

# Isotopisch instationäre $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse in *Escherichia coli*

Von der Fakultät Maschinenbau der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der  
Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von  
Jochen Schaub  
aus Stuttgart

Hauptberichter: Prof. Dr.-Ing. Dr. h.c. Matthias Reuss  
Mitberichter: Prof. Dipl. Ing. Dr. techn. Elmar Heinzle  
Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2007

Institut für Bioverfahrenstechnik  
Prof. Dr.-Ing. Dr. h.c. Matthias Reuss  
Universität Stuttgart

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>Symbolverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>9</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>11</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>13</b>
1.1 Stand des Wissens .....	14
1.2 Zielsetzung dieser Arbeit.....	18
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
2.1 Organismus und Kultivierung .....	20
2.1.1 Organismus .....	20
2.1.2 Nährmedien und Anzucht .....	20
2.2 Versuchsanlage .....	22
2.2.1 Prozessführung .....	24
2.2.2 Steady state und stimulus-response Experimente .....	24
2.2.3 <sup>13</sup> C-Markierungsexperimente .....	26
2.3 Analytische Methoden zur Prozessanalyse .....	27
2.3.1 Bestimmung der Biotrockenmasse .....	27
2.3.2 Bestimmung der Konzentrationen von Glucose, Acetat und Ethanol .....	29
2.3.3 Abgasanalyse.....	30
2.3.4 Stoffbilanzen.....	30
2.3.5 Wachstumsparameter .....	30
2.3.6 Stationäre Raten.....	31
<b>3 Integriertes Probenahmeverfahren für die quantitative Metabolitanalyse</b> .....	<b>33</b>
3.1 Einleitung.....	33
3.2 Material und Methoden .....	36
3.3 Ergebnisse.....	42
3.3.1 Auslegung des Probenahmesystems.....	42
3.3.2 Thermische Stabilität .....	43
3.3.3 Quenching .....	44
3.3.4 Extraktion .....	46
3.3.5 Filtration .....	48

---

3.3.6	Konzentrierungsschritte und LC-MS Analytik.....	49
3.3.7	Anwendung .....	50
3.4	Diskussion .....	51
<b>4</b>	<b>GC-MS basierte Bestimmung von Massenisotopomeren proteinogener und freier Aminosäuren in <i>E. coli</i>.....</b>	<b>55</b>
4.1	Einleitung.....	55
4.1.1	Biosynthese der Aminosäuren.....	56
4.1.2	Aminosäuren aus Proteinhydrolysat .....	58
4.1.3	Freie Aminosäuren .....	59
4.2	Material und Methoden .....	59
4.2.1	Derivatisierung und Fragmentierung.....	59
4.2.2	Detektorlinearität .....	60
4.2.3	Isotopenfraktionierung .....	61
4.2.4	GC-MS Analysemethode .....	61
4.2.5	Identifikation .....	61
4.2.6	Korrektur der Massenisotopenverschiebung.....	62
4.2.7	Probenvorbereitung.....	63
4.2.8	Ermittlung des isotopisch stationären Zustandes .....	64
4.3	Ergebnisse.....	66
4.3.1	Proteinogene Aminosäuren .....	66
4.3.2	Freie Aminosäuren .....	68
4.3.2.1	Metabolisch stationär, isotopisch stationär .....	68
4.3.2.2	Metabolisch stationär, isotopisch instationär .....	68
4.4	Zusammenfassung .....	70
<b>5</b>	<b>LC-MS basierte Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen in <i>E. coli</i> im steady state und nach stimulus-response Experimenten .....</b>	<b>72</b>
5.1	Einleitung.....	72
5.1.1	Ionenchromatografie.....	74
5.1.2	LC-MS Kopplung .....	75
5.1.3	Massenspektrometrie .....	76
5.2	Material und Methoden .....	77
5.2.1	MS-Einstellungen .....	77
5.2.2	Detektierbare Metabolite und Bestimmungsgrenzen.....	78
5.2.3	Einfluss der Salzkonzentration.....	80
5.2.4	Metabolitidentifikation .....	81

---

5.2.5 Interne Standards .....	82
5.2.6 Metabolitquantifizierung .....	85
5.3 Ergebnisse .....	85
5.3.1 Steady state .....	85
5.3.2 Stimulus-response .....	89
5.4 Zusammenfassung .....	95
<b>6 LC-MS basierte Bestimmung isotopisch stationärer und isotopisch instationärer Massenisotopomere in <i>E. coli</i> im steady state .....</b>	<b>97</b>
6.1 Einleitung .....	97
6.2 Material und Methoden .....	99
6.2.1 Konzentrationseffekte .....	100
6.2.2 Isotopenfraktionierung .....	101
6.2.3 Quantifizierung von Massenisotopomeren .....	102
6.3 Ergebnisse .....	104
6.3.1 Metabolisch stationär, isotopisch stationär .....	104
6.3.2 Metabolisch stationär, isotopisch instationär .....	106
6.4 Zusammenfassung .....	123
6.5 Vergleich der Analysemethoden .....	125
<b>7 Modellierung von Isotopomeren-Netzwerken .....</b>	<b>127</b>
7.1 Einleitung .....	127
7.2 Modell .....	129
7.2.1 Teilmodell und Ganzzellmodell .....	129
7.2.2 Biochemisches Reaktionsmodell .....	130
7.2.3 Precursorbedarf für Biomassesynthese .....	132
7.3 Bilanzgleichungssystem .....	134
7.4 Isotopomerenmodell .....	135
7.4.1 Bilanziertes Teilsystem .....	135
7.4.2 Modellierung reversibler Reaktionen .....	138
7.4.3 Modellierung von Scrambling-Reaktionen .....	138
7.4.4 Formulierung und automatisierte Erstellung der Modellgleichungen .....	139
7.5 Topologische Modellanalyse .....	140
7.5.1 Stöchiometrisches Modell .....	140
7.5.2 Isotopomerenmodell .....	141
7.6 Zusammenfassung .....	143

<b>8 Simulation von <sup>13</sup>C-Markierungsexperimenten und Schätzung intrazellulärer Raten</b> .....	<b>144</b>
8.1 Einleitung .....	144
8.2 Lösung von Isotopomeren-Bilanzgleichungssystemen .....	146
8.2.1 Lösungsansätze für stationäre Systeme .....	146
8.2.2 Numerische Integration .....	148
8.2.2.1 Dynamische Simulationen .....	149
8.2.2.2 Numerische Stabilität .....	151
8.2.3 Iteratives Verfahren .....	152
8.3 Flusschätzung .....	153
8.3.1 Parameteridentifikation in Isotopomeren-Netzwerken .....	153
8.3.2 Parameterschätzproblem im untersuchten Modellsystem .....	155
8.3.3 Optimierung unter Nebenbedingungen .....	156
8.3.4 Statistische Bewertung der Ergebnisse .....	159
<b>9 Isotopisch instationäre und stationäre <sup>13</sup>C-Stoffflussanalysen in <i>E. coli</i></b> .....	<b>162</b>
9.1 Einleitung .....	162
9.2 <sup>13</sup> C-Stoffflussanalyse auf Basis isotopisch instationärer und isotopisch stationärer LC-MS Messdaten .....	162
9.3 <sup>13</sup> C-Stoffflussanalysen auf Basis isotopisch stationärer Messdaten .....	173
9.3.1 LC-MS .....	173
9.3.2 GC-MS .....	175
9.3.3 LC-MS und GC-MS .....	177
9.4 Zusammenfassung und Diskussion .....	179
<b>10 Ausblick</b> .....	<b>183</b>
<b>Anhang</b> .....	<b>186</b>
A1 Bezeichnung von Metaboliten, Nettoraten und Enzymen .....	186
A2 Stöchiometrisches Modell .....	188
A3 C-Atom Transitionen im Isotopomerenmodell und Scrambling-Reaktionen ...	189
A4 Isotopomerenmodell .....	191
<b>Literatur</b> .....	<b>213</b>

# Symbolverzeichnis

## Lateinische Symbole

$A$	Wärmeübertragungsfläche	$[m^2]$
$c_i$	Konzentration i-ter Stoff	$[g/l]$ bzw. $[mol/l]$
$c_p$	spezifische Wärmekapazität	$[kJ/(kg K)]$
$D$	Verdünnungsrate	$[h^{-1}]$
$D_a$	Windungsdurchmesser	$[mm]$
$d_i$	Rohrwendelinnendurchmesser	$[mm]$
$f$	Probenahmefrequenz	$[s^{-1}]$
$F$	Volumenstrom	$[l/h]$
$I_i$	Isotopomeren-Anteilsvektor i-ter Metabolit	$[Mol-\%]$
$IS$	Index strukturelle Zellintegrität	$[-]$
$k$	Wärmedurchgangszahl	$[W/(m^2 K)]$
$l$	Länge Rohrwendel entlang Rohrachse	$[cm]$
$l_\alpha$	Länge Aufheizstrecke entlang Rohrachse	$[cm]$
$l_\beta$	Länge Heizstrecke entlang Rohrachse	$[m]$
<b>MI</b>	Massenisotopomerenverteilung eines Metaboliten, $[Mol-\%]$ Vektor der m+i Massenisotopomerenanteile	
$m_s$	Erhaltungsstoffwechselkoeffizient	$[g_{Glucose}/(g TS h)]$
$m_0$	Massenisotopomerenanteil (unmarkiert)	$[Mol-\%]$
$m+i$	i-ter Massenisotopomerenanteil	$[Mol-\%]$
$Nu$	Nusselt-Zahl	$[-]$
$PME$	prozentuale Metabolitextraktion	$[\%]$
$pO_2$	Partialdruck des Sauerstoffs in Luft	$[bar]$
$Pr$	Prandtl-Zahl	$[-]$
$q_i$	spezifische i-te Reaktionsrate	$[mol/(g TS h)]$
$Q_i$	volumenbezogene i-te Reaktionsrate	$[mol/(l h)]$
$r$	Vektor der intrazellulären j Reaktionsraten	$[mmol/l_{cyto} s]$
$r_j$	intrazelluläre Reaktionsrate j-te Reaktion	$[mmol/l_{cyto} s]$
$\bar{r}_j$	intrazelluläre Reaktionsrate j-te Hinreaktion	$[mmol/l_{cyto} s]$
$\bar{r}_j$	intrazelluläre Reaktionsrate j-te Rückreaktion	$[mmol/l_{cyto} s]$
$Re$	Reynolds-Zahl	$[-]$

$t$	Zeit	[s]
$t_{\alpha}$	Zeitbedarf Grundoperation Quenching	[s]
$t_{\beta}$	Zeitbedarf Grundoperation Extraktion	[s]
$T$	Temperatur	[K]
$T_{\text{Kultivierung}}$	Kultivierungstemperatur	[K]
$\Delta T_m$	mittlere logarithmische Temperaturdifferenz	[K]
$V$	Volumen	[l]
$\dot{V}$	Volumenstrom	[ml/s]
$w$	Strömungsgeschwindigkeit	[m/s]
$x_i$	Molenbruch	[-]
$Y_{X/S}$	Biomasse-Substrat-Ausbeutekoeffizient	[g TS/g <sub>Glucose</sub> ]

