowie zur weiteren kinetischen Charakterisierung des *HXT5*-Einzelexpressionsstammes (JBY19) wurden anaerobe Chemostat-Kulturen eingesetzt. Ein Schüttelkolben mit Schikanen und einem Stutzen zur Entnahme von Biosuspension wurde für die anaerobe Züchtung der Vorkultur mit einem Gummistopfen versiegelt. In den Gummistopfen war eine Entlüftung eingearbeitet, die mit einem Sterilfilter (Glasfaserkartusche im Filterhalter von Bioengineering, Wald, Schweiz) versiegelt war. Nach Animpfen des Vorkulturmediums ( $V = 300$  ml) mit 1 ml einer aeroben Anzuchtkultur wurde die Abluftstrecke mit einem Gärröhrchen (1%ige NaSO<sub>3</sub>-Lösung) versiegelt, um eine Kontamination mit Luftsauerstoff zu vermeiden. Die Vorkultur (300 ml) wurde bei 30°C bis zur Biomasse von ca. 2,5 g<sub>TS</sub>/l auf einer Schüttelmaschine inkubiert (Model G-53, New Brunswick Scientific, USA).

Der Bioreaktor (Laboratory glass fermentor 2 l, Eigenbau, Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart), in dem der batch-Prozess stattfand, wurde mit eingefülltem batch-Medium autoklaviert. Danach wurde die Vorkultur über eine Anstechnadel eingefüllt. Im batch-Prozess ( $V_F = 1,5$  l) wurden die Zellen bis zu einer Biomasse von ca. 2,5 g<sub>TS</sub>/l vermehrt und danach wurde auf Chemostat-Betrieb umgeschaltet. Die Verdünnungsrate lag bei  $D = 0,07$  h<sup>-1</sup>, die Rührerdrehzahl bei 300 rpm (siehe auch Publikation 1, Material and methods).

(e):

Um die Dynamik der Transportproteine für Hexosen zu erfassen, wurde ausgehend von einem Chemostat auf eine batch-Kultivierung umgeschaltet. Die damit erreichte Erhöhung der Glukosekonzentration im Medium sollte eine Änderung der Typen und Mengen an Transportproteinen in der Membran zur Folge haben. Bei dieser Untersuchung wurde *S. cerevisiae* JBY20 eingesetzt.

Zur Anzucht wurden Vorkulturen (3 x 250 ml) beimpft und bei 30°C auf einer Schüttelmaschine (Model G-53, New Brunswick Scientific, USA) bis zu einer Biomasskonzentration von ca. 2 g<sub>TS</sub>/l inkubiert. Danach folgte eine über einen Prozessrechner gesteuerte fed-batch-Phase im Bioreaktor (Laboratory glass fermentor 2 l, Eigenbau, Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart) bis zu einer Biomassekonzentration von 5 g<sub>TS</sub>/l bei einem Arbeitsvolumen von 1 l. Nach der fed-batch-Phase wurde auf Chemostatbetrieb umgeschaltet. Die Konzentration an Gelöstsauerstoff wurde mit einer Sauerstoffelektrode gemessen und der Wert mit dem Prozessrechner erfasst. Die Rührerdrehzahl wurde manuell eingestellt, um ein Absinken der Konzentration des Gelöstsauerstoffs unter 30% zu vermeiden. Der shift auf den batch-Prozess ist in Publikation 3 beschrieben.

(f):

Bei den Versuchen zur Dynamik der Hexosetransportproteine Hxt1, Hxt5 und Hxt7 (Multiple Stimuli) sowie der Erfassung der dynamischen Antwort der Konzentrationen von intrazellulärer Glukose und G6P unter Einsatz der stopped-flow Technik B wurde ein Chemostat mit 10 l Arbeitsvolumen eingesetzt. Zum einen konnte somit der hohen Probenahmefrequenz bei den multiplen Stimuli Rechnung getragen werden. Zum anderen wird bei Experimenten mit der modifizierten stopped-flow Technik bei einem Probenahmezyklus (Vorlauf, Probenahme, Nachlauf, Reinigung) über 100 ml an Biosuspension entnommen. Durch das Arbeitsvolumen von 10 l war es möglich, mehrere stopped-flow Experimente hintereinander durchzuführen. Das höhere Volumen an Biosuspension garantierte eine während der Experimente innerhalb des Messfehlers der Volumenregelung des Bioreaktors konstante Verdünnungsrate. Die stopped-flow Experimente wurden mit *S. cerevisiae* JBY19 (*HXT5*-Einzelexpressionsstamm), die Versuche zur Dynamik der Hexosetransporter mit *S. cerevisiae* JBY20 (*HXT5* mit *HA*-tag) durchgeführt.

Die Anzuchtstrategie umfasste eine Vorkultur im Schüttelkolben mit 5 x 400 ml bis zu einer Biomassekonzentration von 2 g<sub>TS</sub>/l, eine batch-Phase mit 4,5 l Arbeitsvolumen und einer Biomassekonzentration von 4 g<sub>TS</sub>/l im Bioreaktor (pilot plant, Fa. Bioengineering, Wald, Schweiz). Nach der anschließenden fed-batch-Phase bis zu einem Volumen von 10 l bei einer Biomassekonzentration von 15 g<sub>TS</sub>/l wurde auf Chemostat-Betrieb umgeschaltet. Die Rührerdrehzahl wurde bei diesem Prozess geregelt, um ein Absinken der Konzentration an Gelöstsauerstoff unter 40% zu vermeiden. Der Druck im Bioreaktor (p<sub>F</sub>) wurde auf 0,5 bar geregelt. Die Verdünnungsrate lag bei  $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ .

Zur Prozesssteuerung und -regelung, Datenerfassung, -verarbeitung und -speicherung, sowie zur Online-Visualisierung wurde für alle Prozesse das am IBVT entwickelte Softwarepaket Fed Batch Control Tower (FBCT; A. Willocquet, 1999, IBVT, Universität Stuttgart) verwendet. Dies basiert auf Visual Designer (Intelligent Instrumentation, Burr-Brown company, Tucson, USA) und erlaubte auch die Integration der Steuerungssoftware für die stopped-flow Techniken. Zum Einlesen und Ausgeben der analogen und digitalen Signale

wurde ein handelsüblicher PC in Verbindung mit einer Messkarte (Burr Brown PCI 20098C-1, Intelligent Instrumentation, Filderstadt, Deutschland) eingesetzt. Bei den fed-batch Prozessen wurde die Feedrate über die Erfassung der Gewichts­differenz eines Waagensignals (Gewichtsdifferenz der Medienvorlage) mit dem Sollwert des Feed (errechnete exponentielle Feedrate) verglichen und bei Abweichung nachgeregelt (FBCT-Software). Bei den aeroben Prozessen wurde der pH-Wert nur mit 2 M NaOH auf 5,0 geregelt. Im Rahmen der anaeroben Chemostat-Kultivierungen kam bei der pH-Regelung zusätzlich 2 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> zum Einsatz. Der Gehalt des Sauerstoffs in der Flüssigphase wurde, hauptsächlich durch Veränderung der Rührerdrehzahl und des Überdruckes im Kopfraum des Bioreaktors, auf über 25% der Luftsättigung gehalten. Die Belüftungsrate lag meist bei 1 vvm und wird bei Abweichung beim entsprechenden Versuchs- oder Methodenteil erwähnt. Es wurde ein paramagnetischer Sauerstoffanalysator (Oxygor 6N) und ein Infrarotanalysator für CO<sub>2</sub> (Unor 6N), beide von der Firma Maihak (Hamburg, Deutschland), eingesetzt. Um übermäßige Schaumbildung zu vermeiden wurde täglich eine geringe Menge des Antischaummittels Contraspum 210 (Zschimmer & Schwarz, Lahnstein, Deutschland) zugegeben. Um die Verdünnungsrate  $D$  [h<sup>-1</sup>] im Chemostatbetrieb zu kontrollieren, wurde das ausgetauschte Volumen der Biosuspension pro Zeiteinheit volumetrisch (Messzylinder) bestimmt. Weitere Besonderheiten im Rahmen der Fermentationen sind im jeweiligen Versuchsteil vermerkt. In Abb. 7 ist der generelle Aufbau der eingesetzten Bioreaktoren sowie deren periphere Einrichtungen dargestellt.

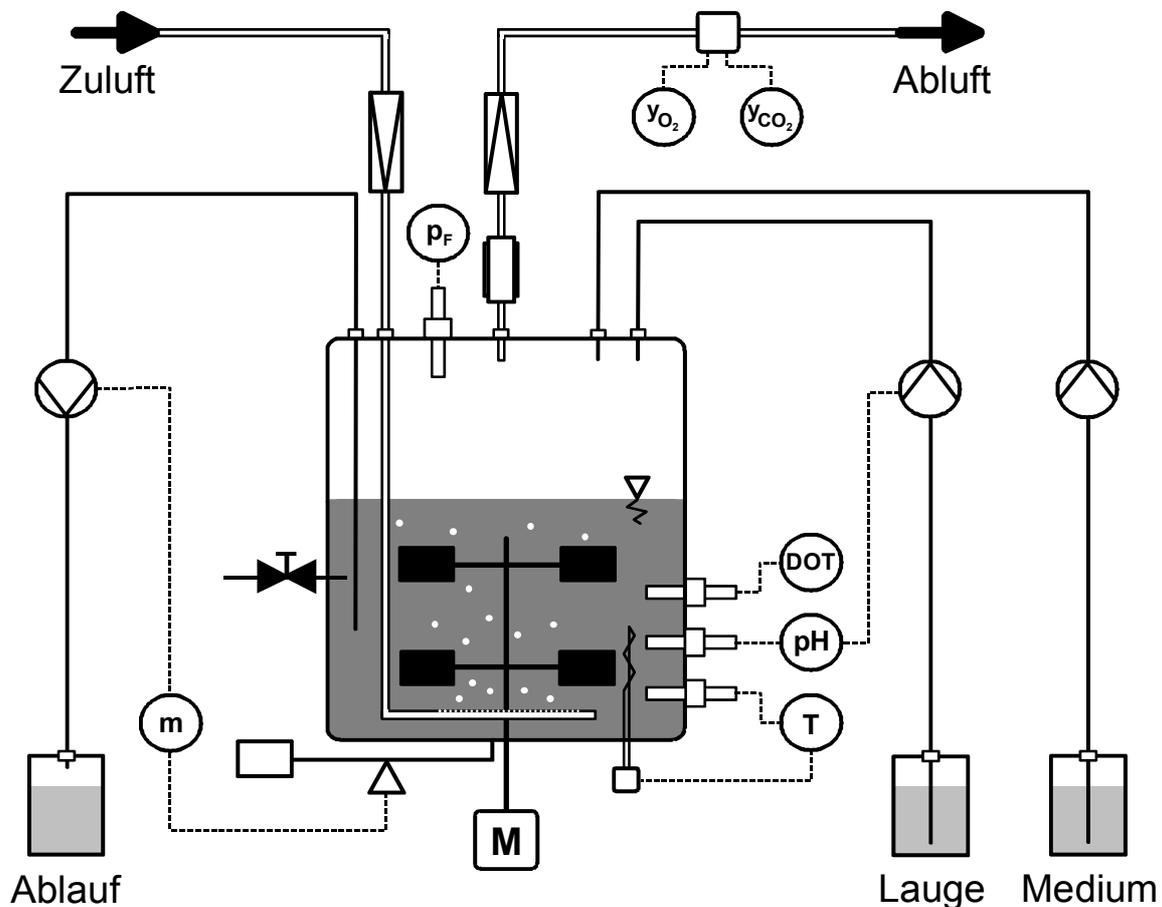


Abbildung 7: Prinzipieller Aufbau der eingesetzten Bioreaktoren und deren Peripherie

### 3.4 Pulsversuche

Die Pulsversuche wurden auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt. Kleinere Mengen an steriler Pulslösung (bis 20 ml) wurden mit einer Einwegspritze durch ein Septum in den Bioreaktor injiziert. Hierbei wurde 50%ige (w/v) Glukoselösung eingesetzt [Theobald et al., 1993].

Bei Glukoselösungen mit höherem Volumen ( $> 20$  ml) wurde eine separate Animpfflasche (geeignetes Druckgefäß) mit Druck überlagert und die sterile Lösung über einen Silikonschlauch mit einer Animpfnadel in den Bioreaktor injiziert.

Bei den Pulsversuchen im Rahmen der anaeroben Kultivierung wurde Stickstoff zur Drucküberlagerung eingesetzt. Die Lösung wurde mit den der Fermentationmedien entsprechenden Medienbestandteilen versetzt um einer eventuellen Limitierung vorzubeugen und vor der Injektion auf die Fermentationstemperatur gebracht.

### 3.5 Probenahmesysteme

#### 3.5.1 Manuelles Probenahmeventil

Diese Probenahmetechnik erlaubt die kontaminationsfreie Entnahme von Biosuspension aus dem Bioreaktor mit hoher Frequenz [Theobald et al., 1993]. Unmittelbar nach der Entnahme werden die Proben mit unterschiedlichen Methoden gequencht. In Abb. 8 ist das Probenahmeventil schematisch dargestellt.

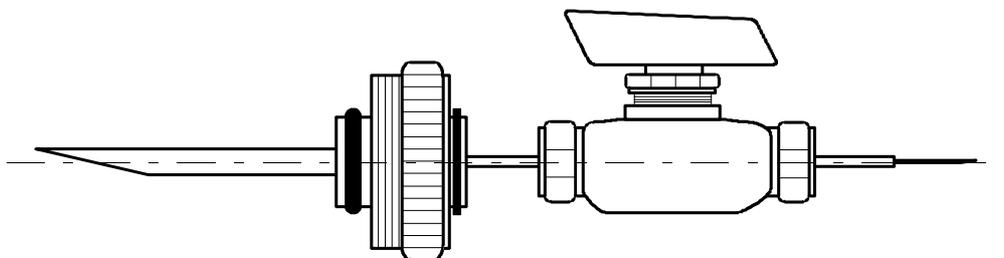
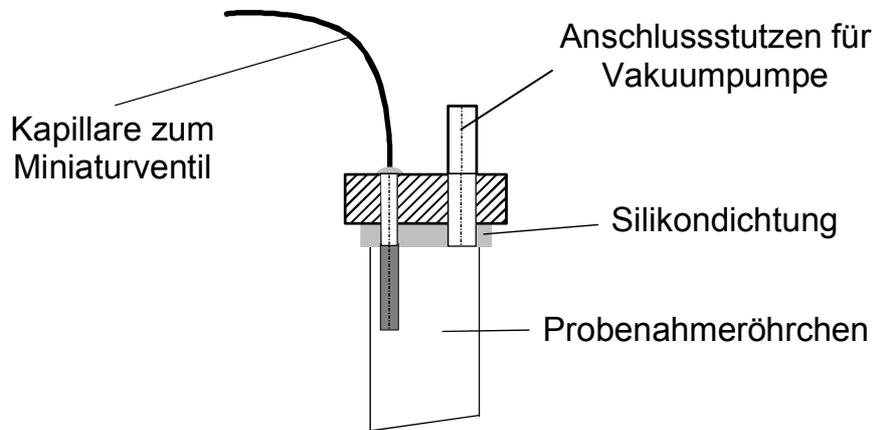


Abbildung 8: Manuelles Probenahmeventil

Die Vorrichtung wird über eine Anstechnadel (Bioengineering, Wald, Schweiz) am Bioreaktor angebracht. Ein Miniaturventil (Whitey, Ohio, USA) ermöglicht es, die ausführende Kapillare (HPLC-Edelstahlkapillare, Innendurchmesser von 0,7 mm, M&W Chromatographietechnik, Berlin, Deutschland) zu öffnen. Das Totvolumen der Probenahmervorrichtung beträgt 230  $\mu$ l. Die Vorrichtung wird im ausgebauten Zustand sterilisiert und dann über die Probenahmennadel am Bioreaktor angebracht. Auf die ausführende Kapillare wird zum Schutz vor Kontamination ein Reagenzglas mit Schraubdeckel gesteckt, in dem Aceton vorliegt.

Diese Probenahmetechnik wurde auch in Kombination mit einem Adapter für Probenahme-  
röhrchen eingesetzt. Dabei wurde nur die ausführende Kapillare nach dem Miniaturventil  
durch einen Adapter mit Vakuumanschluss ausgetauscht. In Abbildung 9 ist der Adapter für  
das Probenahmeventil schematisch dargestellt.

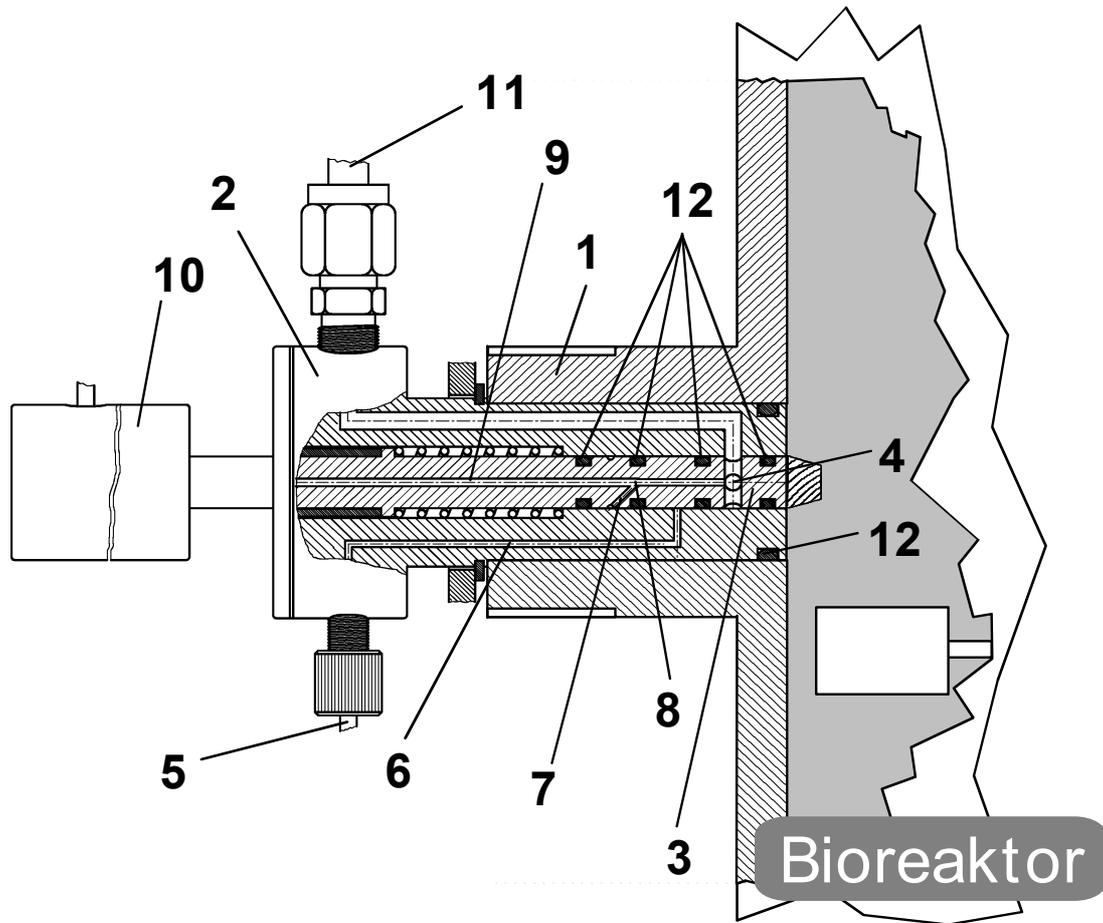


**Abbildung 9: Adapter für das Probenahmeventil**

Über eine Vakuumpumpe wurde dabei im Probenahmeröhrchen ein Unterdruck erzeugt, um  
die Biosuspension aus dem Reaktor zu saugen. Der Adapter dichtet gegen das Probenahme-  
röhrchen über eine Silikondichtung ab. Dies gewährleistete bei Fermentationen, die nicht  
unter Überdruck durchgeführt wurden, eine hohe Probenahmefrequenz.

### **3.5.2 Stopped-flow - Probenahmesysteme**

Bei den Untersuchungen zur Metabolitdynamik im Millisekundenbereich wurde eine neu  
entwickelte stopped-flow Probenahmetechnik eingesetzt. Das Kernstück dieser Technik ist  
ein Probenahmeventil, das zugleich ein Mischventil darstellt. In Abbildung 10 ist das  
Probenahmeventil dargestellt.

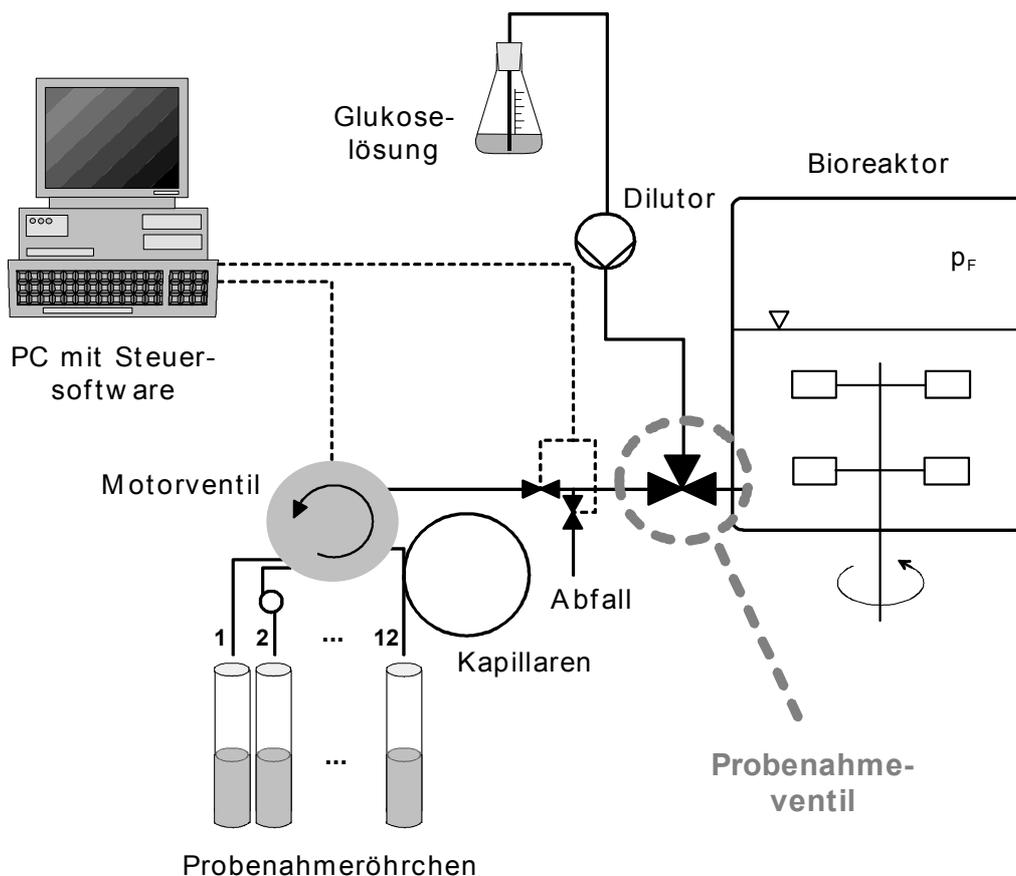


**Abbildung 10: Probenahmeventil der stopped-flow Technik;**  
**Nummerierung: 1: Anschlussstutzen des Bioreaktors; 2: Ventilkörper; 3: Ventilkolben;**  
**4: Bohrung (Auslass der Biosuspension aus dem Bioreaktor); 5: Einlass für die**  
**Glukoselösung; 6: Kapillare für die Glukoselösung; 7: Verbindungskapillare; 8: Mischkammer;**  
**9: Ausführende Kapillare (für das Gemisch der Biosuspension mit der Glukoselösung);**  
**10: Auslass des Gemisches; 11: Dampfanschluss; 12: O-Ringe;**

Die aus dem Bioreaktor strömende Biosuspension wird darin mit einer Glukoselösung vermischt. Das Gemisch fließt durch eine Kapillare und wird nach einer bestimmten Verweilzeit, die durch die Länge der Reaktionsstrecke nach dem Probenahmeventil und dem Überdruck im Bioreaktor festgelegt wird, in einem Probenahmeröhrchen aufgefangen. Dort wird der Stoffwechsel der Zellen durch geeignete Quenchingmittel abgestoppt. Es werden zwei Modelle dieser Technik eingesetzt, die sich nur im Aufbau der Reaktionsstrecke unterscheiden. Die ursprüngliche stopped-flow Technik (im Folgenden stopped-flow Technik A genannt) ist ausführlich in Publikation 2 beschrieben. Hierbei dient eine Kaskade von 5, durch kurze Kapillaren verbundenen Dreiweeventilen als Reaktionsstrecke. Durch Ansteuerung der Ventile können unterschiedlich lange Reaktionsstrecken festgelegt werden, die zu unterschiedlichen Verweilzeiten führen.

Bei der modifizierten Form der stopped-flow Technik (im Folgenden stopped-flow Technik B genannt) wird die Länge der Reaktionsstrecke durch 12 unterschiedlich lange Kapillaren realisiert, die über ein HPLC-Ventil (Motorventil „N“, Seriennummer: 95/400, BESTA, Wilhelmsfeld, Deutschland) mit dem Probenahmeventil verbunden sind. Am Ausgang dieser

Kapillaren befinden sich wieder Probenahmeröhrchen mit vorgelegter Quenchinglösung. Mit dieser Technik können 12 Proben entnommen werden und somit entweder die Reaktionszeiten verlängert oder eine höhere Auflösung realisiert werden als mit der stopped-flow Technik A. In Publikation 2 wird die Problematik der Sauerstoffversorgung der Biosuspension in der Reaktionsstrecke diskutiert. Diese Überlegungen flossen in das Design der modifizierten stopped-flow Technik ein. Die längste Reaktionszeit wurde so gewählt, dass die kritische Sauerstoffkonzentration nicht erreicht wird, während die Biosuspension durch die Kapillaren bis zum Probenahmeröhrchen mit Quenchinglösung fließt. Abbildung 11 zeigt schematisch den Aufbau der stopped-flow Technik B.



**Abbildung 11: Aufbau der modifizierten stopped-flow Technik (stopped-flow B)**

Während das Motorventil in die nächste Ventilstellung schaltet, wird die mit der Glukoselösung vermischte Biosuspension durch Umschalten eines Dreiwegeventils in ein Abfallgefäß umgeleitet, um einen kontinuierlichen Abfluss aus dem Bioreaktor zu gewährleisten.

Die Ansteuerung der Ventile erfolgt über einen PC mit Messkarte (Burr Brown PCI 20098C-1, Intelligent Instrumentation, Filderstadt, Deutschland). Die Software zur Ansteuerung der Technik und zur genauen Erfassung der Ventilschaltzeiten (A. Freund, 2001, IBVT, Universität Stuttgart) basiert auf Visual Designer (Intelligent Instrumentation, Burr-Brown Company, Tucson, USA). Die Abbildung 12 a und 12 b zeigen den Aufbau der stopped-flow Technik A bzw. B am Bioreaktor.

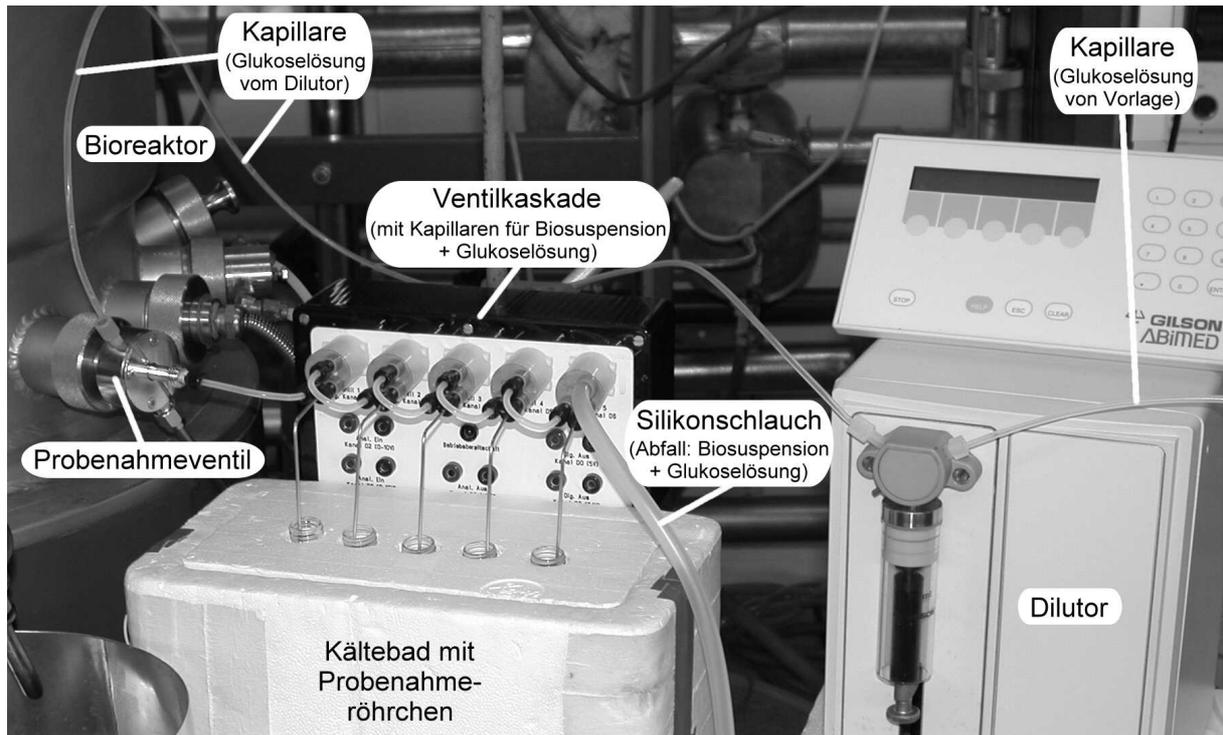


Abbildung 12 a: Aufbau der stopped-flow Technik A am Bioreaktor

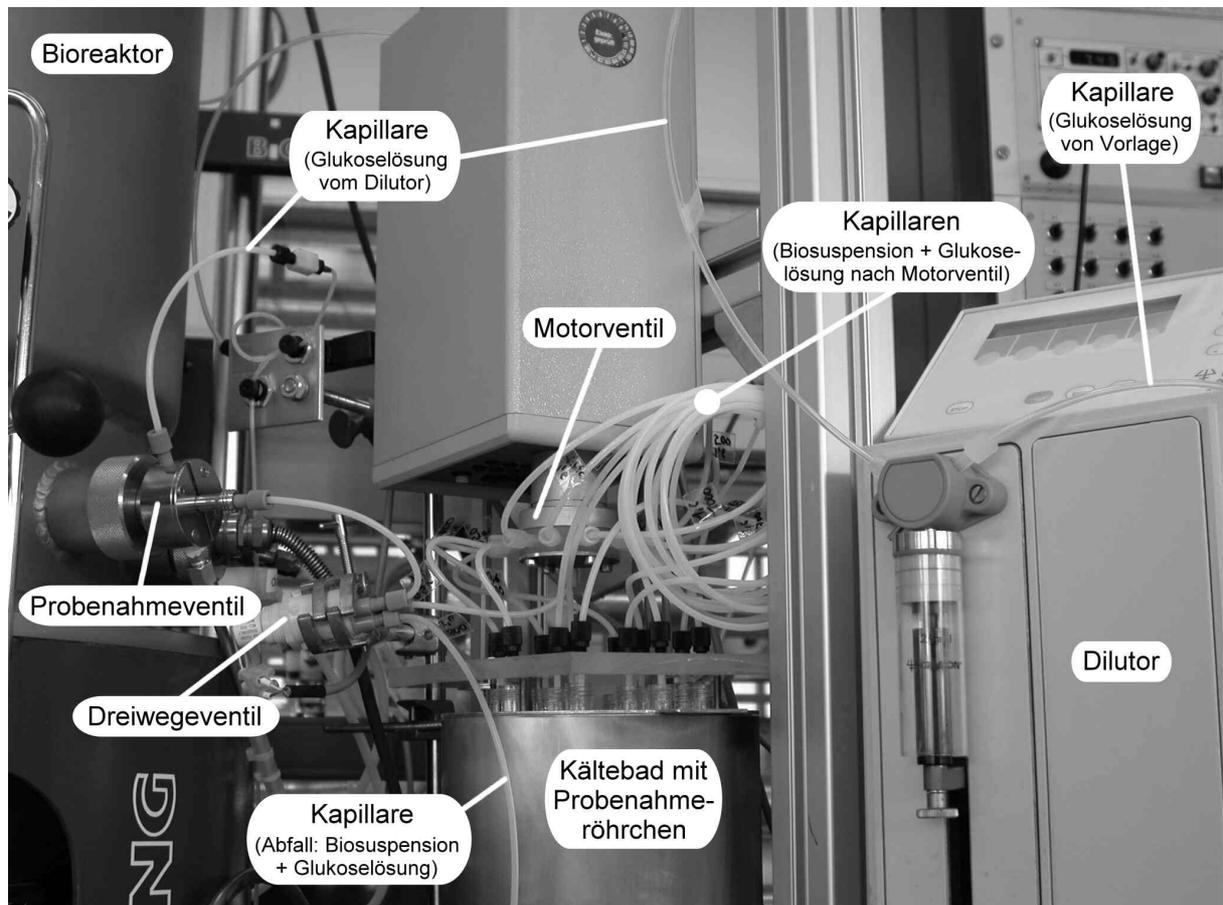


Abbildung 12 b: Aufbau der stopped-flow Technik B am Bioreaktor

Im Rahmen der Versuche mit der stopped-flow Technik A (siehe Publikation 2) wurde die Biosuspension in der Mischkammer mit reiner Glukose- und Laktoselösung vermischt. Die Laktose diente als Standardlösung, die von *S. cerevisiae* nicht verstoffwechselt wird, und zur Berechnung der Verdünnung der Biosuspension durch die Glukoselösung eingesetzt wurde. Bei Anwendung der stopped-flow Technik B kam ein komplettes Medium zum Einsatz, um zu gewährleisten, dass bei längeren Verweilzeiten keine Limitierungen auftreten. Die Zusammensetzung dieses Mediums ist in den Tabellen 8 a und b angegeben.

**Tabelle 8 a: Zusammensetzung des Glukosemediums für die stopped-flow Technik B**

Medienkomponente	$c_i$ [g/l]
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	15
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	6
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5
Uracil	0,660
L-Leucin	0,975
L-Tryptophan	0,135
L-Histidin	0,250
Glukose	15
Laktose	5

**Tabelle 8 b: Zusammensetzung des Glukosemediums für die stopped-flow Technik B**

Zugabe	$c_i$ [ml/l]
SEL (siehe Tab. 4, Seite 30)	3
Vitaminlösung (siehe Tab. 5, Seite 30)	3

## 3.6 Extraktion intrazellulärer Metabolite

### 3.6.1 Extraktion von Glukose-6-Phosphat und der Adeninnukleotide (PCA-Methode)

Glukose-6-Phosphat und die Adeninnukleotide wurden nach der Methode von Kopperschläger und Augustin [1967] extrahiert. Im Rahmen der Auswahl einer Methode zur Quantifizierung intrazellulärer Glukose wurde diese Extraktion auch getestet. Das Quenching wurde unter Verwendung von flüssigem Stickstoff ( $-196^\circ\text{C}$ ) durchgeführt. Zu den gefrorenen Proben wurde 1 bis 1,2 ml PCA (35%,  $-25^\circ\text{C}$ ) gegeben und 3 Gefrier-Tau Zyklen zwischen  $4$  und  $-25^\circ\text{C}$  durchgeführt. Es wurde auf vollständiges Einfrieren und Auftauen geachtet, wobei

die Temperatur der Suspension niemals über 4°C lag. Nach dem letzten Auftauen wurden die Proben mit Lauge (2 M KOH + 0,5 M Imidazol) auf pH 6,5 eingestellt und filtriert (Einwegspritze mit Vorsatzfilter, 25 mm Ø, 0,45 µm, Red rim, Schleicher und Schuell, Deutschland). Das Filtrat wurde anschließend analysiert oder über Nacht eingefroren.

### 3.6.2 Extraktion intrazellulärer Glukose (boiling-water Methode)

Zum Quenching der zur Extraktion intrazellulärer Glukose bestimmten Proben wurden 5 ml 60% Methanol/H<sub>2</sub>O (n.p.) eingesetzt, das auf -20 bis -40°C abgekühlt war. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach der boiling-water Methode [Bhattacharya et al., 1995], die den Anforderungen entsprechend modifiziert wurde.

Nach dem Quenching wurden die Proben im Kryostat bei -20°C gelagert. Der folgende Filtrationsschritt fand im Kühlraum statt (4-6°C). Die Biosuspension wurde über einen Membranfilter (Metrigard™, Glass Fiber Filter, 47 mm, Prod.-Nr.: 64798, Pall Corporation, Michigan, USA) unter Verwendung einer Vakuumfiltrationseinheit abfiltriert. Vor der Filtration der Biosuspension wurde die Filtrationseinheit mit der Waschlösung (60% Methanol/Wasser, -20°C) abgekühlt. Bei den Vorversuchen zur Bestimmung intrazellulärer Glukose kam noch Waschlösung zum Einsatz, die 2 Desoxyglukose (1 g/l) enthielt (siehe Kapitel 4.2.1). Danach folgten die Waschschrte (die Anzahl der Waschschrte ist bei den jeweiligen Versuchen angegeben). Der Filter mit dem Filterkuchen wurde mit einer Pinzette schnell in ein leeres Reagenzglas überführt und bis zur weiteren Aufarbeitung im Kryostat (-20°C) gelagert. Zum Zellaufschluss wurden 5 ml H<sub>2</sub>O (n.p.) im Wasserbad auf 98°C erhitzt und in das Reagenzglas mit dem Filter gegeben. Der Filterkuchen löste sich sofort vom Filter, der dann entfernt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff (-196°C) auf 5 - 0°C abgekühlt um einen steilen Temperaturgradienten zu gewährleisten. Die Lagerung der Probe erfolgte wieder im Kryostat (-20°C). Der anschließenden Lyophilisation (Christ, ALPHA 2-4, B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland) ging ein Abkühlen der Probe in flüssigem Stickstoff (-196°C) voraus. Die Lyophilisation wurde bis zur Trockene durchgeführt, und der Rückstand danach in H<sub>2</sub>O (2 ml, (n.p.), 4°C) aufgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 2000 g; Kühlzentrifuge, Centrifuge 5420, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) zur Beseitigung der Zelltrümmer konnte die Probe analysiert werden.

Bei der Bestimmung der Glukosekonzentration in der Waschlösung und der Laktosekonzentration in der Biosuspension (siehe Kapitel 4.2.1) wurden die Waschlösungen einzeln aufgefangen und getrennt gelagert. Da diese als methanolische Lösungen vorlagen, wurden davon 3 ml zuerst einer Vakuumdestillation unterzogen und anschließend in H<sub>2</sub>O (2 ml, (n.p.), 4°C) resuspendiert. Somit konnten die Konzentrationen dieser Zucker mit enzymatischen Tests bzw. der Ionenchromatographie bestimmt werden.

## 3.7 Western blot Analysen

Um die Dynamik der Hexosetransportproteine Hxt1, Hxt5 und Hxt7 nach Änderungen der extrazellulären Glukosekonzentration zu erfassen, wurden Western blot Analysen durchgeführt [Krampe et al., 1998]. Dazu wurden die Zellen nach der Ernte aufgeschlossen, aus den Zellpellets die Membranfraktion präpariert und daraus die Proteine extrahiert. Danach folgte eine SDS-Gelelektrophorese.

Im anschließenden Western blot wurden die aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Membran übertragen. Die Membranen wurden zunächst mit spezifischen Antikörpern gegen die jeweiligen Hxt-Proteine und darauffolgend mit den Sekundäantikörpern behandelt. Das mit dem zweiten Antikörper gekoppelte Enzym ermöglichte den Chemilumineszenznachweis der Proteine auf einem Röntgenfilm.

### 3.7.1 Zellaufschluss und Präparation der Membranfraktion

Nach der Probenahme wurden 50 OD<sub>600</sub>-Einheiten der Biosuspension in einer Eppendorfcup-Zentrifuge (Kühlzentrifuge, Centrifuge 5420, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) abzentrifugiert (6 Minuten, 720 g, 4°C), in H<sub>2</sub>O (3 ml, (n.p.), 4°C), resuspendiert und auf zwei Eppendorfcups verteilt. Nach erneutem Zentrifugationsschritt (8 Minuten, 11600 g, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet im Anschluss aufgearbeitet oder bei -20°C gelagert.

Für den Zellaufschluss wurden Glasperlen (ca. 0,25 ml, 0,45 mm Ø) und 0,2 ml Aufschlusspuffer (Tris-Puffer + PMSF) zum Pellet gegeben und für 5 Minuten gevortext. Nach Zugabe von 0,2 ml Tris-Puffer wurde der Aufschluss in ein neues Eppendorfcup überführt. Nach Waschen der Glasperlen mit 0,2 ml Tris-Puffer und kurzem Vortexen wurde die Suspension möglichst vollständig aufgenommen und mit dem bereits überführten Aufschluss vereinigt. Abschließend folgten zwei Zentrifugationsschritte (3 Minuten, 720 g, 4°C), bei denen der Überstand jeweils in ein frisches Eppendorfcup überführt wurde.

Um die Membranfraktion zu erhalten, wurde der vereinigte Zellaufschluss zentrifugiert (45 Minuten, 11600 g, 4°C), das Pellet in 0,4 ml Puffer (Tris-Puffer + 5 M Urea) resuspendiert und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (45 Minuten, 11600 g, 4°C) wurde das Pellet in 0,32 ml Tris-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 80 µl TCA erfolgte nach kurzem Vortexen eine erneute Inkubation für 30 Minuten (4°C) zur Präzipitation der Membranproteine. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (30 Minuten, 11600 g, 4°C) wurde das Pellet in 100 µl Imidazolpuffer resuspendiert. Die erhaltene Membranfraktion wurde direkt verwendet oder bei -20°C gelagert. Tabelle 9 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen, die während der Aufarbeitung eine Temperatur von 4°C hatten. Die Puffer und Lösungen wurden in H<sub>2</sub>O (n.p.) angesetzt, der pH-Wert mit NaOH oder HCl eingestellt. Die Lagerung erfolgte im Kühlraum (4 - 6°C).

**Tabelle 9: Puffer und Lösungen zur Präparation der Membranfraktion**

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Konzentration der Komponenten</b>
Tris-Puffer	0,1 M Tris; 0,15 M NaCl; 5 mM EDTA (Na <sub>2</sub> ); pH 7,5
Tris-Puffer + PMSF	0,1 M Tris; 0,2 mM PMSF
Tris-Puffer + Urea	0,1 M Tris; 5 M Urea
TCA-Lösung	50% (w/v)
Imidazolpuffer	0,1 M Imidazol; 0,15 M NaCl; 5 mM EDTA; pH 7,5

### 3.7.2 SDS-Gelelektrophorese

Die Proteinkonzentration der Proben (Membranfraktionen, siehe voriges Kapitel) wurde nach Bradford (siehe Kapitel 3.8.3) bestimmt. Danach wurde zur Auftrennung der Proteine des Gemisches eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt.