### Griechische Symbole

$\alpha$	Wärmeübergangszahl	[W/(m <sup>2</sup> K)]
$\beta_j$	Reversibilitätsfaktor (j-te Reaktion)	[-]
$\zeta$	dimensionslose Reibungszahl	[-]
$\vartheta$	Temperatur	[°C]
$\vartheta_{\text{Kultivierung}}$	Kultivierungstemperatur	[°C]
$\Theta$	Verweilzeit	[h]
$\lambda$	Wärmeleitfähigkeit	[W/(m K)]
$\mu$	spezifische Wachstumsrate	[h <sup>-1</sup> ]
$\mu_{\text{max}}$	maximale spezifische Wachstumsrate	[h <sup>-1</sup> ]
$\nu$	kinematische Zähigkeit	[m <sup>2</sup> /s]
$\nu_{ij}$	stöchiometrischer Faktor (Metabolit i, Reaktion j)	[-]
$\rho$	Dichte	[kg/m <sup>3</sup> ]
$\sigma$	Standardabweichung	
$\tau_i$	Turnover i-ter Metabolit	[s]
$\chi^2$	Chi-Quadrat-Wert	[-]

### Mathematische Operatoren

$\otimes$	elementweise Vektormultiplikation
-----------	-----------------------------------

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
amu	atomic mass unit
AQA <sub>max</sub>	Spannung zwischen Eintrittskonus und Hexapol (Massenspektrometer)
aTol	absolute Fehlertoleranz
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserum Albumin
DAE	Differential-Algebra-System
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESI	Elektrospray-Ionisierung
EtOH	Ethanol
GC	Gas Chromatography
h	Schrittweite
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethan-Sulfonsäure
HPIC	High Performance Ion Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
<b>IMM</b>	Isotopomer Mapping Matrix
LC	Liquid Chromatography
m/z	Massen-/Ladungsverhältnis
MS	Massenspektrometrie
MTBSTFA	N-Methyl-N-(tert-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamid
NAD(H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADP(H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OD	optische Dichte
PEEK	Polyetheretherketon
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethan)-Sulfonsäure
PTS	Phosphotransferase-System
RQ	Respirationskoeffizient
rTol	relative Fehlertoleranz
SIM	Selected Ion Monitoring
TBDMS	tert-Butyldimethylsilyl-Derivate
THF	Tetrahydrofuran
VF	Verdünnungsfaktor
VK	Variationskoeffizient

## Indizes

c, m, n	Koeffizienten bzw. Exponenten
cyto	Cytoplasma
frei	freier Fluss
gem	gemessen
Grenz	Grenzfluss
i	i-ter Stoff/Metabolit bzw. i-tes Isotopomer
R	Reaktionsvolumen
sim	simuliert
W	Rohrwendelwand
x	Biomasse
zu/ab	Zulauf/Ernte

## Abstract

$^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis is an important tool in metabolic engineering. Starting point of this study was the fact that broad application of  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis, e. g. in analysis of industrial relevant batch and fed batch processes as well as in studies with mammalian cell cultures, as yet is limited by the fact that predominantly GC-MS and NMR analytical methods are applied for quantification of proteinogenic amino acids. Because of large time constants due to small protein turnover rates quasi steady state conditions are not achieved within a sufficiently short time period as is required for metabolic flux analysis. Hence, this approach is mainly applied to chemostat cultivations. Alternatively, an elaborate bioreactor design becomes necessary (Drysch *et al.*, 2004). Aside from long labeling times, high total costs are involved. Only recently, LC-MS analytical methods enable direct assessment of labeling patterns of intracellular metabolites from central carbon metabolism (van Winden *et al.*, 2005). By reason of high metabolite turnover rates time required to perform  $^{13}\text{C}$  labeling experiments can be substantially reduced. Also, range of possible applications of  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis can be extended by this means.

In the context of this thesis isotopic instationary labeling data from isotopic transient phase were used for identification of intracellular metabolic flux distribution in *E. coli* for the first time. For this purpose data on intracellular metabolite concentrations and relative mass isotopomer distributions are required. Within the scope of this work experimental, analytical and computational tools for isotopic instationary  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis were developed and applied.

For short-time  $^{13}\text{C}$  labeling experiments rapid sampling techniques are needed. Therefore, a novel integrated sampling procedure was designed and adjusted to requirements of LC-MS analytical method. Unit operations sample transfer, quenching, metabolite extraction, and sample conditioning were achieved by indirect short-time heat treatment using a coiled single tube heat exchanger without any addition of chemical reagents. Thus, total number of unit operations was reduced. Reproducibility was enhanced by automation. Time needed to perform all necessary unit operations was shortened to 30 s per sample. Moreover, a LC-MS analytical method for quantification of intracellular metabolite concentrations and mass isotopomer distributions under isotopic stationary and isotopic instationary conditions was developed. GC-MS based quantification of free and proteinogenic amino acids was carried out for validation purposes and for acquisition of supplementary measurement data. In addition to a suitable rapid sampling procedure and a LC-MS analytical method, novel

approaches are also required for simulation of  $^{13}\text{C}$  labeling experiments and flux estimation. At this, the system of isotopomer balance equations was automatically generated, and the resulting nonlinear, stiff, and coupled differential equation system was solved by numerical integration. The extrapolation integrator LIMEX proved to be suitable for numerically stable integration. Furthermore, data from isotopic transient phase can be considered for subsequent flux estimation. For optimization the evolutionary algorithm JavaEvA was used. Developed experimental, analytical, and computational methods were applied to isotopic instationary  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis in *E. coli* W3110 at  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ . At first, investigated *E. coli* strain was physiologically characterized. In a next step, intracellular metabolite concentrations at steady state and after a stimulus-response experiment were quantitatively determined by LC-MS. Likewise, isotopic stationary and isotopic instationary mass isotopomer distributions of metabolites from central carbon metabolism were quantified by LC-MS. Determination of labeling patterns of free and proteinogenic amino acids was performed by GC-MS. In the following LC-MS and GC-MS data sets were used in isotopic instationary and isotopic stationary  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis in *E. coli*. LC-MS based isotopic instationary  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis was successfully applied in determination of intracellular flux distribution in glycolysis, pentose phosphate pathway, and citric acid cycle. As important results, flux distribution at G6P node (normalized to glucose influx) was determined to 55% : 44%, and only minor activity of 4% was detected for malic enzyme. These results were in good agreement with conducted LC-MS and GC-MS based isotopic stationary  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis, as well as with literature data. Altogether, application of the developed approach - comprising a novel integrated sampling procedure, a LC-MS analytical method, and isotopic instationary  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis - appears promising for issues concerning metabolic engineering, bioprocess analysis and development, high throughput screening, and systems biology research. The extended range of potential applications can be attributed to the fact that the introduced approach makes use of existing small time constants in metabolite turnover.

## Zusammenfassung

Die  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse ist ein wichtiges Werkzeug im Metabolic Engineering. Ausgangspunkt dieser Arbeit war der Umstand, dass eine breitere Anwendung der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse, z. B. bei der Analyse der industriell relevanten Prozessführungen Batch und Fed Batch sowie bei tierischen Zellkulturen, bisher insbesondere wegen der eingesetzten GC-MS und NMR basierten Analyse proteinogener Aminosäuren beschränkt ist. Aufgrund der großen Zeitkonstanten infolge eines kleinen Protein-Turnover wird ein quasi-stationärer Zustand in einem für die Stoffflussanalyse interessanten Zeitbereich nicht erreicht. Daher wird diese Vorgehensweise vor allem bei der kontinuierlichen Prozessführung verwendet. Alternativ müssen aufwändige Reaktorkonzepte eingesetzt werden (Drysch *et al.*, 2004). Außerdem bedeutet die erforderliche lange Markierungsdauer hohe experimentelle Kosten. Mittels LC-MS Analysemethoden ist es seit kurzem möglich, intrazelluläre Markierungsinformationen auch direkt auf der Ebene der Metabolite des zentralen Kohlenstoffwechsels zu erheben (van Winden *et al.*, 2005). Wegen des großen Metabolit-Turnover kann auf diese Weise die Zeitdauer eines Markierungsexperimentes erheblich reduziert und damit das Anwendungsspektrum der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse erweitert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten erstmals Messinformationen aus der isotopisch instationären Markierungsdynamik zur Identifikation der intrazellulären Stoffflussverteilung in *E. coli* genutzt werden. Dafür werden Messinformationen zu Absolutkonzentrationen und relativen Massenisotopomerenanteilen benötigt. Für diesen Ansatz der isotopisch instationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse wurden experimentelle, analytische und rechnergestützte Verfahren entwickelt und eingesetzt.

Die Durchführung von Kurzzeit- $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimenten erfordert schnelle Probenahmetechniken. Hierfür wurde ein neuartiges, auf die LC-MS Analytik abgestimmtes integriertes Probenahmeverfahren entwickelt. Da die Grundoperationen Probentransfer, Abstoppen des Metabolismus, Metabolitextraktion und Probenaufarbeitung indirekt in einem Kapillar-Rohrwendel-Wärmeübertrager ohne jeden Zusatz chemischer Reagenzien erfolgten, konnte die Anzahl der Grundoperationen verringert und durch Automatisierung die Reproduzierbarkeit verbessert werden. Der Zeitbedarf zur Durchführung dieser Schritte wurde auf 30 s je Probe reduziert. Des Weiteren wurde eine LC-MS Analysemethode für die Quantifizierung von intrazellulären Absolutkonzentrationen und von Massenisotopomeren im isotopisch stationären und isotopisch instationären Zustand entwickelt. Zur Validierung und Ergänzung der LC-MS basierten Bestimmung von Massenisotopomeren wurden GC-MS

basierte Messungen freier und proteinogener Aminosäuren durchgeführt. Neben einer geeigneten schnellen Probenahmetechnik und einer LC-MS Analysemethode werden für die isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse auch neue Ansätze in der Simulation von  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimenten und für die Flussschätzung benötigt. Hierfür wurden die Bilanzgleichungen des Isotopomerenmodells des untersuchten Reaktionsnetzwerkes automatisiert generiert und das resultierende nichtlineare, gekoppelte und steife Isotopomeren-Differentialgleichungssystem numerisch integriert. Als besonders geeignet für eine numerisch stabile Integration erwies sich der Extrapolationsintegrator LIMEX. Dieser kann außerdem isotopisch instationäre Messdatensätze für die nachfolgende Flussschätzung berücksichtigen. Für die Optimierung wurde der Evolutionsalgorithmus JavaEvA verwendet. Die entwickelten experimentellen, analytischen und rechnergestützten Verfahren wurden für die Ermittlung der intrazellulären Stoffflussverteilung in *E. coli* W3110 bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  angewendet. Zunächst wurde dieser Stamm physiologisch charakterisiert. In einem nächsten Schritt wurden intrazelluläre Metabolitkonzentrationen im steady state und nach einem stimulus-response Experiment mittels LC-MS quantitativ bestimmt. Ebenfalls mit LC-MS wurden isotopisch stationäre und isotopisch instationäre Massenisotopomerenverteilungen von Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels quantifiziert. Die Bestimmung der Markierungsmuster freier und proteinogener Aminosäuren erfolgte mit GC-MS. Die LC-MS und GC-MS Datensätze wurden im Folgenden zur Durchführung von isotopisch instationären und isotopisch stationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen in *E. coli* verwendet. Die LC-MS basierte isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse wurde erfolgreich zur Ermittlung der intrazellulären Stoffflussverteilung in den zentralen Kohlenstoffwechselwegen Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus eingesetzt. Als wesentliche Ergebnisse wurden eine Flussverteilung (bezogen auf die Glucoseaufnahme) am G6P-Knoten zwischen Glykolyse und Pentosephosphat-Weg von 55% : 44% sowie mit 4% nur eine geringe Aktivität des Malatenzym bestimmt. Diese Resultate waren in guter Übereinstimmung mit den gleichfalls durchgeführten LC-MS und GC-MS basierten isotopisch stationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen sowie Literaturwerten.