Auf die 10%igen SDS-Gele wurden pro Tasche 2,5 µg (Versuchsteil Kapitel 4.3.2) und 3 µg (Versuchsteil Kapitel 4.3.3) Gesamtprotein mit 0,02% Bromphenolblau im Probenpuffer aufgetragen. Bei den Gelen, die für die Western blot Analyse bestimmt waren, wurden 23 µl eines vorgefärbten Molekulargewichtsmarkern aufgetragen (prestained molecular weight markers, SDS-7B, SIGMA, Saint Louis, Missouri, USA), der nach dem blot auch auf der Membran sichtbar war. Auf die Gele, die für die Silberfärbung bestimmt waren, wurden 5 µl eines ungefärbten Molekulargewichtsmarkern (ProSieve Protein Markers, Biowhittaker Molecular Applications ApS, Dänemark) aufgetragen. Der Trennvorgang wurde in einer Elektrophoresekammer (Multigel-Lang, Biochemische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland) über Nacht bei 30 V oder in ca. 4 Stunden bei 120 V durchgeführt. Tabelle 10 zeigt die Zusammensetzung des Sammel- bzw. des Trenngels.

**Tabelle 10: Zusammensetzung für jeweils zwei Sammel- und zwei Trenngele**

<b>Komponente</b>	<b>Eingesetzte Volumina</b>	
	<b>Sammelgel (5%)</b>	<b>Trenngel (10%)</b>
H <sub>2</sub> O (n.p.)	5,9 ml	16,2 ml
Upper Tris / Lower Tris (siehe Tabelle 11)	2,5 ml (Upper Tris)	10,0 ml (Lower Tris)
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30%/0,8%)	1,6 ml	13,3 ml
TEMED	15 µl	25 µl
APS 20%	75 µl	200 µl

APS wurde unmittelbar vor den Versuchen angesetzt und wie TEMED erst direkt vor dem Gießen des Gels zugegeben, um die Polymerisationsreaktion zu starten. Das Trenngel wurde

während der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. In Tabelle 11 sind die eingesetzten Puffer dargestellt.

<b>Puffer</b>	<b>Komponenten</b>
Lower Tris pH 8,8	1,5 M Tris (Ultra Qualität) 0,4% SDS
Upper Tris pH 6,8	0,5 M Tris (Ultra Qualität) 0,4% SDS
10X Laufpuffer	250 mM Tris (Ultra Qualität) 1,92 M Glycin
Laufpuffer	10% (v/v) des 10X Laufpuffer, 0,1% SDS

Die Lösungen wurden mit H<sub>2</sub>O (n.p.) angesetzt bzw. auf das Endvolumen gebracht. Die pH-Werte wurden mit HCl eingestellt.

Die Gele wurden der Western blot Analyse unterzogen. Ein Teil der Gele wurde für eine Silberfärbung verwendet, um sicherzustellen, dass die aufgetragene Proteinmenge reproduzierbar ist.

### 3.7.3 Silberfärbung der SDS-Gele

Bei den Untersuchungen zur Dynamik der Hexosetransportproteine wurden die exprimierten Proteine über das Signal der Western blot Analyse erfasst. Eine zeitliche Veränderung in der Proteinkonzentration sollte sich somit in unterschiedlichen Signalen spiegeln. Deshalb wurde überprüft, ob gleiche Proteinmengen reproduzierbar auf das Gel aufgetragen werden können. Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford durchgeführt und daraus das aufzutragende Volumen der Probe errechnet. Die aufgetrennten Proteine wurden dann im Gel angefärbt. Die zuerst durchgeführte Coomassie-Brilliant-Blue Färbung erwies sich als nicht empfindlich genug, worauf die empfindlichere Silberfärbung durchgeführt wurde.

Das Gel wurde nach der Elektrophorese für mindestens 30 Minuten in die Fixierlösung und danach für 5 Minuten in die Oxidierlösung gelegt. Das durch die Oxidierlösung orange gefärbte Gel wurde mit H<sub>2</sub>O (v.e.) bis zur vollständigen Entfärbung gewaschen. Danach wurde das Gel 20 Minuten in der Silberlösung inkubiert und erneut mit H<sub>2</sub>O (v.e.) gewaschen. In der Entwicklerlösung konnte dann der Grad der Schwarzfärbung über den Zeitpunkt der Zugabe der Abstopplösung bestimmt werden. Die Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die gefärbten Gele wurden mit der Geldokumentationsanlage (Image Master VDS, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) photographiert und mit der Software ImageMaster (TotalLab Software 1.11, Amersham Pharmacia Biotech) ausgewertet. Die benötigten Lösungen sind in Tabelle 12 aufgeführt.

**Tabelle 12: Lösungen zur Silberfärbung**

<b>Lösung</b>	<b>Komponenten</b>
Fixierlösung	40% Methanol (v/v) 10% Essigsäure (v/v)
Oxidierlösung	Silver Stain Oxidizer von Bio-RAD 1:10 verdünnt
Silberreagenz	0,2% (w/v) Silbernitrat
Entwickler	Silver Stain Developer von Bio-RAD 9,6 g auf 300 ml H <sub>2</sub> O (v.e.)
Abstopplösung	7% (v/v) Essigsäure

### 3.7.4 Elektroblothing

Bei unseren Analysen wurde das Elektroblothing (Semidryblothing) angewandt, um die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine vom Gel unter Erhaltung des Trennmusters auf eine Membran zu übertragen.

Beim Aufbau des Blotsandwiches wurden das Trenngel und die Whatman-Papiere (Gel-Blotting-Papier GB 400, Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) in Transferpuffer getaucht. Die Membran selbst wurde zum Quellen in Methanol gelegt, mit Wasser gespült und anschließend ebenfalls in Transferpuffer getaucht. Der Elektroblo wurde für 30 Minuten bei einer Stromstärke von 297 mA in einer Semidry-Blottingapparatur (Biometra, Fast-Blot, Biochemische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland) unter Verwendung einer PVDF-Membran (hydrophobe Polyvinylidenfluorid-Membran, Immobilon-P Transfer Membranes, pore size 0,45 µm, Millipore, Schwalbach, Deutschland) durchgeführt.

### 3.7.5 Immunodetektion

Nach dem Elektroblothing wurde eine Immunodetektion durch Chemilumineszenz durchgeführt, um die Proteine auf der Membran sichtbar zu machen.

Dazu wurde die geblothingte Membran kurz in Methanol getaucht, in H<sub>2</sub>O (n.p.) gewaschen und für mindestens 1,5 Stunden auf einem Schwenker bei Raumtemperatur in PBSTB inkubiert. Die noch freien, unspezifischen Bindestellen der Membran wurden durch das BSA im PBSTB blockiert. Danach wurde der Puffer abgegossen, die Lösung mit dem Primärantikörper (gegen Hxt1, Hxt7 und das HA-Tag des Hxt5-Proteins) zugegeben und die Membran über Nacht bei Raumtemperatur darin inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 mal für 10 Minuten mit PBST gewaschen und mindestens 1 Stunde in der Lösung mit dem Sekundärantikörper (gegen den Primärantikörper gerichtet und mit einer Peroxydase gekoppelt) bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBST für jeweils 10 Minuten wurde die Membran kurz in PBS gewaschen, um sie vom im PBST enthaltenen Tween zu befreien, das beim Chemilumineszenznachweis stören würde.

Die weiteren Schritte wurden im Fotolabor durchgeführt. Die Membran wurde auf einer Glasplatte mit der Reaktionslösung bestrichen und mit einer Kopierfolie abgedeckt. Nach Zugabe der Reaktionslösung (BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) bewirkt die an den Sekundäntikörper gebundene Peroxydase indirekt die Oxidation von Luminol, das dadurch aktiviert wird und Licht emittiert. Dieses Signal wird durch Exposition und Entwicklung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht. Dazu wurde ein Film (CEAAB RP, Medical X-RAY Screen Film blue sensitive, Strängnäs, Schweden) je nach Signalstärke für eine Sekunde bis zu einer Stunde lang aufgelegt, entwickelt (SW-Negativentwickler ULTRAFIN liquid, TETENAL Photowerk GmbH, Norderstedt, Deutschland) und fixiert (Superfix Fixierkonzentrat für SW-Material, TETENAL Photowerk GmbH, Norderstedt, Deutschland). Die Filme wurden mit Wasser gewaschen, danach getrocknet und eingescannt. Tabelle 13 zeigt die verwendeten Reagenzien und Tabelle 14 die eingesetzten Antikörper.

**Tabelle 13: Reagenzien für das Elektroblothing und die Immunodetektion**

<b>Puffer</b>	<b>Komponenten</b>
10X Laufpuffer-Stammlösung (ohne SDS)	250 mM Tris (Ultra Qualität) 1,92 M Glycin
Transferpuffer	10% (v/v) 10X Laufpuffer 20% (v/v) Methanol (techn. Qual.)
10X PBS (pH 6,5)	1,5 M NaCl 0,1 M Na-P-Puffer pH 7,2
PBS	10% (v/v) 10X PBS
PBST	10% (v/v) 10X PBS 0,3% Tween20
PBSTB	10% (v/v) 10X PBS 0,1% Tween20 3% BSA (Albumin Fraktion V)

Die Lösungen wurden mit H<sub>2</sub>O (n.p.) angesetzt und die pH-Werte mit NaOH oder HCl eingestellt.

**Tabelle 14: Zur Immunodetektion eingesetzte Antikörper und deren Verdünnungen**

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung in PBSTB</b>
Anti-Hxt1 (Polyklonaler Antikörper von E. Boles, Institut für Mikrobiologie, Goethe-Universität Frankfurt)	1:1000
Anti-Hxt7 (Polyklonaler Antikörper von E. Boles, Institut für Mikrobiologie, Goethe-Universität Frankfurt)	1:1000
Anti-HA High Affinity monoklonaler Antikörper aus Ratte (Klon3F10), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	1:1000
Horseradish peroxidase conjugated affinity purified secondary antibody, CHEMICON, Temecula, USA	1:5000
Peroxidaseconjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Jackson Immuno Research Laboratories, Dianova Forschungsreagenzien, Hamburg, Deutschland	1:5000

## 3.8 Analytik

### 3.8.1 Bestimmung der Biomassekonzentration

Zur Abschätzung der Biomassekonzentration während der Fermentationen wurde die optische Dichte (OD) der Zellsuspensionen bestimmt. Die Biosuspension wurde dazu soweit verdünnt, dass das Signal innerhalb des kalibrierten Bereiches lag und die Absorption photometrisch bei 620 nm gemessen werden konnte.

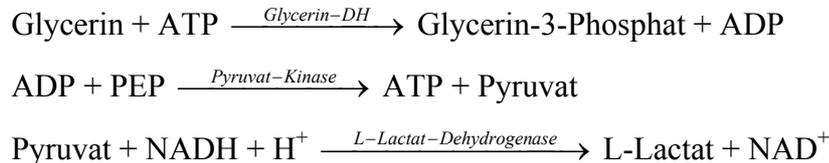
Zuvor wurden für Biosuspensionen aus aerober fed-batch- und Chemostat-Kultivierung, sowie dem anaeroben Chemostat jeweils eine OD-Trockenmasse-Korrelation bestimmt. Zur Bestimmung der Trockenmasse (TS) wurden, abhängig von der Dichte der Biosuspension, 3 bis 5 ml Fermentationsfluid entnommen, abzentrifugiert (2465 g, 10 Minuten, Raumtemperatur) und zweimal mit 0,9%iger Saline (NaCl) gewaschen (2465 g, 10 Minuten, Raumtemperatur). Nach der letzten Abnahme des Überstands mit einer Glaspipette wurde das Pellet bis zur Gewichtskonstanz bei 105°C getrocknet und die Biotrockenmasse gravimetrisch bestimmt.

### 3.8.2 Enzymtests (Glukose, Glycerin, G6P, Laktose)

Für die Bestimmung der Konzentrationen der Metabolite Glycerin und Glukose-6-Phosphat, die Markierungssubstanz Laktose (siehe Kapitel 3.5.2) und das Substrat Glukose wurden Enzymtests eingesetzt.

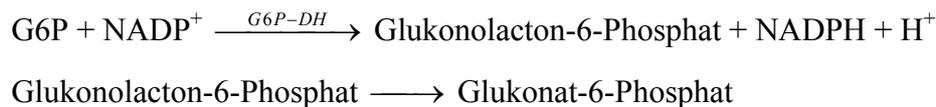
### 3.8.2.1 Bestimmung der Glycerinkonzentration

Die Bestimmung der Glycerinkonzentration wurde mit einem kommerziellen Testkit durchgeführt (Glycerin, UV-Test, Nr. 148270, Boehringer Mannheim, Deutschland). Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist der Glycerin-Menge äquivalent. NADH ist Messgröße und aufgrund seiner Absorption bei 340 nm zu quantifizieren.



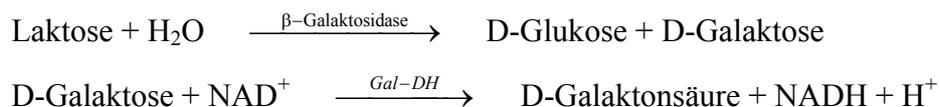
### 3.8.2.2 Bestimmung der Konzentration von Glukose-6-Phosphat

Die Bestimmung von Glukose-6-Phosphat (G6P) erfolgte nach dem Verfahren von Bergmeyer [1974] und basiert auf einem gekoppelten optischen Test. NADPH ist die Meßgröße und wird bei 340 nm quantifiziert:



### 3.8.2.3 Bestimmung der Laktosekonzentration

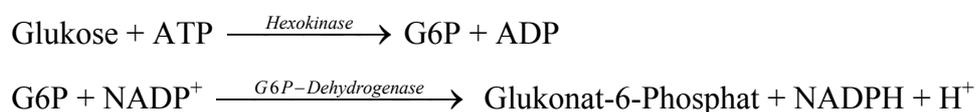
Hierbei wurde ein kommerziell erhältliches Testsystem (Lactose/D-Galactose, UV-Test, Nr. 176303, Boehringer Mannheim, Deutschland) verwendet, das sich folgender Reaktionen bedient:



Die Menge des während der zweiten Reaktion gebildeten NADH ist äquivalent zur Menge an D-Galaktose bzw. Laktose. NADH ist die Meßgröße und wird bei 340 nm quantifiziert. Die einzusetzenden Volumina an Lösungen und Suspensionen aus der Anleitung wurden halbiert.

### 3.8.2.4 Bestimmung der Glukosekonzentration

Bei der Bestimmung von Glukose wurde auf das Verfahren von Bergmeyer zurückgegriffen [1974]. Auch hier ist das gebildete NADPH die Messgröße und wird bei 340 nm quantifiziert.



Dieses Testsystem wurde für die übliche Messung in Küvetten (Einmalküvetten, UV, PMMA-Halbmicro, MBT Brand, Gießen, Deutschland), aber auch in 96 Well Microtiterplatten (UVStar 96 Well Microplates, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) eingesetzt. Die Anwendung des Testsystems in Multititerplatten bietet die Möglichkeit der automatisierten Messung und der parallelen Probenbehandlung. Die Zusammensetzungen des Puffers und des Enzymmix sind in Tabelle 15 und 16 dargestellt.

**Tabelle 15: Konzentrationen der Pufferlösung im Testansatz (in Küvette bzw. in Kavität der MTP)**

Komponente	Konzentration	Bezugsquelle	Produktnummer
TEA·HCl	0,4 M	Boehringer Mannheim	127426
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 mM	Fluka	63142
KCl	100 mM	Merck	4936
ATP	3 mM	Boehringer Mannheim	319987
NADP	0,3 mM	GERBU	1014
Mutarotase	0,1 U/ml	Boehringer Mannheim	127264

Zuerst wurden die Salze eingewogen und nach pH-Einstellung auf 7,5 (1 M NaOH) ATP und NADP zugegeben. Nach erneuter pH-Korrektur (7,5) erfolgte die Zugabe von Mutarotase. Der Puffer wurde bei +4 °C aufbewahrt.

**Tabelle 16: Eingesetzte Aktivität der Enzyme im Testansatz (in Küvette bzw. in Kavität der MTP)**

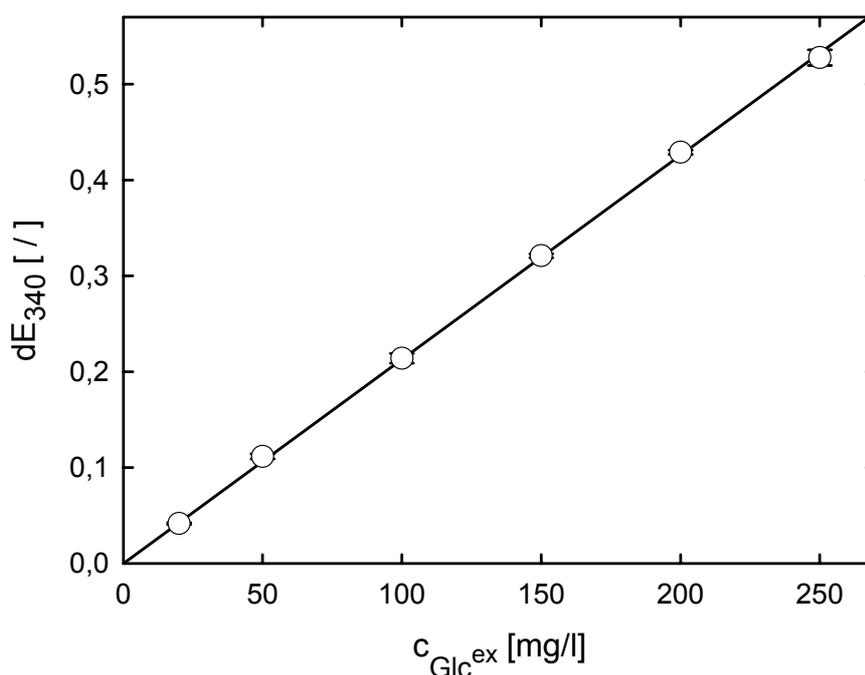
Komponente	Aktivität		Bezugsquelle	Produktnummer
	MTP	Küvette		
Hexokinase	0,5 U	2 U	Boehringer Mannheim	1426362
G6P-DH	0,25 U	1U	Boehringer Mannheim	127671

Die Enzyme wurden in 3,2 M Ammoniumsulfatlösung bei +4 °C aufbewahrt. Der Test wurde auf die Messung von zwei Konzentrationsbereichen ausgelegt. Der erste Bereich lag zwischen 1 und 60 mg/l, der zweite zwischen 20 und 250 mg/l. Um die Bestimmungsgrenze des Tests zu erweitern, war es nötig, im unteren Messbereich ein erhöhtes Probenvolumen einzusetzen. Die Konzentrationen der Pufferstammlösungen wurden dementsprechend angepasst. Bei jeder Benutzung des Tests wurde mit Kalibrierstandards die Gültigkeit der Kalibriergeraden getestet. Bei den MTP-Messungen wurden mindestens Dreifach-, bei den Küvettest mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt. Tabelle 17 zeigt die Pipettierschemata für die Messungen in den Multititerplatten und in den Küvetten.

**Tabelle 17: Pipettierschema der Glukosebestimmung (Multititerplatten und Küvetten)**

Arbeitsschritte	Multititerplatten		Küvetten	
	20-250 mg/l	1-60 mg/l	20-250 mg/l	1-60 mg/l
Konzentrationsbereich	20-250 mg/l	1-60 mg/l	20-250 mg/l	1-60 mg/l
Pufferlösung pipettieren	250 µl	200 µl	1000 µl	800 µl
Probenlösung pipettieren	25 µl	125 µl	100 µl	500 µl
mischen, E <sub>0</sub> messen				
Enzymmix pipettieren	2,5 µl	2,5 µl	10 µl	10 µl
mischen, sobald Extinktion konstant (30-60 min) E <sub>1</sub> messen				

Die Messungen der Multititerplatten erfolgten mit einem MTP-Reader (Spectrafluor, TECAN A-5002, SLT Labinstrumente GmbH, Salzburg, Austria). Das Mischen der Puffer- und Probelösungen in den Kavitäten wurde mit einer Kolbenhub-Multipipette oder einer normalen Kolbenhubpipette durchgeführt. Die Mischzyklen während des Messvorgangs wurden vom MTP-Reader automatisch durchgeführt. Zur Leerwertbestimmung wurde H<sub>2</sub>O (n.p.) anstatt Probelösung eingesetzt. Abbildung 13 zeigt exemplarisch eine Kalibriergerade für den Messbereich 20 bis 250 mg/l. Es sind die Mittelwerte aus drei Messungen und die dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt.



**Abbildung 13: Kalibriergerade für Glukose (MTP Enzymtest; Messbereich: 20 – 250 mg/l)**

Für die Messungen in Küvetten wurden Einstrahl-Photometer (Shimadzu, Spectrophotometer, UV-120-02, Duisburg, Deutschland) benutzt. Das Photometer wurde gegen Luft kalibriert. Die Messungen fanden bei Raumtemperatur statt.

### 3.8.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen in Proben der Membranfraktionen wurde der kommerziell erhältliche Bradford-Test (Bio-RAD, München, Deutschland) eingesetzt. Der Test wurde in Einmalküvetten (Vis-Halbmikroküvetten) durchgeführt. Die Stammlösung wurde 1:5 verdünnt und nach dem Pipettierschema der Tabelle 18 eingesetzt.

**Tabelle 18: Pipettierschema der Proteinbestimmung nach Bradford**

Pipettierschritte	Leerwert [ml]	Probe/ Standardlösung [ml]
Bradford Reagenz (1:5)	1	1
Probe/Standardlösung	/	0,02
H <sub>2</sub> O (v.e.)	0,02	/

Als Standardlösung diente BSA in Konzentrationen von 0,1 bis 0,5 g/l. Die Ansätze wurden mit einem Rührspatel durchmischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Aus den Werten für die Standardlösungen wurde zu jeder Messung eine Kalibriergerade erstellt und damit die Proteinkonzentrationen in den Proben mit den Membranfraktionen bestimmt.

### 3.8.4 HPLC-Analytik

Zur Bestimmung der Adeninnukleotide wurde eine Reversed-Phase Ionenpaar-chromatographie eingesetzt (Fa. Thermo Quest GmbH, Darmstadt, Deutschland). Die Chromatographie-Methode stammt von Folley et al. [1983] und wurde von Baumeister A. [1995] und Mailinger et al. [1998] optimiert. Die verwendete Trennsäule (Lichrosphere-Säule: 100 LP-18 ;5 µm, 12,5 cm x 4 mm der Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde durch eine Vorsäule erweitert (Chromsil 120 ODS 3-CP, Merck, Darmstadt, Deutschland). Zur besseren Trennung wurde eine Gradientenelution angewandt. Die mobile Phase bestand aus zwei verschiedenen Fließmitteln:

Fließmittel A: TEA-P<sub>i</sub>-Puffer (30 mM TEA-P<sub>i</sub>; pH 6,5).

Fließmittel B: TEA-P<sub>i</sub>/MgSO<sub>4</sub>-Puffer (30 mM TEA-P<sub>i</sub>, 5 mM MgSO<sub>4</sub>; pH 6,5).

Die Flußrate betrug 1,5 ml/min. Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm. Das Injektionsvolumen betrug 20 µl. Die Steuerung der HPLC-Anlage erfolgte durch einen PC unter Verwendung der Software PC 1000 (Fa. Thermo Quest GmbH, Darmstadt, Deutschland). Zur Bestimmung der Konzentrationen von Adeninnukleotiden wurden Standardlösungen chromatographiert.

### 3.8.5 Gaschromatographie

Ethanol wurde mit einem Gaschromatograph (Typ 5890, Series II with FID-detector, Hewlett Packard Company, Avondale, USA) bestimmt. Die Säule (FS-OV-1-CB, Chromat. Service GmbH, Langerwehe, Deutschland) wurde vor den Bestimmungen über Nacht ausgeheizt (200°C). Als interner Standard kam 1-Propanol bzw. 1-Butanol zum Einsatz.

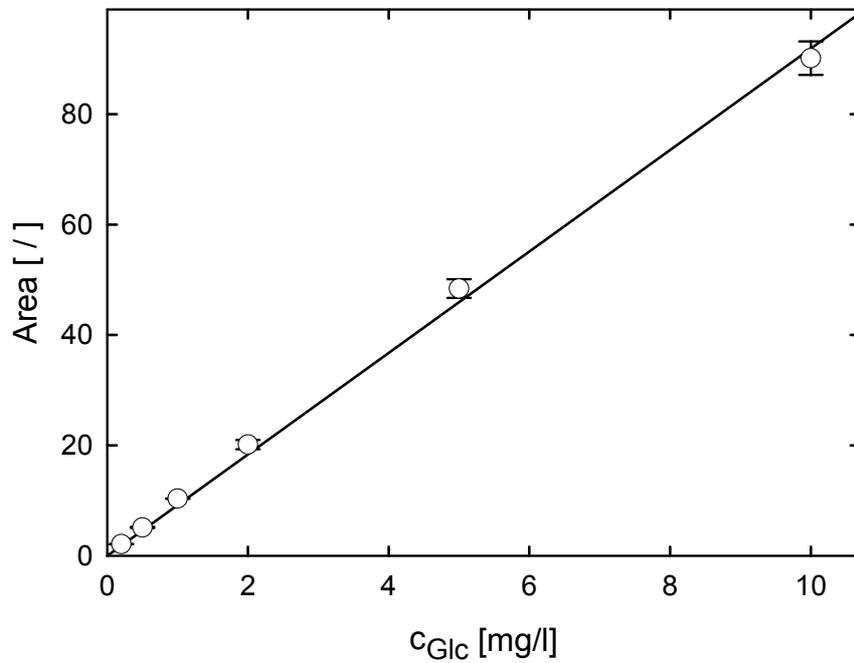
### 3.8.6 Ionenchromatographie

Für die Detektion sehr niedriger Glukosekonzentration im Rahmen der Bestimmung intrazellulärer Glukose stand eine leistungsfähige Ionenchromatographie (DX-500 BioLC, Dionex, Idstein, Deutschland) zur Verfügung. Die Anlage bestand aus einem Autosampler (AS50), einer Gradienten-Pumpe mit Entgasungseinheit (GP50) und einem Chromatographie-Ofen (AS50, Thermal Component). Der eingesetzte elektrochemische Detektor (ED40) arbeitete nach dem pulsamperometrischen Detektionsprinzip, womit ein breiter linearer Bereich und eine sehr niedrige Bestimmungsgrenze für Glukose erreicht wurde. Diese Detektionsmethode ist für Analyten spezifisch, die bei einem bestimmten Potential oxidiert werden können. Es können somit Kohlenhydrate, Alkohole etc. sehr selektiv nachgewiesen werden, da die nicht oxidierten Verbindungen nicht detektiert werden [Dionex, Application Note 122].

Die verwendete Säule (CarboPac PA100, Dionex, Idstein, Deutschland) wurde durch eine Vorsäule (PA100, OnGuard, Dionex, Idstein, Deutschland) und eine Säule zur Reduzierung des Carbonatanteils im Fliessmittel (IonPac<sup>®</sup>, ATC, 2 mm, Dionex, Idstein, Deutschland) erweitert. Als Fliessmittel kamen Wasser (n.p.) und Natriumhydroxydlösung (100 mM) zum Einsatz. Die Natriumhydroxydlösung wurde aus einer 50%igen (w/w) kommerziellen Stammlösung (J.T. Baker, Deventer, Holland) hergestellt. Dies verringerte den Carbonateintrag im Vergleich zu Lösungen, die aus Natriumhydroxydpellets hergestellt werden. Letztere sind von einer dünnen Schicht aus Natriumcarbonat bedeckt. Carbonat verringert die chromatographische Auflösung, da es bei hohen pH-Werten als divalentes Anion stark an das Säulenmaterial bindet. Das Fliessmittel wurde mit Wasser (n.p.) hergestellt, das zuvor mit Helium entgast wurde. Nach Zugabe der Natriumhydroxydlösung wurde die Vorlage dicht verschlossen und über die Heliumbegasung mit einem Druck von ca. 0,2 bar beaufschlagt.

Die Ansteuerung der Komponenten der Anlage sowie die Datenerfassung erfolgte mit einem PC unter Verwendung der Software Peaknet (Chromatography Workstation, Dionex Corporation, Sunnydale, USA) bzw. Chromeleon (Version 6.20, Chromatography Information Management System, Dionex Corporation, Sunnydale, USA). Diese Software diente auch zur Auswertung der Chromatogramme und Quantifizierung der Glukosekonzentrationen.

Abbildung 14 zeigt exemplarische eine Kalibriergerade. Dargestellt sind Mittelwerte aus jeweils zwei Messungen mit den Standardabweichungen. Daraus geht die Linearität der Kalibrierung über 3 Größenordnungen, die gute Reproduzierbarkeit sowie die geringe Bestimmungsgrenze bis zu einer Glukosekonzentration von 0,2 mg/l hervor.



**Abbildung 14: Kalibriergerade zur Glukosebestimmung mit dem Ionenchromatograph**

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Bestimmung der *in vivo* Kinetik der Glukose-transporter von *Saccharomyces cerevisiae*

Das Ziel der Untersuchungen war die reaktionskinetische Charakterisierung von Transportmutanten von *S. cerevisiae* *in vivo*. Die vom Kooperationspartner (Prof. Dr. E. Boles, Institut für Mikrobiologie, Goethe-Universität Frankfurt) bereitgestellten *HXT*-Einzelexpressionsstämme (siehe Publikation 1, Chapter 3.3) wurden dazu bei definierten Wachstumsraten gezüchtet und mit Hilfe von Glukosepulsen dynamisch stimuliert. Anstatt der für diese Fragestellung üblichen kontinuierlichen Prozessführung im Chemostaten wurde ein Zulaufverfahren (fed-batch) angewandt. Mit diesem Verfahren kann ein quasi steady-state schneller erreicht werden als ein steady-state im Chemostat. Dies bot die Möglichkeit, die Mutanten in schnellerer Abfolge zu charakterisieren und gewährleistete über den Untersuchungszeitraum eine bezüglich der Transporterausstattung homogene Hefepopulation. Es wurden Pulsversuche mit den *HXT*-Einzelexpressionsmutanten *HXT1*<sup>+</sup> (JBY01), *HXT5*<sup>+</sup> (JBY19), *HXT7*<sup>+</sup> (JBY02) und dem Wildtyp (CEN.PK2-1C) durchgeführt. Figure 4 in der Publikation 1 zeigt die Konzentrationsverläufe für die extrazelluläre Glukose vor und nach der Pulsgabe. In den verschiedenen Konzentrationsverläufen für die Mutantenstämme spiegeln sich in erster Näherung die Affinitätsunterschiede zwischen den hochaffinen (Hxt7) und den niedrigaffinen (Hxt1) Transportern. Der Konzentrationsverlauf für den *HXT5*-Einzelexpressionsstamm liegt dazwischen, was auf eine intermediäre Affinität schliessen lässt.

Ausgehend von den experimentellen Beobachtungen der externen Glukosekonzentrationen während der Pulsversuche liessen sich dann die reaktionskinetischen Parameter der Glukosetransporter Hxt5, Hxt7 und für den Wildtyp bestimmen. Dazu wurde die instationäre Stoffbilanz für Glukose numerisch integriert und die Fehlerquadrate zwischen gemessenen und berechneten Glukosekonzentrationen unter Variation der kinetischen Parameter minimiert. Da über die kinetischen Parameter für den Hxt5-Transporter in der Literatur keine Daten zur Verfügung standen, wurden in den ersten Pulsversuchen Glukosekonzentrationen eingesetzt, die auch bei der Charakterisierung des Wildtyps zum Einsatz kamen. In der Optimierung erwies sich die gewählte Glukosekonzentration als zu gering. Die geschätzten Parameter waren nicht sensitiv, da die Glukosekonzentration im Puls zu niedrig war, um das System ausreichend auszulenken. Deshalb wurden in weiteren Versuchen höhere Pulskonzentrationen eingesetzt, um diesen Transporter reaktionskinetisch charakterisieren zu können. Aus Tabelle 19 geht der Vergleich der bestimmten kinetischen Parameter der *HXT*-Einzelexpressionsmutanten *HXT5*<sup>+</sup> (JBY19), *HXT7*<sup>+</sup> (JBY02) und des Wildtyps (CEN.PK2-1C) der vorliegenden Untersuchungen mit den Literaturwerten hervor.

**Tabelle 19: Vergleich der bestimmten kinetischen Parameter der *HXT*-Einzelexpressionsmutanten und des Wildtyps mit Literaturwerten**

Stamm	$K_M$ [mM]	Literaturdaten	
	(siehe Publikation 1)	$K_M$ [mM]	Referenz
Wildtyp (CEN.PK2-1C)	0,4	0,5 – 1,0	[Boles et al., 1997; Lagunas, 1993; Reifenberger et al., 1997]
<i>HXT5</i> <sup>+</sup> (JBY19)	6,5	10	[Diderich et al., 2001]
<i>HXT7</i> <sup>+</sup> (JBY02)	1,1	1,1	[Reifenberger et al., 1997]

Die Ergebnisse für den Hxt7 Transporter stimmen sehr gut mit dem Literaturwert überein. Die Differenz beim Wildtyp könnte eventuell aus einer Maskierung des  $K_M$ -Wertes für den Hxt7-Transporter durch den des Hxt2 Proteins herrühren [Petit et al., 2000]. Die Affinität des Hxt2-Transporters scheint von der Konzentration extrazellulärer Glukose moduliert zu werden [Reifenberger et al., 1997]. Beim Hxt5-Transporter könnte der Unterschied zum Literaturwert auf die C-terminale HA-Sequenz zurückgeführt werden.

Bei der Bestimmung der reaktionskinetischen Parameter für den *HXT5*-Einzelexpressionsstamm wurden auch die  $q_s^{\max}$ -Werte geschätzt. Unter Miteinbeziehung der bestimmten  $K_M$ -Werte und der gemessenen Glukosekonzentrationen im steady-state wurden die spezifischen Glukoseverbrauchsrate für den steady-state errechnet ( $(q_s)_{\text{kinetics}}$ , siehe Publikation 1, Chapter 3.4). Ein Vergleich dieser Werte mit den in der steady-state Phase bestimmten spezifischen Glukoseverbrauchsrate ( $(q_s)_{\text{in situ}}$ , siehe Publikation 1, Chapter 3.4) wies speziell für die anaerobe Kultivierung erhebliche Unterschiede auf. Dies könnte auf eine über einen längeren Zeitraum anhaltende Akkumulation intrazellulärer Glukose zurückzuführen sein. Um diesen Sachverhalt weiter zu beleuchten, wurde in weiteren Untersuchungen versucht, die Konzentration intrazellulärer Glukose im steady-state und unter dynamischen Bedingungen zu messen.

## 4.2 Messung intrazellulärer Glukose

Im Publikation 2 wird eine neue Technik zur Messung der Dynamik von Metabolitkonzentrationen im Subsekundenbereich demonstriert (stopped-flow Technik A). Die dort gezeigten Messungen für G6P und die Adeninnukleotide bei *S. cerevisiae* und Phosphoenolpyruvat sowie Pyruvat bei *E. coli* öffnen neue Wege in der Beschreibung des Metabolismus von Mikroorganismen, da nun auch die Kurzzeitdynamik von Metaboliten erfasst werden kann. Die bestehende Technik wurde deshalb weiter ausgebaut und zur Messung der Dynamik intrazellulärer Glukose eingesetzt (stopped-flow Technik B, siehe Kapitel 3.5.2). Zunächst musste allerdings eine Methode zur Messung intrazellulärer Glukose etabliert werden.

Bei der Parameterschätzung im Rahmen der in Kapitel 4.1 sowie Publikation 1 beschriebenen Untersuchungen wurde vereinfacht eine Michaelis-Menten Kinetik eingesetzt. Um den Transportschritt jedoch vollständig beschreiben zu können, muss eine reversible Influx-Efflux Kinetik unter Berücksichtigung einer Inhibition durch G6P verwendet werden [Rizzi et al.,

1996]. Damit wird auch der Dynamik des Efflux der intrazellulären Glukose Rechnung getragen. Untersuchungen von Teusink et al. [1998] machen deutlich, dass bei Vernachlässigung des intrazellulären Glukosepools Fehler in den Aufnahmeraten von bis zu 50% auftreten können. Die Erfassung der Konzentrationsverläufe für intrazelluläre Glukose und G6P war deshalb die nächste Aufgabenstellung, da nur auf deren Basis eine vollständige Beschreibung des Glukosetransport möglich wird.

#### 4.2.1 Voruntersuchungen zur Messung intrazellulärer Glukose

Bei der Auswahl einer geeigneten Methode zum Zellaufschluss und der Extraktion intrazellulärer Glukose wurden die in der Tabelle 20 aufgeführten Methoden getestet.

**Tabelle 20: Methoden zur Bestimmung intrazellulärer Glukose**

Methode	Referenz
PCA Methode	[Kopperschläger et al., 1967]
boiling-ethanol Methode	[Gonzalez et al., 1997]
Chloroform Methode	[de Koning et al., 1992]
boiling-water Methode	[Bhattacharya et al., 1995]

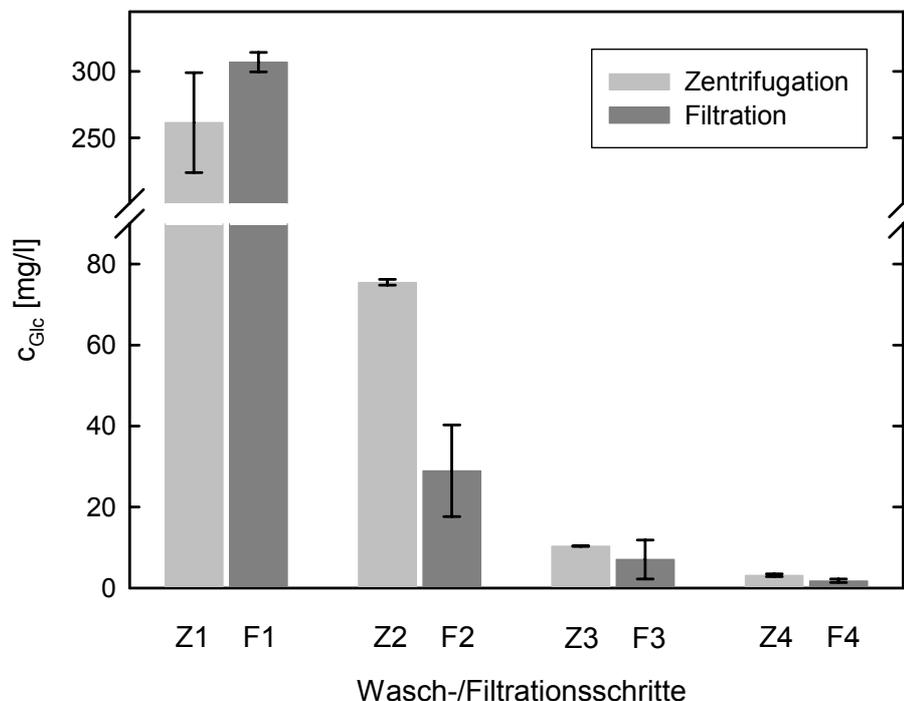
Die PCA Methode wird in Kapitel 3.6.1 beschrieben. Nach der Extraktion liegen in der Analyseprobe durch die Verwendung von Perchlorsäure und anschließender Neutralisation mit KOH hohe Salzkonzentrationen vor. Eine Analyse unter Verwendung des Ionenchromatographen ist somit nicht mehr möglich. Der Versuch, die Glukosebestimmung nach diesem Aufschluss mit enzymatischen Methoden durchzuführen, misslang aufgrund der sehr niedrigen Glukosekonzentrationen.

Mit der boiling-ethanol Methode und der Chloroform Methode liess sich keine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit für die intrazelluläre Glukosekonzentration von steady-state Proben erzielen.

Unter Anwendung der boiling-water Methode gelang es, das Signal intrazellulärer Glukose reproduzierbar zu erfassen. Um diese Technik zu validieren und an unsere Anforderungen anzupassen, wurden weitere Untersuchungen angestellt. Zunächst sollte durch Zugabe von geeigneten Verbindungen zum Waschpuffer der Efflux intrazellulärer Glukose nach dem Quenching vermieden werden. Hierbei kämen Substanzen in Frage, welche die Glukosebindestelle am Transporter absättigen oder das Transportprotein so beeinträchtigen, dass es keine Glukose mehr transportieren kann. Desweiteren darf die gewählte Substanz die Analytik zur Erfassung der intrazellulären Glukose nicht stören. Zunächst wurden Versuche mit L-Glukose durchgeführt, die von der Zelle nicht aufgenommen wird. Es war allerdings mit der für diese Untersuchungen nötigen Analytik keine Trennung zwischen L- und D-Glukose möglich. Sorbose kam ebenfalls in Frage, störte die Analytik aber ebenfalls empfindlich. 2-Desoxyglukose (2-DOG) liess sich zwar sehr gut analytisch nachweisen, war allerdings in den bezahlbaren Qualitäten mit D-Glukose verunreinigt, was unser Signal verfälscht hätte. Die Anwendung von Uranyl-Ionen zur Vergiftung des Transportsystems

wurde schon früh beschrieben [Cirillo et al., 1964]. Davon wurde wegen der hohen Toxizität der Substanz abgesehen. In den weiteren Untersuchungen wurde auf eine Blockiersubstanz verzichtet, da die kritischen Schritte der Aufarbeitung in den Kühlraum verlegt werden konnten. Zudem wurde die Filtrationseinheit vor dem Filtrationsschritt gekühlt. Bei den somit vorherrschenden Temperaturen ( $< 4-6^{\circ}\text{C}$ ) sollte die Transportaktivität soweit minimiert sein, dass nicht mit einer signifikanten Verfälschung der Messwerte durch den Efflux intrazellulärer Glukose während der Aufarbeitung gerechnet werden muss [Coons et al., 1995].

Einen besonders kritischen Schritt bei der Aufarbeitung der Zellsuspension stellt die Abtrennung der Biomasse vom Medium dar. Die Grundvoraussetzung einer quantitativen Bestimmung intrazellulärer Glukose ist das vollständige Abwaschen extrazellulärer Glukose von den Zellen. Aufgrund spezifischem und unspezifischem Binden der Glukosemoleküle auf Bestandteilen der Plasmamembran oder der Zellwand würden bei unzureichend abgewaschener extrazellulärer Glukose die Konzentrationwerte intrazellulärer Glukose verfälscht werden. Speziell nach dynamischer Anregung durch Erhöhung der extrazellulären Glukosekonzentration spielt dieser Schritt eine entscheidende Rolle. Grundsätzlich steht dafür die Filtration und die Zentrifugation zur Verfügung. Diese Methoden wurden hinsichtlich ihrer Effektivität im Abwaschen extrazellulärer Glukose verglichen. Dazu wurde Biosuspension aus einem Chemostat ( $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ , *S. cerevisiae*, CEN.PK2-1C, steady-state) mit Glukoselösung versetzt, die Zellen mit der jeweiligen Methode gewaschen und die Glukosekonzentrationen der Waschfiltrate bzw. Zentrifugationsüberstände bestimmt. Die Proben stammten aus den Vorversuchen mit der stopped-flow Technik, weshalb die Konzentration extrazellulärer Glukose für das erste Filtrat und den ersten Zentrifugationsrückstand nicht genau gleich waren. Abbildung 15 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. Dargestellt sind die Mittelwerte zweier Proben und die dazugehörigen Standardabweichungen.