Insgesamt ist die Anwendung der entwickelten Methodik bestehend aus integriertem Probenahmesystem, LC-MS Analysemethode und isotopisch instationärer  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse aussichtsreich für die Bearbeitung von Fragestellungen im Metabolic Engineering, in der Bioprozessanalyse und -entwicklung, im Hochdurchsatzscreening und für systembiologische Untersuchungen. Dieses erweiterte Spektrum potentieller Anwendungen wird maßgeblich durch die Nutzung der kleinen Zeitkonstanten beim Metabolit-Turnover ermöglicht.

# 1 Einleitung

Die metabolische Stoffflussanalyse hat sich zu einem wichtigen Werkzeug im Metabolic Engineering entwickelt (Stephanopoulos *et al.*, 1998; Nielsen, 2001; Wiechert, 2001; Wiechert *et al.*, 2005). Sie hat die Quantifizierung intrazellulärer Raten in den zentralen Kohlenstoffwechselwegen von Prokaryonten und Eukaryonten zum Gegenstand (Wiechert, 2001). Die Analyse der intrazellulären Stoffflussverteilung bzw. des Fluxoms ist neben der Analyse von Genom, Transkriptom, Proteom und Metabolom (Reed *et al.*, 2003; Bro *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2005) eine Methode zur Analyse komplexer biologischer Systeme. Da die intrazelluläre Stoffflussverteilung eine Funktion von Genexpression, Enzymaktivitäten, posttranslationalen Proteinmodifikationen und von Protein-Metabolit-Wechselwirkungen darstellt, ist deren Informationsgehalt besonders groß (Nielsen, 2003). Die Raten in einem biochemischen Reaktionsnetzwerk hängen ab von Aktivität und Menge der die Umsetzungen katalysierenden Enzyme, von spezifischen Enzymeigenschaften (Affinitäten von Substraten und Produkten, Einfluss von Effektoren) und von den Konzentrationen der Reaktionspartner (Metabolite), so dass die metabolische Stoffflussanalyse einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung von Regulationsmechanismen in metabolischen Reaktionsnetzwerken leistet (Nielsen, 2003; Shimizu, 2004). Die metabolische Flussanalyse ermöglicht zudem, das Potential metabolischer Stoffwechselleistungen zu diagnostizieren, Auswirkungen von genetischen Modifikationen zu untersuchen und Targets für genetische Eingriffe zu identifizieren (Wiechert *et al.*, 2005). Durch die Ermittlung einer stationären Stoffflussverteilung stellt die metabolische Flussanalyse darüber hinaus einen wichtigen Ausgangspunkt für dynamische Modelle (Chassagnole *et al.*, 2002) und für ein rationales metabolisches Design dar (Fell, 1996; Hatzimanikatis *et al.*, 1998; Visser *et al.*, 2003; Schmid *et al.*, 2004). Zielsetzungen des Einsatzes experimenteller und analytischer Methoden (z. B. Analyse von Genom, Transkriptom, Proteom und Metabolom), molekularbiologischer Methoden (z. B. rekombinante DNA Technologie) und rechnergestützter Methoden (z. B. topologische Analyse, metabolische Stoffflussanalyse und Metabolic Control Analysis für Analyse und Design biochemischer Reaktionsnetzwerke *in silico*) mit Blick auf die Anwendung in der Weißen Biotechnologie sind, das Substratspektrum der eingesetzten Mikroorganismen zu erweitern, Ausbeute und/oder Produktivität zu erhöhen, durch Modifikation von bestehenden Stoffwechselwegen bzw. Integration neuer Stoffwechselwege neue Produkte herzustellen und die heterologe Proteinproduktion zu ermöglichen bzw. zu optimieren (Stephanopoulos *et al.*, 1998; Nielsen, 2001; Koffas *et al.*, 2005). Die Methoden

des Metabolic Engineering wurden zur Herstellung von Aminosäuren wie Glutamat, Lysin, Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und Cystein, von organischen Säuren wie Milchsäure, Gluconsäure und Zitronensäure, von Alkoholen wie Ethanol und 1,3-Propanediol, von Sekundärmetaboliten und von Vitaminen wie Ascorbinsäure (Vitamin C) und Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>) eingesetzt (Cameron *et al.*, 1998; Altaras *et al.*, 1999; Chotani *et al.*, 2000; Stahmann *et al.*, 2000; Nielsen, 2001; Georgi *et al.*, 2005). Neben der rationalen Stammentwicklung für die biotechnologische Stoffproduktion (Stafford *et al.*, 2001; Koffas *et al.*, 2005) rücken nun verstärkt systembiologische und pharmazeutische Fragestellungen in das Blickfeld (Borodina *et al.*, 2005; Raab *et al.*, 2005; Rajasethupathy *et al.*, 2005).

## 1.1 Stand des Wissens

Bei der metabolischen Flussanalyse sind die Ansätze der stöchiometrischen Flussanalyse und der <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse zu unterscheiden. Die stöchiometrische Flussanalyse (Varma *et al.*, 1994; van Heijden *et al.*, 1994a; Nielsen *et al.*, 1994) basiert auf der Bilanzierung von Metaboliten. Da metabolische Reaktionsnetzwerke in der Regel unterbestimmt sind (Wiechert, 2001), müssen zur Berechnung intrazellulärer Raten bei der stöchiometrischen Flussanalyse Substrataufnahme- und Produktbildungsraten gemessen werden. Außerdem sind weitere Annahmen hinsichtlich des Reaktionsnetzwerkes, z. B. bei parallelen Stoffwechselwegen und metabolische Zyklen, sowie bei bilanzierten Komponenten zu treffen (Bonarius *et al.*, 1997). Problematisch ist insbesondere die Bilanzierung von Kofaktoren und Nukleotiden und die damit verbundenen Unsicherheiten wie nicht schließende Bilanzen von NADH und NADPH (Marx *et al.*, 1996), unbekannte Transhydrogenaseaktivität (Emmerling *et al.*, 2002), nicht vollständig geklärte ATP-Ausbeute bei der Regeneration von (NADH+H<sup>+</sup>) in der Atmungskette (Sauer *et al.*, 1999) und das Vorhandensein sogenannter futile cycles bei den anaplerotischen Reaktionen (Petersen *et al.*, 2000).

Dem Problem der Unterbestimmtheit begegnet die Flux Balance Analysis (Edwards *et al.*, 1999) durch Ermittlung der gesuchten intrazellulären Flussverteilung aus einer linearen Optimierung. Die Schwierigkeit besteht dabei darin, eine geeignete Zielfunktion wie Maximierung von Biomassewachstums- oder Produktbildungsrate zu finden (Schilling *et al.*, 2000).

Einen anderen Weg geht die <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse (Nielsen *et al.*, 1994; Stephanopoulos *et al.*, 1998). Diese basiert auf der Bilanzierung von Markierungszuständen (sogenannter Isotopomere) einzelner C-Atome von Metaboliten bzw. Stoffwechselprodukten. Dabei ist in einem ersten Schritt das biochemische Reaktionsmodell auf C-Atom Ebene der beteiligten Reaktionspartner zu formulieren. Im nächsten Schritt wird die <sup>13</sup>C-Markierungsverteilung des

durchgeführten  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimentes in dem untersuchten Reaktionsnetzwerk simuliert. Im letzten Schritt werden die gesuchten intrazellulären Flüsse unter Einhaltung der Stöchiometrie optimiert, wobei als Zielfunktion meist die Fehlerquadratsumme zwischen experimentell ermittelter und simulierter  $^{13}\text{C}$ -Markierungsverteilung minimiert wird. Im Gegensatz zur stöchiometrischen Flussanalyse muss die gesuchte intrazelluläre Flussverteilung bei der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse durch Lösen eines nichtlinearen Gleichungssystems ermittelt werden d. h. im isotopisch stationären Fall ist zur Berechnung der intrazellulären Raten ein nichtlineares Inversenproblem zu lösen (Marx *et al.*, 1996).

Die  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse ist zur Identifikation von Stoffwechselwegen geeignet (Marx *et al.*, 1996). Sie ermöglicht zudem die Auflösung paralleler Stoffwechselwege, metabolischer Zyklen und eingeschränkt auch reversibler Reaktionen (Wiechert, 2001). Der Vorteil dieses Ansatzes besteht darin, dass das Isotopomeren-Bilanzgleichungssystem in Bezug auf die gesuchten intrazellulären Raten überbestimmt ist, so dass auf die problematische Bilanzierung von Kofaktoren und Nukleotiden verzichtet werden kann.

Für die Durchführung von  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen müssen jedoch neben der Stöchiometrie auch die C-Atom Transitionen aller Reaktionen in dem betrachteten Reaktionsnetzwerk bekannt sein. Unter Verwendung von C-Atom-Zuordnungsmatrizen (Zupke *et al.*, 1994) können die Isotopomeren-Zuordnungsmatrizen (Schmidt *et al.*, 1997) berechnet und damit Isotopomeren-Bilanzgleichungssysteme generiert werden. Die Modellierung eines Reaktionsnetzwerkes in der allgemeinsten Form als Isotopomerenmodell ist insofern zweckmäßig, als auf diese Weise Messdaten unterschiedlicher Analysetechniken wie NMR oder Massenspektrometrie integriert werden können. Jedoch wird die Anwendung der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse auf großskalige metabolische Reaktionsnetzwerke durch mangelnde Verfügbarkeit benötigter C-Atom Transitionen, auf Metabolite des zentralen Kohlenstoffwechsels einschließlich Aminosäuresynthesen begrenzte Messinformation und den rechentechnischen Aufwand bei Modellerstellung, Simulation und Optimierung, insbesondere bei mehrmolekularen Reaktionen und Makromolekülen, limitiert.

Zur Ermittlung intrazellulärer Stoffflussverteilungen bei  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimenten existieren verschiedene Ansätze. Zur Berechnung von isotopisch stationären Isotopomerenverteilungen werden schon seit längerem iterative Lösungsverfahren wie Gauss-Seidel-Verfahren (Zupke *et al.*, 1994) und modifizierte Jakobi-Iterationsverfahren (Schmidt *et al.*, 1999a) eingesetzt. Eine analytische Lösung im isotopisch stationären Fall erlaubt die Formulierung von Isotopomeren-Bilanzgleichungssystemen auf Basis sogenannter Cumomere (Wiechert *et al.*, 1999).

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, das Isotopomeren-Bilanzgleichungssystem durch numerische Integration zu lösen (Schmidt *et al.*, 1999a; Wittmann *et al.*, 1999; Wittmann *et al.*, 2002b). Nur die numerische Integration ist geeignet, isotopisch instationäre Messdaten

aus dem isotopisch instationären Markierungsaufbau als zusätzliche Messinformationen für die Fluss schätzung zu nutzen. Eine instationäre metabolische Flussanalyse wurde von Wiechert (Wiechert *et al.*, 2005) vorgeschlagen. Als Gründe für eine bisher ausgebliebene Umsetzung können zum einen die eingesetzten Analysetechniken wie NMR und GC-MS genannt werden, die zwar die Quantifizierung von Markierungsmustern der proteinogenen Aminosäuren ermöglichen, nicht jedoch der Metabolite des zentralen Kohlenstoffwechsels, außerdem rechentechnische Beschränkungen bei dynamischer Simulation und Optimierung. Unabhängig von der Lösungsstrategie von Isotopomeren-Bilanzgleichungssystemen werden wegen der gekoppelten, nichtlinearen Gleichungsstruktur die intrazellulären Raten mittels Parameterschätzverfahren ermittelt, die auch eine Evaluierung von Daten aus größeren Netzwerken ermöglichen (Wiechert *et al.*, 1997b; Isermann *et al.*, 2003; van Winden *et al.*, 2005). Eingesetzt hierfür wurden Evolutionäre Algorithmen (Schmidt *et al.*, 1999a; Dauner *et al.*, 2001a), Simulated Annealing (Schmidt *et al.*, 1999a; Dauner *et al.*, 2001a) und Methoden der restringierten nichtlinearen Optimierung wie die Sequentielle Quadratische Programmierung (Wittmann *et al.*, 2002b; van Winden *et al.*, 2005).

Der Übergang von der isotopisch stationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse zu einer isotopisch instationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, erfordert auch den Einsatz anderer Analysetechniken. Unter *isotopisch instationärer  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse* soll hier eine  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse verstanden werden, bei der  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente nicht nur mittels numerischer Integration dynamisch simuliert werden, sondern auch Messinformationen aus der isotopisch instationären Markierungsdynamik für die Identifikation der intrazellulären Stoffflussverteilung genutzt werden. Die für die  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse bisher überwiegend verwendeten Analysetechniken wie NMR (Malloy *et al.*, 1988; Szyperski, 1995; Marx *et al.*, 1996) und GC-MS (Park *et al.*, 1997; Christensen *et al.*, 1999; Dauner *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2003) unterscheiden sich gegenüber den erst seit kurzem zur Quantifizierung von Markierungsmustern eingesetzten LC-MS Technologien (van Winden *et al.*, 2005) vor allem in den *in vivo* Zeitkonstanten der zu analysierenden Stoffwechselprodukte.

Bei NMR und GC-MS werden die Markierungsmuster der proteinogenen Aminosäuren analysiert, d. h. maßgeblich ist der Turnover der Proteine mit entsprechend großen Zeitkonstanten. Dies hat zur Folge, dass die Markierungsdauer entsprechend lang gewählt werden muss, wodurch  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente wegen der einzusetzenden Substrate sehr teuer werden. Wegen der großen Zeitkonstanten wird diese Vorgehensweise bevorzugt bei der kontinuierlichen Prozessführung eingesetzt (Marx *et al.*, 1996; Dauner *et al.*, 2001a; Christensen *et al.*, 2002; Shimizu, 2004). Beispielsweise beträgt bei einer Verdünnungsrate von  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  der Turnover von Proteinen 10 h.

Mit LC-MS erfolgt dagegen eine unmittelbare Quantifizierung der Massenisotopomere von Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels. Bei typischen Zeitkonstanten von ungefähr 0.01 h (Wiechert *et al.*, 2005) kann die Markierungsdauer erheblich reduziert werden.

Bei der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse haben sich die MS-Techniken gegenüber den NMR-Techniken wegen höherer Sensitivität und des geringeren experimentellen Aufwandes durchgesetzt (Wiechert, 2001; Wiechert *et al.*, 2001; Wiechert *et al.*, 2005).

Während es sich bei GC-MS um etablierte, robuste Analyseverfahren handelt (Christensen *et al.*, 1999), die auf in hohen Konzentrationen intrazellulär vorliegenden Proteinen basieren, werden LC-MS Technologien erst seit kurzem zur Bestimmung von Absolutkonzentrationen (Buchholz *et al.*, 2001; Lange *et al.*, 2001; Mashego *et al.*, 2004) und von Massenisotopomeren (van Winden *et al.*, 2005) eingesetzt, da einerseits die Metabolite des zentralen Kohlenstoffwechsels *in vivo* nur in sehr niedrigen Konzentrationen vorliegen und andererseits gekoppelte LC-MS Systeme wegen der benötigten Ionisierung und Überführung von Analyten von der Flüssig- in die Gasphase für Routineanwendungen in der Metabolitanalytik noch nicht etabliert sind.

Gegenüber GC-MS können bei LC-MS mit einer Analysemethode Absolutkonzentrationen und Massenisotopomerenverteilungen von Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels quantifiziert werden. Eine aufwändige Probenaufarbeitung ist dabei nicht erforderlich. Da die Analyse direkt auf der Ebene der Metabolite stattfindet, entfällt auch das Problem unterschiedlicher Zeitskalen beim Turnover von Metaboliten, freien Aminosäuren und Proteinen (Wiechert *et al.*, 2005).

Mit LC-MS ist prinzipiell der isotopisch instationäre als auch der isotopisch stationäre Zustand unmittelbar zugänglich. Gelingt es, dieses isotopisch instationäre Übergangsverhalten messtechnisch zu erfassen, so können diese zusätzlichen Messinformationen für die Identifikation der intrazellulären Stoffflussverteilung verwendet werden. Auf diese Weise kann zum einen die Güte der Flussschätzung verbessert werden, zum anderen ist gegebenenfalls eine weitere Verkürzung der Markierungsdauer möglich.

Da für die isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse intrazelluläre Absolutkonzentrationen und relative Massenisotopomerenverteilungen benötigt werden, sind wegen des hohen Turnover intrazellulärer Metabolite schnelle Probenahmeverfahren erforderlich (Theobald *et al.*, 1993; Schaefer *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2001; Buziol *et al.*, 2002; Chassagnole *et al.*, 2002; Visser *et al.*, 2002; Wittmann *et al.*, 2004b; van Winden *et al.*, 2005).

Vorteile der LC-MS basierten isotopisch instationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse ergeben sich vor allem hinsichtlich der Anwendung. So ist diese Vorgehensweise in besonderer Weise zur Analyse der industriell relevanten Prozessführungen Batch und Fed Batch geeignet (Wiechert *et al.*, 2005), außerdem zur Analyse von biologischen Systemen mit sehr niedrigen Wachstumsraten wie tierischen Zellkulturen, bei denen eine nur unzureichende bzw. keine

Biomassesynthese stattfindet. Von den kleinen Zeitkonstanten könnte auch das Hochdurchsatzscreening, z. B. bei Experimenten im Mikrotiterplattenformat (Fischer *et al.*, 2004; Wittmann *et al.*, 2004a), profitieren.

Vor dem Hintergrund des erweiterten Anwendungsspektrums sollten im Rahmen dieser Arbeit die notwendigen experimentellen und rechnergestützten Verfahren für die isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse entwickelt und eingesetzt werden. Hierfür sollte das nicht-lineare, gekoppelte und steife Isotopomeren-Bilanzgleichungssystem durch numerische Integration gelöst werden und erstmals LC-MS basierte Messungen von Absolutkonzentrationen und Massenisotopomerenverteilungen von Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels aus der isotopisch instationären Markierungsdynamik für die Identifikation der intrazellulären Stoffflussverteilung in *E. coli* herangezogen werden. Die Zielsetzungen sind im einzelnen in Kapitel 1.2 beschrieben.

## 1.2 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung experimenteller, analytischer und rechnergestützter Verfahren für die isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse und deren Anwendung zur Analyse der intrazellulären Stoffflussverteilung in *E. coli* W3110. Die Zielsetzungen lauteten im einzelnen:

### ▪ Entwicklung eines Probenahmeverfahrens (Kapitel 3)

Für die Quantifizierung von Absolutkonzentrationen und Massenisotopomeren intrazellulärer Metabolite war wegen des großen Metabolit-Turnover ein schnelles Probenahmeverfahren zu entwickeln, das auf die spezifischen Erfordernisse der nachfolgenden LC-MS Analytik abgestimmt ist. Eine für die Quantifizierung kritische Änderung der Ionenkonzentration sowie unerwünschte Wechselwirkungen bei der Elektrospray-Ionisierung durch chemische Reagenzien sollten vermieden werden. Die Grundoperationen Probentransfer, Abstoppen des Metabolismus, Extraktion der Metabolite und Probenaufarbeitung sollten quantitativ, reproduzierbar und automatisiert durchgeführt werden.

### ▪ Entwicklung eines LC-MS Analyseverfahrens (Kapitel 5 und 6)

Für die isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse werden Messinformationen über Absolutkonzentrationen und Massenisotopomerenverteilungen von Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels benötigt. Für deren quantitative Bestimmung war ein LC-MS Analyseverfahren zu etablieren.

---

- **Modellierung, Simulation und Flussschätzung (Kapitel 7 und 8)**

Basierend auf einem stöchiometrischen Reaktionsnetzwerk der zentralen Kohlenstoffwechselwege in *E. coli* mit bekannten C-Atom Transitionen sollte das Isotopomeren-Bilanzgleichungssystem automatisiert generiert werden. Das Differentialgleichungssystem sollte numerisch integriert und die intrazellulären Raten auf Basis von LC-MS Daten aus der isotopisch instationären Markierungs-dynamik identifiziert werden.

- **Isotopisch instationäre und stationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen in *E. coli***

Unter Verwendung der erhobenen isotopisch instationären und stationären LC-MS Daten sollten isotopisch instationäre und isotopisch stationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen in den zentralen Kohlenstoffwechselwegen Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus von *E. coli* W3110 bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  durchgeführt werden. Zur Validierung sollten zusätzlich GC-MS Daten (Kapitel 4) proteinogener Aminosäuren verwendet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Organismus und Kultivierung

#### 2.1.1 Organismus

In der vorliegenden Arbeit wurde der Stamm *Escherichia coli* W3110 verwendet. Es handelt sich dabei um ein gram-negatives, fakultativ anaerobes, stäbchenförmiges Bakterium. *Escherichia coli* ist eines der am besten untersuchten Mikroorganismen (Keseler *et al.*, 2005) und wird in der Biotechnologie vorwiegend zur Produktion rekombinanter Proteine (Baneyx, 1999), aber auch von Chemikalien wie Aromaten, organische Säuren, Alkohole und Sekundärmetabolite verwendet (Chotani *et al.*, 2000).

#### 2.1.2 Nährmedien und Anzucht

##### LB Medium

LB Medium (Luria-Bertani Medium) gemäß Tabelle 2-1 wurde zur Anzucht von Zellen aus Gefrierkulturen in Animpfröhrchen verwendet.

**Tabelle 2-1.** Zusammensetzung LB Medium.

Trypton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	10 g

mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen, lösen und autoklavieren, pH 7.0 (Einstellung mit 1 M NaOH)

##### Minimalmedium für Schüttelkolben

Minimalmedium gemäß Tabelle 2-2 wurde zur weiteren Anzucht in Schüttelkolben verwendet. Die Medienzusammensetzung erfolgte nach Dauner (Dauner *et al.*, 2000).