**Abbildung 15: Vergleich der Zentrifugation mit der Filtration in ihrer Effektivität beim Abwaschen extrazellulärer Glukose**

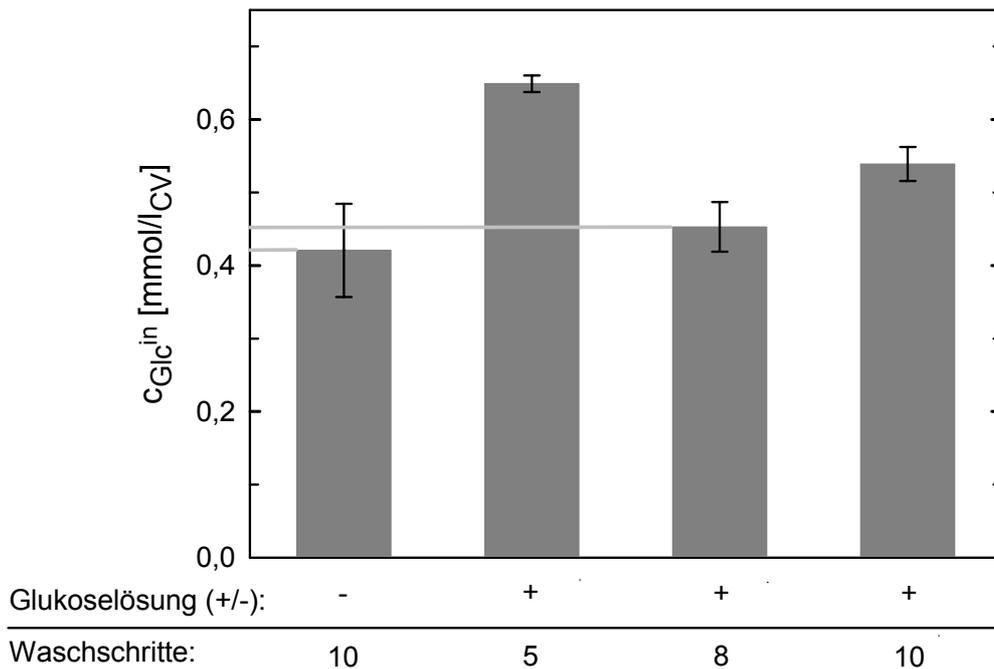
Mit Z1 bzw. F1 wird der erste Zentrifugations- respektive Filtrationsschritt bezeichnet. Hierbei werden die Zellen ohne Verwendung von Waschlösung vom Medium abgetrennt. Proben mit der Bezeichnung Z2 bis Z4 (Zentrifugation) bzw. F2 bis F4 (Filtration) wurden dann mit Waschlösung (60% Methanol/Wasser + 1 g/l 2-DOG) gewaschen. Die Filtration ist in Kapitel 3.6.2 beschrieben. Bei der Zentrifugation (J2-21M/E Centrifuge, Rotor 20.1, Beckman-Coulter, Unterschleissheim-Lohhof, Germany) wurde der Überstand nach dem ersten Zentrifugationsschritt (1340 g, 5 Minuten, -20°C) dekantiert und die Glukosekonzentration bestimmt (Z1). Das Pellet wurde dann pro Waschschrift (Z2 bis Z4) mit 1 ml der Waschlösung (60% Methanol/Wasser + 1 g/l 2-DOG, -30°C) versetzt, resuspendiert und erneut zentrifugiert (1340 g, 5 Minuten, -20°C). Die Glukosekonzentration im Überstand von Z1 und Z2 wurde enzymatisch bestimmt, Überstand Z3 und Z4 wurde unter Verwendung der Ionenchromatographie vermessen.

Diese Versuche wurden noch mit 2-DOG als Blockiersubstanz (siehe Seite 57) durchgeführt. Da aber bei beiden Methoden, der Zentrifugation und der Filtration, 2-DOG eingesetzt wurde, sind die Ergebnisse dennoch vergleichbar. Die extrazellulären Glukosekonzentrationen für das Medium sind bei der Filtration höher aber dennoch vergleichbar mit denen der Zentrifugation (Z1, F1). Bei der Filtration wird das Medium effektiver von den Zellen gewaschen als bei der Zentrifugation, was sich in geringeren Glukosekonzentrationen in der ersten Waschlösung zeigt (Z2, F2). Außerdem wurde bei der Zentrifugation nur 1 ml Waschlösung eingesetzt verglichen mit 5 ml bei der Filtration. Die Proben Z3 und F3 bzw. Z4 und F4 weisen nur eine geringe Abweichung auf.

Bei genügend hoher Anzahl an Waschschriften ist es somit mit beiden Methoden möglich, extrazelluläre Glukose von den Zellen zu waschen. Die Filtration erwies sich als geringfügig besser und wurde in Folge eingesetzt.

Die Glukosekonzentration in der Waschlösung lag nach 3 Waschschriften noch bei fast 2 mg/l (siehe Abbildung 15). Da diese Restkonzentration zu hoch ist, um von der eingesetzten 2-DOG zu stammen, wurden unter Anwendung der Filtrationsmethode weitere Versuche mit zusätzlichen Waschschriften durchgeführt. Lässt sich die Glukose vollständig von den Zellen waschen, sollte im Waschfiltrat keine Glukose mehr nachweisbar sein. Dennoch könnte Glukose an der Zelle haften, die erst beim Zellaufschluss wieder in Lösung geht und somit die Konzentrationen intrazellulärer Glukose verfälscht. Unter Anwendung der Filtrationsmethode wurden deshalb 10 Waschschriften eingesetzt, und der Einfluss des Anhaftens extrazellulärer Glukose auf die Konzentration intrazellulärer Glukose untersucht. Dazu wurden 2 ml Biosuspension aus einem Chemostat ( $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ , *S. cerevisiae*, CEN.PK2-1C, steady-state) in 5 ml Methanol (60%, -20°C) aufgenommen, mit Glukosemedium (0,75  $\mu\text{l}$ , +4°C, Zusammensetzung siehe Tabelle 8 a und b) versetzt, durchmischt und im Kryostat bei ca. -12°C bis zur weiteren Aufarbeitung aufbewahrt. Danach wurden die Waschschriften (siehe Kapitel 3.6.2) mit jeweils 5 ml Methanol (60%, -20°C) im Kühlraum bei +6°C durchgeführt und die Waschlösungen aufbewahrt. Diese wurden einer Vakuumdestillation unterzogen, um das Methanol zu entfernen, das die Analytik stören würde. Die Rückstände der Vakuumdestillation wurden in 2 ml H<sub>2</sub>O (n.p.) aufgenommen und auf die Glukosekonzentration analysiert. Die Glukosekonzentration wurde bis zum 3. Waschfiltrat mittels enzymatischem Test ermittelt und ab dem 4. Waschfiltrat aufgrund der niedrigen Glukosekonzentrationen die Ionenchromatographie eingesetzt. Nach der Extraktion (boiling-water Methode) wurde die Konzentration intrazellulärer Glukose bestimmt. Zum Vergleich

wurden steady-state Proben ohne vorheriges Vermischen mit Glukoselösung ebenso gequenched, aufgeschlossen und der Analyse intrazellulärer Glukose unterzogen. Die Glukosekonzentration im extrazellulären Medium (entspricht dem Filtrat 1, nicht dargestellt) wurde somit auf fast 1,3 g/l erhöht. Das 4. Waschfiltrat wies nur noch eine Glukosekonzentration von 1,4 mg/l auf, während die Werte für das 6. Waschfiltrat schon außerhalb des Kalibrierbereichs des Ionenchromatographen lagen. Die Glukosekonzentrationen für das 8. und das 10. Waschfiltrat lagen ebenfalls außerhalb des kalibrierten Bereichs, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass keine weitere Glukose von den Zellen gewaschen werden kann. Das Ergebnis für die intrazelluläre Glukose ist in Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 16: Konzentration intrazellulärer Glukose nach den Waschschr.**

Nach 8 Waschschr. ist die Konzentration intrazellulärer Glukose bei den Proben, die mit Glukoselösung versetzt wurden, nur noch ca. 7% höher als bei den steady-state Proben. Warum der Wert nach 10 Waschschr. ca. 29% höher liegt als bei den steady-state Proben, ist nicht zu erklären. Ein Auswaschen der Glukose sollte bei den vorherrschenden Temperaturen nicht stattfinden [Coons et al., 1995]. Bei Betrachtung der Streuungen liegt der Konzentrationswert nach 10 Waschschr. allerdings fast noch im Fehlerbereich der steady-state Konzentrationen für intrazelluläre Glukose. Im Rahmen der weiteren Untersuchungen wurden 8 Waschschr. durchgeführt.

Dieses Ergebnis demonstriert, dass ein effektives Abwaschen extrazellulärer Glukose und somit eine Bestimmung intrazellulärer Glukose möglich ist. Es ist allerdings darauf hinzuweisen, dass die Biosuspension, die in diesem Versuchsteil eingesetzt wurde, aus einer glukoselimitierten kontinuierlichen Kultivierung stammte und somit auch schon extrazelluläre Glukose aufwies. Die Absolutwerte könnten somit fehlerbehaftet sein. Die relative Änderung der intrazellulären Glukosekonzentration bei dynamischer Anregung wird dennoch erfasst.

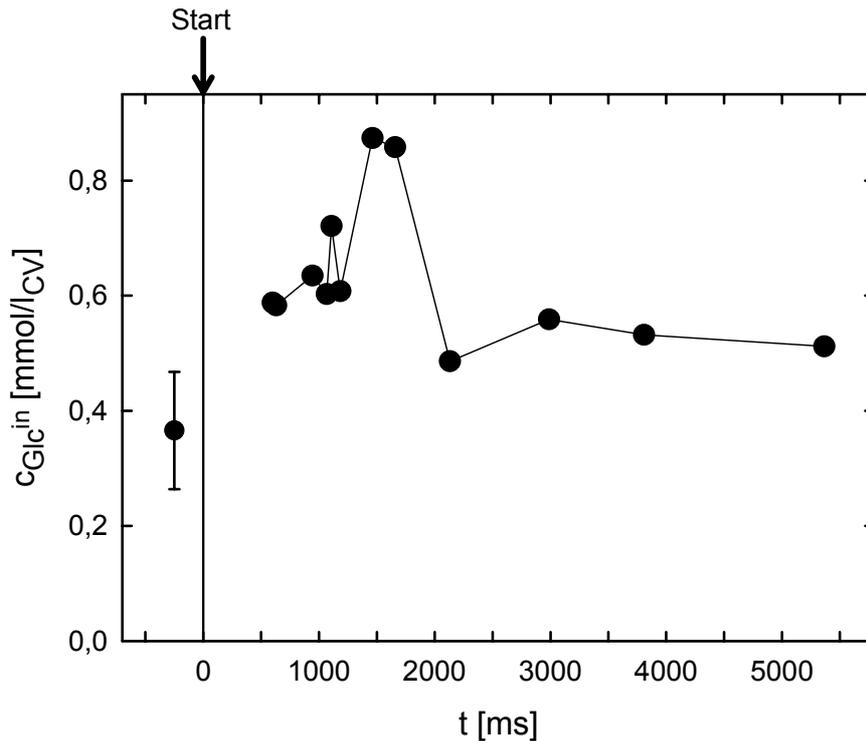
Es wurden Vorversuche unternommen eine *hxt*-Nullmutante (EBY.VW4000, siehe Kapitel 1.3.3) auf alternativen Kohlenstoffquellen zu kultivieren, um extrazelluläre Glukose in der Biosuspension zu vermeiden. Diese Mutante staut allerdings intrazellulär höhere Mengen Glukose an (E. Boles, persönliche Information). Da im Bioreaktor immer ein Anteil an toten („aufgeschlossenen“) Zellen vorliegt, der wieder für extrazelluläre Glukose sorgt, wäre somit auch bei Kultivierung der *hxt*-Nullmutante extrazelluläre Glukose zu erwarten.

In weiteren Untersuchungen zur Anwendbarkeit der boiling-water Methode wurden verschiedene Membranfilter für die Abtrennung der Zellen vom extrazellulären Medium getestet. Hierbei lag ein Augenmerk auf einer hohen Filtrationsrate und einem geringen Störsignal in der Analytik. Ein Membranfilter (Metrigard™, Glass Fiber Filter, 47 mm, Prod.-Nr.: 64798, Pall Corporation, Michigan, USA) ermöglichte hohe Fließraten und dessen Störsignal lag, nach Konditionierung (5 min in 5 ml H<sub>2</sub>O (n.p.), 98°C), unter der Bestimmungsgrenze der Ionenchromatographie.

Um sicherzustellen, daß die Glukosekonzentration während der Aufarbeitung nach der boiling-water Methode nicht verfälscht wird, wurden Wiederfindungstests durchgeführt. Zuerst wurden Glukose-Standardlösungen nach der boiling-water Methode aufgearbeitet. Die Wiederfindung betrug ca. 98%. In einem weiteren Versuch wurden Glukoselösungen in Gegenwart der Fermentationssalze aufgekocht und auf ihre Wiederfindung vermessen. Hierbei ergab sich ein Verlust von unter 6%. Die Stabilität der Glukose bei Aufarbeitung der Proben nach der boiling-water Methode ist somit zufriedenstellend.

### 4.2.2 Stopped-flow Messungen intrazellulärer Glukose

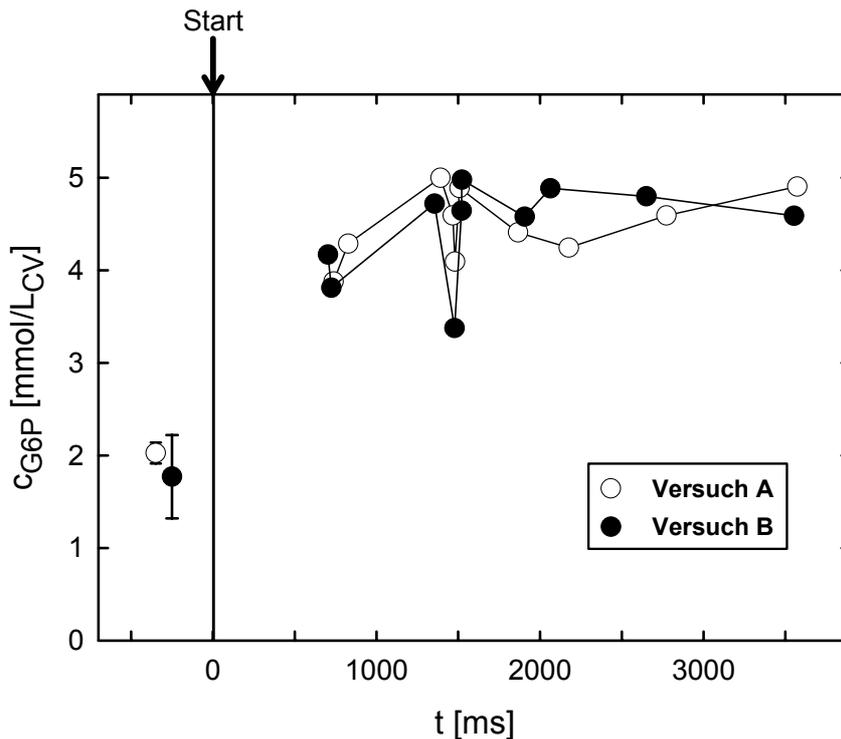
Auf Basis der Voruntersuchungen wurden stopped-flow Messungen durchgeführt um die Dynamik intrazellulärer Glukose und von Glukose-6-Phosphat nach pulsartiger Erhöhung extrazellulärer Glukose zu verfolgen. Dazu wurde die stopped-flow Technik B eingesetzt. Die Untersuchungen wurden an einer Chemostatkultur (pilot plant, Bioengineering,  $V_F = 10$  l,  $D = 0,1\text{h}^{-1}$ ) unter Verwendung des *HXT5*-Einzelexpressionsstammes (JBY19) durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17: Konzentrationsverläufe für intrazelluläre Glukose im Millisekundenbereich (stopped-flow Technik B, *S. cerevisiae* JBY19)**

Die vorgefundenen Konzentrationen für intrazelluläre Glukose im steady-state und der Dynamik liegen im Bereich der Literaturwerte [de Koning et al., 1992]. Das Signal für die intrazelluläre Glukose deutet auf einen Anstau während der ersten zwei Sekunden hin. Die Form des gezeigten Kurvenzugs wurde reproduziert (nicht dargestellt), lag allerdings unter dem Konzentrationsverlauf in Abbildung 17. Dies lag vermutlich an Problemen, die während der Aufarbeitung auftraten und für den Verlust eines Anteils der Probe sorgten.

Der Konzentrationsverlauf für G6P in Abbildung 18 zeigt den Anstieg dieses Metaboliten im Subsekundenbereich. Die Absolutwerte können nicht mit denen in Publikation 2 (Figure 4, stopped-flow A) verglichen werden, da dort ein Wildtyp eingesetzt wurde. Der Anstieg der G6P-Konzentration verläuft qualitativ aber ähnlich.



**Abbildung 18: Konzentrationsverläufe für G6P im Millisekundenbereich (stopped-flow Technik B, *S. cerevisiae* JBY19)**

Beim Vergleich der Konzentrationen für intrazelluläre Glukose und G6P fällt eine Schwingung bei ca 1,5 Sekunden auf, die für die Metabolite gegenläufig ist. Beim Signal der intrazellulären Glukose ist ein kurzer Anstieg, beim G6P ein kurzer Abfall zu erkennen. Diese Besonderheit konnte für G6P als auch für intrazelluläre Glukose reproduziert werden, aufgrund dessen sie signifikant zu sein scheint. Die Ursache dieses Verhaltens könnte auf Rückkopplungseffekte zurückzuführen sein. Vielleicht ist dieses Phänomen zu erklären, sobald ein validiertes Modell existiert, mit dem der an den weiteren Zellstoffwechsel gekoppelte Glukosetransportschritt beschrieben werden kann.

Die experimentellen Daten für die Dynamik intrazellulärer Glukose und von G6P können nun eingesetzt werden um das Modell von Rizzi et al. [1996] (siehe auch Kapitel 1.3.2) zu validieren. Auf der Basis der dabei zu schätzenden kinetischen Parameter kann der Transportschritt dann erstmalig vollständig charakterisiert werden. Dies wird die Rolle des G6P (Inhibition) und der intrazellulären Glukose (Akkumulation) weiter beleuchten.

### 4.3 Dynamik der Hexosetransportproteine Hxt1, Hxt5 und Hxt7

In den bisherigen Untersuchungen wurde der Glukosetransport bei *S. cerevisiae* auf der Ebene des Substrats und der von Metaboliten betrachtet. Wie in der Einleitung dargestellt, wird die Expression der Transportproteine des multifaktoriellen Transportsystems sehr komplex reguliert. Hierbei fungierten das Substrat (Glukose) und die intrazellulären Metabolite (intrazelluläre Glukose, G6P) als Signal- bzw Regulator-Molekül. In diesem Abschnitt werden die

Ergebnisse dargestellt, bei denen über Veränderungen in der Substratkonzentration eine Änderung in der Expression der Glukosetransportproteine erwirkt wurde. Dieser Teil der Untersuchungen reflektiert zudem am treffendsten den Titel der vorliegenden Arbeit, die „Verknüpfung molekularphysiologischer und reaktionskinetischer Werkzeuge zum Studium der *in vivo* Regulation des Glukosetransports in *Saccharomyces cerevisiae*“. Durch den Einsatz von Western blot Analysen konnten Änderungen der Expressionsprofile von drei wichtigen Hexosetransportproteinen (Hxt1, Hxt5 und Hxt7) als Antwort auf Veränderungen in der extrazellulären Glukosekonzentration erfasst werden. Die Antikörper gegen Hxt7 erkennen aufgrund der hohen Identität der beiden Proteine auch Hxt6. Da das Protein Hxt7 viel stärker exprimiert wird als Hxt6 und beide einer ähnlichen Regulation unterliegen, wird in Folge nur vom Hxt7-Transporter die Rede sein (siehe auch Kapitel 1.3.3). Die Untersuchungen unterteilten sich in zwei Fragestellungen:

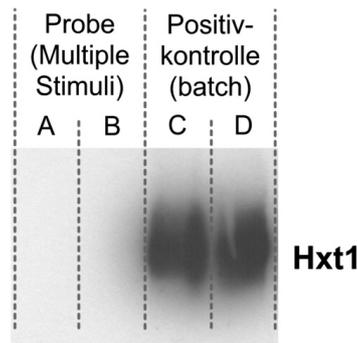
- 1.) Wie verläuft die Dynamik der Hexosetransportproteine nach Erhöhung der extrazellulären Glukosekonzentration? Dazu wurde die extrazelluläre Glukosekonzentration auf Werte erhöht, die so gewählt wurden, dass die Regulationspfade aller betrachteten Transportertypen ein Signal zur Induktion oder Repression erhalten mussten. Es war deshalb nötig, die Glukosekonzentration auf über 1,2 M zu erhöhen, um nicht nur die nötige Intensität des Signals zu erreichen, sondern auch zu gewährleisten, dass es über einen längeren Betrachtungszeitraum erhalten bleibt.
- 2.) Im zweiten Versuchsteil wurden Zellen durch multiple Injektion von Glukosepulsen (multiple Stimuli) dynamisch angeregt und die Induktion/Repression der drei erwähnten Transporter verfolgt. Dies sollte eine Situation simulieren, wie sie in grossen Produktionsbioreaktoren durch unzureichende Durchmischung der Biosuspension mit der zugefütterten Substratlösung vorkommt und zur Ausbildung von räumlichen und zeitlichen Konzentrationsgradienten führt (siehe Publikation 3, Introduction).

### **4.3.1 Voruntersuchungen zur Erfassung der Expressionslevel von Hxt-Proteinen**

Zu Beginn der Untersuchungen wurden die Expressionslevel der drei Transportertypen im glukoselimitierten Chemostat erfasst. Wie erwartet konnte für Hxt1 (niedrigaffiner Transporter) kein Signal nachgewiesen werden, während für Hxt7 (hochaffiner Transporter) und für Hxt5 (intermediäraffiner Transporter) deutliche Chemilumineszenzsignale sichtbar waren. Dies entspricht auch den Literaturdaten (siehe Kapitel 1.3.3). Um sicherzustellen, dass reproduzierbare Proteinmengen auf die SDS-Gele aufgetragen werden, wurden zu Beginn Silberfärbungen durchgeführt. Die Ergebnisse der rechnergestützten Auswertung der eingescannten Gele bestätigten eine reproduzierbare Auftragung gleicher Proteinmengen (nicht dargestellt).

Da im steady-state der eingesetzten aeroben Chemostaten das Hxt1-Protein nicht nachzuweisen war, mussten für die folgenden Untersuchungen Positivkontrollen mit aufgearbeitet werden. Da Hxt1 unter hohem Glukoseüberschuss exprimiert wird, wurden Zellen aus batch-Prozessen (nicht gezeigt) aufgearbeitet und bei den beiden Versuchsteilen mit den dort gewonnenen Proben der Western blot Analyse unterzogen. Abbildung 19 zeigt

das Ergebnis einer Western blot Analyse für eine Probe aus dem Versuchsteil „Multiple Stimuli“ (A und B in Abbildung 19 entsprechen der Doppelbestimmung der Probe ca. 3 Stunden nach Puls 6, siehe Kapitel 4.3.3 sowie Publikation 3, Figure 3) und einer Probe aus einem batch-Prozess unter Glukoseüberschuss (Positivkontrolle C:  $c_{\text{Glukose}} = 75 \text{ mM}$ , Positivkontrolle D:  $c_{\text{Glukose}} = 92 \text{ mM}$  in Abbildung 19). Die Proben des Versuchsteils „Multiple Stimuli“ sind in Doppelbestimmung aufgetragen (A und B), die Positivkontrollen stammen aus zwei Einzelexperimenten (C und D). Während bei der aufgearbeiteten Probe aus dem Versuchsteil „Multiple Stimuli“ das Hxt1-Protein nicht nachzuweisen war, konnte bei der batch-Probe eine starke Expression nachgewiesen werden.



**Abbildung 19: Hxt1-Signal der Positivkontrolle verglichen mit dem Signal einer Probe aus dem Versuchsteil „Multiple Stimuli“**

Der nächste Schritt war die Etablierung einer enzymatischen Glukoseanalytik auf Multititerplatten, wie sie von Larsson et al. [1996] vorgeschlagen wurde. Mit diesem System war es schliesslich möglich, die hohe Anzahl von Analyseproben aus dem 2. Versuchsteil (Multiple Stimuli) zu bewältigen (siehe Figure 3 in Publikation 3). Die Validierung dieser Methode ergab eine hohe Präzision und Bestimmungsgrenzen, die mit denen des Küvettentests vergleichbar sind. Die Reproduzierbarkeit wird durch die geringen Standardabweichungen der Messwerte der Kalibriergeraden deutlich (siehe Kapitel 3.8.2.4).

### 4.3.2 Shift vom Chemostat-Betrieb auf einen batch-Prozess

Beim Umschalten vom Chemostat-Betrieb auf einen batch-Prozess wurde die Glukosekonzentration in der Biosuspension von ca.  $80 \mu\text{M}$  im steady-state auf über  $1,2 \text{ M}$  erhöht. Vor und während des Umschaltens wurden dem Bioreaktor Proben entnommen und auf die Konzentrationen der extrazellulären Glukose, Ethanol und der Biomasse untersucht. Zudem wurden Proben für die Western blot Analyse entnommen und aufgearbeitet. Die Änderung der extrazellulären Glukosekonzentration stellt für die Zelle ein Signal dar, ihre Ausstattung an Glukosetransportern den veränderten Umgebungsbedingungen anzupassen. Zwei Effekte spielen hierbei eine Rolle und sind in der Literatur eingehend beschrieben (siehe Kapitel 1.3.3 und Publikation 3, Results and discussion). Zum einen bewirkt die hohe Glukosekonzentration, dass die Expression der hochaffinen Transporter reprimiert und die der niedrigaffinen induziert wird. Außer dem Glukosesignal wirkt aber auch noch der hyperosmotische Stress auf die Zelle ein und veranlasst sie, neben anderen Proteinen eine

Änderung in den Expressionsmustern von Glukosetransportern zu initiieren. Hierbei wurde die Induktion des Hxt1- und Hxt5-Transporters beobachtet [Hirayama et al., 1995; Rep et al., 2000]. Hxt5, das unter „Hungerbedingungen“ exprimiert wird, sollte durch das Umschalten auf den batch-Prozess reprimiert werden [Buziol et al., 2002; Diderich et al., 2001]. Unsere Ergebnisse konnten die in der Literatur beschriebenen Veränderungen in den Expressionsprofilen für Hxt1 und Hxt5 auf Proteinebene bestätigen, wobei es sehr lange dauerte, bis das Signal für Hxt5 signifikant abnahm. Hierbei könnten die gegenläufigen Signale für Repression (hohe Glukosekonzentration) und Induktion (hyperosmotischer Stress) zu einer verzögerten Antwort der Zelle geführt haben. Die Expressionsänderung von Hxt7 verlief allerdings anders als erwartet. Nach der Erhöhung der extrazellulären Glukosekonzentration war zunächst eine stärkere Expression des Hxt7-Proteins erkennbar. Erst als auch Hxt1 exprimiert wurde, nahm das Signal für Hxt7 ab, bis es fast völlig verschwunden war. Die Motivation der Zelle, die Expression von Hxt7 nach dem Umschalten auf den batch-Modus zu erhöhen, könnte darin liegen, dass sie somit sehr schnell auf das höhere Angebot an Glukose reagieren kann. Dies wird dadurch unterstützt, dass Hxt7 abgebaut wurde, sobald Hxt1 exprimiert wurde.

Mit dieser Untersuchung gelang es, das Zusammenspiel zwischen Glukosetransportern *in vivo* auf Proteinebene zu verfolgen. Der Zusammenhang zwischen der Expression und Repression von Hxt1 und Hxt5 tritt besonders deutlich zu Tage. Zudem wurden Besonderheiten in der Regulation des Hxt7-Transporters erfasst.

### 4.3.3 Multiple Stimuli

Beim zweiten Versuchsansatz wurden in einen glukoselimitierten Chemostaten multiple Glukosepulse injiziert. Während eines Pulses wurde die extrazelluläre Glukosekonzentration von ca. 80  $\mu\text{M}$  im steady-state auf ungefähr 5 mM erhöht. Nachdem die Glukosekonzentration wieder auf den steady-state Wert abgesunken war, wurde der nächste Puls injiziert. Die Zeitspanne, bis die Zellen die Glukose aufgebraucht hatten, wurde vorher in einem separaten Pulsexperiment ermittelt (nicht dargestellt). Insgesamt wurden 6 Pulse zugegeben. Vor und während der multiplen Stimuli wurden dem Bioreaktor Proben entnommen und auf die Konzentrationen der extrazellulären Glukose, Ethanol und Biomasse untersucht. Zudem wurden Proben für die Western blot Analyse entnommen und aufgearbeitet. Wie Figure 3 in Publikation 3 zu entnehmen ist, bewirken die Glukosepulse keine signifikante Veränderung im Expressionsprofil des Transporters Hxt5. Sowohl im steady-state als auch in der Dynamik konnte kein Signal für Hxt1 erfasst werden, womit die Glukosepulse auch hier anscheinend keine Auswirkung hatten. Bei Betrachtung des Signals der Western blot Analyse für Hxt7 sind deutliche Veränderungen zu erkennen. Es wird zunächst stärker, um dann wieder fast auf das steady-state Signal abzufallen. Die letzte Probe weist eine sehr starke Expression auf. Das Signal der Western blot Analyse für Hxt7 unterliegt offenbar einer Schwingung. Überlappung von Signalen, die an den unterschiedlichen und komplexen Regulationspfaden für die Induktion und die Repression von Hxt7 beteiligt sind (siehe Kapitel 1.3.4.1) könnten zu einer konkurrierenden Verstärkung und Dämpfung der Expression von Hxt7 führen. Das starke letzte Signal der Western blot Analyse für Hxt7 liesse sich somit durch ein Aufschwingen gegenläufiger Signale erklären.

Auf die Problematik der unzureichenden Durchmischung und daraus resultierender Gradienten im Produktionsbioreaktor wird in Publikation 3 ausführlich eingegangen. Das Ergebnis der multiplen Stimuli unterstreicht die Befunde von Enfors [2001] und Bylund [1998], wonach durch Substratgradienten weitreichende Veränderungen im Metabolismus von Mikroorganismen zu erwarten sind. Es wurde gezeigt, dass Schwankungen in der Substratkonzentration eine Veränderung in der Expression von Glukosetransportproteinen bewirken können.

### 4.3.4 Effekt der Überexpression von Hxt7 auf die Glukoseaufnahmerate

Die Ergebnisse des Versuchsteils „Multiple Stimuli“ erlauben es, den Expressionslevel des Transportproteins Hxt7 qualitativ mit der maximalen spezifischen Glukoseaufnahme- und Ethanolbildungsrate zu korrelieren. In Figure 4 der Publikation 3 werden die spezifischen Raten für die Ethanolbildung (A) und die Glukoseaufnahme (B) während der Pulse dargestellt und mit dem Expressionslevel des Transportproteins Hxt7 (C, Western blot) verglichen.

Die spezifische Glukoseaufnahmerate steigt zum Puls 6 auf das ca. 7-fache des steady-state Wertes an. Die Expression von Hxt7, erfasst über die Western blot Analyse, steigt während der ersten drei Pulse zunächst an, um danach bis zum letzten Puls wieder ungefähr auf den Level im steady-state abzufallen.

Die Erhöhung der extrazellulären Glukosekonzentration auf einen Wert, der über dem 10-fachen des  $K_S$ -Wertes für den Wildtyp von *S. cerevisiae* liegt (siehe Publikation 1, Chapter 3.4), führt zu einer dem exprimierten Aufnahmesystem entsprechenden maximalen Glukoseaufnahmerate. Der weitere Anstieg der maximalen Glukoseaufnahmerate nach Puls 2 könnte eine Konsequenz zusätzlich eingesetzter Transportkapazität sein. Diese Annahme wird durch die höheren Expressionslevel für das Hxt7 Protein unterstützt (siehe Publikation 3, Figure 4 C).

Die spezifische Ethanolbildungsrate wurde für die Glukosepulse 1 bis 3 bestimmt (siehe Publikation 3, Figure 4 A). Im steady-state lag keine Ethanolbildung vor. Die spezifische Ethanolbildungsrate steigt in Korrelation mit der Zunahme der spezifischen Glukoseaufnahmerate vom zweiten zum dritten Puls drastisch an. Dies spricht auch dafür, dass auf dem Glukosetransportschritt unter diesen Bedingungen bezüglich der glykolytischen Leistung eine hohe Flusskontrolle lag (siehe auch Publikation 4, Figure 8).

Die beobachtete Erhöhung der Glukoseaufnahme- und Ethanolbildungsrate könnte auch mit einem durch die Glukosepulse induzierten verstärkten „Bedarf“ an ATP erklärt werden. Nach Cornish-Bowden et al. [1995] kann der Fluss durch einen Stoffwechselweg erhöht werden, indem das Endprodukt dieses Pfades entfernt wird. In einer jüngeren Untersuchung wird diese Theorie experimentell untermauert [Koebmann et al., 2002]. Auf unser System übertragen, könnte das beobachtete Absinken der ATP-Konzentration nach einer dynamischen Anregung (siehe Publikation 2, Figure 5) für die Zelle das Signal für den erhöhten Bedarf darstellen. Da es sich beim ATP um das wichtigste „Energienmolekül“ handelt, wird die Zelle beim Absinken der Konzentration dieser Verbindung alles daran setzen diesem entgegenzuwirken. Eine Erhöhung des Flusses und der damit verbundene verstärkte Glukoseeinstrom in die Zelle könnte eine Antwort auf den erhöhten Bedarf der Zelle nach „Energie“ widerspiegeln.

Die weitere Auswertung der Ergebnisse des Versuchsteils „Multiple Stimuli“ spricht für eine hohe Flusskontrolle des Glukosetransportschrittes auf die glykolytische Leistung, wie sie des

öfteren in der Literatur beschrieben wurde (z.B. [Lagunas, 1993]). Die Ergebnisse sind aber auch mit der gegenwärtig wieder verstärkt diskutierten Hypothese im Einklang, der Stofffluss liesse sich durch erhöhten „Bedarf“ der Zelle steigern.

#### 4.4 Computergestütztes Design von metabolischen Netzwerken

Eine Abhängigkeit der Glukoseaufnahme vom Transportschritt wurde schon auf theoretischer Ebene erkannt. In der vorliegenden Arbeit vorangegangenen Untersuchungen wurden am IBVT kinetische Analysen zur modellmässigen Beschreibung des anaeroben Wachstums von *S. cerevisiae* durchgeführt. Basierend auf dynamischen Messungen der intrazellulären Metabolite konnte ein metabolisch strukturiertes Modell validiert werden. In einer dynamischen Sensitivitätsanalyse wurde die Verteilung der Flusskontrollkoeffizienten für den Stoffwechselweg von extrazellulärer Glukose bis zu Ethanol berechnet. Dabei wies der Transportschritt unter den getroffenen Annahmen die mit Abstand höchste Sensitivität im betrachteten Stoffwechselfad auf (siehe Publikation 4, Figure 8). Eine Überexpression der für den Transport von Glukose in die Zelle verantwortlichen Carrier könnte nach diesem Ergebnis zu einem erhöhten Fluss vom Substrat (Glukose) zum Produkt (Ethanol) führen. Von dieser Annahme ausgehend wurde vom Kooperationspartner (Prof. Dr. E. Boles, Institut für Mikrobiologie, Goethe-Universität Frankfurt) auf der Basis einer *hxt*-Nullmutante (EBY.VW4000) eine *HXT5*-Überexpressionsmutante konstruiert, bei der ein *HXT5*-Gen auf einem Multicopyplasmid (YE<sub>p</sub>HXT5) hinter einem verkürzten *HXT7*-Promotor konstitutiv exprimiert wurde. Im anaeroben Chemostat wurde die glycolytische Leistung dieses Stammes mit der eines Wildtyps (CEN.PK2-1C) und eines *HXT5*-Einzelexpressionsstammes (JBY19) verglichen. Dabei wurden spezifische Glukoseverbrauchs- und Ethanolbildungsraten wie folgt bestimmt:

$$q_s = \frac{D \cdot (c_s^0 - c_s)}{c_x} \quad (12)$$

$$q_p = \frac{D \cdot (c_p - c_p^0)}{c_x} \quad (13)$$

$q_s$  = spezifische Glukoseverbrauchsrate [mmol/(g<sub>TS</sub>·h)]

$q_p$  = spezifische Produktbildungsrate [mmol/(g<sub>TS</sub>·h)]

$D$  = Verdünnungsrate [h<sup>-1</sup>]

$c_s$  = Substratkonzentration [mM]

$c_s^0$  = Substratkonzentration in der Mediovorlage [mM]

$c_p$  = Produktkonzentration [mM]

$c_p^0$  = Produktkonzentration in der Mediovorlage [mM]

$c_x$  = Biomassekonzentration [g<sub>TS</sub>/l];

Verglichen mit dem Wildtyp fand sich beim Überexpressionsstamm nur eine ca. 10% höhere spezifische Ethanolbildungsrate und eine ungefähr 25% höhere spezifische Glukoseverbrauchsrate.

Die Konstruktion eines Stammes von *S. cerevisiae*, der konstitutiv das Transportergen (*HXT1*) überexprimiert, wurde schon zur Patentierung eingereicht [GIST-BROCADES, 1997]. Hierbei wurde das Glukosetransportergen *HXT1* konstitutiv hinter einem *ADHI*-Promotor ins Genom integriert. Die anderen Gene für Glukosetransporter des eingesetzten Industriestammes blieben unverändert. Auch dieser Eingriff führte im Vergleich zum Wildtyp nur zu einer ca. 10%igen Erhöhung der Ethanolbildungsrate.

Die Ursache für die unbefriedigende Erhöhung des glycolytischen Flusses könnte darin zu finden sein, dass die Überexpression des Glukosetransporters zu einer Belastung der Zelle führte, die in der Literatur unter dem Begriff der „protein burden“ beschrieben wird [Snoep et al., 1995]. Der erhöhte Energiebedarf zur Synthese überexprimierter Enzyme stellt eine zusätzliche Belastung dar. Auch die Verminderung relativer Konzentrationen von Enzymen („Verdünnung“ von Enzymkonzentrationen) kann sich negativ auf den Stoffwechsel der Zelle auswirken. Bei Überexpression eines Proteins kann es außerdem zur Konkurrenz um Transkriptionsfaktoren kommen [Smits et al., 2000].

Ein weiterer Grund könnte mit den „Poolkonzentrationen“ in der Zelle zusammenhängen. Der erhöhte Einstrom der Gukose könnte stark veränderte Metabolitkonzentrationen nach sich ziehen, die sich für die Zelle schädlich auswirken. Beide Phänomene können dem Oberbegriff der Homöostase untergeordnet werden, die es bei einer angestrebten Flusserhöhung aufrechtzuerhalten gilt. Bei einer Optimierung der Enzymverteilung eines Stoffwechselfades sind somit auch diejenigen Enzyme zu berücksichtigen, die der Erhöhung von Poolkonzentrationen entgegenwirken. Desweiteren sollte die Überexpression von bestimmten Enzymen durch eine verminderte Expression anderer Enzyme soweit ausgeglichen werden, dass die Gesamtkonzentration an Protein sich für die Zelle nicht schädlich auswirkt. Die aus diesen Forderungen resultierende optimale Verteilung von Enzymaktivität könnte eine Erhöhung des Flusses ermöglichen.

## 5 Ausblick

Unter Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen das komplette Set der wachstumsrelevanten Hxt-Proteine könnten in Glukoseaufnahmemessungen kinetische Eigenschaften mit der Expression bestimmter Hxt-Proteine oder Kombinationen von Hxt-Proteinen korreliert werden. Dieser Ansatz würde vielleicht zu einer Einsicht in die *in vivo* Kinetik und Expression einzelner Transportertypen führen, die der natürlichen Regulation unterliegen. Zudem könnten Veränderungen durch Interaktionen einzelner Transportertypen erfasst werden.

Um Interaktionen zwischen Transportern gezielt nachweisen zu können, würde sich der Einsatz der split-ubiquitin Technik (siehe Kapitel 1.3.1) empfehlen.

Auf der Basis der Ergebnisse zur Dynamik intrazellulärer Glukose und von G6P (siehe Kapitel 1.3.2) kann eine Simulation unter Einsatz der von Rizzi [1996] vorgeschlagenen reversiblen Influx-Efflux Kinetik mit G6P-Inhibition durchgeführt werden. Durch vollständige Parametrierung der Kinetik läge somit ein Modell vor, das in der Lage wäre, den Transportschritt erstmalig vollständig zu beschreiben.

Die Ergebnisse der Publikationen 3 und 4 weisen auf zwei Strategien, die verfolgt werden könnten, um einen erhöhten Fluss durch die Glykolyse zu erreichen. Die Konstruktion eines Stammes mit den in Publikation 4 beschriebenen optimalen Enzymkonzentrationen sowie Ansätze, die den „Bedarf“ der Zelle nach wichtigen glykolytischen Intermediaten oder für die Zelle lebensnotwendigen Verbindungen erhöhen, könnten hierbei zum Ziel führen. Koebmann et al. [2002] gelang auf diesem Wege eine starke Erhöhung des glykolytischen Flusses bei *E. coli*.

## 6 Literaturverzeichnis

- Andre L, Hemming A and Adler L. 1991. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>). FEBS Lett. **286**: 13-7.
- Azam F and Kotyk A. 1969. Glucose-6-Phosphate as regulator of monosaccharide transport in baker's yeast. FEBS Lett. **2**: 333-35.
- Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW and Elledge SJ. 1996. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. Cell. **86**: 263-74.
- Barford JP and Hall RJ. 1981. A mathematical model for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* with saturated respiratory capacity. Biotechnol Bioeng. **23**: 1735-62.
- Becker JU and Betz A. 1972. Membrane transport as controlling pacemaker of glycolysis in *Saccharomyces carlsbergensis*. Biochim Biophys Acta. **274**: 584-97.
- Benito B and Lagunas R. 1992. The low-affinity component of *Saccharomyces cerevisiae* maltose transport is an artifact. J Bacteriol. **174**: 3065-9.
- Benthin S, Nielsen J and Villadsen J. 1992. Anomeric specificity of glucose uptake systems in *Lactococcus cremoris*, *Escherichia coli*, and *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism, kinetics, and implications. Biotechnol Bioeng. **40**: 137-46.
- Bergmeyer HU. 1974. Methods in Enzymic Analysis. Acad. Press. New York.
- Bhattacharya M, Fuhrman L, Ingram A, Nickerson KW and Conway T. 1995. Single-run separation and detection of multiple metabolic intermediates by anion-exchange high-performance liquid chromatography and application to cell pool extracts prepared from *Escherichia coli*. Anal Biochem. **232**: 98-106.
- Bisson LF, Coons DM, Kruckeberg AL and Lewis DA. 1993. Yeast sugar transporters. Crit Rev Biochem Mol Biol. **28**: 259-308.
- Bisson LF and Fraenkel DG. 1984. Expression of kinase-dependent glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. **159**: 1013-7.
- Bisson LF and Fraenkel DG. 1983 (a). Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A. **80**: 1730-4.
- Bisson LF and Fraenkel DG. 1983 (b). Transport of 6-deoxyglucose in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. **155**: 995-1000.

- Boles E and Hollenberg CP. 1997. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol Rev.* **21**: 85-111.
- Brambilla L, Bolzani D, Compagno C, Carrera V, van Dijken JP, Pronk JT, Ranzi BM, Alberghina L and Porro D. 1999. NADH reoxidation does not control glycolytic flux during exposure of respiring *Saccharomyces cerevisiae* cultures to glucose excess. *FEMS Microbiol Lett.* **171**: 133-40.
- Brown CJ, Todd KM and Rosenzweig RF. 1998. Multiple duplications of yeast hexose transport genes in response to selection in a glucose-limited environment. *Mol Biol Evol.* **15**: 931-42.
- Buckholz RG and Gleeson MA. 1991. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology (N Y).* **9**: 1067-72.
- Busturia A and Lagunas R. 1986. Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol.* **132**: 379-85.
- Buziol S, Becker J, Baumeister A, Jung S, Mauch K, Reuss M and Boles E. 2002. Determination of *in vivo* kinetics of the starvation-induced Hxt5 glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research.* **1488**: 1-9.
- Bylund F, Collet E, Enfors SO and Larsson G. 1998. Substrate gradient formation in the large-scale bioreactor lowers cell yield and increases by-product formation. *Bioprocess Engineering.* **18**: 170-81.
- Ciriacy M and Reifenberger E. 1997. Hexose Transport. p. 45-65. In: *Yeast Sugar Metabolism, Biochemistry, Genetics, Biotechnology, and Applications*. Zimmermann, F. K. Entian, K. D. Technomic Publishing CO., INC. Lancaster, Basel.
- Cirillo VP. 1968. Relationship between sugar structure and competition for the sugar transport system in Bakers' yeast. *J Bacteriol.* **95**: 603-11.
- Cirillo VP and Wilkins PO. 1964. Use of uranyl ion in membrane transport studies. *J Bacteriol.* **87**: 232-33.
- Clifton D, Walsh RB and Fraenkel DG. 1993. Functional studies of yeast glucokinase. *J Bacteriol.* **175**: 3289-94.
- Coons DM, Boulton RB and Bisson LF. 1995. Computer-assisted nonlinear regression analysis of the multicomponent glucose uptake kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **177**: 3251-8.
- Cornish-Bowden A, Hofmeyr J-HS and Cardenas ML. 1995. Strategies for Manipulating Metabolic Fluxes in Biotechnology. *Bioorg Chem.* **23**: 439-49.

- Cortassa S and Aon MA. 1997. Distributed control of the glycolytic flux in wild-type cells and catabolite repression mutants of *Saccharomyces cerevisiae* growing in carbon-limited chemostat cultures. *Enzyme Microb Technol.* **21**: 596-602.
- Davies SE and Brindle KM. 1992. Effects of overexpression of phosphofructokinase on glycolysis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry.* **31**: 4729-35.
- de Koning W and van Dam K. 1992. A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Anal Biochem.* **204**: 118-23.
- DeVit MJ and Johnston M. 1999. The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol.* **9**: 1231-41.
- Diderich JA, Schepper M, van Hoek P, Luttk MA, van Dijken JP, Pronk JT, Klaassen P, Boelens HF, de Mattos MJ, van Dam K and Kruckeberg AL. 1999. Glucose uptake kinetics and transcription of HXT genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **274**: 15350-9.
- Diderich JA, Schuurmans JM, Van Gaalen MC, Kruckeberg AL and Van Dam K. 2001. Functional analysis of the hexose transporter homologue HXT5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **18**: 1515-24.
- Dionex. Application Note 122. The Determination of Carbohydrates, Alcohols, and Glycols in Fermentation Broths.
- Dlugai S, Hippler S, Wiczorke R and Boles E. 2001. Glucose-dependent and -independent signalling functions of the yeast glucose sensor Snf3. *FEBS Lett.* **505**: 389-92.
- Enfors SO, Jahic M, Rozkov A, Xu B, Hecker M, Jurgen B, Kruger E, Schweder T, Hamer G, O'Beirne D, Noisommit-Rizzi N, Reuss M, Boone L, Hewitt C, McFarlane C, Nienow A, Kovacs T, Tragardh C, Fuchs L, Revstedt J, Friberg PC, Hjertager B, Blomsten G, Skogman H, Hjort S, Hoeks F, Lin HY, Neubauer P, van der Lans R, Luyben K, Vrabel P and Manelius A. 2001. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *J Biotechnol.* **85**: 175-85.
- Entian KD and Frohlich KU. 1984. *Saccharomyces cerevisiae* mutants provide evidence of hexokinase PII as a bifunctional enzyme with catalytic and regulatory domains for triggering carbon catabolite repression. *J Bacteriol.* **158**: 29-35.
- Entian KD and Zimmermann FK. 1980. Glycolytic enzymes and intermediates in carbon catabolite repression mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* **177**: 345-50.
- Fell DA. 1998. Increasing the Flux in Metabolic Pathways: A Metabolic Control Analysis Perspective. *Biotechnol Bioeng.* **58**: 121-4.

- Fields S and Song O. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*. **340**: 245-6.
- Folley L, Power S and Poyton R. 1983. Reversed Phase Chromatography. *J Chromat*. **287**: 199-20.
- Foury F. 1997. Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene*. **195**: 1-10.
- Franzusoff A and Cirillo VP. 1982. Uptake and phosphorylation of 2-deoxy-D-glucose by wild-type and single-kinase strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. **688**: 295-304.
- Franzusoff AJ and Cirillo VP. 1983. Glucose transport activity in isolated plasma membrane vesicles from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. **258**: 3608-14.
- Fuhrmann GF and Völker B. 1993. Misuse of graphical analysis in nonlinear sugar transport kinetics by Eadie-Hofstee plots. *Biochim Biophys Acta*. **1145**: 180-2.
- Gancedo JM. 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev*. **62**: 334-61.
- Gellissen G, Melber K, Janowicz ZA, Dahlems UM, Weydemann U, Piontek M, Strasser AW and Hollenberg CP. 1992. Heterologous protein production in yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **62**: 79-93.
- GIST-BROCADES BV. 1997. Klaassen, P., Van Rooijen, R.J. European Patent Application. Application Nr. 97200053.3.
- Goffeau A. 2000. Four years of post-genomic life with 6,000 yeast genes. *FEBS Lett*. **480**: 37-41.
- Gonzalez B, Francois J and Renaud M. 1997. A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast*. **13**: 1347-55.
- Grivell LA and Planta RJ. 1990. Yeast: the model 'eukaryote'? *Trends Biotechnol*. **8**: 241-3.
- Grosz R, and Stephanopoulos G. 1990. Physiological, Biochemical, and Mathematical Studies of Micro-Aerobic Continuous Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. III: Mathematical Model of Cellular Energetics and Catabolism. *Biotechnol Bioeng*. **36**: 1030-40.
- Hall RJ and Barford JP. 1981. Simulation of the Integration of the Internal Energy Metabolism and the Cell Cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*. **23**: 1763-95.
- Hauf J, Zimmermann FK and Muller S. 2000. Simultaneous genomic overexpression of seven glycolytic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol*. **26**: 688-698.

- Henstock M and Wheals A. 2002. Some useful internet sites for research and teaching with yeasts. *FEMS Yeast Research*. **1455**: 1-4.
- Herrero P, Martinez-Campa C and Moreno F. 1998. The hexokinase 2 protein participates in regulatory DNA-protein complexes necessary for glucose repression of the *SUC2* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. **434**: 71-6.
- Hirayama T, Maeda T, Saito H and Shinozaki K. 1995. Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity- responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. **249**: 127-38.
- Hitzeman RA, Hagie FE, Levine HL, Goeddel DV, Ammerer G and Hall BD. 1981. Expression of a human gene for interferon in yeast. *Nature*. **293**: 717-22.
- Holzer H. 1976. Catabolite inactivation in yeast. *Trends in Biochemical Sciences*. **1**: 178-80.
- Horak J and Wolf DH. 1997. Catabolite inactivation of the galactose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: ubiquitination, endocytosis, and degradation in the vacuole. *J Bacteriol*. **179**: 1541-9.
- Itakura K, Hirose T, Crea R, Riggs AD, Heynecker H, Bolivar F and Boyer HW. 1977. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science*. **198**: 1056-63.
- Jackson M. 1977. *The world guide to beer*. Ballantine Books, New York.
- Johnston M. 1999. Feasting, fasting and fermenting. *Trends in Genetics*. **15**: 29-33.
- Kasahara M, Shimoda E and Maeda M. 1996. Transmembrane segment 10 is important for substrate recognition in Gal2 and Hxt2 sugar transporters in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. **389**: 174-8.
- Ko CH, Liang H and Gaber RF. 1993. Roles of multiple glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **13**: 638-48.
- Koebmann BJ, Westerhoff HV, Snoep JL, Nilsson D and Jensen PR. 2002. The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *J Bacteriol*. **184**: 3909-16.
- Kopperschläger G and Augustin HW. 1967. Fehlermöglichkeiten bei der Bestimmung von Metabolitgehalten in Hefezellen. *Experientia*. **23**: 623-24.
- Kotyk A. 1967. Mobility of the free and of the loaded monosaccharide carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. **135**: 112-9.
- Kotyk A and Kleinzeller A. 1967. Affinity of the yeast membrane carrier for glucose and its role in the Pasteur effect. *Biochim Biophys Acta*. **135**: 106-11.

- Krampe S and Boles E. 2002. Starvation-induced degradation of yeast hexose transporter Hxt7p is dependent on endocytosis, autophagy and the terminal sequences of the permease. *FEBS Lett.* **513**: 193-6.
- Krampe S, Stamm O, Hollenberg CP and Boles E. 1998. Catabolite inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *FEBS Lett.* **441**: 343-7.
- Kruckeberg AL. 1996. The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* **166**: 283-92.
- Kruckeberg AL and Bisson LF. 1990. The HXT2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for high-affinity glucose transport. *Mol Cell Biol.* **10**: 5903-13.
- Kruckeberg AL, Walsh MC and Van Dam K. 1998. How do yeast cells sense glucose? *Bioessays.* **20**: 972-6.
- Kruckeberg AL, Ye L, Berden JA and van Dam K. 1999. Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein. *Biochem J.* **339**: 299-307.
- Lafuente MJ, Gancedo C, Jauniaux JC and Gancedo JM. 2000. Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* **35**: 161-72.
- Lagunas R. 1993. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* **10**: 229-42.
- Lagunas R, Dominguez C, Busturia A and Saez MJ. 1982. Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of sugar transport systems. *J Bacteriol.* **152**: 19-25.
- Lang JM and Cirillo VP. 1987. Glucose transport in a kinaseless *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *J Bacteriol.* **169**: 2932-7.
- Larsson G and Tornkvist M. 1996. Rapid sampling, cell inactivation and evaluation of low extracellular glucose concentrations during fed-batch cultivation. *J Biotechnol.* **49**: 69-82.
- Li FN and Johnston M. 1997. Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *Embo J.* **16**: 5629-38.
- Liang H and Gaber RF. 1996. A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by Snf3-regulated expression of HXT6. *Mol Biol Cell.* **7**: 1953-66.

- Lucero P, Moreno E and Lagunas R. 2002. Catabolite inactivation of the sugar transporters in *Saccharomyces cerevisiae* is inhibited by the presence of a nitrogen source. *FEMS Yeast Research*. **1**: 307-14.
- Ma H, Bloom LM, Walsh CT and Botstein D. 1989. The residual enzymatic phosphorylation activity of hexokinase II mutants is correlated with glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **9**: 5643-9.
- Mailing W, Baumeister A, Reuss M and Rizzi M. 1998. Rapid and highly automated determination of adenine and pyridine nucleotides in extracts of *Saccharomyces cerevisiae* using a micro robotic sample preparation-HPLC system. *J Biotechnol*. **63**: 155-66.
- Maitra PK. 1971. Glucose and fructose metabolism in a phosphoglucoisomeraseless mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. **107**: 759-69.
- Moir DT and Dumais DR. 1987. Glycosylation and secretion of human alpha-1-antitrypsin by yeast. *Gene*. **56**: 209-17.
- Mueckler M. 1994. Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem*. **219**: 713-25.
- Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE and Lodish HF. 1985. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*. **229**: 941-5.
- Neigeborn L and Carlson M. 1984. Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **108**: 845-58.
- Nelissen B, De Wachter R and Goffeau A. 1997. Classification of all putative permeases and other membrane plurispanners of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*. **21**: 113-34.
- Nourani A, Wesolowski-Louvel M, Delaveau T, Jacq C and Delahodde A. 1997. Multiple-drug-resistance phenomenon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of two hexose transporters. *Mol Cell Biol*. **17**: 5453-60.
- Oliver S. 2002. Metabolism: demand management in cells. *Nature*. **418**: 33-4.
- Ongjoco R, Szkutnicka K and Cirillo VP. 1987. Glucose transport in vesicles reconstituted from *Saccharomyces cerevisiae* membranes and liposomes. *J Bacteriol*. **169**: 2926-31.
- Özcan S, Dover J and Johnston M. 1998. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*. **17**: 2566-73.
- Özcan S, Dover J, Rosenwald AG, Wolf S and Johnston M. 1996 (a). Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**: 12428-32.

- Özcan S and Johnston M. 1999. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**: 554-69.
- Özcan S and Johnston M. 1995. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol Cell Biol.* **15**: 1564-72.
- Özcan S and Johnston M. 1996 (b). Two different repressors collaborate to restrict expression of the yeast glucose transporter genes HXT2 and HXT4 to low levels of glucose. *Mol Cell Biol.* **16**: 5536-45.
- Özcan S, Leong T and Johnston M. 1996 (c). Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription. *Mol Cell Biol.* **16**: 6419-26.
- Paulsen IT, Sliwinski MK, Nelissen B, Goffeau A and Saier MH, Jr. 1998. Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **430**: 116-25.
- Perea J, Gancedo, C. 1978. Glucose Transport in a Glucosephosphate Isomeraseless Mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Microbiology.* **1**: 209-11.
- Peringer P, Blachere H, Corrieu G and Lane AG. 1973. Mathematical model of the kinetics of growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng Symp.* **0**: 27-42.
- Petit T, Diderich JA, Kruckeberg AL, Gancedo C and Van Dam K. 2000. Hexokinase regulates kinetics of glucose transport and expression of genes encoding hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **182**: 6815-8.
- Prior C, Fukuhara H, Blaisonneau J and Wesolowski-Louvel M. 1993. Low-affinity Glucose Carrier Gene *LGT1* of *Saccharomyces cerevisiae*, a Homologue of the *Kluyveromyces lactis* *RAG1* gene. *Yeast.* **9**: 1373-77.
- Ramos J and Cirillo VP. 1989. Role of cyclic-AMP-dependent protein kinase in catabolite inactivation of the glucose and galactose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **171**: 3545-8.
- Randez-Gil F, Herrero P, Sanz P, Prieto JA and Moreno F. 1998 (a). Hexokinase PII has a double cytosolic-nuclear localisation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **425**: 475-8.
- Randez-Gil F, Sanz P, Entian KD and Prieto JA. 1998 (b). Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. *Mol Cell Biol.* **18**: 2940-8.
- Reifenberger E, Boles E and Ciriacy M. 1997. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur J Biochem.* **245**: 324-33.

- Reifenberger E, Freidel K and Ciriacy M. 1995. Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Mol Microbiol.* **16**: 157-67.
- Rep M, Krantz M, Thevelein JM and Hohmann S. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem.* **275**: 8290-300.
- Rizzi M, Baltes M, Theobald U and Reuss M. 1997. *In vivo* analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: II. mathematical model. *Biotechnol Bioeng.* **55**: 592-608.
- Rizzi M, Theobald U, Querfurth E, Rohrhirsch T, Baltes M and Reuss M. 1996. *In vivo* investigation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng.* **49**: 316-27.
- Rolland F, Winderickx J and Thevelein JM. 2002. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research.* **1457**: 1-19.
- Romano AH. 1982. Facilitated Diffusion of 6-Deoxy-D-Glucose in Bakers' Yeast: Evidence Against Phosphorylation-Associated Transport of Glucose. *J Bacteriol.* **152**: 1295-7.
- Rose M, Albig W and Entian KD. 1991. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinases PI and PII. *Eur J Biochem.* **199**: 511-18.
- Sanz P, Alms GR, Haystead TA and Carlson M. 2000. Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol Cell Biol.* **20**: 1321-8.
- Schaaff I, Heinisch J and Zimmermann FK. 1989. Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. *Yeast.* **5**: 285-90.
- Schertler GF and Hargrave PA. 2000. Preparation and analysis of two-dimensional crystals of rhodopsin. *Methods Enzymol.* **315**: 91-107.
- Schmidt MC, McCartney RR, Zhang X, Tillman TS, Solimeo H, Wolf S, Almonte C and Watkins SC. 1999. Std1 and Mth1 proteins interact with the glucose sensors to control glucose-regulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **19**: 4561-71.
- Schuddemat J, van den Broek PJ and van Steveninck J. 1988. The influence of ATP on sugar uptake mediated by the constitutive glucose carrier of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* **937**: 81-7.
- Schulte F, Wiczorke R, Hollenberg CP and Boles E. 2000. The HTR1 gene is a dominant negative mutant allele of MTH1 and blocks Snf3- and Rgt2-dependent glucose signaling in yeast. *J Bacteriol.* **182**: 540-2.

- Skowyra D, Craig KL, Tyers M, Elledge SJ and Harper JW. 1997. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell*. **91**: 209-19.
- Smits H-P, Hauf J, Müller S, Hogley TJ, Zimmermann FK, Hahn-Hägerdal B, Nielsen J and Olsson L. 2000. Simultaneous overexpression of enzymes of the lower part of glycolysis can enhance the fermentative capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **16**:
- Smits H-P, Smits GJ, Postma PW, Walsh MC and Van Dam K. 1996. High-affinity Glukose Uptake in *Saccharomyces cerevisiae* is not Dependent on the Presence of Glucose-Phosphorylating Enzymes. *Yeast*. **12**: 439-447.
- Snoep JL, Yomano LP, Westerhoff HV and Ingram LO. 1995. Protein burden in *Zymomonas mobilis*: negative flux and growth control due to overproduction of glycolytic enzymes. *Microbiol*. **141**: 2329-37.
- Stagljar I, Korostensky C, Johnsson N and te Heesen S. 1998. A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**: 5187-92.
- Stapleton D, Gao G, Michell BJ, Widmer J, Mitchelhill K, Teh T, House CM, Witters LA and Kemp BE. 1994. Mammalian 5'-AMP-activated protein kinase non-catalytic subunits are homologs of proteins that interact with yeast Snf1 protein kinase. *J Biol Chem*. **269**: 29343-6.
- Teusink B, Diderich JA, Westerhoff HV, van Dam K and Walsh MC. 1998. Intracellular glucose concentration in derepressed yeast cells consuming glucose is high enough to reduce the glucose transport rate by 50%. *J Bacteriol*. **180**: 556-62.
- Theobald U, Mailinger W, Reuss M and Rizzi M. 1993. *In vivo* analysis of glucose-induced fast changes in yeast adenine nucleotide pool applying a rapid sampling technique. *Anal Biochem*. **214**: 31-7.
- Treitel MA and Carlson M. 1995. Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**: 3132-6.
- Trueman LJ. 1995. Heterologous expression in yeast. *Methods Mol Biol*. **49**: 341-54.
- Tu J and Carlson M. 1994. The GLC7 type 1 protein phosphatase is required for glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **14**: 6789-96.
- Turkel S and Bisson LF. 1999. Transcription of the HXT4 gene is regulated by Gcr1p and Gcr2p in the yeast *S. cerevisiae*. *Yeast*. **15**: 1045-57.
- Van Belle D and Andre B. 2001. A genomic view of yeast membrane transporters. *Curr Opin Cell Biol*. **13**: 389-98.

- van Steveninck J. 1969. The mechanism of transmembrane glucose transport in yeast: evidence for phosphorylation, associated with transport. *Arch Biochem Biophys.* **130**: 244-52.
- Verduyn C, Postma E, Scheffers WA and Van Dijken JP. 1992. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous- culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast.* **8**: 501-17.
- Verduyn C, Postma E, Scheffers WA and van Dijken JP. 1990. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J Gen Microbiol.* **136**: 395-403.
- Verwaal R, Paalman JW, Hogenkamp A, Verkleij AJ, Verrips CT and Boonstra J. 2002. HXT5 expression is determined by growth rates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **19**: 1029-38.
- Walsh MC, Smits HP, Scholte M and van Dam K. 1994. Affinity of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated during growth on glucose. *J Bacteriol.* **176**: 953-8.
- Walsh MC, Smits HP and van Dam K. 1994. Respiratory inhibitors affect incorporation of glucose into *Saccharomyces cerevisiae* cells, but not the activity of glucose transport. *Yeast.* **10**: 1553-8.
- Wendell DL and Bisson LF. 1994. Expression of high-affinity glucose transport protein Hxt2p of *Saccharomyces cerevisiae* is both repressed and induced by glucose and appears to be regulated posttranslationally. *J Bacteriol.* **176**: 3730-7.
- Wendell DL and Bisson LF. 1993. Physiological characterization of putative high-affinity glucose transport protein Hxt2 of *Saccharomyces cerevisiae* by use of anti- synthetic peptide antibodies. *J Bacteriol.* **175**: 7689-96.
- Wieczorke R, Krampe S, Weierstall T, Freidel K, Hollenberg CP and Boles E. 1999. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **464**: 123-8.
- Wilkins PO and Cirillo VP. 1965. Sorbose counterflow as a measure of intracellular glucose in baker's yeast. *J Bacteriol.* **90**: 1605-10.
- Ye L, Berden JA, van Dam K and Kruckeberg AL. 2001. Expression and activity of the Hxt7 high-affinity hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **18**: 1257-67.

## 7 Originalartikel

### Publikation I

Buziol S, Becker J, Baumeister A, Jung S, Mauch K, Reuss M and Boles E. 2002. Determination of *in vivo* kinetics of the starvation-induced Hxt5 glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research. **2(3)**: 283-91.

### Publikation II

Buziol S, Bashir I, Baumeister A, Claaßen W, Noisommit-Rizzi N, Mailinger W and Reuss M. 2002. A new bioreactor coupled rapid stopped-flow sampling technique for measurements of metabolite dynamics on a subsecond time scale. Biotechnol Bioeng. **80(6)**: 632-36.

### Publikation III

Buziol S, Warth L, Magario I, Freund A and Reuss M. Dynamic response of the expression of transport proteins Hxt1, Hxt5 and Hxt7 in *Saccharomyces cerevisiae* to perturbations in the extracellular glucose concentration. Yeast. submitted

### Publikation IV

Mauch K, Buziol S, Schmid J and Reuss M. 2002. Computer aided design of metabolic networks. Reviewed paper. Chemical Process Control VI. AIChE Symposium Series No. 326. **98**: 82-91

## Publikation I

Buziol S, Becker J, Baumeister A, Jung S, Mauch K, Reuss M and Boles E. 2002. Determination of *in vivo* kinetics of the starvation-induced Hxt5 glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research. **2(3)**: 283-91.

**Determination of *in vivo* kinetics of the starvation-induced Hxt5  
glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae***

**Stefan Buziol<sup>(1)</sup>, Jessica Becker<sup>(2)</sup>, Anja Baumeister<sup>(3)</sup>, Susanne Jung<sup>(3)</sup>, Klaus Mauch<sup>(1)</sup>,  
Matthias Reuss<sup>(1)</sup> and Eckhard Boles<sup>(2)\*</sup>**

<sup>(1)</sup> Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart, Allmandring 31, D-70569 Stuttgart,  
Germany

<sup>(2)</sup> Institut für Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstr. 1, Geb.  
26.12.01, D-40225 Düsseldorf, Germany

<sup>(3)</sup> Fachgebiet Biotechnologie, Universität Hohenheim, Emil-Wolff-Str. 14, D-70599 Stuttgart,  
Germany

## **Abstract**

We have investigated the role and the kinetic properties of the Hxt5 glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. The *HXT5* gene was not expressed during growth of the yeast cells in rich medium with glucose or raffinose. However, it became strongly induced during nitrogen or carbon starvation. We have constructed yeast strains constitutively expressing only Hxt5, Hxt1 (low affinity) or Hxt7 (high affinity), but no other glucose transporters. Aerobic fed-batch cultures at quasi steady-state conditions, and aerobic and anaerobic chemostat cultures at steady-state conditions of these strains were used for the estimation of the kinetic properties of the individual transporters under *in vivo* conditions, by investigating the dynamic responses of the strains to changes in extracellular glucose concentration. The  $K_M$ -value and the growth properties of the *HXT5* single expression strain indicate that Hxt5 is a transporter with intermediate affinity.

## **Keywords:**

*Saccharomyces cerevisiae*; glucose transport; sugar uptake; Hxt5; starvation; kinetic analysis

## 1 Introduction

Transport of glucose across the plasma membrane into the cell is the first step of glucose metabolism. *Saccharomyces cerevisiae* can deal with extremely broad ranges of glucose concentrations and glucose can be metabolised effectively at concentrations from higher than 1.5 M down to micromolar concentrations [1]. This implies the presence of a complex and highly regulated glucose uptake system.

The major glucose transporters of *S. cerevisiae* are encoded by genes *HXT1-4* and *HXT6-7* [2-4]. All of them are regulated by the kind and concentration of the carbon source [5]. Moreover, the kinetic parameters of the transporters as determined by zero *trans*-influx measurements with radioactively labelled glucose vary considerably, and the  $K_M$ -values for glucose have been determined to reach from 1.1 mM for Hxt7 to about 100 mM for Hxt1 [6, 7]. Deletion of all these genes together resulted in a strain nearly unable to take up glucose and to grow on it as the sole carbon source under laboratory growth conditions [8,9]. However, also all of the other yeast genes from *HXT8-17* (except for *HXT12*) and *HXT5* are able to mediate uptake of hexoses if overexpressed [10]. These observations suggest that most of the yeast Hxt proteins are able to transport hexoses but that some of them are only used under specific conditions and for specific purposes.

One of the hexose transporters in yeast whose physiological role is not yet clear is the Hxt5 protein. Recently, it has been suggested that Hxt5 may serve as a ‘reserve’ transporter in the initial uptake of glucose, when glucose is absent and becomes available again [7]. Most studies concerning microbial processes have analyzed cell metabolism during growth of the organisms. In their natural environment, however, microorganisms spend most of their time under conditions of no or very slow growth. Slow growth or stationary phase is usually due to severe limitation or starvation for several or specific nutrients. Here, we report that the *HXT5* gene becomes strongly expressed during starvation conditions.

In all previous studies, the kinetic parameters of glucose uptake have been investigated by zero *trans*-influx measurements with radioactively labelled glucose. This method uses yeast cells incubated in phosphate buffer, i.e. under *in vitro* conditions [6,7]. However, it is not clear how those conditions might influence the properties of the hexose transporters. Therefore, it is desirable to develop a method to study glucose uptake under *in vivo* conditions. Here, we describe a new approach to assess the kinetic properties of glucose transporters during growth of the yeast. We used the dynamic response to changes in extracellular glucose concentration of yeast strains expressing only individual hexose transporters for the estimation of their kinetic properties *in vivo*. With this approach we first confirmed the kinetic properties of Hxt1 and Hxt7 as measured under *in vitro* conditions. We then determined Hxt5 to be an intermediate-affinity glucose transporter *in vivo*.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Yeast strains and growth conditions

All yeast strains described in this work were derived from strain CEN.PK2-1C (*MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2*) or from the isogenic strain CEN.PK113-5D (*MATa ura3-52 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2*). The construction of the yeast strain EBY.VW4000 (*MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δmph2 Δmph3 Δstl1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2*) carrying multiple deletions of its hexose transporter genes (*HXT*) was described in [10]. Rich media were based on 1% yeast extract and 2% peptone (YP). Minimal media consisted of 0.17% Difco yeast nitrogen base without amino acids and ammonium (YNB), supplemented for auxotrophic requirements and with 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and various carbon sources. Yeast cells were grown aerobically at 30°C on a rotary shaker or on agar plates. Cell growth was monitored by measuring optical densities at 600 nm (OD<sub>600</sub>) or comparing growth of yeast colonies on agar plates.

### 2.2 Construction of yeast strains

#### 2.2.1 Genomic HA-tagging of *HXT5*

Three consecutive copies of a hemagglutinin (HA) epitop were fused in the genome to the carboxy-terminal end of the *HXT5* open reading frame (ORF) by using a modification of the PCR targeting technique [11]. First, the two primers HATAG-1 and HATAG-2 (Table 1), which contain a 16-bp complementary sequence at their 3' ends, were used in a PCR reaction to amplify each other. The resulting 134-bp fragment was cleaved with *XhoI* at one end and cloned between the *PvuII* and *SalI* restriction sites in front of the first *loxP* site of plasmid pUG6, resulting in plasmid pUG6-HA. This plasmid was then used as a template to generate by PCR, with primers J1-HX5HA and J2-HX5HA (Table 1) a DNA molecule consisting of a *3×HA-kanMX* marker cassette flanked by short homology regions to the end of the *HXT5* locus. The 1.7-kb PCR product was transformed into strain CEN.PK113-5D, selecting for resistance to G418 (200 mg l<sup>-1</sup>) on YPD agar plates, and used to replace the stop codon of *HXT5* by the *3×HA-kanMX* cassette. Thereby, the triple HA-epitop was fused in frame to the carboxy-terminal end of Hxt5, allowing to detect it with commercially available anti-HA antibodies. After transformation of this strain with plasmid pSH47, the *kanMX* marker was removed as described [11], resulting in strain JBY20. Yeast transformation was as described [12].

Table 1. Primers used in this work

HATAG-1	5'-GCCGGTGTGGATCCGG TTACCCATACGACGGTT CCAGACTACGCTGGTGCCTACCCCTTACGATGTCCCTG ATTACGCCTCTG GTACCCGCT-3'
HATAG-2	5'-CCCTCGAGTCATTAGGCGG CGTAGTCAGGAA CATCGTATGGGTAA GCGGTACCCAGAGGGCG-3'
J1-HX5HA	5'-GATCCGAGAC CATTTTATAA AAGGATGTTT ACTAAAGAAA AAGCCGGTGC TGGATCCGGT-3'
J2-HX5HA	5'-GAACATTGCA AGTATGCGAA AATAGTTGAT CCTACACTAC AAGAGAGCAT AGGCCACTAG TGGATCTG-3'
S1-LH514	5'- ATGTCGGAACCTTGAA AACGCTCATCAAG CCCCTTGGAAAGGT CTGCTACTTTCGTACGCT GCAGGTCGAC-3'
S2-HX514	5'-TTAGATC ATCAGCGTTGTAG TCAGTACCTCTCTTGT TGGTGGAA CCA AG GCATAGG CCACTAGTGGATCTG-3'
PROHX17-1	5'-GGACTAGTGA TATCTCTCGT AGGAACAATT TCGG-3'
PROHX17-2	5'-GGACTAGTTG CTCTGCAATA GCAGCGTC-3'
INTPH7-1	5'-CCTATTCGTC ATCGCAGACA GCCTTCATCT TCTCGAGATA ACACCTGGAG CGCGCGTTTC GGTGATGACG-3'
INTPH7-2	5'-AAGTTTCTTT GTCTCCGTCC CACTCAAACCT TCTGAGAAACA AATGATCCAT TTTTGTGATTA AAA TTA AAAA AAC-3'
C1-IHXT1	5'-CAAAGAATAA ACACAAA AAC AAAAGTTTT TTTAATTTA ATCAAAAAT GAATTCAACTCCCGATCTAATA-3'
C4-IHXT1	5'-AAGTTTCTTT GTCTCCGTCC CACTCAAACCT TCTGAGAAACA AATGATCCCT TGGTGAAGGT CAAGAACTAG C-3'
C1-IHXT7	5'-CCTGCGTGT CTCTGAGGT TC-3'
C4-IHXT7	5'-TTTGTAGACG TGGTCTGCA GGCA-3'
I-KURA31	5'-CAAAGAATAA ACACAAA AAC AAAAGTTTT TTTAATTTA ATCAAAAAT GTCCACAAA TCATATACCA GTAG-3'
I-KURA32	5'-GCACAAAATTA GAGCGTGATC ATGAATTAAT AAAAGTGTTC GCAAATTAAT GGGGAGCGCT GATTCCTTT TG-3'
C1-IHXT5	5'-CAAAGAATAA ACACAAA AAC AAAAGTTTT TTTAATTTA ATCAAAAAT GTCGGAACTT GAAAACGCTC-3'
C4-IHAH5	5'-CAAATGCACA AATTAGAGCG TGATCATGAA TTAATAAAAAG TGTTCCGCAA TTAAGCGTAG TCTGGAACGT CGTATGGGTA ACCACCTTTT TCTTTAGTGA ACATCCTTTT ATAAAA-3'

### 2.2.2 Genomic *HXT5* promoter-*lacZ* fusion

Genomic replacement of the *HXT5-1-4* gene cluster in strain CEN.PK113-5D by a PCR-amplified *lacZ-kanMX* reporter cassette was used to fuse the promoter and the first 48 nucleotides of the truncated *HXT5* ORF to the *Escherichia coli lacZ* gene [13]. For PCR amplification of the *lacZ-kanMX* reporter cassette, plasmid pUG6lacZ [13] and the primers S1-LH514 and S2-HX514 (Table 1) were used.

### 2.2.3 *HXT1*, 5 and 7 single expression strains

To determine the kinetic properties of Hxt5 and to compare them with those of Hxt1 and Hxt7, the *HXT1*, 5 and 7 genes were constitutively expressed in strain EBY.VW4000 which is deleted for all its hexose transporters and unable to take up hexoses [10]. For this, a 392-bp *HXT7* promoter fragment was integrated into the genome of strain EBY.VW4000, into the former *HXT3-6-7* gene cluster region, by using a modification of the PCR targeting technique, resulting in a very strong and constitutive *HXT7 promoter-terminator* expression cassette [14]. Part of the *HXT7* promoter together with part of the *HXT7* coding region from -392 to +30 was amplified by PCR with primers PROHXT7-1 and PROHXT7-2 (Table 1), and plasmid p21-PST [8] as a template. The PCR product was cleaved with *SpeI* at both ends and cloned in the correct orientation into the *SpeI* site of plasmid pUG6 behind the second *loxP* site, resulting in plasmid pUG6-kPHXT7. This plasmid was then used as a template to generate by PCR, with primers INTPH7-1 and INTPH7-2, a DNA molecule consisting of a *kanMX-HXT7p* marker cassette flanked by short homology sequences to the *HXT3* promoter (-770 to -720) and *HXT7* terminator regions. The 2.4-kb PCR product was transformed into strain EBY.VW4000 (whose *HXT3-6-7* gene cluster is replaced by a *loxP* site), selecting for resistance to G418 (200 mg l<sup>-1</sup>) on YPMaltose agar plates, and used to replace the *HXT3 promoter-loxP* region by the *kanMX-HXT7p* cassette. After transformation with plasmid pSH47, the *kanMX* marker was removed as described [11], resulting in strain EBY.VW4002.

The *HXT1* gene was amplified by PCR from plasmid pTHXT1-1 [6] with primers C1-IHXT1 and C4-IHXT1 (Table 1). The *HXT7* gene was amplified by PCR from plasmid p21-PST with primers C1-IHXT7 and C4-IHXT7. Both PCR products containing short homology sequences to the *HXT7 promoter-terminator* expression cassette of strain EBY.VW4002 were transformed into this strain, selecting for growth on YPGlucose agar plates. Integration into the genomic expression cassette by homologous recombination resulted in strains JBY01 (*HXT1*<sup>+</sup>) and JBY02 (*HXT7*<sup>+</sup>). To construct an FOA(5-fluoroorotic acid)-counterselectable marker expression cassette in strain EBY.VW4002, the *Kluyveromyces lactis URA3* ORF was PCR-amplified from strain MS7-62 (gift of C. Falcone, Rome, Italy) with primers I-KURA31 and I-KURA32 (Table 1), resulting in a DNA-fragment with the *KIURA3* ORF flanked by short homology regions to the *HXT7* promoter and *HXT7* terminator. The DNA fragment was transformed into strain JBY02 selecting for growth on a synthetic medium without uracil and with maltose as the carbon source, resulting in strain JBY15 containing a genomically integrated *HXT7 promoter*<sup>(-392 - +1)</sup> – *KIURA3* – *HXT7 terminator* expression cassette.

The *HXT5* gene was amplified by PCR with plasmid p10 [8] and primers C1-IHXT5 and C4-IHAH5 (Table 1), resulting in a DNA fragment containing the *HXT5* ORF fused to an HA-epitop sequence and flanked by short homology regions to the *HXT7* promoter and *HXT7*

terminator. This DNA fragment was transformed into strain JBY15, selecting for growth on synthetic medium with 0.2% glucose and 1 mg ml<sup>-1</sup> FOA. The resulting strain expressing an Hxt5-HA fusion protein behind the strong *HXT7* promoter fragment was named JBY19.

### 2.3 Preparation of membrane fractions and Western blot analysis

Preparation of yeast membrane fractions and Western blot analysis were done essentially as described in [15]. Anti-HA high-affinity antiserum (Roche) was diluted 1:1000. Sheep anti-rat peroxidase conjugate (Roche), diluted 1:10000, was used as secondary antibody. The glucose transporters were visualized using Super Signal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce).

### 2.4 Fed-batch cultivation

The different mutants of *S. cerevisiae* (*HXT* single expression strains JBY19 (*HXT5*<sup>+</sup>), JBY02 (*HXT7*<sup>+</sup>), JBY01 (*HXT1*<sup>+</sup>) and CEN.PK2-1C (wild-type)) were grown in fed-batch culture under glucose (wild-type) or maltose (mutants) limitation at 30°C in a stirred tank bioreactor (Biostat E, Braun Biotech International, Melsungen, Germany). A controlled exponential feeding rate led to a constant specific growth rate ( $\mu$ ) of  $\mu^{\text{SP}} = 0.1 \pm 0.009 \text{ h}^{-1}$ :

$$F = \left( \frac{\mu^{\text{SP}}}{Y_{X/S}} + m_s \right) \frac{(c_X^0 \cdot V_L^0) \cdot e^{(\mu^{\text{SP}} \cdot t)}}{c_S^0} \quad (1)$$

with  $c_X^0$ ,  $V_L^0$  initial biomass concentration and liquid volume, respectively;  $c_S^0$  concentration of glucose/maltose in the feed = 65 g l<sup>-1</sup>;  $m_s$  maintenance coefficient = 0.04 h<sup>-1</sup> [16],  $Y_{X/S}$  biomass yield = 0,44 g dry weight (g DW) (g glucose)<sup>-1</sup> and  $Y_{X/S} = 0,4 \text{ g DW (g maltose)}^{-1}$  (the yield coefficients were determined in the first fed-batch experiments). The outflow was kept at 1 vvm and the pH was controlled at 5.0 by addition of 2 M NaOH. The oxygen concentration was not allowed to decline under 40 % of air saturation. Maltose was used as sole source of carbon and energy to guarantee standardized growth rates independent of the different glucose transporters.

The concentrations of the components in the synthetic mineral medium were precalculated from elementary balancing [17] for production of 15 g DW l<sup>-1</sup> as described in [18]. The bioreactor was connected to an exhaust air analysis device consisting of a paramagnetic oxygen analyzer (Oxygor 6N) and an infrared CO<sub>2</sub> analyzer (Unor 6N), both from Maihak (Hamburg, Germany). For data acquisition and feeding of glucose or maltose during the fed-batch operation the bioreactor was connected to a personal computer equipped with a data acquisition device (Burr Brown PCI 20098C-1, Intelligent Instrumentation, Filderstadt, Germany).

## 2.5 Chemostat cultivation

### 2.5.1 Aerobic cultivation

*S. cerevisiae* JBY19 (*HXT5* single expression strain) was grown in continuous chemostate culture ( $D = 0.1 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$ ) under glucose limitation at 30°C in a stirred tank bioreactor (KLF2000, Bioengineering, Wald, Switzerland) with a working volume of 1.5 liters. The control of pH, airflow and foam prevention was carried out as described above. The composition of the synthetic mineral medium was balanced for a biomass concentration of 15 g DW l<sup>-1</sup> as described above, with the exception of the glucose concentration in the feeding medium, which was here 30 g glucose l<sup>-1</sup>.

### 2.5.2 Anaerobic cultivation

*S. cerevisiae* JBY19 (*HXT5* single expression strain) was also grown in anaerobic continuous chemostate culture ( $D = 0.07 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$ ) under glucose limitation at 30°C in a stirred tank bioreactor (laboratory glass fermentor 2 l, Hans, W., Schmidt, Mainz, Germany) with a working volume of 1.5 liters. The pH control, and foam prevention was carried out as described above.

The composition of the synthetic mineral medium was balanced for a biomass concentration of 2.5 g DW l<sup>-1</sup> as described above with the exception of the glucose concentration in the feeding medium which was 25 g glucose l<sup>-1</sup> in these experiments. For anaerobic growth ergosterine, oleic acid and tween 80 was added as discribed in [18].

## 2.6 Glucose pulse experiments

To determine the kinetic parameters of the individual mutants, pulse experiments were carried out. Starting from steady-state or quasi steady-state (fed-batch) conditions a pulse of concentrated glucose was injected into the bioreactor with a syringe. Samples were taken using a vacuum driven sampling device in combination with rapid kryofiltration (-20°C) [19]. Glucose was assayed by the glucose dehydrogenase (EC 1.1.47) method using the Granutest 250 test kit (Merck, Darmstadt, Germany) and mutarotase. Ethanol was determined with GC (type 5890, Series II with FID-detector, Hewlett Packard, Avondale, IL, USA; column: FS-OV-1-CB, Chromat. Service, Langerwehe, Germany) using 1-butanol as internal standard.

## 2.7 Kinetic analysis

For estimation of the kinetic parameters measured glucose concentrations were compared with the numerical integration of the dynamic balance equation, for the fed-batch processes:

$$\frac{dc_S}{dt} = \frac{F}{V_F} (c_S^0 - c_S) - q_S^{\max} \frac{c_S}{K_M + c_S} c_X \quad (2)$$

and for the chemostats:

$$\frac{dc_s}{dt} = D(c_s^0 - c_s) - q_s^{\max} \frac{c_s}{K_M + c_s} c_x \quad (3).$$

Integration was performed with the numerical integrator ACSL (Version 11.5.3, Advanced Continuous Simulation Language, Mitchel and Gauthier). For estimation of the kinetic parameters the optimization package OptdesX (Version 2.0.4, Design Synthesis, Simulated annealing algorithm) was used. Minimization of the identification functional

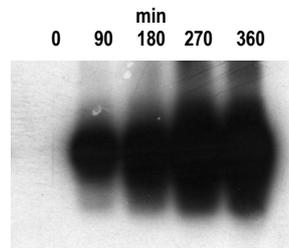
$$J(\underline{P}) = \sum_{k=1}^N \left[ \frac{c_s^{\text{meas.}}(t_k) - c_s^{\text{pred.}}(t_k)}{c_s^{\text{meas.}}(t_k)} \right]^2 \quad (4)$$

( $t_k$  being the time of sampling,  $N$  the number of samples) leads to the estimates of  $K_M$  and  $q_s^{\max}$ . Errors were less than 10%.

### 3 Results and discussion

#### 3.1 The Hxt5 protein appears during nitrogen starvation.

Genome-wide transcriptional analyses using DNA microarrays and Northern blot experiments have previously shown that the yeast *HXT5* gene is repressed by glucose, and is induced by glucose depletion, by aerobiosis in glucose-limited steady-state chemostat cultures, by osmotic shock, during growth on non-fermentable carbon sources and during sporulation [7, 20-23]. To analyse the expression profile of Hxt5 at the protein level, a triple HA-epitop sequence was fused in frame to the end of the genomic *HXT5* ORF by using a modification of the PCR targeting technique [11]. Cells of this strain (JBY20) were grown in YP medium with 3.5% raffinose into the exponential growth phase, and Western blot analysis with HA-specific antibodies was used to detect the Hxt5 protein in a membrane-enriched fraction of yeast cell extracts. No Hxt5 protein was detectable under such conditions (Fig. 1). However, after shifting the yeast cells to a medium without any nitrogen source, the amount of Hxt5 protein increased considerably during 6 h (Fig. 1).