**Tabelle 2-2.** Zusammensetzung Minimalmedium für Schüttelkolben.

M9+ Medium (5x)	20 ml
CaCl <sub>2</sub> (100 mM)	100 µl
MgSO <sub>4</sub> (1 M)	200 µl
M9+ Spurensalzlösung	1 ml

mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen und autoklavieren

Das M9+ Medium (5x) aus Tabelle 2-2 bestand aus den Komponenten gemäß Tabelle 2-3.

**Tabelle 2-3.** Zusammensetzung M9+ Medium.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	37.6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15.0 g
NaCl	2.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	4.0 g

mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen und autoklavieren

Die M9+ Spurensalzlösung aus Tabelle 2-2 bestand aus den Komponenten gemäß Tabelle 2-4.

**Tabelle 2-4.** Zusammensetzung M9+ Spurensalzlösung.

FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	16.67 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.18 g
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.12 g
MnSO <sub>4</sub> ·1H <sub>2</sub> O	0.12 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.18 g
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	22.25 g

in 1 l ddH<sub>2</sub>O auflösen und autoklavieren

Alle Komponenten des Minimalmediums sowie die Glucoselösung (50%) wurden einzeln angesetzt und autoklaviert. Anschließend wurden die Einzellösungen steril zusammengeführt. Die Endkonzentration der Glucose betrug  $c_{\text{Glucose}} = 5.0 \text{ g/l}$ .

### Minimalmedium für kontinuierliche Fermentation

Das Minimalmedium gemäß Tabelle 2-5 wurde für die kontinuierliche Kultivierung unter Kohlenstofflimitierung verwendet. Die Medienzusammensetzung erfolgte nach Dauner (Dauner *et al.*, 2000).

**Tabelle 2-5.** Zusammensetzung Minimalmedium für kontinuierliche Fermentation unter C-Limitierung.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	150 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60 g
NaCl	10 g
NH <sub>4</sub> Cl	54 g
CaCl <sub>2</sub> (100 mM)	20 ml
MgSO <sub>4</sub> (1 M)	40 ml
M9+ Spurensalzlösung	40 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (95%)	14 ml

mit ddH<sub>2</sub>O auf 20 l auffüllen und steril filtrieren. CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> und die M9+ Spurensalzlösung wurden sterilen Stammlösungen entnommen. Die Endkonzentration der Glucose betrug  $c_{\text{Glucose}} = 5.0 \text{ g/l}$ .

### **Minimalmedium für $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente**

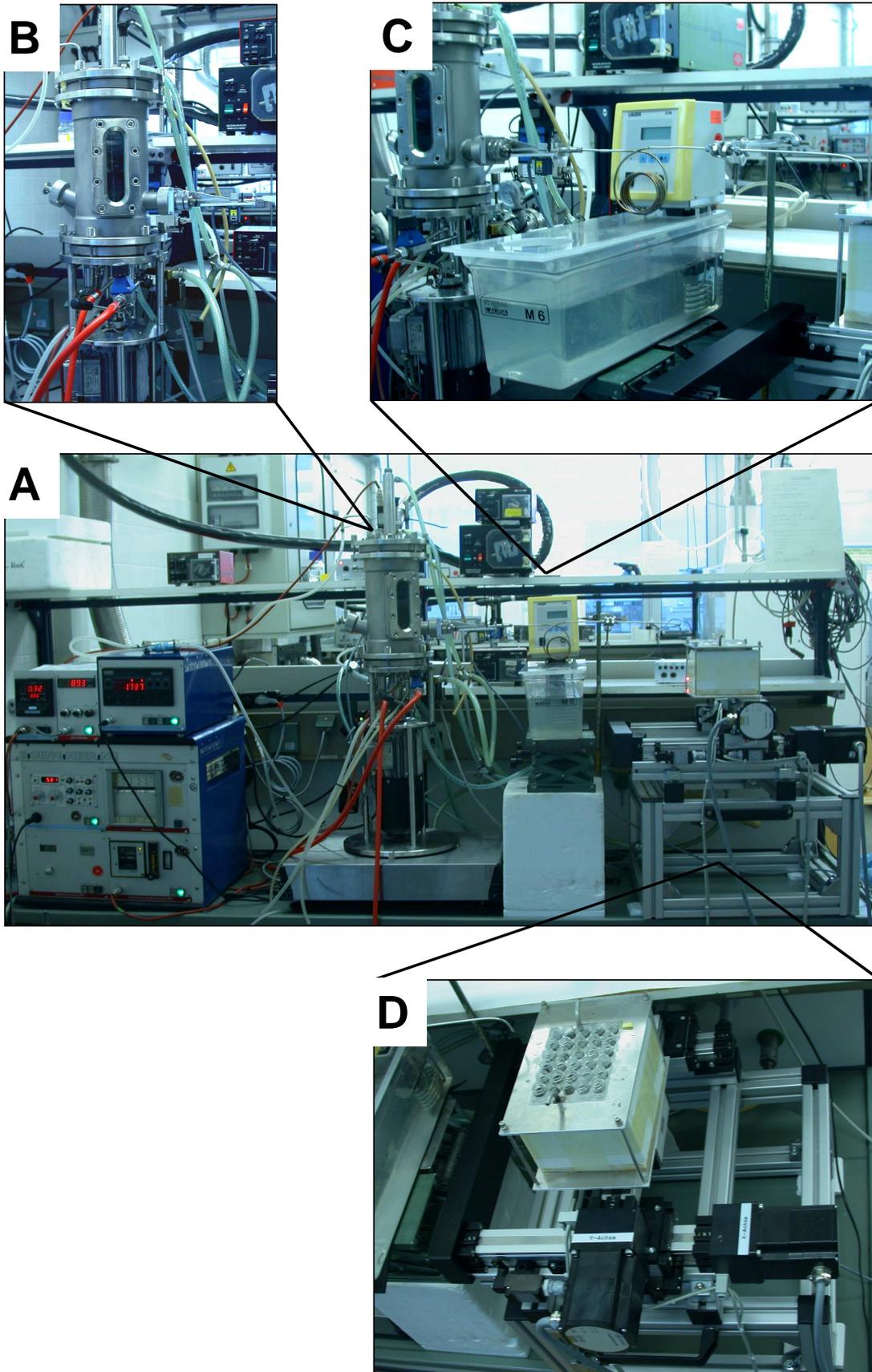
Zur Durchführung von  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimenten wurde das Minimalmedium für die kontinuierliche Kultivierung gemäß Tabelle 2-5 verwendet. Der einzige Unterschied bestand in der eingesetzten Glucose. Bei den  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimenten wurde statt unmarkierter Glucose eine Mischung aus unmarkierter, 1- $^{13}\text{C}$  markierter (Markierung des C1-Atoms) und u- $^{13}\text{C}$  markierter (Markierung aller 6 C-Atome) Glucose in den Anteilen (Mol-%) 40 : 40 : 20 verwendet. Diese Mischung stellt einen Kompromiss aus Kosten und Informationsgehalt eines Experimentes dar (Mollney *et al.*, 1999). Unmarkiertes und markiertes Medium stammten aus der gleichen Ausgangslösung und unterschieden sich damit ausschließlich in der eingesetzten Glucose. Die markierte Glucose wurde von Campro scientific (Nr. 297046/1- $^{13}\text{C}$ , Nr. 389374/u- $^{13}\text{C}$ , Campro scientific, Veenendaal, NL) erworben.

### **Anzucht**

Gefrierkulturen wurden auf LB Medium angezüchtet (bis  $\text{OD}_{600\text{ nm}} \sim 0.5$ ), mit Glycerin versetzt (Verdünnung auf 30-50 Vol.-%) und bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert. Die Gefrierkulturen wurden stets im Eisbad aufgetaut. 20  $\mu\text{l}$  Gefrierkultur wurde in Animpfröhrchen (3 ml LB Medium,  $37^\circ\text{C}$ ) überführt und kultiviert. Nach 16 h wurde dieser Ansatz in einen 1 l Schüttelkolben ( $120\text{ min}^{-1}$ ) überführt, der 100 ml Minimalmedium enthielt und weitere 10 bis 12 h bei  $37^\circ\text{C}$  kultiviert, bevor der Bioreaktor (1.4 l Minimalmedium,  $37^\circ\text{C}$ , 600-800  $\text{min}^{-1}$ ) angeimpft wurde. Es hat sich gezeigt, dass eine zuverlässige Anzucht auch gelingt, wenn 50  $\mu\text{l}$  Gefrierkultur direkt in 100 ml Minimalmedium transferiert werden.

## **2.2 Versuchsanlage**

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Versuchsanlage zeigt zusammenfassend Abbildung 2-1. Prozessführung und Durchführung der Experimente werden im folgenden beschrieben.



**Abbildung 2-1.** Versuchsanlage (A), bestehend aus Bioreaktor (B), schnellem Probenahmeverfahren (C) und Sampling-Roboter (D).

### 2.2.1 Prozessführung

Die Fermentation von *E. coli* erfolgte unter aeroben Bedingungen in einem Bioreaktor im Labormaßstab (KLF 2000, Bioengineering, Wald, Schweiz). Die Versuchsanlage verfügte über Mess- (Sauerstoffpartialdruck, Druck) und Regeleinrichtungen (pH-Wert, Temperatur, Reaktionsmasse). Drehzahl und Belüftungsrate (Massenflussregler, GFC 171S, Analyt-MTC, Müllheim, D) wurden direkt, der Überdruck im Kopfraum des Fermenters wurde über das Abluftventil eingestellt. Der Sauerstoffpartialdruck hängt von Drehzahl, Belüftungsrate und Überdruck ab. Die Fermentationsbedingungen im Batch Betrieb und bei kontinuierlicher Prozessführung sind in Tabelle 2-6 zusammengefasst.

**Tabelle 2-6.** Fermentationsbedingungen bei Kultivierung von *E. coli* im Batch Betrieb und bei kontinuierlicher Prozessführung.

Temperatur	37°C
pH-Wert	7.0
Belüftungsrate	1.5 NI/min
Reaktionsvolumen	1.5 l
O <sub>2</sub> <sup>a)</sup>	> 40 %
Drehzahl	600-800 min <sup>-1 b)</sup>
Überdruck	≤ 0.5 bar

<sup>a)</sup> Gelöstsauerstoff, prozentuale Sättigung mit Luftsauerstoff

<sup>b)</sup> Erhöhung der Drehzahl während Batch Prozessführung

Bei kontinuierlicher Prozessführung wurde ein konstanter Füllstand mittels gravimetrischer Regelung realisiert. Der Zulauf erfolgte kontinuierlich, die Ernte diskontinuierlich. Die Erntepumpe (Schlauchquetschpumpe, Typ 501 U, Watson-Marlow, Falmouth, GB) fungierte als Stellglied der gravimetrischen Regelung und wurde angesteuert, sobald sich die Reaktionsmasse 10 g oberhalb des Sollwertes befand. Für die Regelung des pH-Wertes wurde 3 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> und 2 M NaOH verwendet. Um Schaumbildung während der Fermentation zu verhindern, wurde wenn erforderlich Antischaummittel (Polypropylenglykol P.2000, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D) zudosiert (3 Intervalle pro 24 h, je 2 min, Stufe 4, Schlauchquetschpumpe, Typ 101 U/R MK2 Low Flow, Watson-Marlow, Falmouth, GB).