**Fig. 1. Induction of Hxt5 expression during nitrogen starvation. The strain JBY20 containing an HA-tagged *HXT5* allele was grown in YP medium with 3.5% raffinose into the exponential growth phase. After washing the cells once in YNB medium without carbon and nitrogen source, the cells were shifted to YNB medium with 5% glucose and without nitrogen source. At the indicated times, cells were harvested, membrane fractions were prepared, and the proteins were subjected to Western analysis with anti-HA antibodies.**

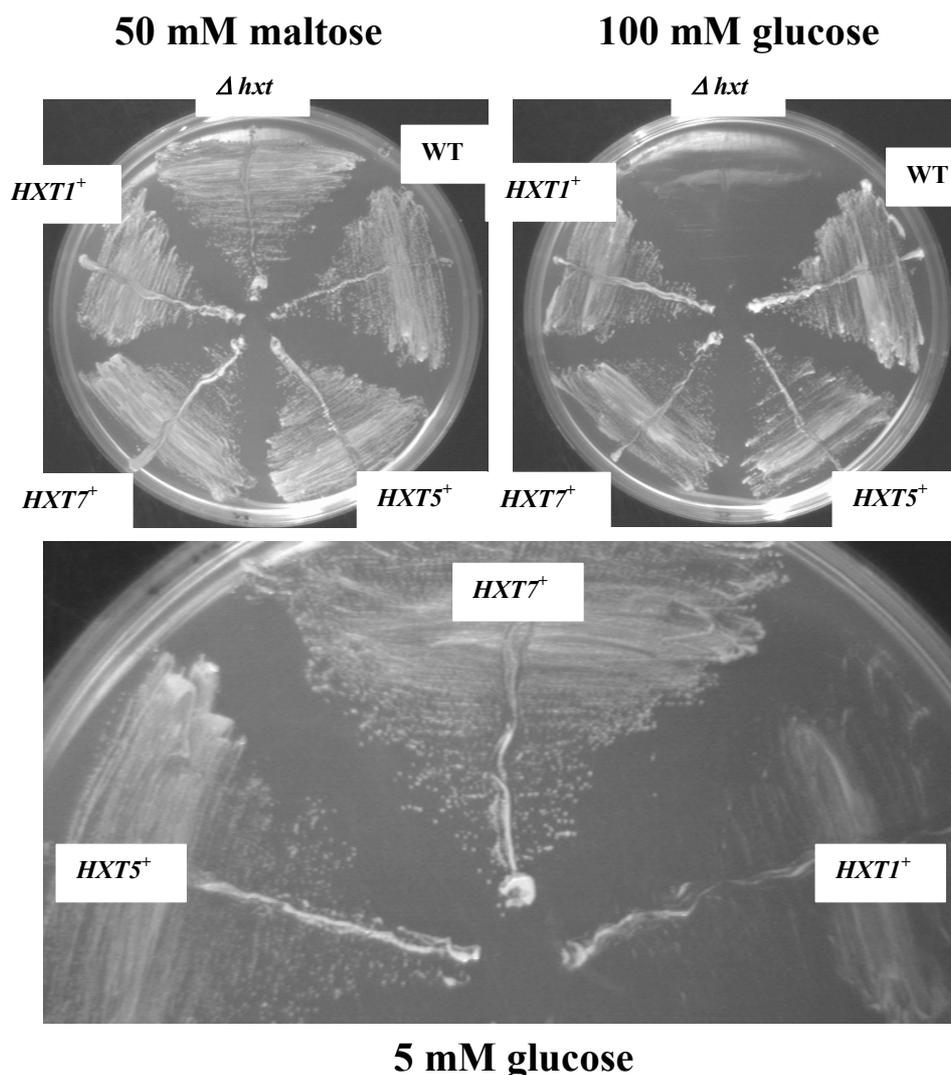
### 3.2 The *HXT5* gene is induced under starvation conditions.

To analyse whether this strong increase in the amount of Hxt5 protein during nitrogen starvation is due to transcriptional induction, a genomic replacement of the *HXT5-1-4* gene cluster in strain CEN.PK113-5D by a PCR-amplified *lacZ-kanMX* reporter cassette was used to fuse the promoter and the first 48 nucleotides of the truncated *HXT5* ORF to the *E. coli lacZ* gene. Measuring of  $\beta$ -galactosidase activities revealed that the *HXT5* promoter is strongly induced by nitrogen starvation. During exponential growth in YNB medium with 3.5% glucose  $\beta$ -galactosidase activities were 4 mU (mg protein)<sup>-1</sup>, whereas they reached 706 mU (mg protein)<sup>-1</sup> 24 h after a shift of the cells to YNB medium with 3.5% glucose and without any nitrogen source. Moreover, the *HXT5* promoter turned out to be strongly induced also by carbon starvation: 24 h after a shift of the yeast cells to YNB medium with ammonium sulfate and without any carbon source,  $\beta$ -galactosidase activities reached 556 mU (mg protein)<sup>-1</sup> compared to 4 mU (mg protein)<sup>-1</sup> during exponential growth in YNB medium with 3.5% glucose.

### 3.3 Construction and growth of *HXT* single expression strains.

To determine the kinetic properties of Hxt5, the *HXT5* gene was constitutively expressed behind an *HXT7* promoter fragment in the genome of strain EBY.VW4000 which is deleted for all its hexose transporters and unable to take up hexoses [10]. For a strong and constitutive expression, an *HXT7 promoter*<sup>(-392 - +1)</sup> - terminator expression cassette was first integrated into the genome of strain EBY.VW4000 ( $\Delta hxt$ ). The cassette was modified into an FOA-counterselectable marker expression cassette by integrating the *K. lactis URA3* gene. Yeast strains expressing a functional *URA3* gene cannot grow in the presence of FOA. This strain could be used to integrate the *HXT5* ORF behind the *HXT7* promoter fragment after transformation and homologous recombination selecting for growth on a glucose medium containing FOA. Similarly, the *HXT1* and the *HXT7* ORFs were also individually expressed behind the *HXT7* promoter fragment in the same background and compared to the *HXT5* single expression strain.

Growth of the various strains were compared on YNB agar plates supplemented with different kinds and concentrations of carbon sources (Fig. 2). Whereas no differences in growth between the strains could be seen on a maltose medium, the EBY.VW4000 parent strain did not grow on any media containing glucose as a carbon source, irrespective of the concentration [10]. As compared to the other strains, the *HXT1* strain (JBY01) showed only slow growth on a 5 mM glucose medium (Fig. 2). In contrast, with glucose concentrations between 100 and 250 mM, growth was similar to the wild-type strain. This is a consequence of the very low affinity ( $K_M$  (glucose)  $\approx$  100 mM) of the Hxt1 glucose transporter [6]. Growth of the *HXT7* and *HXT5* strains (JBY02 and JBY19) was comparable to the wild-type strain on all different glucose concentrations (Fig. 2), confirming the high/intermediate affinity of the transporters for glucose [6, 7].



**Fig. 2. Growth of various *HXT* single expression strains on different sugar concentrations.** Cells of strains EB.Y.VW4000 ( $\Delta hxt$ ), CEN.PK2-1C (wild-type), JBY19 ( $HXT5^+$ ), JBY02 ( $HXT7^+$ ) and JBY01 ( $HXT1^+$ ) were streaked on YNB agar plates with 50 mM maltose or with 5 mM or 100 mM glucose and incubated at 30°C for 3 days. Growth was monitored by comparing colony sizes after 1, 2 and 3 days.

### 3.4 Kinetic characterisation of the glucose transport mutants.

The kinetics of glucose uptake were compared between the wild-type strain and the individual *HXT* single expression strains. In previous studies, the kinetic parameters of glucose uptake have been investigated by zero *trans*-influx measurements with radioactively labelled glucose and with yeast cells incubated in phosphate buffer, i.e. under *in vitro* conditions [6, 7]. In this study, the kinetic parameters of different glucose transporters were estimated by investigating the dynamic response of *HXT* single expression strains to changes in extracellular glucose concentration under *in vivo* conditions. For this purpose, a concentrated glucose solution was injected into carbon-limited yeast fed-batch cultures at quasi steady-state conditions. Samples were taken from the bioreactor using a vacuum-driven sampling device and extracellular glucose was measured enzymatically after a rapid kryofiltration step. For estimation of the

kinetic parameters measured glucose concentrations were compared with the numerical integration of the dynamic balance equation. Minimization of an identification functional leads to the estimates of  $K_M$  and  $q_S^{\max}$ .

The implicit assumption of this approach is that glucose transport has the overwhelming control strength upon the consumption at the experimental conditions of interest. This assumption is, first of all, supported by several indications from the literature [24]. The important hypothesis is furthermore sustained by a comprehensive approach, consisting of the dynamic modelling of the central metabolism of *S. cerevisiae* under aerobic [19, 25, 26] and anaerobic [27, 28] growth conditions. The dynamic model rests upon the experimental observations of intracellular metabolites in response to a stimulus in the form of the extracellular glucose concentration. The most important results of this analysis is summarised in Fig. 3, showing the hierarchy of flux control coefficients for sugar uptake in response to fractional increases of the enzyme activities involved in the path from glucose to ethanol. The flux control coefficients were estimated from the dynamic model according to the approach suggested by Mauch et al. [29]. Since only a subset of the flux control coefficients is shown in Fig. 3 (excluded, for example, are the coefficients of enzymes involved in the pentose phosphate shunt), flux control coefficients of this subset do not necessarily sum up to one. From this hierarchy of sensitivities it can be concluded that the enzyme responsible for the transport of glucose via the cell membrane exerts the overwhelming control strength on the flux. Nevertheless, it cannot be totally excluded that the addition of glucose to the cultures causes a slight shift of the flux control to the glycolytic enzymes downstream of the transporter.

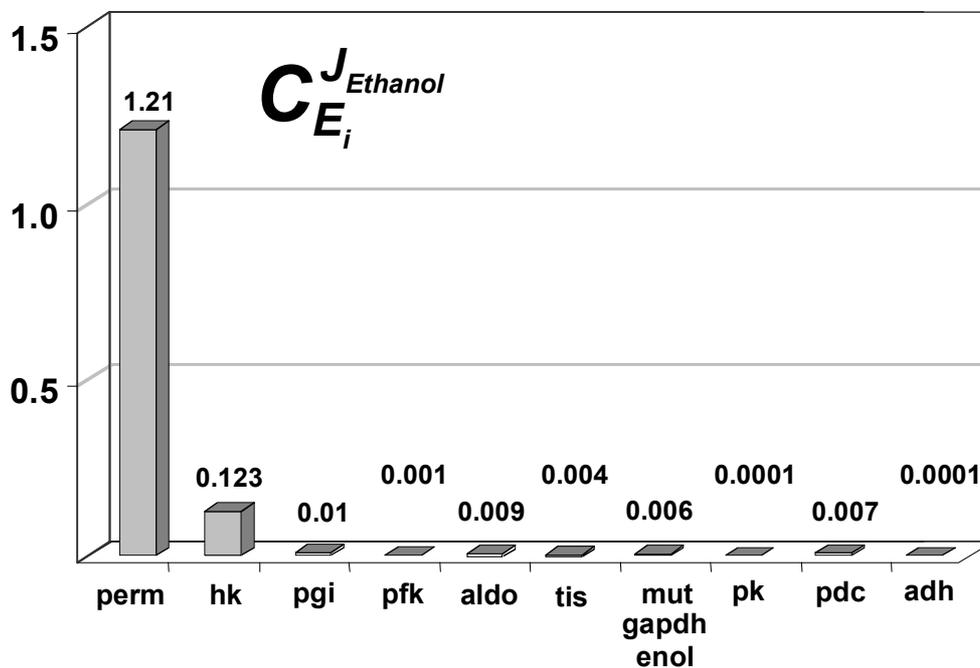
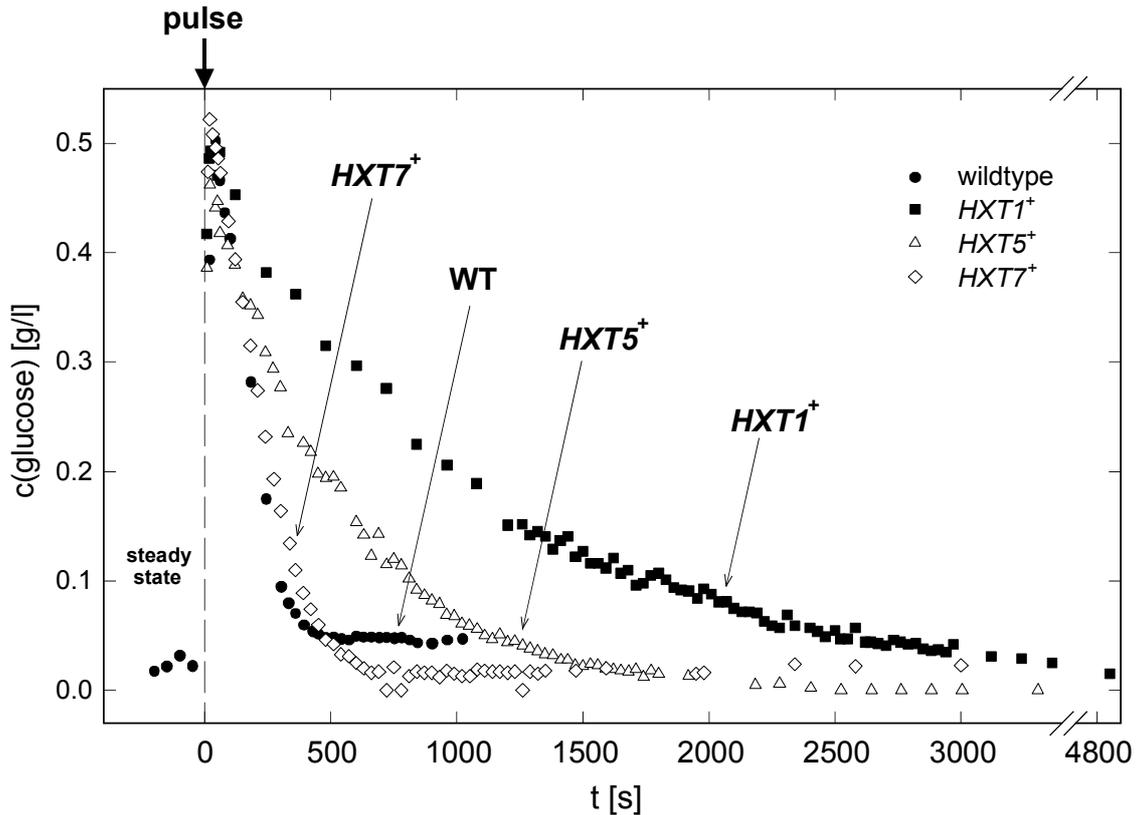


Fig. 3. Distribution of flux control coefficients on ethanol formation route. Enzymes involved: Hexose transporter (perm), hexokinase (hk), phosphoglucose isomerase (pgi), phosphofruktokinase (pfk), aldolase (aldo), triose phosphate isomerase (tis), phosphoglyceromutase (mut), gap dehydrogenase (gapdh), enolase (enol), pyruvate kinase (pk), pyruvatdecarboxylase (pdc), and alcohol dehydrogenase (adh).

The described experiments and estimations of the kinetic parameters were carried out with the *HXT* single expression strains JBY19 (*HXT5*<sup>+</sup>), JBY02 (*HXT7*<sup>+</sup>), JBY01 (*HXT1*<sup>+</sup>) and CEN.PK2-1C (wild-type). Fig. 4 shows the comparison of the time courses for extracellular glucose after a pulse of glucose for the different strains. Already at first glance, the pronounced differences in the shape of the curves reflecting the transient response seem to support the well-known distinction between the high-affinity (*Hxt7*) and low-affinity (*Hxt1*) transporter. From an initial data inspection, *Hxt5* appears to be a transporter with intermediate affinity.



**Fig. 4.** Changes in the levels of glucose during quasi steady-state conditions (fed-batch) and after a glucose pulse ( $\downarrow$ ). Comparison of the *HXT* single expression strains JBY19 (*HXT5*<sup>+</sup>), JBY02 (*HXT7*<sup>+</sup>), JBY01 (*HXT1*<sup>+</sup>), and CEN.PK2-1C (WT = wild type).

Applying the parameter estimation procedure described above provided the following  $K_M$  values for the high-affinity transport systems in CEN.PK2-1C (wild-type) and single expression strain JBY02 (*HXT7*<sup>+</sup>):

$$(K_M)_{\text{wild-type}} = 0.4 \text{ mM}$$

and

$$(K_M)_{\text{HXT7}} = 1.1 \text{ mM} .$$

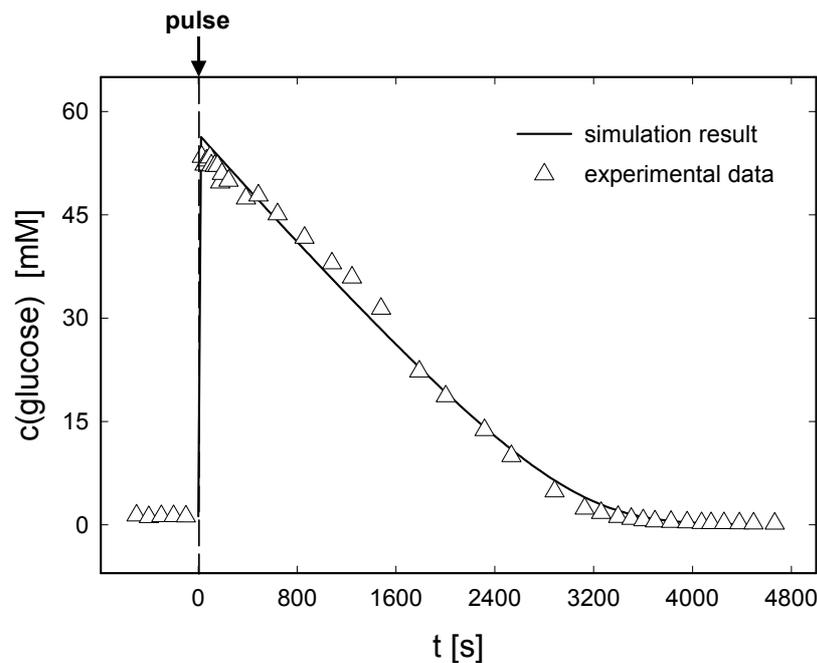
The value obtained for the single expression strain JB02 (*HXT7*<sup>+</sup>) is in excellent agreement with the  $K_M$  values reported in the literature [6], which were obtained with the aid of zero *trans*-influx measurements. This result may also serve as a further support of the hypothesis

of the overwhelming control of glucose flux through the transporter and justify the strategy of the simple stimulus-response method. An interesting phenomenon is, however, related to the lower  $K_M$  value for the wild-type compared to the single expression strain JB02 ( $HXT7^+$ ). A possible explanation can be found from the investigations of Petit et al. [30] showing that the Hxt2 transporter is also expressed at glucose-limited growth conditions. For the hexose transporter Hxt2 a  $K_M$  value of 10 mM for cells growing on high glucose concentrations has been estimated, and a biphasic uptake kinetics with a high-affinity component ( $K_M = 1.5$  mM) after growing on low glucose concentrations [6]. Therefore, the affinity of Hxt2 seems to be modulated dependent on the external glucose concentration. This lower  $K_M$  value may mask the slightly higher value of the high-affinity transporter Hxt7 expressed at the glucose-limited growth conditions during fed-batch cultivation. A slight discrepancy, however, remains regarding the  $K_M$  value obtained for the wild-type strain as compared to data from the literature. The  $K_M$  value for various wild-type strains identified from zero *trans*-influx measurements is in the range of

$$0.5 < (K_M)_{\text{wild-type}} < 1.0 \text{ mM}$$

[31, 4, 6]. Most of these measurements have been performed with samples from shake-flask experiments. The physiological conditions of such experiments are not well defined. It is particularly difficult is to consider the role of Hxt2 transporter for which a modulation of its activity by growth conditions has been clearly indicated [30].

Further investigations for identification of the kinetic properties of the Hxt5 transporter were performed during continuous cultivation of the single expression strain. Starting from steady-state conditions at  $D = 0.1 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$  a pulse of glucose was injected to give an initial bulk concentration of  $10 \text{ g l}^{-1}$ . These experiments were performed under aerobic and anaerobic growth conditions. Fig. 5 shows the comparison of measured and computed glucose concentrations during the transient conditions at aerobic growth.



**Fig. 5. Comparison between experimental data and the simulation for the JBY19 ( $HXT5^+$ ) strain using the optimal parameter values (aerobic chemostat,  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ ).**

The following parameters were estimated by minimising the error square:

$$\text{Aerobic:} \quad K_M = 6.1 \text{ mM} \quad q_S^{\max} = 7.6 \frac{\text{mmol}}{\text{gDW} \cdot \text{h}}$$

$$\text{Anaerobic:} \quad K_M = 6.8 \text{ mM} \quad q_S^{\max} = 9.7 \frac{\text{mmol}}{\text{gDW} \cdot \text{h}}$$

The agreement between the two  $K_M$  values is satisfactory. Moreover, they are similar to the  $K_M$  value of 10 mM determined by zero *trans*-influx measurements [7]. The slight difference might be due to the presence of the carboxy-terminal HA-sequence used in this study. The difference in the maximal uptake rates, however, raises further questions. To get more insight into the meaning of the differences between the maximal rates, the analysis needs to be complemented by a comparison with the so-called *in situ* glucose consumption rates [22]. These rates are calculated from the simple mass balance at steady-state:

$$(q_S)_{\text{in situ}} = \frac{D(c_S^0 - c_S)}{c_X} \quad (5)$$

and compared with the results of uptake rates estimated from the kinetic expression

$$(q_S)_{\text{kinetics}} = q_S^{\max} \frac{(c_S)_{\text{steady-state}}}{K_M + (c_S)_{\text{steady-state}}} \quad (6)$$

with the measured steady-state glucose concentrations  $(c_S)_{\text{steady-state}} = 258 \text{ mg l}^{-1}$  for aerobic and  $(c_S)_{\text{steady-state}} = 230 \text{ mg l}^{-1}$  for anaerobic growth. The calculations yielded the following results:

*Aerobic:*

$$(q_S)_{\text{in situ}} = 1.7 \frac{\text{mmol}}{\text{gDW} \cdot \text{h}}$$

$$(q_S)_{\text{kinetics}} = 1.4 \frac{\text{mmol}}{\text{gDW} \cdot \text{h}}$$

*Anaerobic:*

$$(q_S)_{\text{in situ}} = 3.6 \frac{\text{mmol}}{\text{gDW} \cdot \text{h}}$$

$$(q_S)_{\text{kinetics}} = 1.5 \frac{\text{mmol}}{\text{gDW} \cdot \text{h}}$$

It has been claimed that the efflux of glucose due to accumulation of internal glucose concentrations during the zero *trans*-influx measurement causes a lower uptake rate [22]. The reasonable agreement between the uptake rates observed under aerobic growth conditions suggests that such effects of internal glucose concentrations are of minor importance in the time span of measurements of glucose concentrations after the glucose pulse. The pronounced difference under anaerobic conditions has been previously observed by Diderich [22]. The lower value of glucose uptake rate estimated from the kinetic measurements prompts the hypothesis that the increased influx of glucose in response to the pulse of glucose under anaerobic conditions causes a traffic jam in the glycolysis and leads to an internal accumulation of glucose for a longer time period. Ongoing research focuses on the measurement of intracellular glucose concentrations under the same experimental conditions to get further insight into these problems.

## 4 Conclusions

Previous investigations had indicated that the *HXT5* glucose transporter gene of *S. cerevisiae* is a silent gene and is not transcribed during ‘normal’ laboratory growth conditions [8, 9]. However, more recent data had shown that *HXT5* is induced during glucose depletion or stress conditions [22, 7, 23, 32]. Here, we have demonstrated that indeed the *HXT5* gene is induced by starvation. Both, nitrogen and carbon starvation trigger a strong induction of *HXT5* transcription and a pronounced increase in the amount of Hxt5 protein. In their natural environment yeast cells spend most of their time under severe nutrient limitation or starvation. Therefore, the transcriptional regulation points to an important role of Hxt5 for glucose uptake under starvation and stress conditions. It is remarkable that other transporters like Hxt1, Hxt6 and Hxt7 are proteolytically degraded under the same conditions, at least during nitrogen starvation [33, 15, 34]. Moreover, Hxt5 turned out to be a transporter with a moderately high affinity for glucose. Therefore, it is well suited for uptake of glucose irrespective of its concentration. Consistent with this, expression of only Hxt5 enabled the yeast cells to grow like wild-type cells at any glucose concentration, in contrast to expression of the low-affinity transporter Hxt1. Thus, Hxt5 seems to be used by the yeast cells as a major glucose transporter (i) during nitrogen starvation or other stress conditions such as osmotic shock in order to provide glucose for energy production or (ii) during glucose limitation or carbon starvation in order to enable the cells to rapidly take up glucose as soon as it becomes available again.

## Acknowledgements

We thank Prof. C.P. Hollenberg for his kind support. This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grants BO 1517/1-1 to E.B. and Ri 672/3-1 to M.R.

## References

- [1] Weusthuis, R.A., Pronk, J.T., van den Broek, P.J. and van Dijken, J.P. (1994) Chemostat cultivation as a tool for studies on sugar transport in yeasts. *Microbiol. Rev.* 58, 616-630.
- [2] Bisson, L.F., Coons, D.M., Kruckeberg, A.L. and Lewis, D.A. (1993) Yeast sugar transporters. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28, 259-308.
- [3] Kruckeberg, A.L. (1996) The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 166, 283-292.
- [4] Boles, E. and Hollenberg, C.P. (1997) The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 85-111.
- [5] Özcan, S. and Johnston, M. (1999) Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 554-569.
- [6] Reifenberger, E., Boles, E. and Ciriacy, M. (1997) Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur. J. Biochem.* 245, 324-333.
- [7] Diderich, J.A., Schuurmans, J.M., van Gaalen, M.C., Kruckeberg, A.L., and van Dam, K. (2001) Functional analysis of the hexose transporter homologue *HXT5* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 18, 1515-1524.
- [8] Reifenberger, E., Freidel, K. and Ciriacy, M. (1995) Identification of novel *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Mol. Microbiol.* 16, 157-167.
- [9] Liang, H., and Gaber, R.F. (1996) A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by Snf3-regulated expression of *HXT6*. *Mol. Biol. Cell* 7, 1953-1966.
- [10] Wiczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C.P. and Boles, E. (1999) Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 464, 123-128.
- [11] Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J., and Hegemann, J.H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 24, 2519-2524.
- [12] Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A. and Schiestl, R.H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 20, 1425.
- [13] Boles, E., de Jong-Gubbels, P. and Pronk, J.T. (1998) Identification and characterization of *MAE1*, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding mitochondrial malic enzyme. *J. Bacteriol.* 180, 2875-2882.
- [14] Hauf, J., Zimmermann, F.K. and Müller, S. (2000) Simultaneous genomic over-expression of seven glycolytic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 688-698.
- [15] Krampe, S., Stamm, O., Hollenberg, C.P. and Boles, E. (1998) Catabolite inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *FEBS Lett.* 441, 343-347.
- [16] Indlekofer, M., (1989) Computer-Regelung der Substratzufütterung bei der Backhefe-produktion, Diplomarbeit Universität Stuttgart, Germany
- [17] Rieger, M., (1983) Untersuchungen zur Regulation von Glycolyse und Atmung in *Saccharomyces cerevisiae*, Ph.D. thesis, ETH Zürich, Switzerland

- [18] Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A. and van Dijken, J.P. (1992) Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast*. 8, 501-517.
- [19] Theobald, U., Mailinger, W., Rizzi, M. and Reuss, M. (1997) *In vivo* analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*, I. Experimental Observations. *Biotech. Bioeng.* 55, 305-316.
- [20] DeRisi, J.L., Iyer, V.R. and Brown, P.O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680-686.
- [21] ter Linde, J.J., Liang, H., Davis, R.W., Steensma, H.Y., van Dijken, J.P. and Pronk, J.T. (1999) Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 181, 7409-7413.
- [22] Diderich, J.A., Schepper, M., van Hoek, P., Luttkik, M.A., van Dijken, J.P., Pronk, J.T., Klaassen, P., Boelens, H.F., de Mattos, M.J., van Dam, K. and Kruckeberg, A.L. (1999) Glucose uptake kinetics and transcription of *HXT* genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274, 15350-15359.
- [23] Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J.M. and Hohmann, S. (2000) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. *Hot1p* and *Msn2p/Msn4p* are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J. Biol. Chem.* 275, 8290-8300.
- [24] van Dam, K., Jansen, N., Postma, P., Richard, P., Ruijter, G., Rutgers, M., Smits, H. P., Teusink, B., van der Vlag, J., Walsh, M. & Westerhoff, H.V. (1993) Control and regulation of metabolic fluxes in microbes by substrates and enzymes. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 63(3-4), 315-21.
- [25] Rizzi, M., Baltés, M., Theobald, U., Reuss, M. (1997) *In vivo* analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: II. Mathematical model. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 592-608.
- [26] Vaseghi, S., Baumeister, A., Rizzi, M., Reuss, M. (1999) *In vivo* dynamics of the pentose phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering.* 1, 128-140.
- [27] Mauch, K., Hieber, S. E. and Reuss, M. (2000) Pathway analysis and pathway design in *Metabolic Engineering*. 4th international congress on biochemical engineering, Stuttgart, Fraunhofer IRB Verlag.: 57-62.
- [28] Mauch, K., Buziol, S., Schmid, J. and Reuss, M. (in press) Computer aided design of metabolic networks. *AIChE Symposium Series*, Tuscon, Arizona.
- [29] Mauch, K., Arnold, S. and Reuss, M. (1997) Dynamic sensitivity analysis for metabolic systems. *Chem. Eng. Sci.* 52, 2589-2598.
- [30] Petit, T., Diderich, J.A., Kruckeberg, A.L., Gancedo, C., Van Dam, K. (2000) Hexokinase regulates kinetics of glucose transport and expression of genes encoding hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 182(23), 6815-18.
- [31] Lagunas, R. (1993) Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 104, 229-42.
- [32] Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P.O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 11, 4241-4257.
- [33] Busturia, A. and Lagunas, R. (1986) Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 132, 379-385.

[34] Krampe, S., and Boles, E. (2002) Starvation-induced degradation of yeast hexose transporter Hxt7p is dependent on endocytosis, autophagy and the terminal sequences of the permease. *FEBS Lett.* 513, 193-196.

## Publikation II

Buziol S, Bashir I, Baumeister A, Claaßen W, Noisommit-Rizzi N, Mailinger W and Reuss M. 2002. A new bioreactor coupled rapid stopped-flow sampling technique for measurements of metabolite dynamics on a subsecond time scale. *Biotechnol Bioeng.* **80(6)**: 632-36.

**A new bioreactor coupled rapid stopped-flow sampling technique  
for measurements of metabolite dynamics on a subsecond  
time scale**

Stefan Buziol<sup>1</sup>, Imtiaz Bashir<sup>2</sup>, Anja Baumeister<sup>2</sup>, Wolfgang Claaßen<sup>2</sup>, Naruemol Noisommit-Rizzi<sup>1</sup>, Werner Mailinger<sup>1</sup> and Matthias Reuss<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemical Engineering, University of Stuttgart, Allmandring 31, D-70569 Stuttgart, [www.ibvt.uni-stuttgart.de](http://www.ibvt.uni-stuttgart.de)

<sup>2</sup>Institute of Food Technology - Dept. Biotechnology, University of Hohenheim, Emil-Wolff Str. 14, D-70599 Stuttgart

**Running title:**

Bioreactor coupled rapid stopped-flow sampling technique

---

We dedicate this paper to Prof. Manfred Rizzi who decisively pushed this development and who passed away after the first successful experiments.

**Abstract:**

Knowledge of concentrations of intracellular metabolites is important for quantitative analysis of metabolic networks. As far as the very fast response of intracellular metabolites in the millisecond range is concerned, the frequently used pulse technique shows an inherent limitation. The time span between the disturbance and the first sample is constrained by the time necessary to obtain a homogeneous distribution of the perturbation within the bioreactor. For determination of rapid changes, a novel sampling technique based on the stopped-flow method has been developed. A continuous stream of biosuspension leaving the bioreactor is being mixed with a glucose solution in a turbulent mixing chamber. Through computer aided activation of sequentially positioned three way valves, different residence times and thus reaction times can be verified. The application of this new sampling method is illustrated with examples including measurements of adenine nucleotides and glucose-6-phosphate in *Saccharomyces cerevisiae* as well as measurements related to the PTS system in *Escherichia coli*.

**Keywords:**

Stopped-flow; bioreactor; rapid sampling; metabolite dynamics in the subsecond range

## INTRODUCTION

Steady-state as well as transient analyses of intracellular metabolites belong to the well established tools of microbial physiology and biochemistry. Recent information about the concentrations of metabolites is also of increasing importance in metabolic engineering and functional genomics. For quantitative analyses, it is an essential prerequisite to define the physiological state of biological systems used for these measurements. Of course, this imperative requires experimental conditions and related process operations that are defined and reproducible. We also need to devise methods for sampling, quenching and extraction that ensure that the results of the subsequent analysis accurately reflect the status of the living cell. The concrete design of the appropriate tools and operations in the sequence are as follows: process operation (steady-state in continuous culture, transient), sampling (time span after disturbance and frequency of sampling), quenching, extraction and analysis depend on (a) the biotic state variables to be measured and (b) the information to be derived from these measurements. Attributes related to the biotic state variables include chemical and biological stability of the compound, half-life times typically on the order of a second or less (Theobald et al. 1993), analytical method applied. The focus of the second point (b) is the purpose of the measurements.

The interest in such measurements may be related to dynamic responses of metabolite pools to extracellular disturbances for identification of in vivo kinetics, including modulation at the metabolite level. This stimulus-response methodology requires very fast sampling strategies to guarantee that enzyme levels not change. Sampling techniques suggested for this task are usually based upon a glucose pulse introduced into the bioreactor and fast sampling/quenching techniques to stop the metabolism rapidly.

Theobald et al. (1993; 1997) used a sampling device with minimal dead space and could achieve a high sampling frequency starting with the first sample 5 s after a pulse of glucose. Weuster-Botz (1997) developed a sampling tube device to perform sampling, inactivation, and extraction continuously in a tube connected to the reactor to obtain a fast, dynamic response of the biosuspension after a pulse of glucose and could achieve even higher resolution. Schaefer et al. (1999) introduced an automated sampling device coupled to a stirred tank reactor. Sample flasks fixed in transport magazines were moved by a step engine and filled within 200 ms, resulting in a sampling rate of  $4.5 \text{ s}^{-1}$ . Application of this sampling device was shown for measurements of intracellular metabolites of *Escherichia coli* growing in steady-state continuous cultures and disturbed with a pulse of glucose.

As far as the very fast and initial response of intracellular metabolites in the millisecond range is concerned, these approaches show an inherent limitation. The time span between the disturbance and the first sample is constrained by the time necessary to obtain a homogeneous distribution of the perturbation within the bioreactor. Depending on the metabolites of interest, this can be a serious restriction because first significant changes most often related to uptake kinetics may occur within a second (de Koning and van Dam, 1992).

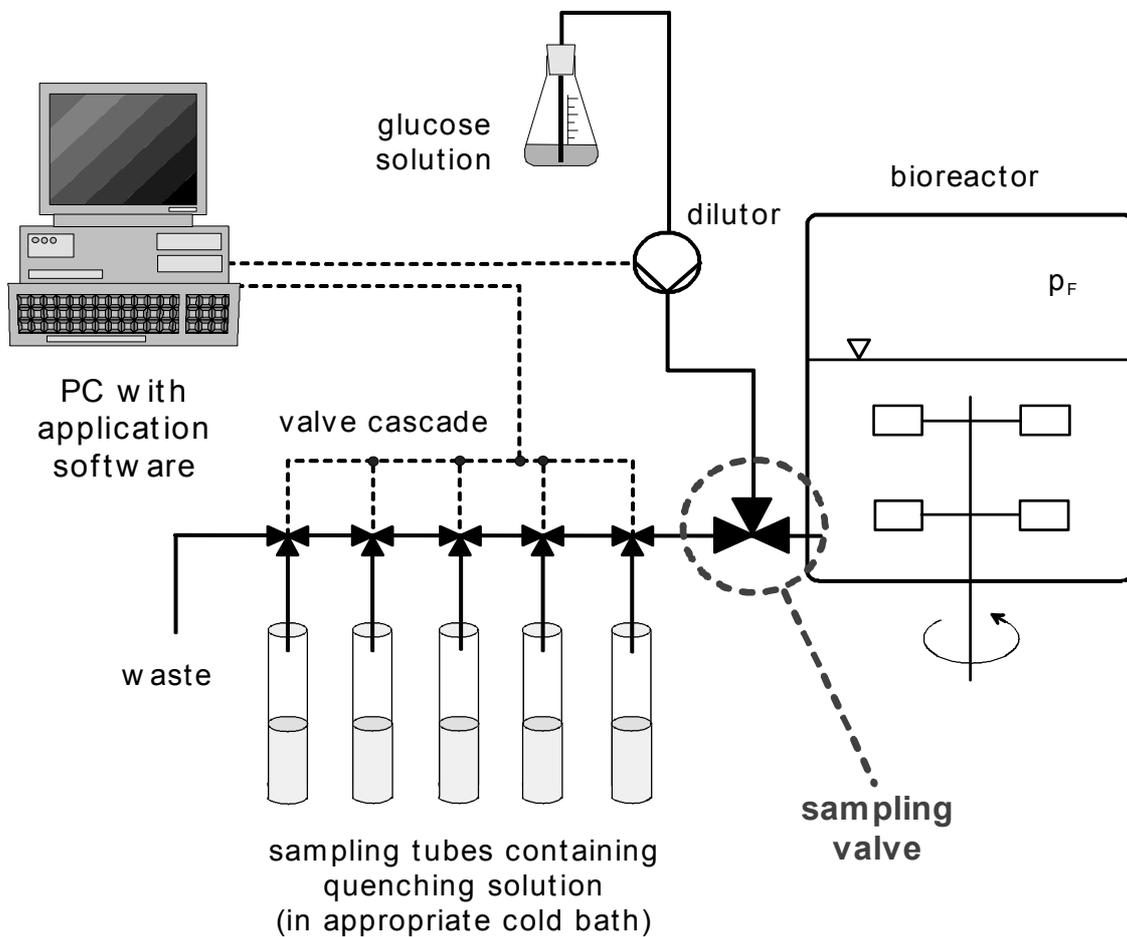
This paper deals with the application of a new device based on the stopped-flow technique originally developed by Chance et al. (1964) combined with a modified rapid-freezing method used by Bray (1961). The method has been modified for measurements of very fast reactions in many different areas of biological research (Bisswanger, 2000; Shastry et al., 1998; Zscherp and Barth, 2001). De Koning and van Dam (1992) applied the stopped-flow technique to incubation of yeast cells with glucose solution and observed changes in metabolite levels in the subsecond time scale after incubation with glucose. The sampling,

however, was not linked to continuous cultures and therefore does not permit investigation of dynamic responses starting from defined and reproducible physiological growth conditions. The approach applied in our investigations overcomes this drawback by connecting a specially designed sampling and mixing valve to a standard port of the bioreactor.

## MATERIAL AND METHODS

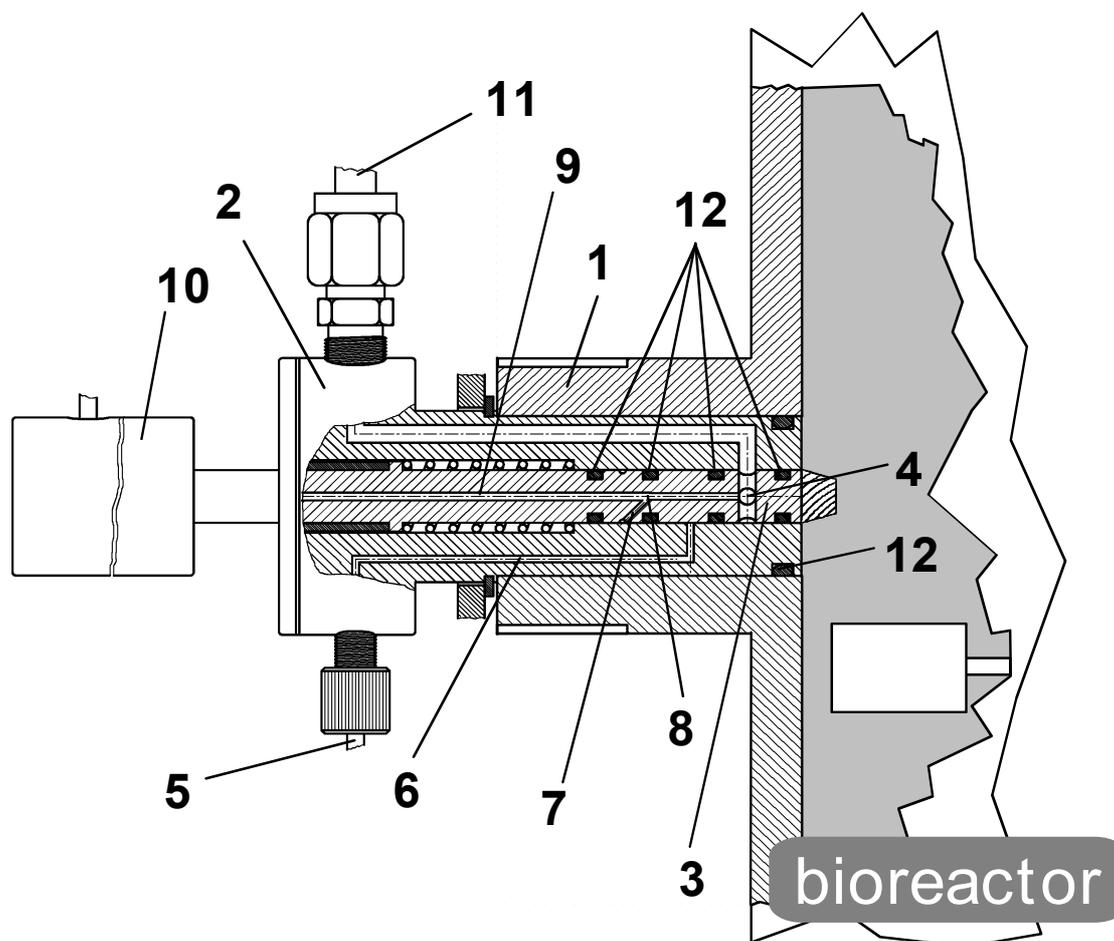
### Sampling system

The sampling device simultaneously serving as a mixing chamber is located in a connecting piece of the stirred tank bioreactor (Biostat E, Braun, Melsungen, Germany, for experiments with *Saccharomyces cerevisiae*; KLF 2000, Bioengineering, Wald, Switzerland for experiments with *E. coli*) as shown schematically in Figure 1.



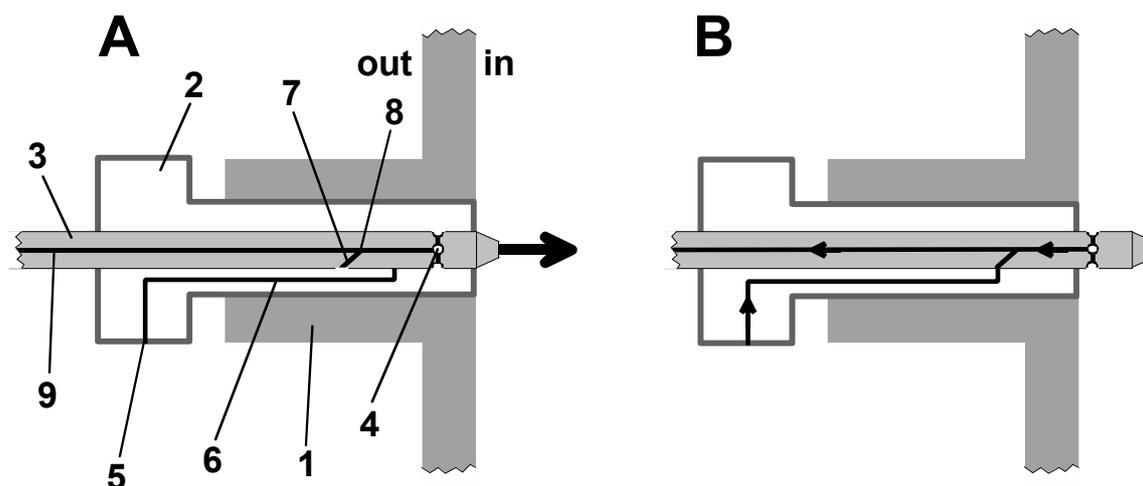
**Figure 1.** Assembly of the new bioreactor coupled rapid stopped-flow sampling technique

The special design of the valve is illustrated in Figure 2.



**Figure 2.** Schematic representation of the sampling valve connected to the bioreactor: (1) connecting piece; (2) valve corpus; (3) ram; (4) bore (for biosuspension from the reactor); (5) inlet for glucose solution; (6) capillary for glucose solution; (7) connecting capillary; (8) mixing chamber; (9) outlet capillary (mixture of biosuspension and glucose solution); (10) outlet for mixture; (11) steam connection; (12) O-rings;

Similar to the sampling valve of the bioreactor, the central piston is pressed manually against the pressure of the spring into the interior of the bioreactor, thereby opening bore 4 and thus connecting the biosuspension with outlet bore 9 (Fig. 3 A, B).



**Figure 3.** (A, B) Functional principle of the sampling valve (for details, see text): (1) nozzle of the bioreactor; (2) valve corpus; (3) ram; (4) inlet for biosuspension; (5) inlet for glucose solution; (6) capillary for glucose solution; (7) connecting capillary; (8) mixing chamber; (9) capillary for the mixture (biosuspension and glucose solution).

The biosuspension flows through the capillary aseptically driven by a controlled overpressure of 0.4 to 0.5 bar in the headspace of the bioreactor. Simultaneously, a connection between the inlet capillary for the concentrated glucose solution (6) and the outlet bore via a small connection capillary (7) is formed (Fig. 3 B). The concentrated glucose solution is then pumped through the capillary into the „mixing chamber“ (8), in which the two liquid jets are rapidly mixed. The biosuspension loaded with the concentrated glucose solution flows through the outlet capillary toward the cascade of three-way valves (Fig.1). After the capillary is flushed with the mixture of biosuspension and glucose solution through to the waste, the first sample flow is redirected through the position of valve 1 to the sampling tube containing the quenching fluid (liquid nitrogen,  $-196^{\circ}\text{C}$ ). The opening time of valve one is under control of the computer. The first valve is then closed and the mixture proceeds toward the waste to flush the capillary again to the second valve. The second valve is redirected, and the procedure (flow into the tube filled with quenching fluid) is repeated. The procedure is continued until the suspension flows into the waste tube. The corresponding reaction time for each of the samples is calculated from the length and the diameter of the capillary and the flow rate. The length of the capillaries is in the range of 261 mm (outlet 1) to 686 mm (outlet 5) from the mixing chamber to the outlet with a diameter of 1.5 mm. The flow rate is determined by weighing the sampling tube containing only the quenching solution and then by weighing the same plus the mixture of biosuspension and glucose solution. With known opening times of the valves, the flow can be quantified. The dilution effect caused by the glucose solution is considered by means of lactose as a marker substance. To assure plug flow in the sampling tube the Reynolds number was calculated to be 2,500 ( $Re_{\text{crit}} = 2,300$ ), which confirms turbulent conditions in the sampling tube.

Before the sampling procedure is begun the outlet capillary (Fig. 2, position 9) and the part of the ram that is introduced into the bioreactor are sterilized using steam and subsequently flushed with sterile water. The valves (miniatur chemically inert solenoid valves, LFYA Series, Port Type 156 Ministac, The Lee Company, Westbrook, CT) and the pump (Abimed Dilutor, Gilson, Middleton, WI) are under control of the computer (PC with interface PCI-

20098C-1, Burr-Brown, Filderstadt, Germany). The interactive software module developed for the sampling procedure permits simple variation of the parameter of an injection experiment.

The main features of this sampling device may be characterized as follows. (1) The culture remains at steady-state because the organisms are stimulated by the glucose in the mixing chamber within the valve. (2) Sampling time and reaction time are decoupled. The volume of the individual samples can be chosen independently. (3) The time span between glucose stimulus and first sample can be less than 100 ms. (4) The method can be easily adapted to other stimuli, e.g., temperature or pH, which may lead to irreversible stress responses. The only limitation of the technique in its current version is the problem of oxygen limitation at aerobic growth. Thus, the longest reaction time is determined by the oxygen consumption rate in the sampling tube, which depends on the organism, growth rate, and cell concentration in the bioreactor. Using the experimentally determined value for the oxygen uptake rate during steady-state conditions in the chemostat, it is possible to estimate the maximal duration up to the critical oxygen concentration (ca.  $5 [K_M]_{\text{cytochrome oxidase}} \approx 9 \mu\text{M}$ ) is reached. This time is about 20 s, and the oxygen concentration is therefore above the critical value in the biosuspension proceeding from the bioreactor to the outlet of the longest capillary.

For studying the complete response we therefore recommend the use of both sampling devices: the stopped-flow technique for the first seconds and the pulse technique with manual or automated sampling (Theobald et al., 1993; 1997) for longer time periods.

### **Microorganisms and Culture Conditions**

*S. cerevisiae* CBS 7336 (ATCC 32167) was grown in continuous chemostat culture ( $D = 0.1 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$ ) under glucose limitation at 30°C in a stirred tank bioreactor (Biostat E, Braun) with a working volume of 2 L. The airflow was kept at 1 vvm and the pH was maintained at 5.0 by addition of 2M NaOH. To prevent foam formation, small quantities of Contraspum 210 (Zschimmer & Schwarz) were added at regular intervals. The composition of the synthetic mineral medium was balanced for a biomass concentration of 15 gDW/L as described previously (Theobald et al., 1993).

*E. coli* W3110 (Hill and Harnish, 1981) was grown at  $D = 0.1 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$  under glucose limitation at 35°C in a stirred tank bioreactor (KLF 2000, Bioengineering), with a working volume of 1.5 L. The airflow was kept at 1 vvm, and the pH was controlled at 7.0 by addition of 2 M NaOH. To prevent foam formation, small quantities (1 mL) of Contraspum 210 (Zschimmer & Schwarz) were added periodically. The concentrations of the components in the synthetic mineral medium were precalculated from elementary balancing for production of 10 g dry weight (g DW) per liter: 4.0 g/L  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 5.36 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 1.0 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 7.3 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 1.8 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 120 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{-H-citrat}$ ; 4.0 mL/L  $\text{MgSO}_4$  (1 M); 6.0 mL/L trace element solution; 0.02 g/l thiamine, and 20.0 g/L glucose.

### **Quenching/Extraction and Analysis**

Using the novel technique, the biosuspension flows out aseptically driven by overpressure in the headspace of the bioreactor. After the incubation with glucose solution and the flow through the valve(s) the biosuspension ( $V[\text{biosusp.}] = 2.6\text{-}3.7 \text{ mL}$ ) flows into a glass tube,

which is filled with liquid nitrogen ( $V[\text{LN}_2] \approx 10 \text{ mL}$ ) in order to quench the metabolism rapidly.

#### *Extraction and Analysis for S. cerevisiae*

After addition of perchloric acid (1-1.3 mL, depending on the volume of the biosuspension, 35%,  $-25^\circ\text{C}$ ) 3 freeze-thaw cycles were carried out to extract the metabolites (Kopperschläger und Augustin, 1967). After neutralisation (2 M KOH, 0.5 M imidazole) of the extract to pH 7.0 and a filtration step to remove the  $\text{KClO}_4$  precipitate, a liquid is obtained that can be analyzed (Theobald et al., 1993). During the extraction procedure, the sample temperature was not allowed to rise above  $4^\circ\text{C}$ . Measurements of glucose-6-phosphate (G6P) were carried out by enzymatic analysis (Bergmeyer, 1974), and the adenine nucleotides (adenosine monophosphate, AMP; adenosine diphosphate, ADP; adenosine triphosphate, ATP) were analysed using HPLC (Mailinger et al., 1998). The stability of the adenine nucleotides using liquid nitrogen as quenching solution was verified. Retrieval was checked using standard solutions of G6P treated like samples during the extraction procedure and found to be 97 %. For calculation of the metabolite concentrations, an intracellular volume of  $420 \text{ g}_{\text{DW}}/\text{L}_{\text{CV}}$  was used (Ditzelmüller, 1983; Theobald, 1995) (where  $\text{g}_{\text{DW}}/\text{L}_{\text{CV}}$  is the gram dry weight per liter of cytoplasmic volume).

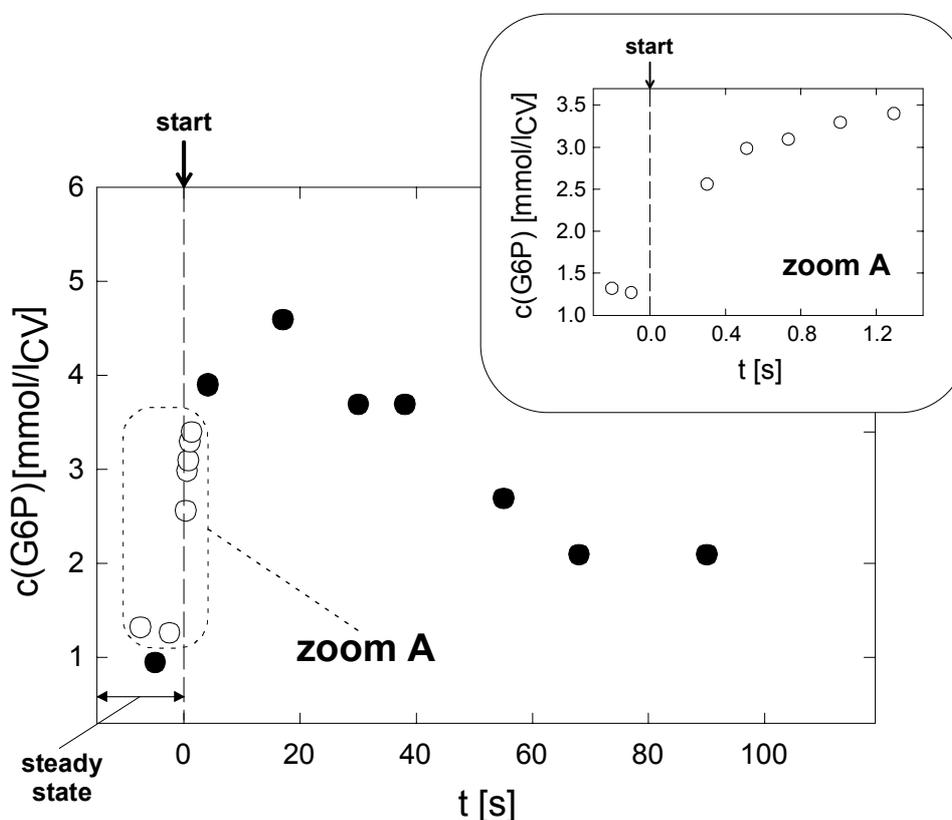
#### *Extraction and Analysis for E. coli*

For determination of phosphoenolpyruvate (PEP) and pyruvate (Pyr), the biomass suspension was immediately injected into liquid nitrogen ( $-196^\circ\text{C}$ ) to cease metabolic activities.

The sample was kept at  $-25^\circ\text{C}$  for 10 min. After evaporation of the liquid nitrogen, the sample volume was determined by weighing. Sample extraction was carried out by adding half the sample volume of Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$ /EDTA (20 mM/2 mM) pH 7.75, at  $-25^\circ\text{C}$ . After 1 min the sample was thawed and pipetted into another one-half volume of Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$ /EDTA, pH 7.75, at  $90^\circ\text{C}$ . The mixture was thoroughly vortexed to ensure that the mixing temperature did not fall below  $70^\circ\text{C}$ . After 10 min the sample was centrifuged (16,000 g,  $1^\circ\text{C}$ , 15 min). The supernatant was filtered (pore size  $0.2 \mu\text{m}$ ) and then used for measuring PEP and Pyr. PEP and Pyr were measured in the presence of 0.22 M TEA/2.2 mM EDTA-buffer, 0.12 mM  $\beta$ -NADH, 8 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.06 M KCl, and 1.3 mM ADP. After stabilization of the baseline, lactate dehydrogenase (5 U/mL) was added to measure pyruvate. After completion of the reaction, pyruvate kinase (2 U/ml) was added to measure PEP.

## RESULTS

Figure 4 shows results using the novel sampling technique for the experimental determination of concentrations of G6P.



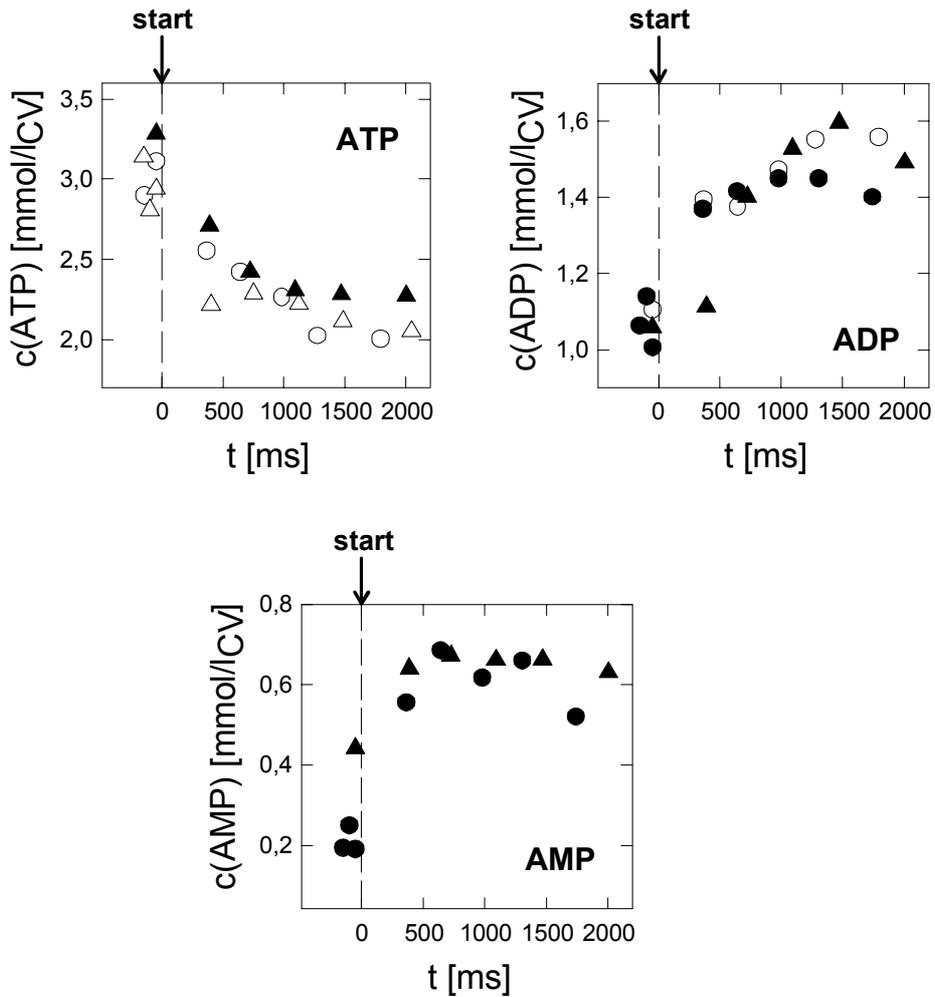
**Figure 4.** Signal for glucose-6-phosphate (G6P) of a continuous culture of *S. cerevisiae* at steady-state conditions and after stimulation with concentrated glucose solution.

(○) Concentration of G6P in main graph and zoom A using the novel sampling technique. These datapoints represent the mean value of three individual experiments.

(●) Concentration of G6P in main graph, results of pulse experiment performed with the manual fast sampling technique described by Theobald et al. (1993; 1997).

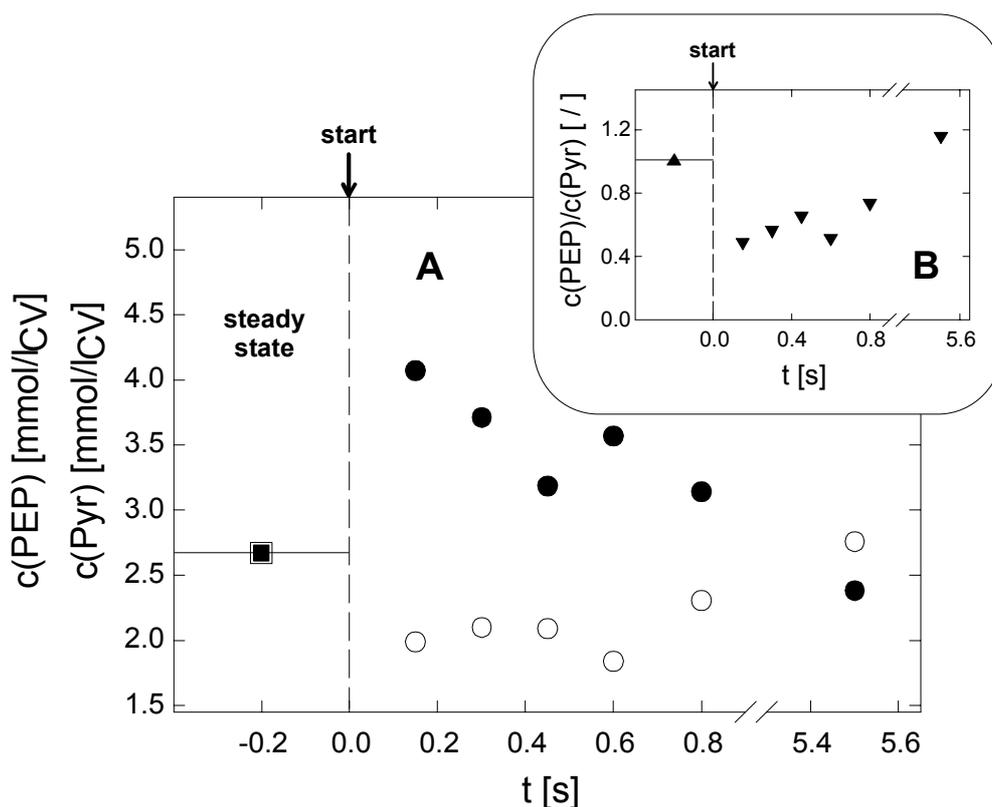
After incubation of the cells with glucose solution, the concentration of intracellular G6P increases rapidly. Also shown in Figure 4 are results of the measurements of intracellular G6P performed with the manual fast sampling technique described by Theobald et al. (1993; 1997). There is good accordance between the data gathered with the new technique and the data obtained with the classical pulse method.

In Figure 5 the dynamic response of the adenine nucleotides due to the increase of the glucose concentration is shown. The data points reflect the very fast phosphorylation reactions immediately after glucose uptake.



**Figure 5.** Dynamic response of the adenine nucleotides due to increased glucose concentration in a stopped-flow experiment with a continuous culture of *S. cerevisiae* (open and closed symbols represent the results from different experiments).

The second example shows the dynamic response of the pool concentrations of PEP and Pyr after glucose incubation of *E. coli* growing in continuous culture. The fast response in the first second after the stimulus of the high glucose concentration (Fig. 6 A) illustrates a rapid decrease of the PEP pool accompanied by a corresponding increase of the Pyr pool.



**Figure 6.** Phosphoenolpyruvate (PEP) and pyruvate (Pyr) during a stopped-flow experiment with a steady-state culture of *E. coli* stimulated by high glucose concentration using the new sampling technique ( $\circ$  PEP,  $\bullet$  Pyr). The steady-state values of the main graph ( $\square$  PEP,  $\blacksquare$  Pyr) are the mean of three steady-state values. Diagramm B (insert) shows the PEP/Pyr ratio during the aforementioned experiment ( $\blacktriangle$  mean of three steady-state quotients,  $\blacktriangledown$  dynamic response of the quotient).

This behavior reflects the fast dynamics of the phosphotransferase system (PTS) in *E. coli*. It would seem that the sharp drop in the ratio of the two concentrations illustrated in Figure 6 B could lead to a limitation of the PTS system at high glucose concentrations. The potential control of the PEP/Pyr ratio can be predicted by a model that assumes equilibrium of the reactions involving enzyme I, HPr, and  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ , and the rate-limiting step to be the final step of glucose transport and phosphorylation (Liao et al., 1996). Chassagnole et al. (2002) have used this approach for the kinetic analysis of the PTS system and glycolysis in *E. coli*.

## CONCLUSION

The new stopped-flow sampling device introduced in this paper is a powerful tool for experimental observation of very rapid changes in metabolite concentrations triggered by external disturbances. The subsecond time range is of particular interest for quantifying the kinetics of uptake and excretion rates. Application of this approach to other disturbances could help to elucidate the dynamics of various stress responses. The coupling to a bioreactor permits investigations at defined and reproducible growth conditions.

## References

- Bergmeyer HU. 1974. Methods in Enzymic Analysis, Vols III and IV. 3<sup>rd</sup> edition. New York: Academic Press.
- Bisswanger H. 2000. Enzymkinetik: Theorie und Methoden. 3<sup>rd</sup> edition. Weinheim: Wiley-VHC p 234-242.
- Bray RC. 1961. Sudden freezing as a technique for the study of rapid reactions. Biochem J 81:189-193.
- Chance B, Eisenhardt RM, Gibson QH, Lonberg-Holm KK. 1964. Rapid mixing and sampling techniques in biochemistry. New York: Academic Press p 89-102.
- Chassagnole C, Noisommit-Rizzi N, Schmid JW, Mauch K and Reuss M. 2002. Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*. Biotechnol Bioeng 79:53-73
- de Koning W, van Dam, K. 1992. A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. Anal Biochem 204:118-23.
- Ditzelmueller G, Woehrer W, Kubicek P and Roehr M. 1983. Nucleotide pools of growing, synchronized and stressed cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch Microbiol 135:63-7.
- Hill CW, Harnish BW. 1981. Inversions between ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 78:7069-72.
- Kopperschläger G, Augustin HW. 1967. Fehlermöglichkeiten bei der Bestimmung von Metabolitgehalten in Hefezellen. Experientia 23:623-624.
- Liao JC, Hou S-Y, Chao Y-P. 1996. Pathway analysis, engineering, and physiological considerations for redirecting central metabolism. Biotechnol Bioeng 52:129-140.
- Mailinger W, Baumeister A, Reuss M, Rizzi M. 1998. Rapid and highly automated determination of adenine and pyridine nucleotides in extracts of *Saccharomyces cerevisiae* using a micro-robotic sample preparation-HPLC system. J Biotechnol 63:155-166.
- Meyer S, Noisommit-Rizzi N, Reuss M, Neubauer P. 1999. Optimized analysis of intracellular adenosine and guanosine phosphates in *Escherichia coli*. Anal Biochem 271(1):43-52.
- Schaefer U, Boos W, Takors R, Weuster-Botz, D. 1999. Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamics. Anal Biochem 270:88-96.
- Shastry, MC, Luck SD, Roder H. 1998. A continuous-flow capillary mixing method to monitor reactions on the microsecond time scale. Biophys J 74:2714-2721.

Theobald U. 1995. Untersuchungen zur Dynamik des Crabtree-Effektes. Ph.D. thesis. Stuttgart, Germany: Universität Stuttgart.

Theobald U, Mailinger W, Reuss M, Rizzi M. 1993. *In vivo* analysis of glucose-induced fast changes in yeast adenine nucleotide pool applying a rapid sampling technique. *Anal Biochem* 214:31-37.

Theobald U, Mailinger W, Rizzi M, Reuss M. 1997. *In vivo* analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: I. Experimental Observations. *Biotechnol Bioeng* 55:305-316.

Weuster-Botz D. 1997. Sampling tube device for monitoring intracellular metabolite dynamics. *Anal Biochem* 246:225-233.

Zscherp C, Barth A. 2001. Reaction-induced infrared difference spectroscopy for the study of protein reaction mechanisms. *Biochemistry* 40:1875-1883.

## Publikation III

Buziol S, Warth L, Magario I, Freund A and Reuss M. Dynamic response of the expression of transport proteins Hxt1, Hxt5 and Hxt7 in *Saccharomyces cerevisiae* to perturbations in the extracellular glucose concentration. *Yeast*, submitted

**Dynamic response of the expression of transport proteins Hxt1, Hxt5 and Hxt7 in *Saccharomyces cerevisiae* to perturbations in the extracellular glucose concentration**

**Stefan Buziol, Lydia Warth, Ivana Magario, Andreas Freund and Matthias Reuss\***

Institute of Biochemical Engineering, University of Stuttgart, Allmandring 31, D-70569 Stuttgart, [www.ibvt.uni-stuttgart.de](http://www.ibvt.uni-stuttgart.de)

**Running title:**

*Saccharomyces cerevisiae*, dynamics of hexose transport proteins, Hxt, multiple stimuli.

## **Abstract**

Glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is based on a multifactorial uptake system. The glucose-dependent modulation of the affinity in wild-type cells is a result of the differential expression of various sets of hexose transport-related proteins with significantly different affinities to the sugar. To elucidate the dynamics of three different glucose transport proteins in parallel in *S. cerevisiae*, we followed their expression after changes in the concentration of extracellular glucose. Shifting a glucose-limited continuous cultivation to a batch process by adding a complete batch medium shifted the glucose concentration from a steady-state level of about 80  $\mu\text{M}$  to more than 1,2 M. In a second approach we applied multiple glucose pulses to a chemostat cultivation under glucose limitation to simulate concentration gradients in large-scale production bioreactors. We used antibodies against the hexose transport proteins Hxt1 (low-affinity), Hxt5 (intermediate-affinity), and Hxt7 (high-affinity) to follow their expression levels before and after the perturbations.

During the steady-state phases in both chemostat cultivations, Hxt7 was expressed and Hxt1 was not detectable, which is in line with their function as high- and low-affinity transporter, respectively. In accordance with its function as transporter expressed under starvation conditions, Hxt5 was expressed under glucose limitation during steady-state conditions.

After a switch to batch mode we observed an induction of Hxt1 expression and a decrease in the expression of Hxt5. Expression of Hxt7 declined also after an initial increase in the abundance of this protein. The results for the second approach strongly points to alterations in the expression pattern at least for the glucose transporter Hxt7 upon multiple stimuli of rapid transient changes in the concentration of extracellular glucose.

## Introduction

The yeast *S. cerevisiae* has evolved sophisticated regulatory mechanisms to cope with the wide range of glucose concentrations common in nature. The utilisation of glucose by this yeast is governed by both the membrane transport systems and the regulation of glucose metabolism. In recent years, the data gathered from comprehensive sequencing of the yeast genome [Boles et al., 1997; Kruckeberg, 1996] and investigations using transport mutants [Reifenberger et al., 1997] point to a multifactorial uptake system for hexoses. The 20 members of the hexose transport-related proteins (Hxt1-17, Gal2, Snf3 and Rgt2) are accompanied by further proteins of the sugar permease family which are not yet fully characterized [Diderich et al., 1999; Wieczorke et al., 1999]. The regulation of the membrane transport system, which is the first step in glucose metabolism of *S. cerevisiae*, is not yet fully understood. However, many components and their mode of action are known by now [Özcan et al., 1999; Rolland et al., 2002]. Investigations using single transport mutants showed that Hxt1 to Hxt4, Hxt6, and Hxt7 are the major hexose transporters in yeast that can transport glucose, fructose, and mannose [Reifenberger et al., 1997; Reifenberger et al., 1995]. Growth experiments using these mutants as well as other investigations for clarification of the transcription of *HXT* genes allowed to determine under which conditions several transporter proteins are expressed [Boles et al., 1997]. In addition, further characterisation has been performed for some members of this transport family [Buziol et al., 2002; Diderich et al., 1999; Diderich et al., 2001; Wendell et al., 1993; Ye et al., 2001].

Diderich et al. [1999] followed the transcription of all 20 members of the hexose transport gene family in chemostat cultivations under various nutrient-limited conditions (aerobic and anaerobic) and at dilution rates ranging between 0.05 and 0.38 h<sup>-1</sup> under aerobic glucose-limited conditions as well as in a batch process.

There is also information available about the type and amount of Hxt protein expressed in *S. cerevisiae* under various growth conditions. Using *HXT1::lacZ* and *HXT3::lacZ* fusion plasmids, Ko et al. [1993] were able to measure *HXT1*- and *HXT3*-dependent  $\beta$ -galactosidase activity under different growth conditions. They demonstrated expression of *HXT1::lacZ* during the exponential phase of a batch process and a maximal  $\beta$ -galactosidase activity for *HXT3::lacZ* after entry into stationary phase. Wendell and Bisson [1993] used specific antibodies against Hxt2 and could show that this protein is expressed if extracellular glucose changes from high to low concentrations of glucose. No Hxt2 protein expression was observed in the stationary phase of a batch culture. Applying Western analysis, the same authors also followed the expression of Hxt2 during a batch cultivation on 0.05 % glucose. The signal for Hxt2 increased as the yeast cells started with exponential growth, reached a maximum level and declined upon exhaustion of glucose. They were also able to show that high expression of Hxt2 does not always result in Hxt2-dependent high-affinity transport, which points to a posttranslational regulation of this transporter type [Wendell et al., 1994]. Ye et al. [2001] used antibodies against Hxt7, *HXT7*-specific oligonucleotide probes and a *HXT7::GFP* construct to analyse the expression pattern and to visualise the subcellular localisation of Hxt7. They demonstrated that in a wild-type strain, *HXT7* transcription was repressed at high glucose conditions, increased when glucose approached depletion and declined rapidly after glucose was exhausted. Investigations of Buziol et al. [2002] using antibodies against the Hxt5 protein showed expression of this glucose transporter in response to starvation conditions. To our knowledge, no data about the coupled dynamics of different hexose transport-related proteins has been presented so far.

In large-scale bioreactors, concentration gradients of glucose, oxygen and pH may cause a decrease in productivity and yield [Amanullah et al., 2001; Bajpai et al., 1982; Bylund et al., 1998; Enfors et al., 2001; Schmalzriedt et al., 2002]. Enfors et al. [2001] followed a scale-down approach and used a plug flow reactor with feeding inlet connected as a loop to a stirred tank reactor to investigate the dynamics of metabolic and stress responses of *Escherichia coli*. They observed a metabolic response and an increase in concentrations of mRNA of stress inducible genes while the cells passed through the high glucose concentration zone in the loop. Bylund et al. [1998] studied cultivation of *E. coli* in a large-scale production bioreactor with distributed feeding and sampling ports positioned at three different levels (top, middle, and bottom). They observed a lower biomass yield compared to bench-scale bioreactors as a result of gradients in substrate of up to 400 times the mean value and also by-product formation when feed was added to relatively stagnant mixing zones.

Two approaches have been applied to assess the dynamics of the hexose transport proteins Hxt1, Hxt5, and Hxt7 in *S. cerevisiae*. First we shifted a glucose-limited continuous cultivation process to a batch process (glucose excess) by adding a complete batch medium containing concentrated glucose solution. In the second experiment we performed multiple pulses of concentrated glucose solution to a glucose-limited chemostat. This approach was aimed at simulating the formation of substrate gradients in large-scale production bioreactors. Samples were withdrawn from the cultures to follow the concentration of biomass, glucose and ethanol. In addition a Western analysis was performed on bioreactor samples to observe the parallel dynamics of different hexose transport-related proteins. The measured dynamics of the extracellular glucose concentration in the multiple stimuli approach was further used to estimate changes in the glucose uptake kinetics.

## Material and methods

### Yeast strain

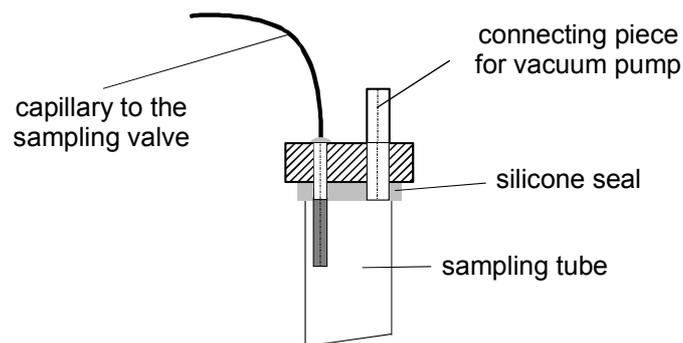
*S. cerevisiae* JBY20 (*MATa*, *ura3-52*, *MAL2-8<sup>c</sup>*, *SUC2*, *HXT5-3xHA*) (kind gift from E. Boles, Department of Microbiology, University of Frankfurt/Main), expressing an Hxt5-HA fusion protein was used for the investigations. The *HXT5* gene in this wild-type yeast is tagged with haemagglutinin to allow detection with anti-HA antibodies. While the regulatory sequence of this gene is not altered, a minor effect due to the HA-tag on the affinity of this transport protein can, however, not be excluded [Buziol et al., 2002].

### Culture conditions

#### Shift from continuous cultivation to batch mode

*S. cerevisiae* JBY20 was grown in continuous cultivation ( $D = 0.1 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ ) under glucose limitation at 30°C in a stirred tank bioreactor (laboratory glass fermentor 2 l, design and construction: Institute of Biochemical Engineering, University of Stuttgart) with a working volume of 1.0 litre. The airflow was kept at 1 vvm and the pH was controlled at 5.0 by adding 2M NaOH. To prevent foam formation, small quantities of Contraspum 210 (Zschimmer & Schwarz, Lahnstein, Germany) were added at regular intervals. The composition of the

mineral medium was balanced for a biomass concentration of 5 g<sub>DW</sub>/liter as described by Verduyn et al. [1992] and supplemented with the base uracil (660 mg/l). The bioreactor was connected to an exhaust analysis device consisting of a paramagnetic oxygen analyzer (Oxygor 6N, Maihak, Hamburg, Germany) and an infrared CO<sub>2</sub> analyzer (Unor 6N, Maihak, Hamburg, Germany). Culture purity was routinely monitored by phase-contrast microscopy. Steady-state conditions were checked five volume changes after the beginning of the chemostat mode by following the signal of the exhaust analysis and the concentrations for biomass, extracellular glucose, and ethanol. After confirming steady-state conditions, prewarmed (30°C) batch medium from a bottle connected to the bioreactor via a silicone tube was introduced into the bioreactor which increased the volume of the biosuspension from 1.0 l to 1.7 l. A pressure increase in the bottle (applied via a sterile filter) forced the solution through the silicone tube into the bioreactor in less than 10 seconds. The pre-sterilized batch medium consisted of the same components as for the continuous cultivation but was adjusted to reach a biomass concentration of 25 g<sub>DW</sub>/litre at the end of the batch phase. Sampling was performed employing a vacuum-driven rapid sampling device (modification of the sampling valve described by Theobald et al. [1993] in combination with rapid cryofiltration (< -20°C) [Müller et al., in press]. The sampling device (Figure 1) was connected to an adapter for vacuum supply.



**Figure 1:** Adaptor for the sampling valve

During the experiment the concentrations of biomass, extracellular glucose, and ethanol were measured. In order to follow the expression of glucose transport proteins at steady-state conditions and during the course of the batch process, we prepared membrane fractions of the samples and subjected them to Western analysis using antibodies against Hxt1, Hxt5, and Hxt7 (kind gift from E. Boles, Department of Microbiology, University of Frankfurt/Main) as described below.

#### Multiple stimuli

*S. cerevisiae* JBY20 was grown in continuous culture ( $D = 0.1 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ ) under glucose-limitation at 30°C in a stirred tank bioreactor (pilot plant 30 l, Bioengineering, Wald, Switzerland) with a working volume of 10 litres. The larger working volume compared to the first experimental approach was chosen to allow for the high number of samples withdrawn from the bioreactor during the experiment. The airflow was kept at 1 vvm and the pH was

controlled at 5.0 by adding 2M NaOH. The overpressure in the headspace of the bioreactor was controlled at 0.5 bar. The composition of the synthetic mineral medium was balanced as described above for a biomass concentration of 15 g<sub>DW</sub>/litre. Addition of antifoam agent, exhaust analysis, check for culture purity, and confirmation of steady-state conditions were performed as described above.

To simulate the concentration gradients in large production bioreactors, multiple pulse experiments were carried out. Starting from steady-state conditions, a pulse of concentrated glucose was injected into the bioreactor. The volume of the concentrated glucose solution introduced into the bioreactor was less than 0.2 % of the total working volume and therefore the dilution rate was kept essentially constant. Samples were taken using a rapid sampling device [Theobald et al., 1993] in combination with rapid cryofiltration (<-20°C) [Müller et al., in press]. An overpressure of 0.5 bar in the headspace of the bioreactor forced the biosuspension out of the sampling valve. The time necessary to return to nearly steady-state levels of the extracellular glucose concentration after the pulse was about 15 minutes (determined in a separate experiment, data not shown). After that time five further pulses were applied to the culture approximately every 15 minutes.

The concentrations of biomass, extracellular glucose, and ethanol were measured during the steady-state and after the pulses of glucose. To evaluate effects of concentration gradients on the physiological properties of *S. cerevisiae*, we followed the dynamics of the expression of the three major hexose transport proteins Hxt1, Hxt5, and Hxt7 in response to the changes of extracellular glucose concentration.

## Analytical procedures

After rapid cryofiltration the samples were frozen and thawed on ice just prior to analysis. Extracellular glucose was measured using an enzymatic assay described by Bergmeyer [1974] based on the reactions of hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and mutarotase. Glucose determinations during the experiments with multiple stimuli were carried out using microtitreplates to cope with the high number of samples. All samples were measured in triplicate.

Ethanol was assayed by gas chromatography (type 5890, Series II with FID-detector, Hewlett Packard Company, Avondale, USA; column: FS-OV-1-CB, Chromat. Service GmbH, Langerwehe, Germany) using 1-propanol as internal standard. These samples were measured in duplicate.

Biomass concentration was determined taking samples from the bioreactor into preweighed tubes. The biosuspension was centrifuged (2465 g, 10 min) and washed twice (0.9 % NaCl). The residues were dried for cell mass determination. Duplicate determinations were carried out for each sample.

Preparation of yeast membrane fractions and Western analysis were done essentially as described by Krampe et al. [1998]. Anti-HA high-affinity antiserum (Roche Diagnostics Inc., Mannheim, Germany) was diluted 1:1,000. Anti-Hxt1 and anti-Hxt7 antiserum (kind gift of E. Boles, Department of Microbiology, University of Frankfurt/Main) was diluted 1:1,000. Sheep anti-rat peroxidase conjugate (Chemicon, Temecula, U.S.A.), diluted 1:5,000, was used as secondary antibody for detection of Hxt5. Goat anti-rabbit peroxidase conjugate (Jackson Immuno Research Laboratories, Dianova Forschungsreagenzien, Hamburg, Germany), diluted 1:5,000, was used as secondary antibody for detection of Hxt1 and Hxt7. The glucose

transporters were visualized using BM chemiluminescence blotting substrate (Roche Diagnostics Inc., Mannheim, Germany). It should be emphasised, however, that antibodies used in this study against Hxt7 also recognise Hxt6. Because of the very low expression level of Hxt6 compared to Hxt7 [Reifenberger et al., 1995] and the similar regulation of their expression [Boles et al., 1997], we refer to them only as Hxt7 protein in this article.

## Results and Discussion

### Impact of perturbations in extracellular glucose on the expression of Hxt1, Hxt5, and Hxt7

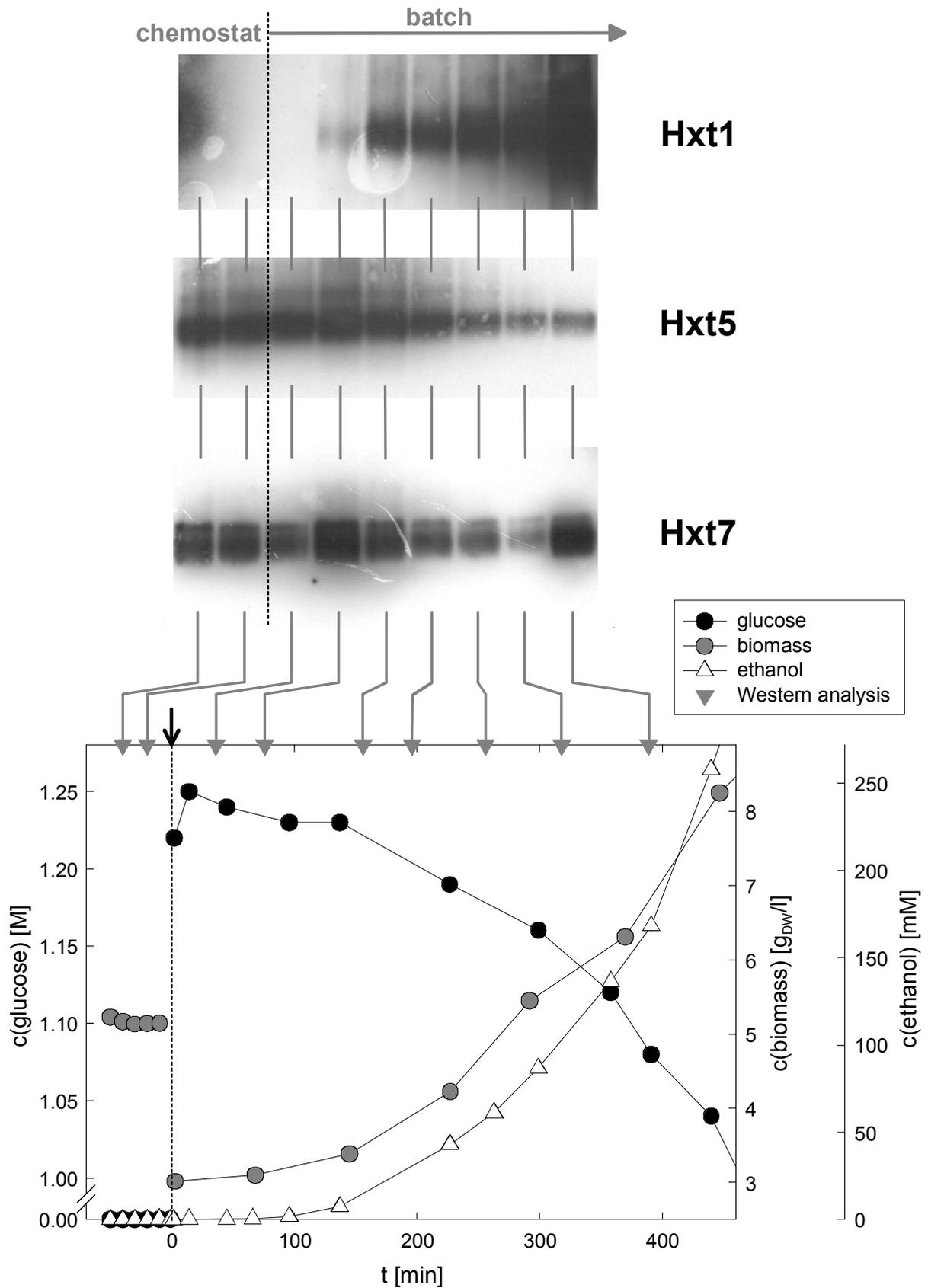
Figure 2 shows the results of the shift from continuous cultivation to a batch process. Before medium addition steady-state concentrations of biomass and glucose were stable. Because ethanol was not detectable fully respiratory growth was assured. The value for dissolved oxygen in the culture was about 80 % of saturation with air before the shift and did not decrease below 30 % during the experiment. Due to the medium addition (shift) the volume of the biosuspension increased from 1.0 l to 1.7 l and therefore the concentration of biomass dropped from about 5 g<sub>DW</sub>/l to 3 g<sub>DW</sub>/l. The measured concentration of extracellular glucose increased between the first and second sample, reflecting the mixing effect of the biosuspension and the prewarmed batch medium. After a short lag phase the biomass concentration increased from 3 g<sub>DW</sub>/l to about 8 g<sub>DW</sub>/l and the glucose concentration dropped from about 1.25 M to almost 1 M during the time of observations. The ethanol concentration in the biosuspension increased to 250 mM. Samples for Western analysis were taken as indicated in Figure 2.

Under steady-state conditions in the continuous cultivation, expression of Hxt1 was not detectable in Western analysis. This is in agreement with the findings of Özcan et al. [1995] regarding the regulation of this low-affinity transporter with respect to extracellular glucose.