### 2.2.2 Steady state und stimulus-response Experimente

#### Steady state Experimente

Kultivierungen im stationären Fließgleichgewicht fanden unter Glucoselimitierung bei Verdünnungsraten von  $D = 0.1 - 0.4 \text{ h}^{-1}$  mit den in Kapitel 2.1.2 beschriebenen Medien statt. Probenahme, Quenching, Extraktion und Probenaufarbeitung erfolgten gemäß Kapitel 3, die

massenspektrometrische Analyse der Proben gemäß Kapitel 5.2. Steady state Bedingungen wurden nach 6.5 Verweilzeiten angenommen.

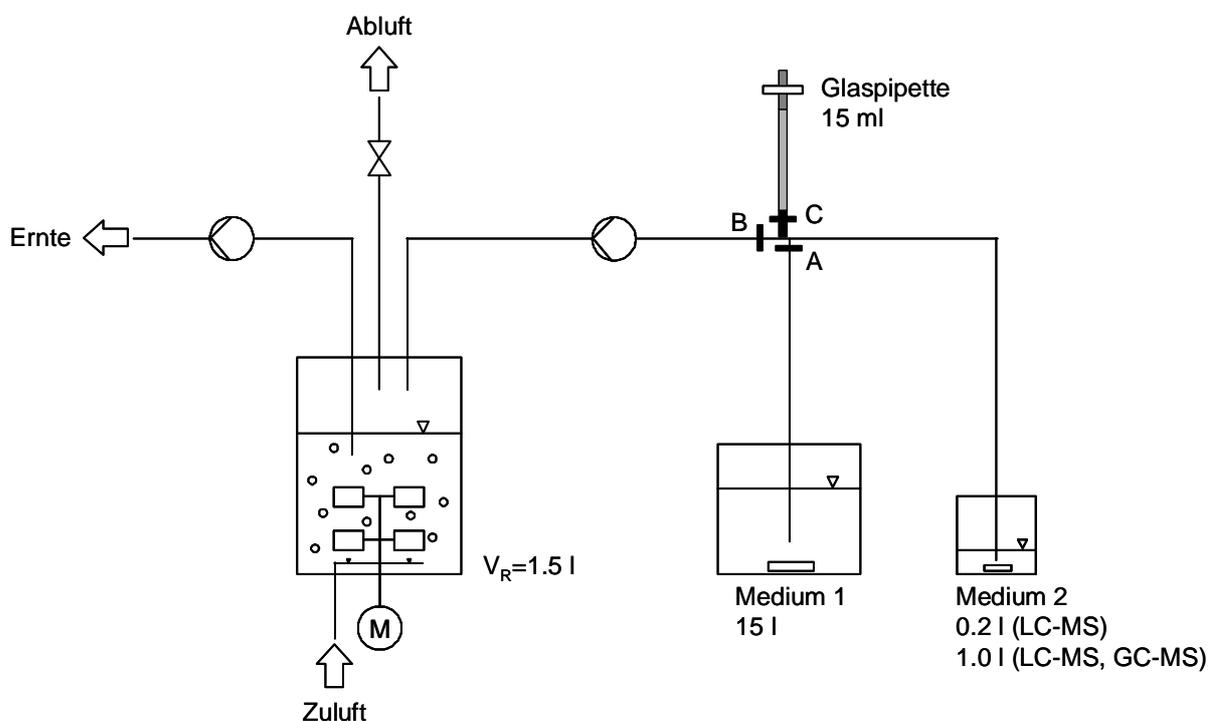
### **Stimulus-response Experimente**

Stimulus-response Experimente fanden ausgehend von dem oben beschriebenen stationären Fließgleichgewicht statt. Für die Durchführung von stimulus-response Experimenten mit einer zeitlichen Auflösung im Bereich von Sekunden wurde eine automatisierte Pulsaufgabebereinheit (Hauck, Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart) verwendet. In einem drucküberlagerten Behälter wird konzentrierte Glucoselösung vorgelegt. Bei Ventilöffnung wird die Glucoselösung durch Druckausgleich in den Bioreaktor eingebracht, wobei die Injektion direkt in die Flüssigphase erfolgt. Die Pulsaufgabebereinheit ist so konstruiert, dass das mit der Glucoselösung eingebrachte Gasvolumen minimal ist. Ein hoher Überdruck gewährleistet eine schnelle Pulsaufgabe. Um die Mischzeit zu minimieren, wurde im Bereich der Injektion (2 cm effektive Eintauchtiefe) ein zusätzlicher Axialrührer (Propellerrührer, 2-flügelig, Durchmesser 5 cm) angebracht. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten stimulus-response Experimenten sollte eine Glucosekonzentration von 0.30 g/l erreicht werden. Die Pulsaufgabebereinheit wurde so ausgelegt, dass der resultierende Überdruck im Kopfraum des Fermenters nach Pulsaufgabe auch zu einem für das integrierte Probenahmeverfahren (Kapitel 3) optimalen Volumenstrom führte. Es wurde bei einem Überdruck von 5 bar 0.9 ml 50%-Glucoselösung vorgelegt, die zu der gewünschten Glucosekonzentration im Reaktor von 0.30 g/l und dem gewünschten Volumenstrom von 3.5 ml/s bei einem resultierenden Überdruck im Kopfraum von 0.5 bar führten. Das Abluftventil wurde während der Pulsaufgabe kurzzeitig (ca. 20 s) geschlossen. Im Gegensatz zur Injektion konzentrierter Glucoselösung mit Spritzen (Theobald *et al.*, 1993; Chassagnole *et al.*, 2002) hat die automatisierte Pulsaufgabebereinheit den Vorteil, dass reproduzierbar die gleiche Menge an Glucoselösung eingebracht wird. Ein Verstopfen bzw. teilweises Verblocken der Spritze, die zur Aufbringung nur einer Teilmenge führt, kann auf diese Weise verhindert werden. Ein weiterer Vorteil stellt die Automatisierung (Steuergerät SM300, SM-Elektronik, Villingen-Schwenningen, D) von Pulsaufgabe und integriertem Probenahmeverfahren (Kapitel 3) dar. Die Ansteuerung der Ventile wurde so programmiert (Visual Designer 4.0, Intelligent Instrumentation, Tucson, USA), dass die Probenahme mit dem integriertem Probenahmeverfahren unmittelbar nach Pulsaufgabe beginnt. Ebenfalls mit dem Steuergerät verbunden ist ein Sampling-Roboter (Hauck, Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart) mit einer Vorrichtung für die Aufnahme von 30 Proben in Reagenzgläsern (Bahr Modultechnik, Luhden, D; SIG positec, Berger Lahr, Lahr D). Durch Änderung der Position in x-y-Richtung werden die einzelnen Reagenzgläser befüllt. Die Probenahmefrequenz wird über die Geschwindigkeit des Roboters eingestellt. In der vorliegenden Arbeit wurden alle 30

Positionen kontinuierlich abgefahren. Die Probenahmefrequenz betrug auf diese Weise bis zu  $5 \text{ s}^{-1}$ .

### 2.2.3 $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente

$^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente wurden im metabolisch stationären Zustand durchgeführt. Die Experimente fanden unter Glucoselimitierung bei einer Verdünnungsrate von  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  statt. Ausgehend von einem stationären Fließgleichgewicht wurde das unmarkierte Medium (Medium 1) durch markiertes Medium (Medium 2) ersetzt (Kapitel 2.1.2). Die experimentelle Anordnung für die Durchführung von  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimenten bei kontinuierlicher Prozessführung zeigt schematisch Abbildung 2-2.



**Abbildung 2-2.** Schematischer Aufbau der Versuchsanlage zur Durchführung von  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimenten bei kontinuierlicher Prozessführung.

Um den Zeitpunkt des Eintritts markierter Glucose in den Bioreaktor möglichst exakt bestimmen zu können, wurde zulaufseitig eine Pipette angebracht. Bei Umstellung der Medien wurde das Medium 1 abgeklemmt (Schlauchklemme A) und das Medium 2 über die Pipette angesaugt und der Zulaufschlauch mit markiertem Substrat befüllt. Zu diesem Zweck wurde der Zulaufschlauch unmittelbar hinter der Pipette kurzzeitig (ca. 5 s) ebenfalls abgeklemmt (Schlauchklemme B). Nach dem Abklemmen des Ausflusses der Pipette

(Schlauchklemme C) konnte der Zulaufschlauch anschließend sofort wieder geöffnet werden (Schlauchklemme B). Da der Ort des markierten Substrates nun bekannt ist (Stelle der Schlauchklemme B), kann die Zeit bis zum Reaktoreintritt auf einfache Weise experimentell in Vorversuchen bestimmt werden. Medium 1 und Medium 2 wurden mit der gleichen Pumpe gefördert, so dass die Verdünnungsrate konstant blieb.

## 2.3 Analytische Methoden zur Prozessanalyse

### 2.3.1 Bestimmung der Biotrockenmasse

Die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration kann indirekt mittels Trübungsmessung oder direkt und genauer gravimetrisch erfolgen. Bei der gravimetrischen Bestimmung existieren zwei Methoden, die entweder Reagenzgläser oder Filter verwenden. Zur Ermittlung der stationären Raten für die metabolische Flussanalyse und der Wachstumsparameter wurde die Biotrockenmassekonzentration gravimetrisch bestimmt.

#### Optische Dichte

Zur Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm mittels Extinktionsmessung ist die Probe gegebenenfalls mit physiologischer Kochsalzlösung (0.9% NaCl) auf den linearen Bereich des Spektrometers (UV-120-02, Shimadzu, Kyoto, Japan) zu verdünnen. Die optische Dichte wurde gemäß Gleichung 2-1 berechnet.

$$OD_{600\text{nm}} = (OD_{\text{Probe}} - OD_{\text{NaCl}}) VF - (OD_{\text{Überstand}} - OD_{\text{NaCl}}) \quad (2-1)$$

Darin bezeichnen OD,  $OD_{\text{Probe}}$ ,  $OD_{\text{NaCl}}$ ,  $OD_{\text{Überstand}}$  die optische Dichte der Kultur, der verdünnten Probe, der physiologischen Kochsalzlösung und des Überstandes, VF steht für den Verdünnungsfaktor. Die optische Dichte der Kultur wurde gegen den Überstand bestimmt (Gleichung 2-1). Hierfür wurde 1 ml unverdünnte Probe 2 min bei  $14000 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert und die optische Dichte des Überstandes bestimmt. Zusätzlich wurde die optische Dichte des Mediums ( $OD_{\text{Medium}}$ ) bestimmt. Unterscheiden sich die Werte von  $OD_{\text{Überstand}}$  und  $OD_{\text{Medium}}$ , so werden extrazelluläre Substanzen ins Medium ausgeschieden, die die OD Bestimmung der Kultur verfälschen. Dies war bei *E. coli* W3110 unter den gewählten Bedingungen jedoch nicht der Fall, so dass dieser Aspekt in Gleichung 2-1 nicht berücksichtigt werden musste. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