During continuous phase the signals for Hxt5 and Hxt7 remain at the same level indicating a constant expression of these transporter proteins during glucose-limited growth.

After the shift to the batch mode the signal for Hxt1 increases constantly from the second sample at 76 min until the last sample at 389 min. The dark shadow seen at the left side of the blot shown in Figure 2 is an artefact in the lane before caused by a cross reaction of the antibody with the used molecular weight marker. Two different regulatory phenomena could be responsible for this expression of Hxt1: The “high glucose” signal and/or the hyperosmotic stress caused by the high glucose concentration.

*HXT1* expression is induced at high levels of glucose (> 200 mM) and is controlled by at least two different signal transduction pathways [Boles et al., 1997]. Transcription of *HXT1* at high glucose concentration is activated via the Rgt2-Rgt1-dependent pathway. Rgt1 is a zinc cluster DNA-binding protein which represses transcription of *HXT1* when glucose is absent and activates its expression at high glucose concentrations by directly binding to the *HXT1* promotor [Özcan et al., 1996]. Another regulatory mechanism, which requires hexokinase II and the Reg1 protein, mediates further induction of *HXT1* expression by high levels of glucose [Özcan et al., 1999].



**Figure 2:** The diagram shows the shift from chemostat cultivation under glucose-limitation to conditions of glucose excess after adding a batch-medium (black arrow). Glucose concentration (●), concentration of biomass (●) and ethanol concentration (△). Also displayed are the results of the Western analysis for the proteins Hxt1, Hxt5 and Hxt7 during the steady-state phase and after the shift to batch mode (▼).

As the glucose concentration after the shift to batch mode was higher than 1.2 M, the cells also faced hyperosmotic stress. Recent investigations [Hirayama et al., 1995; Rep et al., 2000] revealed that expression of Hxt1 is indeed induced by hyperosmotic stress. Likely, the enhanced expression in response to hyperosmotic stress satisfies an increased demand for glucose which can be used for the synthesis of glycerol, an osmoprotective compound. Under hyperosmotic conditions, the cell requires a so-called compatible solute to counter osmotic dehydration and loss of turgor/volume. [Andre et al., 1991]. Presumably both signals, the high glucose conditions (about 12 times the  $K_M$  for Hxt1) and the hyperosmotic stress led to the induction of Hxt1. Hyperosmotic stress may also have been the cause for the observed lag phase. A growth arrest due to hyperosmotic stress is also described by Rep et al. [2000] as a result of major changes in the cellular physiology in response to unfavourable osmotic conditions.

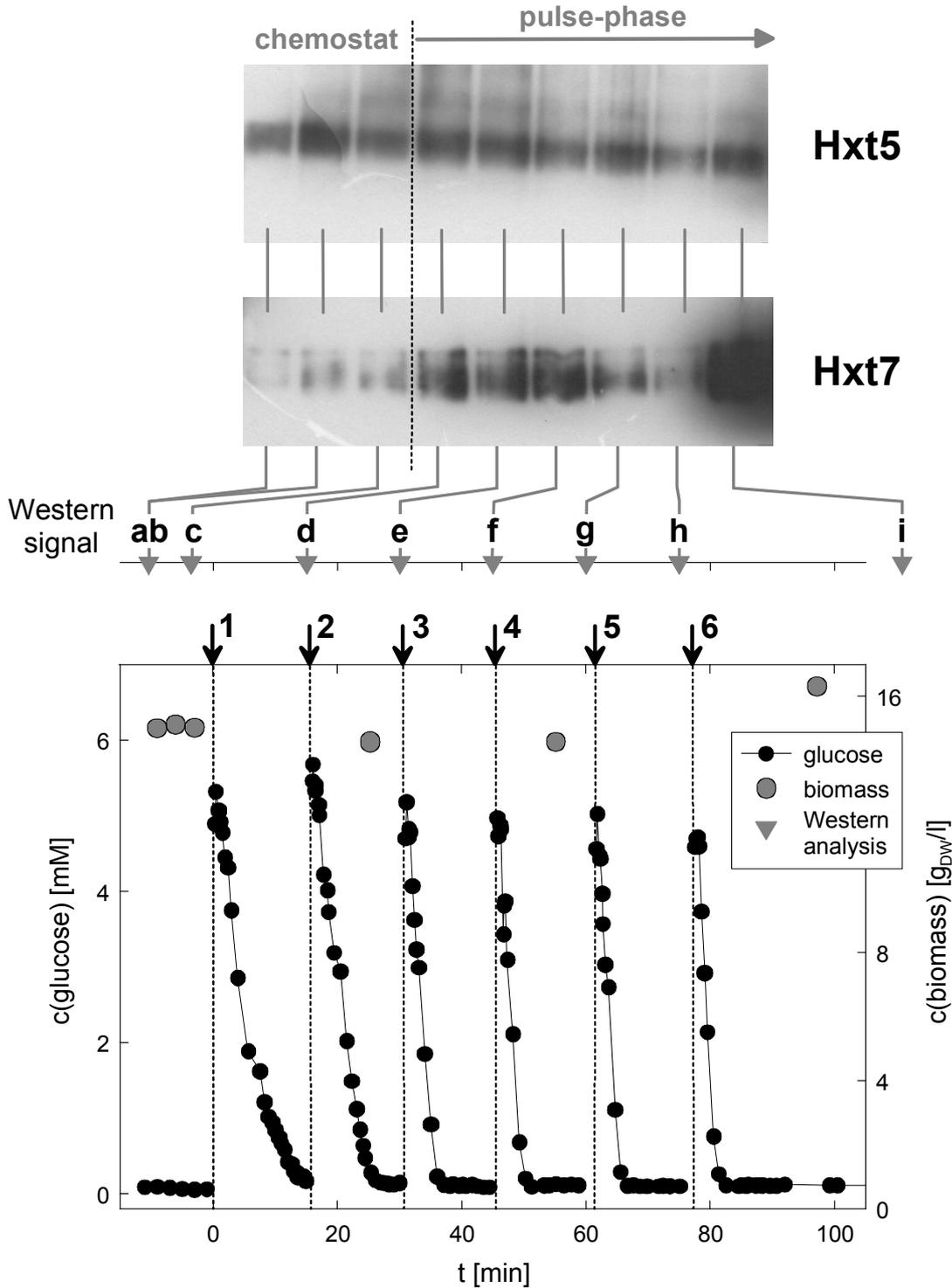
The Hxt5 protein shows constant expression until the Hxt1 transporter is strongly expressed (about 160 min after the shift to batch-mode). Recent investigations [Buziol et al., 2002; Diderich et al., 2001] demonstrated that Hxt5 is induced under glucose-limiting conditions in a chemostat and is repressed when glucose is available in excess. Our data confirm these results as we observed high expression levels under glucose-limited conditions in the chemostat. This is also consistent with the proposed function of Hxt5 as a reserve transporter in the initial uptake of glucose, when glucose becomes available again after being absent [Buziol et al., 2002; Diderich et al., 2001]. Later the expression for Hxt5 decreased but did not vanish completely during our observations. However, Hxt5 is also expressed under conditions of hyperosmotic stress as reported by Rep et al. [2000].

The Hxt7 protein did not show a consistent decrease under high glucose conditions as expected. In contrast to the other two proteins, the expression of the Hxt7 transporter increased between the first (36 min) and second sample at 76 min, and afterwards decreased until the last but one sample at 318 min. The initial response of the cells to this change in extracellular glucose concentration was an increase in the abundance of this transport protein. It appears that the cells initially boost their uptake capacity upon the switch to glucose excess by increasing the concentration of the existing transporter system before the appropriate transporter for the new conditions of "high glucose" (Hxt1) is induced. This would be consistent with the observed decrease in the amount of Hxt7 protein as soon as the Hxt1 transporter becomes visible in Western analysis. Our results are strengthened by recent investigations, showing that expression of Hxt6 and Hxt7 increased early in batch growth, when glucose concentration was still approximately 100 mM [DeRisi et al., 1997]. After the initial increase expression of Hxt7 declined steadily until the last but one sample but did not vanish completely. The expression of this transporter type at 389 min was again very high. At the moment we cannot explain the strong signal for Hxt7 in the last sample. To ensure that this signal is not caused by differences in protein amount a separate investigation was performed with silver staining. The results of this experiment confirmed that reproducible protein amounts were loaded onto the gels.

### Expression of Hxt1, Hxt5 and Hxt7 in response to multiple glucose pulses

To simulate the effect of substrate concentration gradients in large-scale bioreactors, multiple pulses of concentrated glucose solution were applied to a chemostat. We introduced six pulses

of concentrated glucose solution into the biosuspension, which increased the substrate concentration every time from the steady-state level of about 80  $\mu\text{M}$  to almost 5.5 mM. When the signal reached the steady-state level again, the next pulse was introduced. The elapsed time was estimated in a separate experiment (data not shown). In Figure 3 the results of the experiment are displayed.



**Figure 3:** The diagram shows changes in glucose levels under steady-state conditions during aerobic chemostat cultivation and after multiple glucose pulses (black arrows 1-6). Glucose concentration (●), concentration of biomass (●). Also displayed are the results of the Western analysis for the proteins Hxt5 and Hxt7 during steady-state phase and the multiple stimuli (▼). Western signals (a) and (b) derive from the same steady-state sample.

The diagram shows the concentration for glucose and biomass during the six pulses. The black arrows indicate the times at which the pulses were introduced into the bioreactor. Samples were also withdrawn from the bioreactor for Western analysis of the transport proteins Hxt1, Hxt5, and Hxt7. These results are shown in the upper part of Figure 3. The grey lines indicate the times when the samples for Western analysis were taken.

Steady-state concentrations for biomass and glucose were stable and ethanol was not found in the biosuspension, which assured fully respiratory growth. The value of oxygen saturation in the culture was about 80 % of air saturation before the shift and did not decrease below 40 % during the experiment except for the very short phases (few seconds) when the overpressure was relieved to introduce the pulses. But even then the measured oxygen never dropped below 22 %.

During the steady-state phase the signals for Hxt5 and Hxt7 were quite stable (Western signal a – c). In line with the results of the first experiment, the Hxt1 protein was not detectable under glucose-limiting conditions. The evidence of these observations were supported by additional control experiments with known expression of Hxt1 in a similar way as described before.

The expression of Hxt5 did not change significantly with respect to the steady-state level during the six pulses. In contrast, the Hxt7 protein was expressed to a much larger extent after the first pulse (Western signal d) than under steady-state conditions and increased further. After the fourth pulse the expression decreased (Western signal g) and was almost at the steady-state level after the fifth pulse (Western signal h). Surprisingly, about 34 minutes after the last pulse (Western signal i) we observed a very strong expression for Hxt7. The overall dynamics is the result of the concerted interaction of different activation and inhibition signals responsible for the induction and repression/degradation of the transport protein. The gene *HXT7* is induced by low glucose and repressed almost completely by high glucose levels [Ciriacy et al., 1997; Liang et al., 1996]. It appears to be under control of the general glucose repression pathway [Ye et al., 2001]. The low glucose sensor protein Snf3 and Grr1, a central component of a glucose signal transduction mechanism, is involved in induction of *HXT7* by glucose [Schulte et al., 2000]. Overlapping signals of these different complex pathways affecting the repression and induction of the *HXT6* and *HXT7* genes could lead to a competing attenuation or an activation of its synthesis, respectively, what in series may result in the observed strong signal after the last pulse.

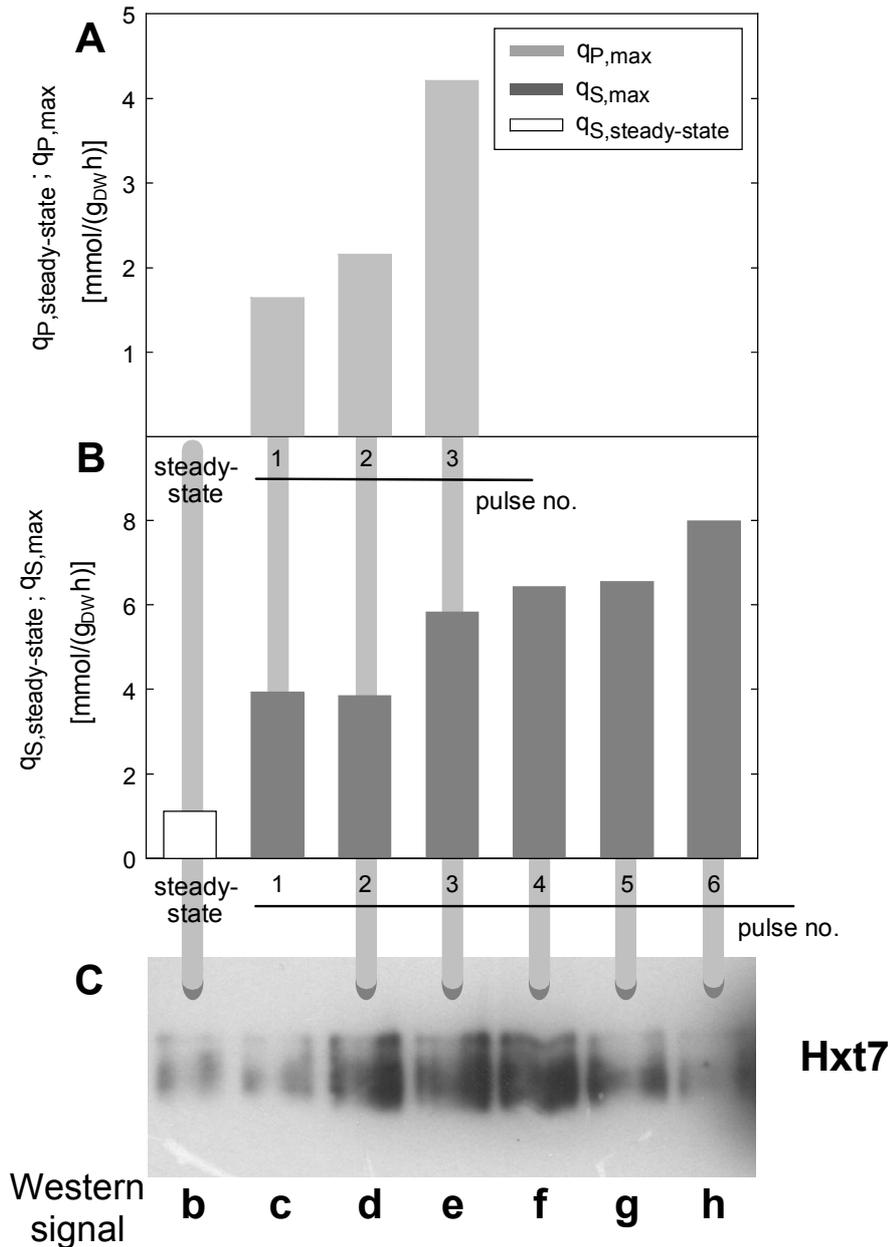
No signal was detectable for the Hxt1 protein (data not shown). The six pulses did not trigger its induction. Either the concentration of glucose or the number of pulses was too low to induce its expression. To validate this observation Western analysis for two samples were withdrawn from a separate batch culture at high glucose concentrations (75 and 92 mM) where Hxt1 is known to be expressed. The expression of Hxt1 for these samples was clearly detectable and confirmed our findings.

The biomass concentration was stable up to the fifth pulse and increased by about 10 % after the sixth pulse with respect to the steady-state level.

The results of this experiment show that rapid transient changes in the concentration of glucose have an pronounced influence on the expression of at least one hexose transport protein. This points to an influence of glucose gradients in large-scale bioreactors on expression patterns of glucose transport proteins and thus probably also on glycolytic flux and productivity.

Effect of elevated expression of Hxt7 on the maximal specific uptake rate

To assess the effect of the observed elevated expression of a component of the high-affinity glucose uptake system (Hxt7) on the maximal specific uptake rate  $q_s$ , we evaluated the glucose signal of the multiple stimuli approach. To this end we compared the expression of the transport protein with the corresponding glucose uptake rate by relating the expression measured via Western analysis to the uptake rate determined from the initial slope of the glucose signal of the following pulse (see Figure 4).



**Figure 4:** Steady-state and maximal specific excretion rates for ethanol  $q_P$  (A) and uptake rates for glucose  $q_S$  (B) before and during the pulse phase compared to the Western signals (C). Lanes b and c in (C) both represent steady-state values.

The predicted maximal specific uptake rates for glucose shown in Figure 4 B confirm the sharp rise of the uptake capacity already visible in the steepening slopes of the pulses 1 to 6 in

Figure 3. Starting from the steady-state values, the specific uptake rate increases until pulse 6 by a factor of about 7 compared to the steady-state value. The expression of the Hxt7 transporter measured via Western analysis first increases (Figure 3, Western signal d, e, f) but then declines again to almost steady-state levels after the fourth pulse (Figure 3, Western signals f to h). As a consequence of the increase in extracellular glucose concentration to values exceeding 10 times the  $K_S$ -value of wild-type *S. cerevisiae* ( $K_S \approx 0.4$  mM, [Buziol et al., 2002]), the first increase in the glucose uptake rate (pulse no. 1 in Figure 4 B) reflects the transition to maximal uptake capacity of the transport system present under steady-state conditions. Thus the specific glucose uptake rate increases from ca. 1 mmol/(g<sub>DW</sub>·h) to about 4 mmol/(g<sub>DW</sub>·h). Until the third pulse the maximal glucose uptake rate further increases to about 6 mmol/(g<sub>DW</sub>·h). This additional increase could be traced back to supplementary transport capacity, arising from newly inserted transport protein into the plasma membrane. This is reflected in the increased expression of Hxt7 before the second pulse (Figure 4 C, Western signal d) which remains at this level until the fourth pulse (Figure 4 C, Western signal e and f). At first glance there is no clear correlation between the Western signal and the glucose uptake capacity. However, the Western signal of the second pulse (Figure 4 C, Western signal d) may result from Hxt7 protein already translated and en route to the plasma membrane in the secretory path as our preparation of membrane fractions not only enriches the plasma membrane but also intracellular membranes. Protein on the way in the secretory path does not contribute to the uptake of glucose but is visible in the Western blot. The Western signal for the Hxt7 protein in the plasma membrane can thus be masked by the Hxt7 protein inserted into intracellular membranes. Therefore the increased glucose uptake rate during the third pulse may reflect the insertion of new protein from the secretory path into the plasma membrane. Investigations of Krampe and Boles [2002] demonstrated a high basal level of Hxt7 turnover. An enhanced demand for this protein within this timescale can therefore be met either by decreased degradation of this transporter or by increased insertion of functional Hxt7 protein into the plasma membrane. Maybe this result actually reflects the rapid recruitment of Hxt7 from an intracellular pool in response to changing environmental conditions as suggested by Kruckeberg et al. [1999] or an accelerated mobilization of protein in the secretory path.

Preliminary results for the ethanol excretion rate ( $q_p$ ) shown in Figure 4 A support this hypothesis as  $q_p$  increases drastically from the second to the third pulse in correlation with the rise of the glucose uptake rate. Moreover, this result is in line with glucose transport exerting by far the highest control over ethanol flux as has been deduced from the hierarchy of flux control coefficients for this pathway by Mauch et al. [2002], i.e. that glucose uptake determines ethanol production to a great extent.

It seems that the yeast cells respond to the "high glucose" signal by an increasing uptake capacity via enhanced expression of the transport protein already in use for glucose uptake. However, the rise in the maximal specific uptake rate cannot solely be the consequence of increased expression of Hxt7 as the uptake rate increases further when the signal for Hxt7 declines. Wendell and Bisson [1994] have shown that Hxt2 also mediates high-affinity transport of glucose in *S. cerevisiae* and that its activity is regulated posttranslationally. Diderich et al. [1999] were able to demonstrate expression of Hxt2 on the basis of RNA blot analysis in aerobic glucose-limited chemostat cultures at various dilution rates. As the steady-state conditions in our system were similar to the latter, Hxt2 was presumably also expressed in our cells. Several groups have reported an activation of Hxt2 at low glucose conditions [Kruckeberg et al., 1999; Özcan et al., 1995]. The glucose concentration used in the

experiments of Kruckeberg et al. [1999] was in the range of the peak-values of the pulses in our investigation. Therefore, an activation of Hxt2 in response to multiple stimuli may have occurred in our experiment thus causing a rapid increase in the maximal specific uptake rate in our system. Another, though rather unlikely possibility for the enhanced uptake could be a modulation of the activity of the Hxt7 protein which has not been reported so far to our knowledge. Alternatively, one of the still ill-characterized or even unknown transport proteins for glucose could account for this observation.

The still incomplete picture of the expression dynamics of glucose transport proteins and the mediated uptake capacity would greatly benefit from an increased availability of antibodies against all transport proteins which are relevant for growth of *S. cerevisiae* on glucose.

### Acknowledgements

This paper is based on results from a project financed by the German Science Foundation (DFG) (grant Ri 672/3-1 to M.R.). The strain JBY20 and antibodies against Hxt1 and Hxt7 were kindly provided by Prof. Dr. E. Boles (Department of Microbiology, University of Frankfurt/Main). We thank N. Rahaus, Dr. M. Siemann and D. Voss for their help with the Western analysis and D. Müller for reading the manuscript.

### References

- Amanullah A, McFarlane CM, Emery AN and Nienow AW. 2001. Scale-down model to simulate spatial pH variations in large-scale bioreactors. *Biotechnol Bioeng.* **73**: 390-9.
- Andre L, Hemming A and Adler L. 1991. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>). *FEBS Lett.* **286**: 13-7.
- Bajpai RH and Reuss M. 1982. Coupling of mixing and microbial kinetics for evaluation of the performance of bioreactors. *Can J Chem Eng.* **60**: 384-92.
- Bergmeyer HU. 1974. *Methods in Enzymic Analysis*. Acad. Press. New York.
- Boles E and Hollenberg CP. 1997. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol Rev.* **21**: 85-111.
- Buziol S, Becker J, Baumeister A, Jung S, Mauch K, Reuss M and Boles E. 2002. Determination of *in vivo* kinetics of the starvation-induced Hxt5 glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research.* **1488**: 1-9.
- Bylund F, Collet E, Enfors SO and Larsson G. 1998. Substrate gradient formation in the large-scale bioreactor lowers cell yield and increases by-product formation. *Bioprocess Engineering.* **18**: 170-81.
- Ciriacy M and Reifemberger E. 1997. Hexose Transport. F. K. Zimmermann and K. D. Entian. Technomic Publishing CO., INC. 45-65
- DeRisi JL, Iyer VR and Brown PO. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science.* **278**: 680-6.
- Diderich JA, Schepper M, van Hoek P, Luttk MA, van Dijken JP, Pronk JT, Klaassen P, Boelens HF, de Mattos MJ, van Dam K and Kruckeberg AL. 1999. Glucose uptake kinetics and transcription of HXT genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **274**: 15350-9.

- Diderich JA, Schuurmans JM, Van Gaalen MC, Kruckeberg AL and Van Dam K. 2001. Functional analysis of the hexose transporter homologue HXT5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **18**: 1515-24.
- Enfors SO, Jahic M, Rozkov A, Xu B, Hecker M, Jurgen B, Kruger E, Schweder T, Hamer G, O'Beirne D, Noisommit-Rizzi N, Reuss M, Boone L, Hewitt C, McFarlane C, Nienow A, Kovacs T, Tragardh C, Fuchs L, Revstedt J, Friberg PC, Hjertager B, Blomsten G, Skogman H, Hjort S, Hoeks F, Lin HY, Neubauer P, van der Lans R, Luyben K, Vrabel P and Manelius A. 2001. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *J Biotechnol*. **85**: 175-85.
- Hirayama T, Maeda T, Saito H and Shinozaki K. 1995. Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity- responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. **249**: 127-38.
- Ko CH, Liang H and Gaber RF. 1993. Roles of multiple glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **13**: 638-48.
- Krampe S and Boles E. 2002. Starvation-induced degradation of yeast hexose transporter Hxt7p is dependent on endocytosis, autophagy and the terminal sequences of the permease. *FEBS Lett*. **513**: 193-6.
- Krampe S, Stamm O, Hollenberg CP and Boles E. 1998. Catabolite inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *FEBS Lett*. **441**: 343-7.
- Kruckeberg AL. 1996. The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*. **166**: 283-92.
- Kruckeberg AL, Ye L, Berden JA and van Dam K. 1999. Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein. *Biochem J*. **339**: 299-307.
- Liang H and Gaber RF. 1996. A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by Snf3-regulated expression of HXT6. *Mol Biol Cell*. **7**: 1953-66.
- Mauch K, Buziol S, Schmid J and Reuss M. 2002. Computer Aided Design of Metabolic Networks. *Chemical Process Control VI. AIChE Symposium Series No. 326*. **98**: 82-91.
- Müller D, Exler S, Aguilera-Vazquez L, Guerrero-Martin E and Reuss M. in press. Cyclic AMP Mediates the Cell Cycle Dynamics of Energy Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **in press**:
- Özcan S and Johnston M. 1999. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev*. **63**: 554-69.
- Özcan S and Johnston M. 1995. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol Cell Biol*. **15**: 1564-72.
- Özcan S, Leong T and Johnston M. 1996. Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription. *Mol Cell Biol*. **16**: 6419-26.
- Reifenberger E, Boles E and Ciriacy M. 1997. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur J Biochem*. **245**: 324-33.
- Reifenberger E, Freidel K and Ciriacy M. 1995. Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Mol Microbiol*. **16**: 157-67.

- Rep M, Krantz M, Thevelein JM and Hohmann S. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem.* **275**: 8290-300.
- Rolland F, Winderickx J and Thevelein JM. 2002. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research.* **1457**: 1-19.
- Schmalzriedt S, Jenne M, Mauch K and Reuss M. 2002. Integration of physiology and fluid dynamics. *Adv Biochem Eng.* in press.
- Schulte F, Wieczorke R, Hollenberg CP and Boles E. 2000. The HTR1 gene is a dominant negative mutant allele of MTH1 and blocks Snf3- and Rgt2-dependent glucose signaling in yeast. *J Bacteriol.* **182**: 540-2.
- Theobald U, Mailinger W, Reuss M and Rizzi M. 1993. In vivo analysis of glucose-induced fast changes in yeast adenine nucleotide pool applying a rapid sampling technique. *Anal Biochem.* **214**: 31-7.
- Verduyn C, Postma E, Scheffers WA and Van Dijken JP. 1992. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous- culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast.* **8**: 501-17.
- Wendell DL and Bisson LF. 1994. Expression of high-affinity glucose transport protein Hxt2p of *Saccharomyces cerevisiae* is both repressed and induced by glucose and appears to be regulated posttranslationally. *J Bacteriol.* **176**: 3730-7.
- Wendell DL and Bisson LF. 1993. Physiological characterization of putative high-affinity glucose transport protein Hxt2 of *Saccharomyces cerevisiae* by use of anti- synthetic peptide antibodies. *J Bacteriol.* **175**: 7689-96.
- Wieczorke R, Krampe S, Weierstall T, Freidel K, Hollenberg CP and Boles E. 1999. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **464**: 123-8.
- Ye L, Berden JA, van Dam K and Kruckeberg AL. 2001. Expression and activity of the Hxt7 high-affinity hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **18**: 1257-67.

## Publikation IV

Mauch K, Buziol S, Schmid J and Reuss M. 2002. Computer aided design of metabolic networks. Reviewed paper. Chemical Process Control VI. AIChE Symposium Series No. 326. **98**: 82-91

## **Computer aided design of metabolic networks**

**K. Mauch, S. Buziol, J. Schmid and M. Reuss**

Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart, Allmandring 31, D-70569 Stuttgart,  
Germany

## **Abstract**

This contribution presents results obtained from a model based design of metabolic networks. In the first part of the paper, topological analysis is used for exploring the metabolic architecture. These investigations - also called pathway analysis or flux space analysis - are aimed at detecting the metabolic routes that lead from anyone starting point to some products. The technique is applied for the computation of maximal yields for amino acids and, for the first time, also for the analysis of metabolic networks in context with the formation of biomass. The latter study leads to an array of mutants with different biomass yields, for which the name „Phenome“ has been coined.

In the second part of the contribution, a strategy for the optimization of product formation rates is presented by means of the ethanol formation rate in *Saccharomyces cerevisiae*. A dynamic model based on experimental observations at defined anaerobic conditions serves as a starting point. Non-linear optimization of the distribution of enzyme activities results in a substantial increase of ethanol formation rate. The optimum is mainly constrained by homeostasis and can be characterized by higher activities of strongly rate limiting steps. However, some enzymes exerting almost no control on ethanol flux (e.g. triose phosphate isomerase) are found at higher activities as well. This finding can be explained by the enzyme's ability of counteracting an increase of pool concentrations effectively.

## **Keywords**

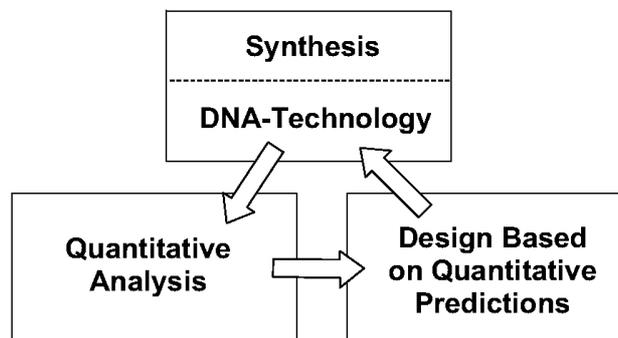
Metabolic networks, flux analysis, flux optimization

## Introduction

One of the fascinating challenges in mastering biosystems is to interpret living processes in a quantitative manner. As such, mathematical modeling is of central importance. At a time of the ballooning amount of data generated by the high throughput technology in genome, transcriptome, proteome and metabolome research, one of the important issues for modeling is to bridge the gap between data and an integrated understanding of the complex functionality of biosystems. Moreover, there is an urgent need for new approaches to strengthen the model based design of biosystems. This activity is of increasing relevance with respect to the optimization of yields, selectivities and productivities in industrial bioprocesses. Furthermore, mathematical modeling will lead to significant insight through an integrative analysis of diseases and support target identification for drug discovery.

While the potential and promise of biological systems modeling is substantial, also several obstacles are encountered. Before benefits can be gathered from biological systems analysis, issues like, for example, the appropriate balance between significance, complexity and availability of quantitative experimental observations need to be addressed. Furthermore, in many cases insufficient emphasis has been placed on fundamental questions of purpose, intended application (Bailey, 1998), predictive power and relevance concerning significant contributions to the solution of the aforementioned problems.

This contribution aims at the design of biosystems within industrial applications. Therefore, modeling is part of a well known engineering cycle depicted in Figure 1.



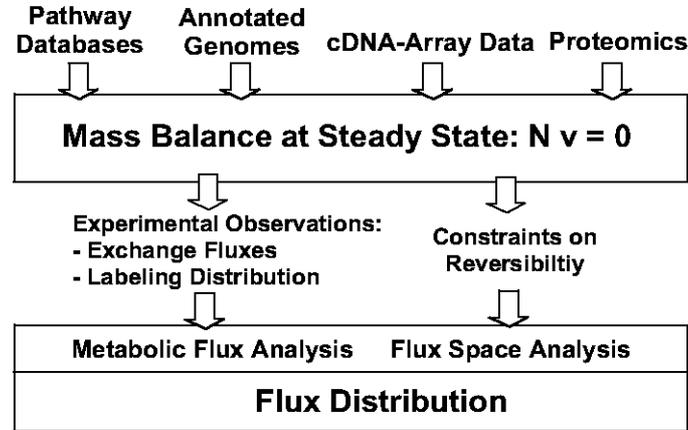
**Figure 1:** Optimization of bioprocesses through Metabolic Engineering.

Central to the general modeling framework is its predictive strength. A sound prediction, in turn, must rest upon reliable experimental data. In the majority of cases, implementation of the model-based suggestions for genetic reprogramming is performed with the aid of recombinant DNA-technology. Unfortunately, only few models qualify for the design of metabolic networks. When extrapolation beyond the horizon of experimental observations is required, the missing link mostly is predictive strength. A critical assessment of the state of the art and meaningful discussion of the present limits would require a comprehensive evaluation of several fundamental issues of modeling biosystems. Only two of these issues will be addressed in this contribution:

- (1) Flux analysis based on topological properties and
- (2) Flux optimization based both on topological and kinetic properties of metabolic networks.

## Flux Analysis

According to the source of information, balance equations for the metabolic system of interest can be created (see Figure 2).



**Figure 2:** Quantification of flux distributions.

When balance equations are derived from annotated sequence data, the resulting stoichiometric matrix reflects the metabolic capabilities of the genotype. While depending on physiological conditions, a more specific phenotype is considered when data from cDNA chips or proteome analysis are used. Generally, balance equations of structured metabolic models can be written as

$$\frac{d}{dt}n = Nv, \quad (1)$$

where matrix  $N(m \times n)$  contains the stoichiometric coefficients  $v_{i,j}$  of the  $n$  biochemical reactions.  $m$  denotes the number of metabolites,  $v$  the vector of reaction rates, whereas the vector of metabolites is denoted by  $n$ . Note that in Eq. (1) the transport rates across the various membranes of the cell as well as the dilution of metabolites due to growth are included in the state vector of the reaction rates  $v$ . For steady-state conditions Eq. (1) reads:

$$Nv = 0, \quad (2)$$

### Metabolic Flux Analysis

Depending on the data available and the area of application, Eq. (2) can be used for the computation of flux distributions in metabolic networks. The first route delivers solutions for flux distributions through experimentally determined exchange fluxes (Stephanopoulos et al., 1998; Mauch et al., 2000). For the estimation of unknown metabolic fluxes from experimentally determined fluxes, we rewrite Eq. (2) as

$$[N_m \mid N_c] \begin{bmatrix} v_m \\ v_c \end{bmatrix} = 0, \quad (3)$$

where vector  $v_m$  consists of  $q$  experimentally determined fluxes. The remaining  $(q-n)$  unknown fluxes are gathered in vector  $v_c$ . Partitioning of  $v$  into the known fluxes  $v_m$  and unknown fluxes  $v_c$  then yields

$$N_m v_m + N_c v_c = 0, \quad (4)$$

with matrices  $N_m$  ( $m \times q$ ) and  $N_c$  ( $m \times n-q$ ) corresponding to  $v_m$  and  $v_c$ , respectively. From Eq. (4) we obtain

$$N_c v_c = -N_m v_m, \quad (5)$$

and upon multiplying Eq. (5) by the transposed of matrix  $N_c$ , the solution for unknown fluxes  $N_c$  is obtained according to

$$v_c = -(N_c^T N_c)^{-1} N_c^T N_m v_m, \quad (6)$$

where the superscript -1 indicates matrix inversion. By defining the pseudoinverse  $N_c^\#$

$$N_c^\# = (N_c^T N_c)^{-1} N_c^T, \quad (7)$$

Eq. (6) may be rewritten as

$$v_c = -N_c^\# N_m v_m. \quad (8)$$

Mathematically, a determined metabolic system is defined by

$$\dim(v_m) = n - \text{rank}(N). \quad (9)$$

That is, the amount of experimentally determined fluxes  $q$  in  $v_m$  equals the degree of freedom of the metabolic network. If no conservation relations are present in a determined system, the pseudoinverse  $N_c^\#$  coincides with the inverse of  $N_c$ , thus

$$(N_c^T N_c)^{-1} N_c^T = (N_c)^{-1}, \quad (10)$$

Hence, the fluxes  $v_c$  of a determined system without conservation relations may be obtained by

$$v_c = -N_c^{-1} N_m v_m. \quad (11)$$

Importantly, a solution for  $v_c$  only exists for a nonsingular matrix  $N_c$ , that is

$$\det(N_c) \neq 0, \quad (12)$$

and for a determined metabolic system with  $0 \leq z < m$  conservation relations:

$$\det(N_c^T N_c) \neq 0. \quad (13)$$

Provided the existence of a unique solution for  $v_c$ , the metabolic system is called observable. For an underdetermined metabolic network we have

$$\dim(v_m) < n - \text{rank}(N), \quad (14)$$

and since a unique solution for  $v_c$  cannot be obtained, we always find

$$\det(N_c^T N_c) = 0. \quad (15)$$

Hence, the dimension  $l$  of the solution space for an underdetermined system is given by

$$l = n - \text{rank}(N_c) - \dim(v_m), \quad (16)$$

whereas an overdetermined (i.e. redundant) metabolic system is characterized by

$$\dim(v_m) > n - \text{rank}(N). \quad (17)$$

Similarly to a determined system, in overdetermined systems a unique solution for the unknown fluxes  $v_c$  can only be derived if Eq. (13) holds. Note that an overdetermined system is not necessarily observable. Frequently we meet the situation where experimental information on some fluxes is redundant while part of the metabolic network still cannot be observed. The problem of non-observable fluxes can often be bypassed when experimental data derived from tracer experiments are available. Those measurements of labeled substrates are either performed with NMR (Marx et al., 1996; Szyperski et al., 1999) or gas chromatography/mass-spectroscopy (GC-MS) (Christensen and Nielsen, 2000; Dauner and Sauer, 2000). When metabolite balance equations are extended with balance equations for the metabolite labeling distributions, a system of non-linear equations has to be solved to estimate the associated steady-state flux distributions (Wiechert and de Graaf, 1997; Wiechert et al., 1997; Schmidt et al., 1997, 1999).

## Flux Space Analysis

Flux space analysis (see Figure 2) summarizes strategies for topological analysis leading to meaningful information on the flux space in metabolic networks. This is an area of increasing importance in integrative functional genomics aimed at a better understanding of the complex relation between genotype and phenotype (Schuster et al., 1999; Schilling et al., 1999, 2000; Schuster et al., 2000; Edwards and Palsson, 1999; Palsson, 2000). This area - in terms of the „omic“ revolution sometimes named „phenomics“ - becomes urgent for developing engineering methods to deal with the massive amounts of genetic and expression data in an integrative and holistic way.

Flux space analysis (sometimes also called pathway analysis) aims at detecting the metabolic routes that lead from anyone starting point to the products of interest steady-state conditions. The two strategies applied for this analysis are the null space and the convex cone. While linear algebra is used to determine the null space of the homogeneous system of linear equations, methods of convex analysis (Vanderbei, 1998) are applied to compute the convex cone.

The null space of matrix  $N$  is the subspace spanned by  $k = \text{rank}(N) - \text{dim}(v)$  linearly independent vectors  $v$  satisfying Eq. (2). Accordingly, every linear independent base vector forms a column of the null space matrix  $K(n \times k)$ , thus

$$NK = 0. \tag{18}$$

Within the null space lie all of the flux distributions under which the system can operate at steady-state. Thus, the null space allows to describe any flux distribution of a genotype (by superposing it's base vectors). The vectors spanning the nullspace are, however, non-unique solutions of Eq. (2). Moreover, the base vectors of the nullspace do not necessarily fulfill reversibility criteria of individual reactions.

A different approach rests upon convex analysis and leads to unique sets of vectors spanning the space of admissible fluxes, for which names like, for example, elementary flux modes (Heinrich and Schuster, 1996) or extreme pathways (Schilling et al., 2000) have been coined for. In contrast to the base vectors of the nullspace, flux vectors obtained by convex analysis always obey sign restrictions of practically irreversible reaction steps. The investigations presented in the following are based on the concepts of the elementary flux modes.

### **Elementary Flux Modes**

Elementary flux modes are non-decomposable flux distributions admissible in steady-state, including reaction cycles (Heinrich and Schuster, 1996). Normally, elementary flux modes comprise a set of non-zero fluxes and a set of zero fluxes, with the latter pointing to enzymes which are not used to implement a specific function. An example for an elementary mode which frequently occurs in cellular systems is the complete oxidation of substrate in the respiratory chain. To sustain respiration, enzymes catalyzing anabolic reactions obviously become dispensable. Another example might be an elementary flux mode leading to the formation of an amino acid where, again, larger parts of the respiratory chain are nonessential. Thus, by computing elementary flux modes, the metabolic capacity of a given metabolic network is unitized. In other words, the phenotype of a certain genotype may be characterized by the complete set of elementary flux modes.

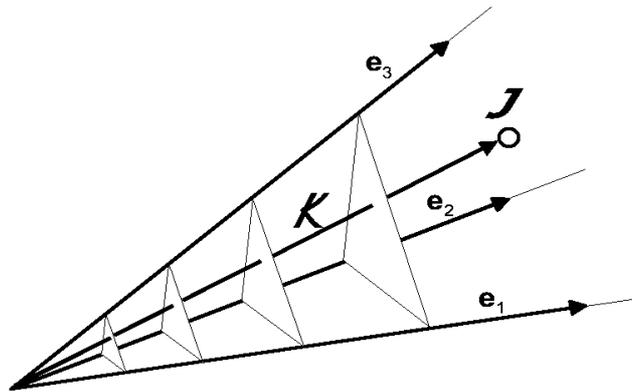
The motivation for the study of elementary flux modes arises from various potential applications. In biotechnology, an important objective is to increase the yield of biosynthetic processes where a desired product can often be synthesized by various different routes. It is then of interest to detect and subsequently implement the route on which the product/substrate ratio is maximum. Generally, a flux pattern that uses only the optimal route cannot be obtained in practice. Nevertheless, it is helpful to compute the upper limits for the molar yield from a given network topology.

It has turned out that the problem of maximizing the yield of a biotransformation can be solved by detecting all elementary modes in the system and choosing the mode giving the best yield (Schuster et al., 1999). Alternatively, such optimization problems were tackled by linear programming (Fell and Small, 1986; Savinell and Palsson, 1992; van Gulik and Heijnen, 1995).

In many cases, the net direction of a reaction is known. Therefore, we decompose the flux vector into two subvectors,  $v^{\text{irr}}$  and  $v^{\text{rev}}$ , corresponding to what will be called the irreversible and reversible reactions, respectively. So we have

$$v^{\text{irr}} \geq 0. \quad (19)$$

Eq. (2) in conjunction with inequality (19) determines what is called a convex polyhedral cone. The edges of the convex cone are established by the elementary flux modes, and all the points on the interior of the cone can be represented as positive combinations of these fundamental pathways (see Figure 3). From there, the convex cone enfolds all potential stationary flux distributions of a metabolic system.



**Figure 3:** Convex polyhedral cone  $K$  spanned by three generating vectors  $e_1$  to  $e_3$ . Flux distribution  $J$  results from a linear combination of the generating vectors  $e_i$ .

Pursuing the goal to find basic pathways in biochemical reaction networks, Schuster and Schuster (1993) have earlier developed a method for detecting the simplest flux vectors  $v$  fulfilling relations (2) and (19) with all reactions assumed to be irreversible. Generalizing the approach in that both reversible and irreversible reactions are allowed for, this has led to the concept of elementary flux modes (Schuster and Hilgetag, 1994).

Elementary flux modes are defined as follows (Heinrich and Schuster, 1996, cf.): An elementary flux mode,  $M$ , is defined as the set

$$M = \{v \in \mathbb{R}^n \mid v = \lambda v^*, \lambda > 0\}, \quad (20)$$

where  $v^*$  is a  $n$  - dimensional vector (unequal to the null vector) fulfilling the following two conditions.

- (a) Steady-state condition.  $Nv^* = 0$ .
- (b) Sign restriction.

If the system involves irreversible reactions, then the corresponding subvector  $v^{irr}$  of  $v^*$  fulfils inequality (19). For any couple of vectors and (unequal to the null vector) with the following properties:

- $v'$  and  $v''$  obey restrictions (a) and (b),
- both  $v'$  and  $v''$  contain zero elements wherever  $v^*$  does, and they include at least one additional zero component each,  $v^*$  is not a nonnegative linear combination of  $v'$  and  $v''$ ,  $v^* \neq \lambda_1 v' + \lambda_2 v'', \lambda_1, \lambda_2 > 0$ .