### Gravimetrische Bestimmung

Die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration erfolgte gravimetrisch mit Reagenzgläsern bei 10 ml Probeneinsatzvolumen verwendet. Alternativ wurden Filter mit 5 ml Probeneinsatzvolumen verwendet (Schiesling, 2002). Im ersten Fall wurden Reagenzgläser 24 h bei 100°C getrocknet, in einem Exsikkator 2 h abgekühlt und gewogen. In die Reagenzgläser wurden dann exakt je 10 ml Probe pipettiert und anschließend 10 min bei 3500 min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 1 ml vorsichtig mit einer Pipette abgezogen. Der folgende Waschschrift (Resuspension des Pellets durch Vortexen) erfolgte mit 10 ml destilliertem Wasser. Danach wurde ein zweiter Zentrifugationsschritt durchgeführt (10 min, 3500 min<sup>-1</sup>). Der Überstand wurde wieder bis auf 1 ml abgezogen und die Glasröhrchen 24 h bei 100°C getrocknet. Nach Abkühlung im Exsikkator (2 h) wurden sie erneut gewogen. Aus der Gewichtsdiﬀerenz wurde die Biotrockenmasse ermittelt. Im zweiten Fall wurden Filter (Super®-200 Membranfilter, Durchmesser 47 mm, Porengröße 0.2 µm, Pall, East Hills, USA) bei 100°C für 24 h getrocknet. Nach Abkühlung im Exsikkator (2 h) wurden diese gewogen und staubfrei gelagert. Mittels einer Vakuumpumpe wurden exakt 5 ml Probe mit einer Pipette transferiert und filtriert. Die Filter wurden nach der Filtration mit destilliertem Wasser (15 ml Waschlösung) gewaschen. Anschließend wurden diese 24 h bei 100°C getrocknet und nochmals gewogen. Aus der Gewichtsdiﬀerenz wurde die Biotrockenmasse ermittelt. Steht eine ausreichende Probenmenge zur Verfügung, so ist aufgrund der einfacheren Handhabung die Methode mit Reagenzgläsern zu bevorzugen. Ein Platzen der Zellen beim Waschen mit destilliertem Wasser infolge eines erhöhten osmotischen Druckes wurde bei keiner der beiden Methoden festgestellt, jedoch wurde eine höhere Messgenauigkeit als bei 0.9% NaCl-Lösung festgestellt (Schiesling, 2002).

### OD-TS Korrelation

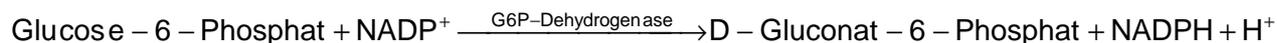
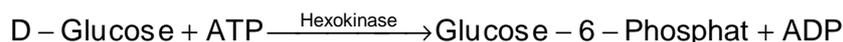
Ausgehend von einer Probe bekannter Biotrockenmassekonzentration  $c_x$  [g TS/l] wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt und jeweils die optische Dichte ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) bestimmt. Die zugehörige Biotrockenmassekonzentration der Verdünnungen wurde aus der Ausgangsprobe berechnet. Für *E. coli* W3110 wurde als OD-TS Korrelation  $c_x = 0.34 OD_{600\text{ nm}}$  ermittelt (Schiesling, 2002) und in dieser Arbeit verwendet.

### 2.3.2 Bestimmung der Konzentrationen von Glucose, Acetat und Ethanol

Zur Berechnung der stationären Raten wurden die extrazellulären Konzentrationen von Glucose, Acetat und Ethanol bei kontinuierlicher Fermentation von *E. coli* W3110 mit  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  enzymatisch bzw. mittels Gaschromatografie bestimmt.

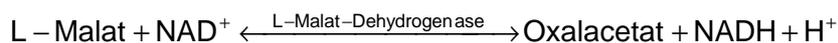
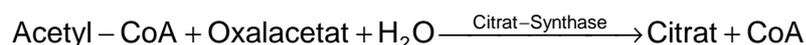
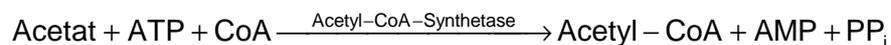
#### Glucose

Die Bestimmung der Glucosekonzentration wurde mit einem Test-Kit durchgeführt (Glucose, UV-Test, Nr. 716 251, Boehringer Mannheim, D). Die während der Reaktion entstehende Menge an NADPH ist der verbrauchten Menge an Glucose äquivalent. Messgröße ist NADPH, das bei einer Wellenlänge von 340 nm spektrometrisch (UV-120-02, Shimadzu, Kyoto, Japan) quantifiziert wurde. Um die Sensitivität des Assays zu erhöhen, wurde gegebenenfalls das Probenvolumen erhöht, wobei der lineare Bereich des Spektrometers einzuhalten ist. Die Glucosebestimmung basiert auf einer zweistufigen Reaktionssequenz.



#### Acetat

Die Bestimmung der Acetatkonzentration erfolgte ebenfalls mit einem Test-Kit (Acetat, UV-Test, Nr. 148 261, Boehringer Mannheim, D). Das für die zweite Reaktion benötigte Oxalacetat wird in einer vorgeschalteten Indikatorreaktion (Reaktion 3) gebildet. Der quantitativen Bestimmung liegt die spektrometrische Messung der NADH-Bildung bei 340 nm zugrunde (UV-120-02, Shimadzu, Kyoto, Japan). Wegen der vorgeschalteten Gleichgewichts-Indikatorreaktion ist die NADH-Menge der Acetatkonzentration nicht direkt linear proportional. Die Reaktionssequenz des Assays umfasst drei Reaktionen.



#### Ethanol

Die Bestimmung der Ethanolkonzentration erfolgte mittels Gaschromatografie. Es wurde ein etabliertes Messprotokoll mit n-Propanol als internem Standard verwendet (Aguilera Vazquez, 2005).

### 2.3.3 Abgasanalyse

Sauerstoff- und Kohlendioxidfraktionen in Zu- und Abluft, die für die Berechnung von Sauerstoffaufnahme- und Kohlendioxidbildungsraten benötigt werden, wurden mit einem Quadrupol-Massenspektrometer (VG ProLab, Thermo ONIX Europe, Winsford, UK) gemessen (Elektronenenergie  $-70\text{eV}$ , Elektrodenspannung  $2.9\text{ V}$ , Repellerspannung  $-0.2\text{ V}$ , Stromstärke  $20\ \mu\text{A}$ , Druck  $2.6 \cdot 10^{-4}\text{ bar}$ ). Mit einem Massenflussregler (GFC 171S, Analyt-MTC, Müllheim, D) wurde bei einem Reaktionsvolumen von  $1.5\text{ l}$  ein konstanter Gasvolumenstrom von  $1.5\text{ NI/min}$  eingestellt.

### 2.3.4 Stoffbilanzen

Die allgemeine Massenbilanz bei kontinuierlicher Prozessführung lautet nach Gleichung 2-2

$$\frac{d}{dt}(V_R c_i) = F (c_i^{\text{zu}} - c_i^{\text{ab}}) + Q_i V_R \quad (2-2)$$

Darin sind  $V_R$  das Reaktionsvolumen,  $F = F^{\text{zu}} = F^{\text{ab}}$  der Volumenstrom von Zulauf und Ernte,  $Q_i$  die volumenbezogene Reaktionsrate und  $c_i$  die Konzentration der  $i$ -ten Komponente. Bei konstantem Reaktionsvolumen ergibt sich die spezifische Reaktionsrate  $q_i$  nach Gleichung 2-3.

$$q_i = \frac{Q_i}{c_x} = \frac{D (c_i^{\text{ab}} - c_i^{\text{zu}})}{c_x} \quad (2-3)$$

Unter der Annahme, dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen außer Acetat und Ethanol (EtOH) keine weiteren Nebenprodukte gebildet werden, ist die C-Bilanz gemäß Gleichung 2-4 erfüllt.

$$q_{\text{Glucose}} = q_{\text{CO}_2} + q_x + q_{\text{Acetat}} + q_{\text{EtOH}} \quad (2-4)$$

### 2.3.5 Wachstumsparameter

#### Batch Prozess

Bei Batch Prozessführung wurde die maximale spezifische Wachstumsrate von *E. coli* W3110 bei Wachstum auf Minimalmedium zu  $\mu_{\text{max}} = 0,42\text{ h}^{-1}$  und der Zell-Substrat-Ausbeutekoeffizient bei exponentiellem Wachstum zu  $Y_{X/S} = 0,41\text{ g TS/g}_{\text{Glucose}}$  ermittelt (Schiesling,

2002). Die maximale spezifische Wachstumsrate ist dabei in guter Übereinstimmung mit früheren Messungen von  $\mu_{\max} = 0,44 \text{ h}^{-1}$ , der dort ermittelte Zell-Substrat-Ausbeutekoeffizient ist dagegen mit  $Y_{X/S} = 0,50 \text{ g TS/g}_{\text{Glucose}}$  deutlich höher (Sauter, 1997).

### Kontinuierliche Prozessführung

Bei kontinuierlicher Prozessführung mit einer Verdünnungsrate von  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ , Kohlenstofflimitierung und Minimalmedium gemäß Kapitel 2.1.2 wurde ein Ausbeutekoeffizient von  $Y_{X/S} = 0,45 \text{ g TS/g}_{\text{Glucose}}$  ermittelt. Ein vergleichbarer Wert von  $Y_{X/S} = 0,43 \text{ g TS/g}_{\text{Glucose}}$  wurde von Chassagnole (Chassagnole *et al.*, 2002) gemessen. Schiesling (Schiesling, 2002) bestimmte außerdem den Erhaltungsstoffwechselkoeffizienten zu  $m_s = 0,03 \text{ g}_{\text{Glucose}}/(\text{g TS h})$ .

### 2.3.6 Stationäre Raten

Vor der Durchführung von  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen wurde überprüft, ob die C-Atom Bilanzen schließen. Auf diese Weise kann festgestellt werden, ob die den berechneten Raten zugrunde liegenden Konzentrationsbestimmungen fehlerbehaftet sind oder ob Nebenprodukte entstehen, die bisher nicht gemessen worden sind. Tabelle 2-7 zeigt die ermittelten spezifischen C-Atom bezogenen Aufnahme- und Bildungsraten von *E. coli* bei kontinuierlicher Prozessführung.

**Tabelle 2-7.** Spezifische C-Atom bezogene Aufnahme- und Bildungsraten von *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ .