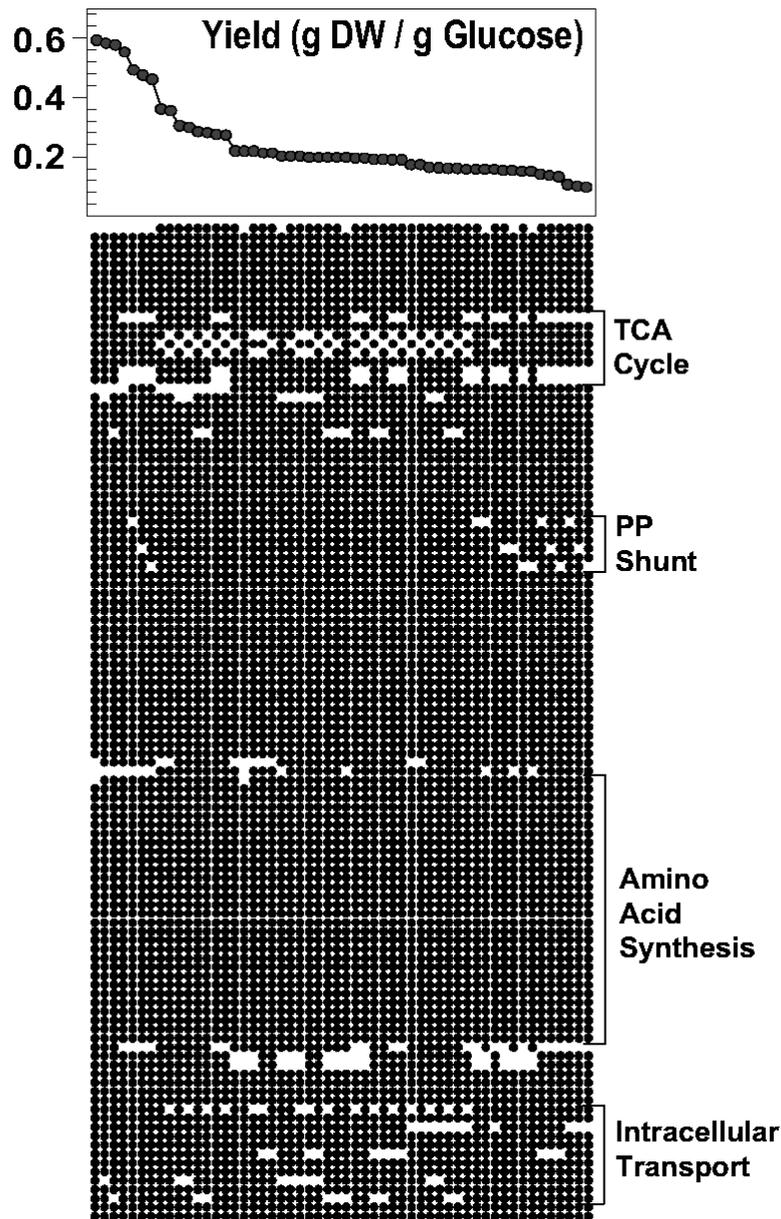
The last condition formalizes the concept of genetic independence introduced by Seressiotis and Bailey (1988). The condition says that a decomposition into two other modes should not involve additional enzymes.

Elementary modes have been determined in a number of biochemical networks, such as the synthesis of precursors of aromatic amino acids (Liao et al., 1996), the tricarboxylic acid cycle and adjacent pathways (Schuster et al., 1999) and glycolysis and alternative pathways in bacteria (Dandekar et al., 1999).

While the promise is substantial, the value of the topological analysis will not be fully utilized until algorithms are developed capable of tackling large metabolic, signaling or gene networks efficiently. What are the limits of the known algorithms in the calculation of elementary flux modes when applied to large systems?

Most of the algorithms applied to biological systems so far are bottom up approaches (Schuster et al., 2000b; Schilling et al, 2000). Initially, the stoichiometric matrix is augmented with the identity matrix. Next, a consecutive computation of matrices through combination of rows is performed until the stoichiometric matrix only contains zero elements. Obviously, this is a consecutive approach where all elementary modes are created at the final step. In addition, a large number of interim solutions are computed which finally disappear. By consequence, since even modest network sizes showing a larger degree of freedom might feature thousands of elementary flux modes, the problem easily becomes computationally intractable. Nevertheless, (Schilling and Palsson, 2000) have recently tackled the problem of prediction of the so called extreme pathways for *Haemophilus influenza*, represented by a network of 461 reactions. The strategy applied rests upon a decomposition of the network into subsystems to get a picture of the structural information for the entire system.

Alternative approaches make use of top down strategies considering the entire system in a more direct way (Happel and Sellers, 1989). As a result, successive solutions containing the complete network information are created. Mauch (to be published) developed an algorithm performing combinations of the base vectors of the null space in pairs. Figure 4 shows an example of the application of this algorithm for a system with 141 reactions in which the polymerization reactions for formation of biomass - and therefore growth - has been taken into account for the prediction of the elementary flux modes.

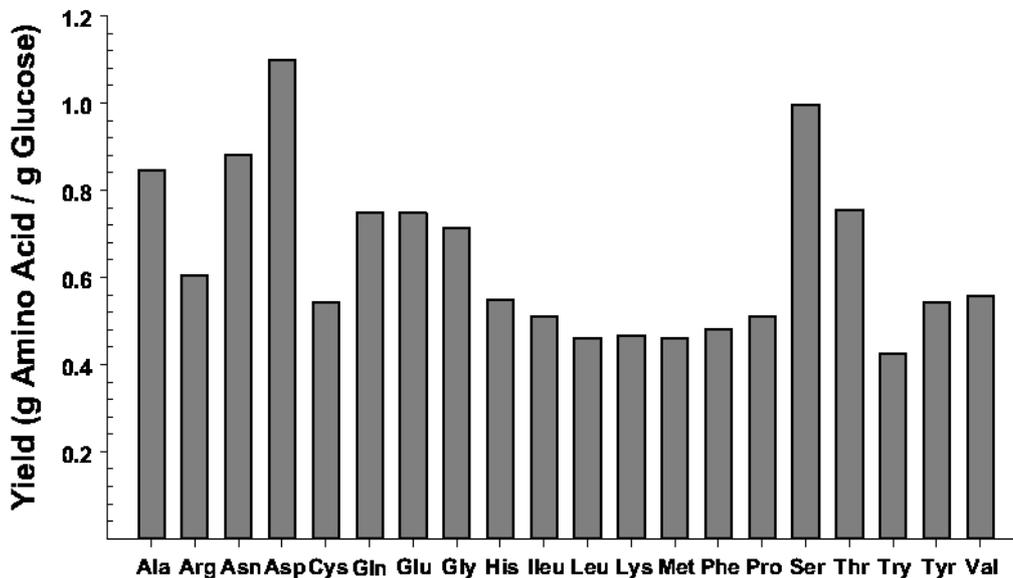


**Figure 4:** Elementary flux modes in *S. cerevisiae*. Explanation see text.

Each column shown in Figure 4 represents an elementary flux mode utilizing glucose as the sole carbon and energy source while producing biomass. Open symbols represent deleted genes for various reactions in the network. Obviously, these different mutants - or different phenotypes - are still able to grow albeit with varying yield coefficients. Elementary modes given in Figure 4 are ordered in descending sequence with respect to the yield of biomass on glucose. The maximal value of the biomass yield is in agreement to what has been measured for *S. cerevisiae* growing with glucose under aerobic conditions. For mutants with defects in the transport systems via the mitochondrial membrane, for example, the biomass yield decreases to a value observed under anaerobic conditions. Thus, structural properties of the network clearly define the upper limit of product yields. Interestingly, these findings are independent of the kinetic properties of the network. Absolute values of fluxes as well as a

dynamic response to system perturbations, however, can only be described when kinetic rate equations have been assigned.

By a closer inspection of the solution shown in Figure 4, it is possible to separate more flexible regions of the network from rigid parts. For instance, we cannot delete any reaction in the pathways leading to amino acids. This is a reasonable finding for growth in the presence of synthetic media. In contrast, greater flexibility is observed in the citric acid cycle (TCA), pentose phosphate (PP) shunt and intracellular transport. It is interesting to recognize that these variations also have been identified as key modulations during the process of evolution. The design aspect of these predictions may be better elaborated by examples of biotechnological relevant product formation. A desired product can often be synthesized by various different routes or pathways within the network. It is then of interest to detect the route on which the product/substrate ratio is maximum. Figure 5 illustrates an example showing the maximal yield of the individual 20 amino acids on substrate glucose in *S. cerevisiae*.



**Figure 5:** Maximal yields of amino acids on glucose in *S. cerevisiae*.

The results shown in Figure 5 have been obtained by detecting all elementary modes in the system and then choosing the mode giving the best yield. Sometimes, however, implementation of an elementary mode leading to a slightly non-optimal yield might be easier from a practical point of view. In contrast to linear optimization, the complete set of elementary flux modes immediately provides the complete spectrum of alternative implementations.

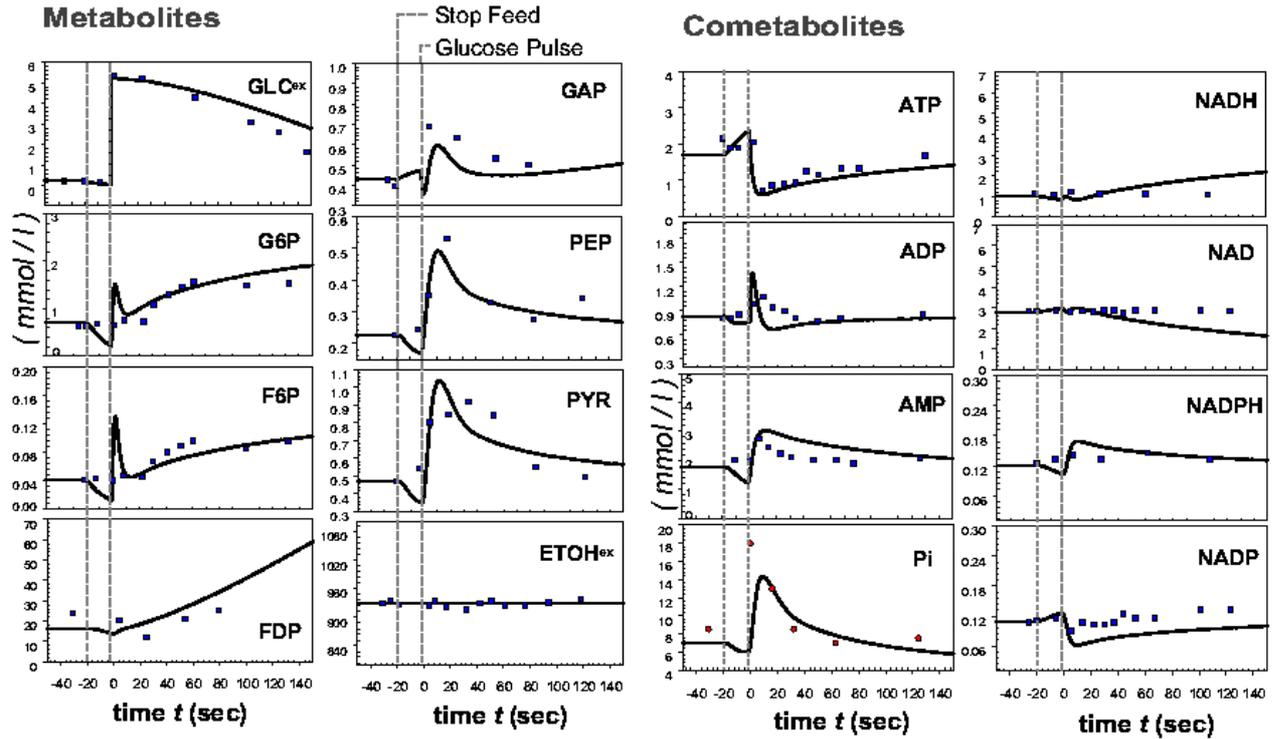
## Flux Optimization

The driving force for selection of an optimal pathway is the maximization of the yield of the product. However, economic considerations also require optimization of the product formation rate (productivity). This problem leads to the question of an optimal modulation of enzyme activities in metabolic networks.

At first glance, the example chosen for this discussion - ethanol production with the yeast *S. cerevisiae* - appears to be rather boring because it has been tackled so many times by yeast geneticists. The primary aim of these empirical attempts to modulate (mostly amplify) the key enzymes within glycolysis is the maximization of ethanol production rate which correlates with carbon dioxide evolution and, in turn, with the baking power of yeast. While addressing this problem it should be emphasized that the interest in answering the question of an optimal redistribution of enzyme activities is much broader. Generally, knowledge of the rate controlling steps in the central metabolism (glycolysis and PP shunt) is of central importance for cell cultures used for producing proteins as well as for the analysis of potential targets in cancer cells. Another field of interest is the identification of potential targets for antitrypanosomal drugs, important for treatment of the african sleeping sickness (Bakker et al, 1999). The last named authors concluded that „Despite the great interest, it is not yet known completely for any organism how the control of the glycolytic flux is distributed“.

## Dynamic Model

Similar to the strategy of (Bakker et al., 1999), the problem can be approached from the basis of experimentally determined kinetic properties of the key enzymes which are then aggregated to a dynamic model. Individual rate expressions including their kinetic parameter have been identified *in vivo* by a stimulus response methodology (Theobald et al., 1997; Rizzi et al., 1997; Vaseghi et al., 1999): A pulse of glucose or alternative stimuli are introduced into a continuous culture operating at steady-state and the transient response of several intracellular metabolite and cometabolite pools is experimentally determined in time spans of seconds or, recently, also milliseconds (Buziol et al., to be published). Within these relatively short time spans, enzyme concentrations are considered to be in a „frozen“ state. Figure 6 summarizes examples for some of the experimental observations of metabolites and cometabolites from the yeast *S. cerevisiae* growing under anaerobic conditions.



**Figure 6:** Comparison between model simulation and measured concentrations of glycolytic metabolites and cometabolites after dynamic system excitation. Data shown left from the broken lines represent steady-state values at a growth rate  $\mu = 0.1 \text{ h}^{-1}$ .

The metabolome's response due to dynamic system excitation has been used to identify the dynamic system behavior by a stepwise internalization of metabolites similar to the method proposed by Rizzi et al. (1997). To describe the dynamic system behavior, deterministic kinetic rate equations for the pathways for the reactions have been formulated.

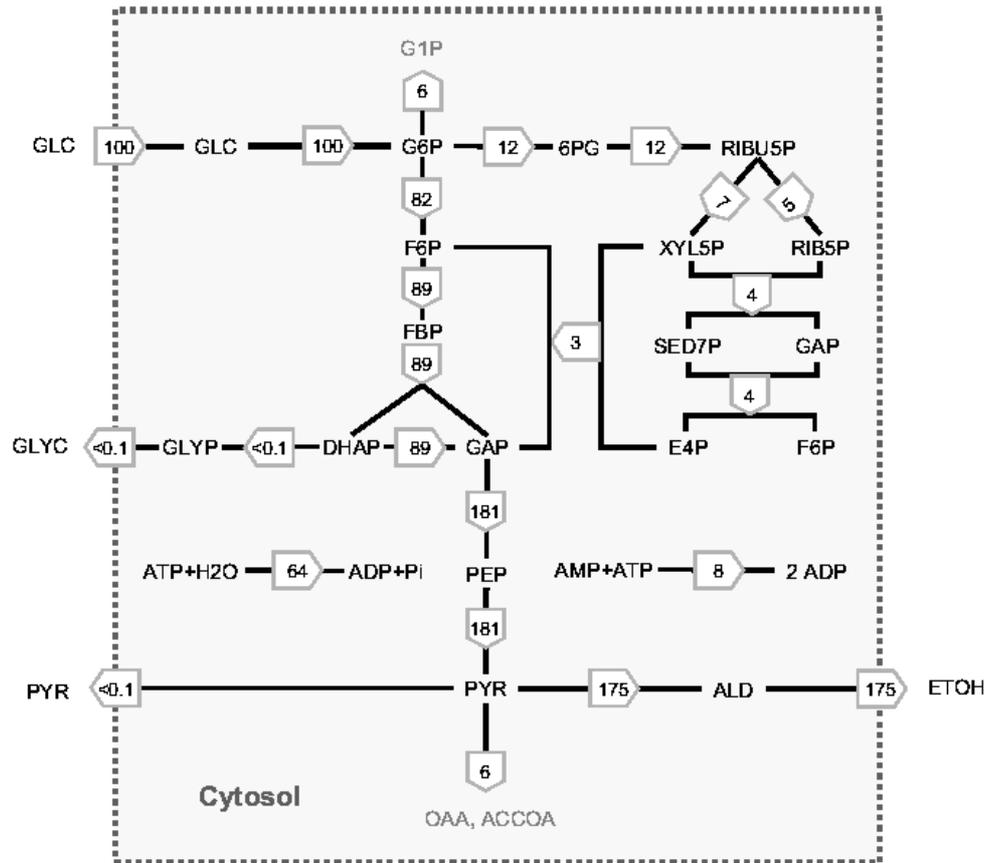
The general form of this rate equations can be written as

$$r_i = r_{\max,i} f(c, p), \quad (21)$$

where the maximal rate (capacity)  $r_{\max,i}$  is obtained from the vector of model parameters  $p$ , the vector comprising metabolite, cometabolite and effector concentrations  $c$  and the flux distribution  $J$  at the systems' steady-state (e.g.  $\mu = 0.1 \text{ h}^{-1}$ ); accordingly

$$r_{\max,i} = 1/r_i^{\text{steady-state}} f(c^{\text{steady-state}}, p). \quad (22)$$

Intracellular flux distribution has been estimated by experimentally determined uptake and excretion rates of glucose, carbon dioxide, ethanol, glycerol and biomass. The results are documented in Figure 7.



**Figure 7:** Flux distribution within central metabolic pathways of *S. cerevisiae* under anaerobic conditions at a specific growth rate of  $\mu = 0.1 \text{ h}^{-1}$ . All fluxes are related to the influx of glucose.

### Sensitivity Analysis

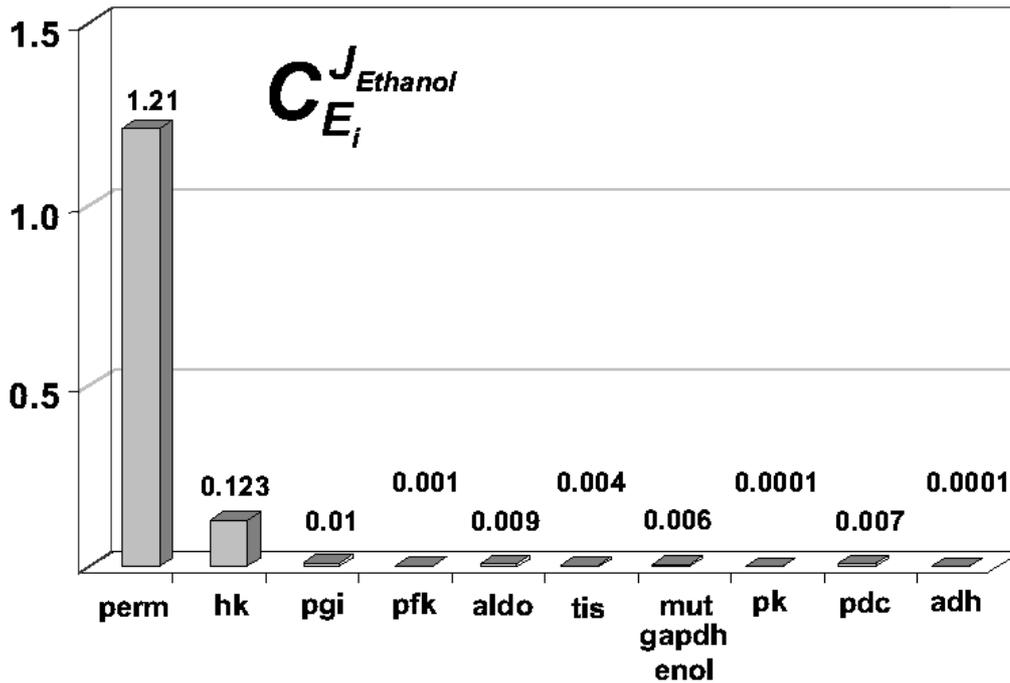
The next step towards solving the envisaged design problem is to calculate the so called flux control coefficients, or - in the terminology of engineering - sensitivity coefficients. The flux control coefficient  $C_{E_i}^J$  has been defined as the fractional change of the network flux  $J$  caused by a fractional change in the level of enzyme activity  $E_i$ . Thus,

$$\text{Flux Control Coefficient} = \frac{dJ(E_i)}{dE_i}. \quad (23)$$

or normalized

$$C_{E_i}^J = \frac{dJ/J}{dE_i/E_i} = \frac{d \ln J(E_i)}{d \ln E_i}. \quad (24)$$

Figure 8 depicts the results of these calculations for those enzymes involved on the path from glucose to ethanol.

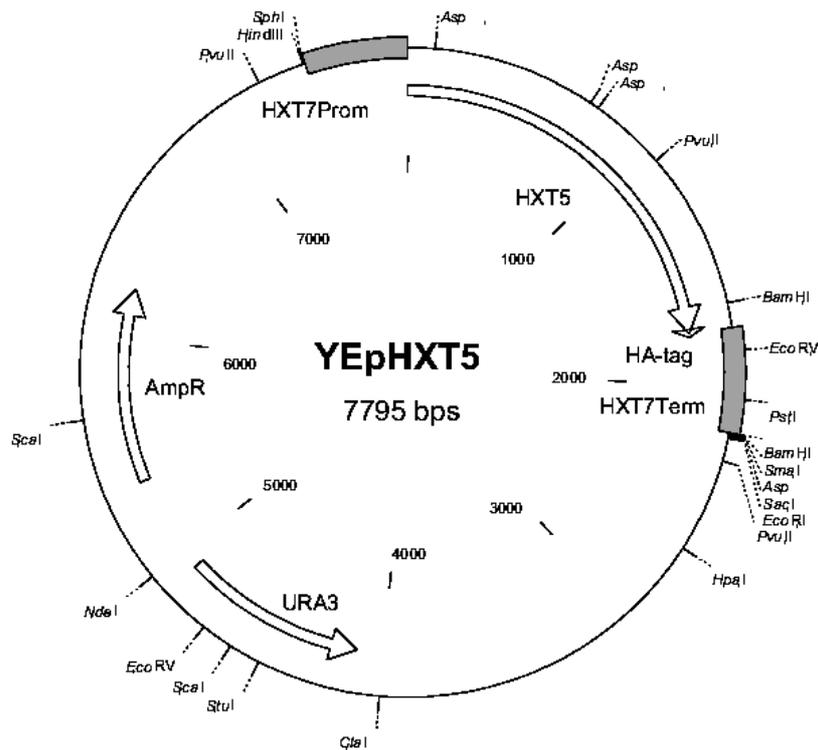


**Figure 8:** Distribution of flux control coefficients on ethanol formation route. Enzymes involved: Hexose transporter (perm), hexokinase (hk), phosphoglucose isomerase (pgi), phosphofructokinase (pfk), aldolase (aldo), triose phosphate isomerase (tis), gap dehydrogenase (gapdh), phosphoglyceromutase (mut), enolase (enol), pyruvate kinase (pk), pyruvatedecarboxylase (pdc) and alcohol dehydrogenase (adh).

Since only a subset of the flux control coefficients with respect to ethanol formation are shown in Figure 8 (excluding, for example, the coefficients of enzymes involved in the PPP shunt), flux coefficients of this subset do not necessarily sum up to one. From the hierarchy of sensitivities it can be concluded that the enzyme responsible for the transport of glucose via the cell membrane (permease) shows the overwhelming control strength upon the ethanol production rate. Consequently, amplification of this enzyme should lead to an increased flux from glucose to ethanol.

### Synthesis - Amplification of Hexose Transporters

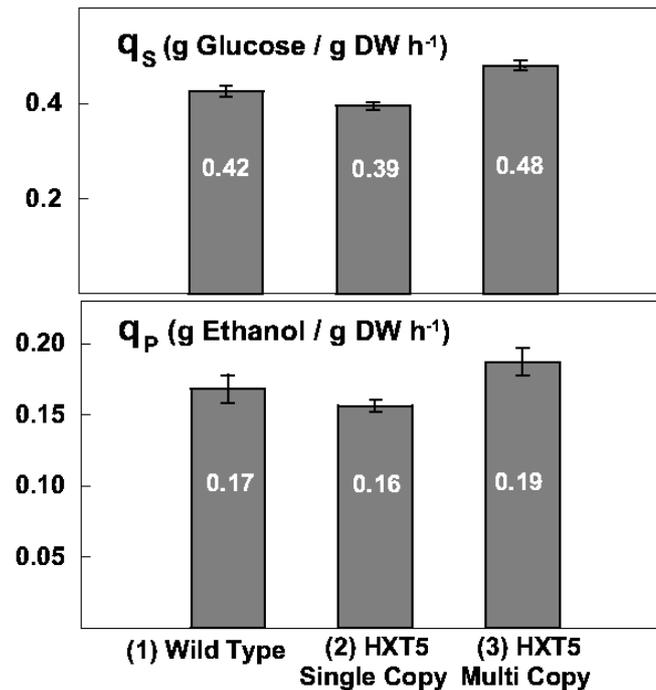
Experimental verification of the above-named design proposal has been performed in a collaboration project with Institute of Microbiology from the University of Düsseldorf (Dr. Boles). Within this project, the kinetics of the three most important hexose transporters out of the 17 transporters identified from the yeast genome project are investigated (Boles et al., 1997; Buziol et al., to be published). One of these - *HXT5* - has been also expressed with a multi copy plasmid, shown in Figure 9 (Boles, to be published).



**Figure 9:** *HXT5* multi copy plasmid.

The transporter gene in *HXT5* is flanked by an enhanced *HXT7* promoter and *HXT7* terminator, respectively. *HXT7* is a high affinity transporter expressed at low glucose concentrations. The construct shown in Figure 9 ensures expression of *HXT5* at target growth conditions. The same transporter has been integrated as single copy in the chromosome of a yeast strain in which all the genes of the other transporters has been knocked out (Wieczorke et al., 1999). As a result of these genetic constructions, it is possible to compare the flux of glucose through the glycolysis between two strains differing only in the amount of the hexose transporter. According to the hierarchy of flux control coefficients discussed in context with Figure 8, one would expect a noticeable increase of ethanol flux.

Experiments with three different strains were performed in continuous cultures at a dilution rate of  $D = 0.07 \text{ h}^{-1}$  (Buziol et al., to be published). The results of these experiments are summarized in Figure 10.



**Figure 10:** Specific substrate uptake rate  $q_s$  and specific product formation rate  $q_p$  during anaerobic chemostat cultivation. (1) Wild strain. (2) *HXT5* single expression strain with a single copy of the gene integrated the chromosome and constitutively expressed. (3) strain with multi copy plasmid (*HXT5*).

Compared to the wild type, ethanol excretion rate and substrate uptake rate of the strain with higher transporter activity have found to be 10% and 25% higher, respectively. The discussion of the relevance of these results from industrial point of view is beyond the horizon of this paper. However, the rather modest effect prompts the question: Are there any other alternative design possibilities resulting in a substantial increase of the ethanol production rate?

### Objective Function

The apparent failure to produce significant increase of the glycolytic flux points to the fundamental question if the underlying assumptions leading to the design suggestion are adequate. Keeping in mind that the pathway of interest is part of a whole - the living cell - , the idea that one need to amplify a single or multiple enzymes according to the hierarchy of flux control coefficients may not correspond to physiological reality. There are two aspects that should attract attention. First, an increased expression of enzymes is linked with energetically expensive protein synthesis. Glycolytic enzymes in yeast are known to contribute in the order of 30% to the total amount of cellular proteins. Thus, it seems to be likely that overexpression of these enzymes result in a stress situation with an unforeseeable impact on cell physiology. Instead of a single or simultaneous elevation of enzyme activities, a more robust strategy should try to keep the total concentration of proteins at a constant value and redistribute the activities according to the required objective.

The optimization problem may then be stated as

$$\text{Maximize } J(\mathbf{r}_{\max}^{\text{Path}}) \quad (25)$$

subject to

$$\frac{1}{W} \sum_{i=1}^w \frac{r_i^{\max}}{r_{i,\text{reference}}^{\max}} \leq \Omega. \quad (26)$$

In writing Eq. (26) we assume that the maximal rate  $r_i^{\max}$  is proportional to the enzyme amount. Therefore, Eq. (26) specifies a fixed level for the total enzyme activity  $\Omega$ .

Another relevant issue concerns the pool concentration of the metabolites within the cell. Attempts to increase metabolic fluxes by changes in individual enzyme concentrations may lead to substantial changes in metabolite concentrations. Again, a substantial change in metabolite concentrations either proves to be cytotoxic or at least leads to an undesired flux diversion (Kell and Mendes, 2000). Therefore, preservation of the metabolite concentrations close to the steady-state values of the wild strain is at any rate desirable to meet the basic property of well established metabolic systems for which the metaphor *homeostasis* has been coined (Reich and Selkov, 1981). It is also known that part of an optimal performance of cells with respect to the use of, for example, energy and carbon sources is a process of adaptation leading to a change of structure to control homeostasis. Interestingly, such structural changes may include a change of enzyme concentrations via regulation of enzyme synthesis. Hence, homeostasis puts a further constraint on the metabolic redesign. Mathematically, this could take the form

$$\frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \frac{|c_{i,\text{optimum}}^{\text{steady-state}} - c_{i,\text{reference}}^{\text{steady-state}}|}{c_{i,\text{reference}}^{\text{steady-state}}} \leq \Theta. \quad (27)$$

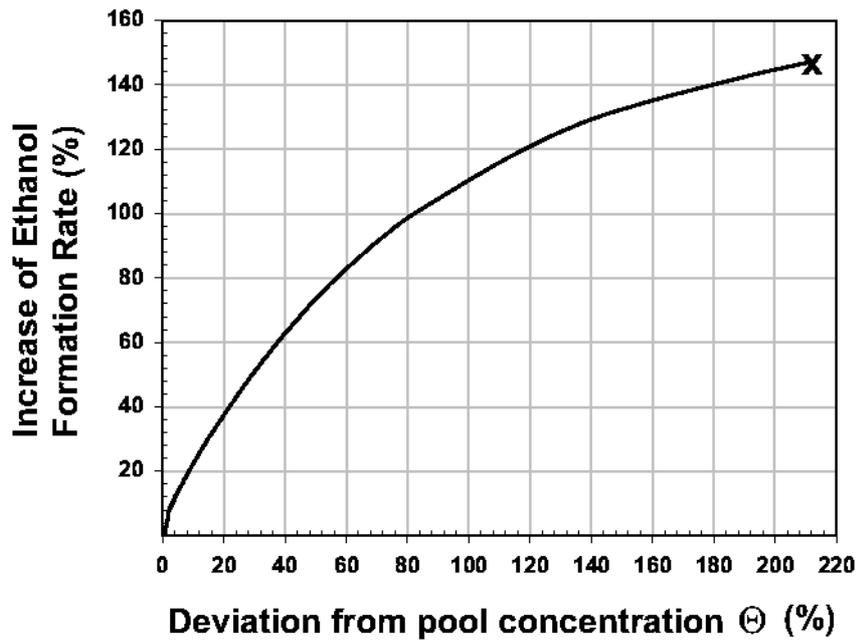
Finally, the optimum must be constraint to stable steady-states, leading to condition (28)

$$\frac{d}{dt} \mathbf{c} = 0 \text{ and } \text{Re}(\lambda_{i,\text{optimum}}) \leq 0, \quad (28)$$

with  $\text{Re}(\lambda_i)$  denoting the real part of the system's eigenvalues.

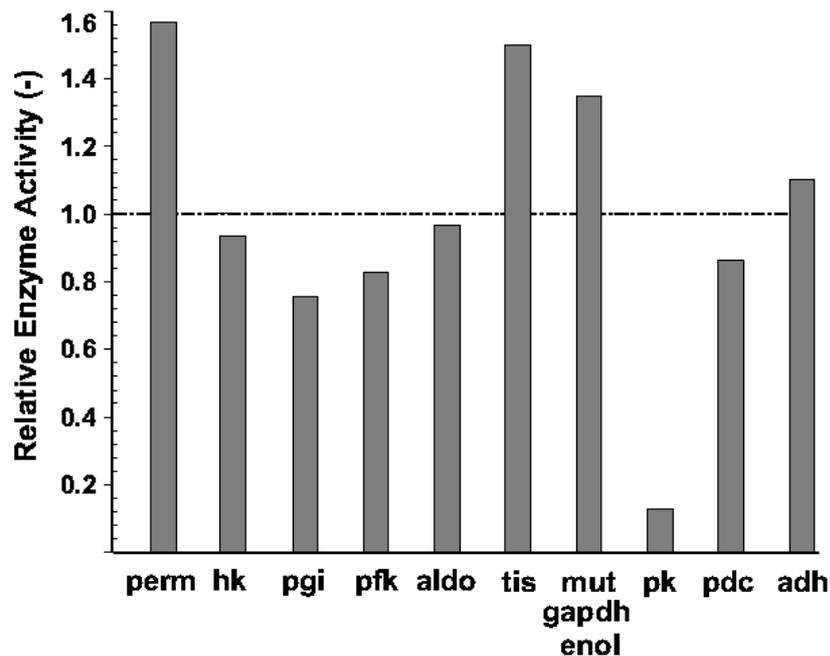
### Optimal Solutions

Retaining the total activity at the system's initial state at  $\Omega = 1$  non-linear optimization of enzyme activities yielded significantly higher ethanol formation rates (see Figure 11).



**Figure 11:** Increase of the Ethanol formation rate as a function of the maximal deviation from initial pool concentrations.

As shown in Figure 11, amplification of ethanol formation largely depends on the allowed deviation from the initial pool concentrations  $\Theta$ . Since the ratios of enzyme levels on the elementary flux mode glucose - ethanol are subject to modifications, no amplification can be expected for  $\Theta = 0\%$  while the maximal possible amplification of ethanol formation is found to be as much as 144% at  $\Theta = 210\%$ . No stable steady-states have been detected above this value.



**Figure 12:** Optimal distribution of enzyme activities. All activities are related to their initial values.

Figure 12 shows the optimal distribution of enzyme activities for the selected example, 40% increase of pool concentrations resulting in an amplification of ethanol formation of 63%.

The optimized modulation of the enzyme activities results in an unexpected and interesting redistribution of enzyme activities. Due to its large share in the control of ethanol formation rate, the activity of the hexose transporter (perm) is found to be significantly higher in the optimized metabolic system. In contrast, even though the control coefficients of tis, gapdh, mut, enol and adh are relatively small, activities of those enzymes are also found to be larger compared to the non-optimized system. This outcome can be explained by the enzymes ability of counteracting an increase of pool concentrations provoked by a risen glucose influx effectively. Obviously, this is the result of the superposition of the three objectives: maximization of flux at more or less homeostatic conditions and unchanged total amount of enzymes.

## Concluding Remarks

This paper has presented typical examples of computer aided design problems in Metabolic Engineering. The examples shown refer to the two different characteristics of biological systems: (1) Topological properties and (2) Kinetic properties of the individual reactions.

Topological analysis of metabolic networks turns out to be of immense value for relating genotypes and phenotypes. The further application of the illustrated concept of elementary flux modes critically depends on the development of new and more effective algorithms to treat larger networks. In case of biotechnological production processes, the most important application concerns the prediction of optimal topological properties for maximizing the product yield.

The second example illustrates model based design of an enhanced product formation rate. In addition to information on the network topology, the suggested solution of this important task in Metabolic Engineering requires detailed knowledge on kinetic rate expressions. Armed with a dynamic model for the most important part of the system, it is then possible to apply non-linear optimization methods. The advantages of this approach are twofold: (1) Effects on large changes in enzyme concentrations can be easily studied and (2) Constraints such as limits on the total amount of enzymes and deviations from steady-state metabolite pool concentrations can be taken into account in parallel.

## References

Bailey JE. 1998. Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities. *Biotechnol. Prog.* **14**: 8-28.

Bakker BM, Michels FR, Opperdoes FR and Westerhoff HV. 1999. What controls glycolysis in bloodstream from *Trypanosoma brucei*? *J. Biol. Chem.* **274**: 14551-14559.

Boles E and Hollenberg CP. 1997. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol Rev.* **21**: 85-111.

- Christensen B and Nielsen J. 2000. Metabolic network analysis of *Penicillium chrysogenum* using <sup>13</sup>C-labeled glucose. *Biotechnol. Bioeng.* **68**: 652-659.
- Dandekar T, Schuster S, Snel B, Huynen M and Bork P. 1999. Pathway alignment: application to the comparative analysis of glycolytic enzymes. *Biochem. J.* **343**: 115-124.
- Dauner M and Sauer U. 2000. GC-MS analysis of amino acids rapidly provides rich information for isotopomer balancing. *Biotechnol. Prog.* **16**: 642-649.
- Edwards JS and Palsson BO. 1999. Systems properties of the *Haemophilus influenzae* Rd metabolic genotype. *J. Biol. Chem.* **274**: 17410-17416.
- Fell DA and Small JR. 1986. Fat synthesis in adipose tissue. *Biochem. J.* **238**: 781-786.
- Happel J and Sellers PH. 1989. The characterization of complex systems of chemical reactions. *Chem. Eng. Commun.* **83**: 221-240.
- Heinrich R and Schuster S. 1996. The regulation of cellular systems. Chapman & Hall. New York.
- Kell DB and Mendes P. 2000. Snapshots of systems: Metabolic Control Analysis and biotechnology in the post-genomic era. p. 3-25. In: Technological and medical implications of Metabolic Control Analysis. Kluwer. Dordrecht.
- Liao JC, Hou SY and Chao YP. 1996. Pathway analysis, engineering and physiological considerations for redirecting central metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* **52**: 129-140.
- Marx A, de Graaf AA, Wiechert W, Eggeling L and Sahm H. 1996. Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 111-129.
- Mauch K, Vaseghi S and Reuss M. 2000. Quantitative analysis of metabolic and signalling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. p. 435-77. In: Bioreaction Engineering. Schügerl, K. and Bellgardt, B. Springer. Berlin.
- Palsson B. 2000. The challenges of in silico biology. *Nat. Biotechnol.* **18**: 1147-1150.
- Reich JG and Selkov EE. 1981. Energy metabolism of the cell. A theoretical treatise. Academic Press. New York.
- Rizzi M, Baltes M, Theobald U and Reuss M. 1997. *In vivo* analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: II Mathematical model. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 592-608.
- Savinell JM and Palsson BO. 1992. Network analysis of intermediary metabolism using linear optimization. I. Development of mathematical formalism. *J. Theor. Biol.* **154**: 421-454.

Schilling CH, Letschert D and Palsson BO. 2000. Theory for the systemic definition of metabolic pathways and their use in interpreting metabolic function from pathway-oriented perspective. *J. Theor. Biol.* **203**: 229-248.

Schilling CH and Palsson BO. 2000. Assessment of the metabolic capabilities of *Haemophilus influenzae* Rd through genome-scale pathway analysis. *J. Theor. Biol.* **203**: 249-283.

Schilling CH, Schuster S, Palsson BO and Heinrich R. 1999. Metabolic pathway analysis: basic concepts and scientific applications in the post genome era. *Biotechnol. Prog.* **15**: 296-303.

Schmidt K, Carlsen J, Nielsen J and Villadsen J. 1997. Modeling isotopomer distribution in biochemical networks using isotopomer mapping matrices. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 831-840.

Schmidt K, Nielsen J and Villadsen J. 1999. Quantitative analysis of metabolic fluxes in *Escherichia coli*, using two-dimensional NMR spectroscopy and complete isotopomer models. *Biotechnol. Bioeng.* **71**: 175-190.

Schuster R and Schuster S. 1993. Refined algorithm and computer program for calculating all non-negative fluxes admissible in steady states of biochemical reaction systems with or without some flux rates fixed. *CABIOS.* **9**: 79-85.

Schuster S, Dandekar T and Fell DA. 1999. Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering. *Trends Biotechnol.* **17**: 53-60.

Schuster S, Dandekar T, Mauch K, Reuss M and Fell DA. 2000. Recent developments in metabolic pathway analysis and their potential implications for biotechnology and medicine. p. 57-66. In: *Technological and medical implications of Metabolic Control Analysis*. Kluwer. Dordrecht.

Schuster S, Fell DA and Dandekar T. 2000. A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks. *Nat. Biotechnol.* **18**: 326-332.

Schuster S and Hilgetag C. 1994. On elementary flux modes in biochemical reaction systems at steady state. *J. Biol. Sys.* **2**: 165-182.

Seressiotis A and Bailey JE. 1988. MPS: an artificially intelligent software system for the analysis and synthesis of metabolic pathways. *Biotechnol. Bioeng.* **31**: 587-602.

Stephanopoulos GN, Aristidou AA and Nielsen J. 1998. *Metabolic engineering*. Academic Press. New York.

Szyperski T, Glaser RW, Hochuli M, Fiaux J, Sauer U, Bailey JE and Wuthrich K. 1999. Bioreaction network topology and metabolic flux ratio analysis by biosynthetic fractional  $^{13}\text{C}$  labeling and two-dimensional NMR spectroscopy. *Metab Eng.* **1**: 189-97.

Theobald U, Mailinger W, Baltes M, Rizzi M and Reuss M. 1997. *In vivo* analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: I. Experimental Observations. *Biotechnol Bioeng.* **55**: 305-316.

van Gulik WM and Heijnen JJ. 1995. A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation. *Biotechnol. Bioeng.* **48**: 681-698.

Vanderbei RJ. 1998. *Linear programming: foundations and extensions*. Kluwer. Boston.

Vaseghi S, Baumeister A, Rizzi M and Reuss M. 1999. *In vivo* dynamics of the pentose phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng.* **1**: 128-40.

Wiechert W and de Graaf AA. 1997. Bidirectional reaction steps in metabolic networks: I. Modeling and simulation of carbon isotope labeling experiments. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 101-117.

Wiechert W, Siefke C, de Graaf AA and Marx A. 1997. Bidirectional reaction steps in metabolic networks: II. Flux estimation and statistical analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 118-134.

Wieczorke R, Krampe S, Weierstall T, Freidel K, Hollenberg CP and Boles E. 1999. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **464**: 123-8.

# Lebenslauf

Von Stefan Buziol aus Kempten im Allgäu, geb. am 13.05.1965

## Schulausbildung

Grund- und Hauptschule (Kempten)	Sept. 1971 – Juli 1979
Handelsschule (Kempten)	Sept. 1979 – Juli 1983
Berufsschule (Kempten)	Sept. 1983 – Feb. 1987

## Berufliche Ausbildung

Berufsausbildung zum Nachrichtengerätetechniker und Feingeräteelektroniker bei der Siemens AG (Durach)	Sept. 1983 – Feb. 1987
--	------------------------

## Berufspraxis

Facharbeiter (Prüffeld) bei der Siemens AG in Durach	Feb. 1987 – Jan. 1988
	April 1989 – Sept. 1989

## Wehrdienst

Pflichtwehrdienst in Ingolstadt und Memmingen	Jan. 1988 – März 1989
---	-----------------------

## Zweiter Bildungsweg

Berufsaufbauschule (Technische Mittlere Reife, Kempten)	Sept. 1989 – Juli 1990
Bayernkolleg (Allgemeine Hochschulreife, Augsburg)	Sept. 1990 – Juli 1993

## Studium

Technische Biologie an der Universität Stuttgart	Sept. 1993 – Dez. 1998
--	------------------------

Auslandspraktikum (2 Monate) am „Laboratory for Molecular Biology“ in Cambridge (UK)	Jan. 1999 – Feb. 1999
--	-----------------------

## Promotionsvorbereitung

Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart	März 1999 – Dez. 2002
---	-----------------------

Hiermit erkläre ich, dass ich unter Verwendung der im Literaturverzeichnis aufgeführten Quellen und unter fachlicher Betreuung diese Dissertation selbständig verfasst habe.

Stefan Buziol