	[C-mmol/(g TS h)]	
	Aufnahmeraten	Bildungsraten
Glucose	6.76	
Biomasse <sup>a)</sup>		4.20
CO <sub>2</sub>		2.57
Acetat		0 <sup>b)</sup>
Ethanol		0 <sup>b)</sup>
Summe	6.76	6.77

<sup>a)</sup> Elementarformel der Biomasse von *E. coli* ( $\text{CH}_{1.77}\text{O}_{0.49}\text{N}_{0.24}$ ) nach Roels (Roels, 1980)

<sup>b)</sup> unterhalb der Bestimmungsgrenze

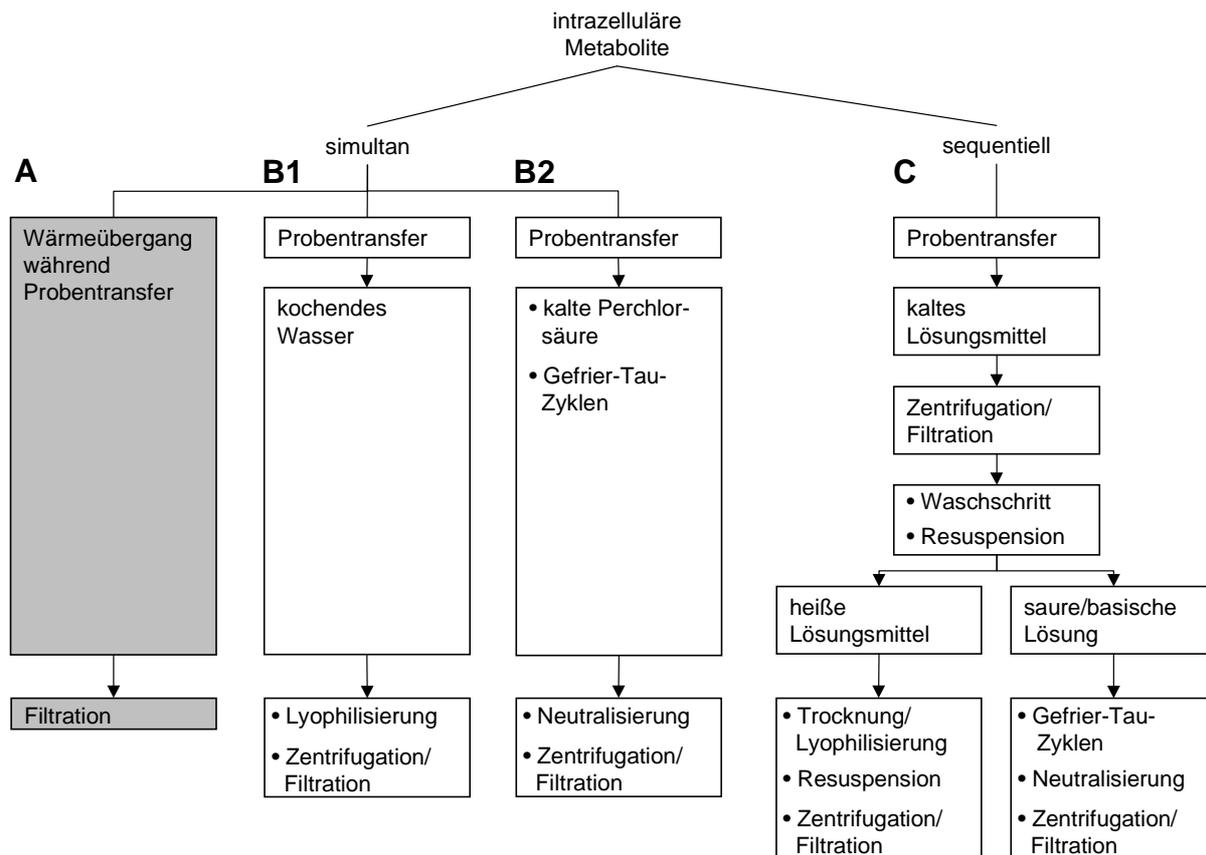
Es wurde weder Acetat noch Ethanol im Überstand nachgewiesen. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Chassagnole (Chassagnole *et al.*, 2002) und Emmerling (Emmerling *et al.*, 2002), die bei *E. coli* bei einer Verdünnungsrate von  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ , Kohlenstofflimitierung und Verwendung von Minimalmedium ebenfalls keine Nebenproduktbildung feststellten. Von weiterer Nebenproduktbildung ist nicht auszugehen, da die C-Bilanzen schließen. Die Messergebnisse aus der Abgasanalyse wurden auch für die Validierung der Kohlendioxidbildungsrate herangezogen. Die spezifische Sauerstoffaufnahme betrug  $q_{\text{O}_2} = 2.42 \text{ mmol}/(\text{g TS h})$ .

h), die Kohlendioxidbildungsrate  $q_{\text{CO}_2} = 2.57 \text{ mmol}/(\text{g TS h})$ . Der Respirationskoeffizient war  $\text{RQ} = 1.06$ . Ein vergleichbarer Wert von  $\text{RQ} = 1.02$  wurde bei früheren Untersuchungen mit einem paramagnetischen Sauerstoffanalysator bzw.  $\text{CO}_2$ -Infrarotanalysator ermittelt, wobei die spezifischen Raten mit  $q_{\text{O}_2} = 2.79 \text{ mmol}/(\text{g TS h})$  und  $q_{\text{CO}_2} = 2.85 \text{ mmol}/(\text{g TS h})$  geringfügig höher waren (Chassagnole *et al.*, 2002). Spezifische Glucoseaufnahme  $q_{\text{Glucose}} = 6.3 \text{ C-mmol}/(\text{g TS h})$  und spezifische Biomassebildungsrate  $q_x = 4.0 \text{ C-mmol}/(\text{g TS h})$  sind ebenfalls vergleichbar (Chassagnole *et al.*, 2002).

## 3 Integriertes Probenahmeverfahren für die quantitative Metabolitanalyse

### 3.1 Einleitung

Die quantitative Analyse von Metaboliten hat sich neben der Analyse von Transkriptom, Proteom und Fluxom zu einem wichtigen Werkzeug im Metabolic Engineering entwickelt (Theobald *et al.*, 1997; Schaefer *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2001; Buchholz *et al.*, 2002; Chassagnole *et al.*, 2002; Visser *et al.*, 2003; Bro *et al.*, 2004; Wittmann *et al.*, 2005). Kritisch im Hinblick auf die Quantifizierung intrazellulärer Metabolite sind neben der Analytik insbesondere die verwendeten Probenahmeverfahren. Hierbei sind mehrere Grundoperationen durchzuführen, die folgende Anforderungen erfüllen müssen. Es muss (i) ein schneller Proben transfer aus der verwendeten Kultivierungseinheit erfolgen, (ii) der Metabolismus bezogen auf den Turnover der Metabolite schnell, idealerweise dauerhaft inaktiviert werden, (iii) die Extraktion der intrazellulären Metabolite quantitativ, möglichst vollständig sein und (iv) eine hinsichtlich der verwendeten Analyse methode geeignete Probenaufarbeitung stattfinden. Hierfür wurden sequentielle (Schaefer *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2001; Chassagnole *et al.*, 2002) und simultane (Theobald *et al.*, 1993; Bhattacharya *et al.*, 1995) Probenahmetechniken entwickelt. Ein Überblick über gebräuchliche Probenahmeverfahren gibt Abbildung 3-1, eine Übersicht findet sich auch in Mauch (Mauch *et al.*, 2000). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist die zeitliche Auflösung. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte integrierte Probenahmeverfahren erlaubt eine Probenahmefrequenz bis zu  $5 \text{ s}^{-1}$ . Sollen dagegen Untersuchungen im Millisekundenbereich stattfinden, so sind sogenannte stopped-flow Probenahmesysteme wie das von Buziol (Buziol *et al.*, 2002) einzusetzen.



**Abbildung 3-1.** Zur quantitativen Analyse intrazellulärer Metabolite werden simultane (A, B1, B2) und sequentielle (C) Probenahmeverfahren verwendet. Beim integrierten Probenahmeverfahren (A) erfolgen die Grundoperationen Quenching und Extraktion durch Wärmeübertragung während des Proben-transfers.

Bei den eingesetzten sequentiellen Probenahmeverfahren (Abbildung 3-1 C) sind bis zu neun Grundoperationen durchzuführen. Nach dem Proben-transfer wird der Metabolismus typischerweise mit gepufferten Quenchinglösungen, z. B. auf Basis von gekühltem Methanol (de Koning *et al.*, 1992; Schaefer *et al.*, 1999; Vaseghi *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2001; Chassagnole *et al.*, 2002; Visser *et al.*, 2002; Castrillo *et al.*, 2003; van Winden *et al.*, 2005), abgestoppt. Im nächsten Schritt werden Kultivierungsmedium und Quenchingpuffer durch Filtration (Theobald *et al.*, 1997), Evaporation (Castrillo *et al.*, 2003) oder Zentrifugation (Schaefer *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2001) abgetrennt. Nach einem oder mehreren Waschschrift erfolgt eine Resuspension der Probe unter Zugabe des Extraktionsmittels. Die Metabolitextraktion erfolgt bevorzugt mit kalter Perchlorsäure (Theobald *et al.*, 1993; Schaefer *et al.*, 1999) oder kochendem Ethanol (Gonzalez *et al.*, 1997; Lange *et al.*, 2001). Nach Durchführung von Gefrier-Tau-Zyklen und Neutralisierung der Proben bzw. Entfernung der organischen Extraktionsmittel durch Vakuumtrocknung und anschließende Resuspension werden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bzw. Filtration abgetrennt (Schaefer *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2001; Castrillo *et al.*, 2003).

Demgegenüber sind bei den simultanen Probenahmeverfahren die Grundoperationen Quenching und Extraktion integriert. Hierfür kann nach Bhattacharya (Bhattacharya *et al.*, 1995) kochendes Wasser verwendet werden, gefolgt von einem Konzentrierungsschritt mittels Lyophilisierung und einer Abtrennung der Zelltrümmer mittels Zentrifugation oder Filtration (Abbildung 3-1 B1). Dagegen verwendet Theobald (Theobald *et al.*, 1993; Schaefer *et al.*, 1999) Perchlorsäure in Verbindung mit drei Gefrier-Tau-Zyklen für simultanes Quenching und Extraktion, gefolgt von Neutralisierung der Proben mit KOH und Abtrennung des Perchloratniederschlages durch Filtration (Abbildung 3-1 B2). In beiden Fällen wird eine weitergehende Automatisierung durch die aufwändige Probenkonditionierung behindert.

Ein Nachteil der sequentiellen Probenahmeverfahren ist die große Anzahl durchzuführender Grundoperationen. Diese wirkt sich wegen der multiplikativen Verknüpfung der Wirkungsgrade der einzelnen Grundoperationen negativ auf die Effizienz des Gesamtverfahrens aus. Die vielen Einzelschritte erschweren zudem die Automatisierung.

Beschränkungen in der Anwendung existieren auch bei den simultanen Verfahren. Bei der Verwendung von kochendem Wasser werden die Proben in einem Verhältnis von 1 : 5 so stark verdünnt, dass zusätzliche Konzentrierungsschritte unerlässlich sind (Bhattacharya *et al.*, 1995). Problematisch bei der Verwendung von Perchlorsäure ist, dass als Folge der Neutralisierung der Proben hohe Salzkonzentrationen auftreten, die im weiteren die chromatografische Analyse beeinträchtigen.

Bei einem Probenahmeverfahren ist jede Grundoperation einzeln zu untersuchen und zu validieren. Die Verweilzeit der Probe im Probenahmesystem liegt üblicherweise im Bereich von Millisekunden (Theobald *et al.*, 1993; Schaefer *et al.*, 1999), wobei sichergestellt werden muss, dass sich in der Probenleitung keine signifikanten Änderungen der Konzentrationen ergeben. Bei Proben transfer und Quenching müssen konstante Volumina und Volumenverhältnisse von Probe und Quenchingmittel vorliegen (Schaefer *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2001; Castrillo *et al.*, 2003). Außerdem müssen die eingesetzten Quenchingmittel den Metabolismus möglichst schnell abstoppen (Theobald *et al.*, 1993; Theobald *et al.*, 1997). Werden die Grundoperationen Quenching und Extraktion als getrennte Schritte durchgeführt bzw. nach der Grundoperation Quenching der Überstand entfernt, so muss sichergestellt sein, dass bei diesem Schritt keine Freisetzung intrazellulärer Metabolite, ein sogenanntes Leakage, stattfindet (Wittmann *et al.*, 2004b). Die Extraktion intrazellulärer Metabolite muss reproduzierbar und quantitativ sein und sollte optimalerweise bei neutralem pH-Wert erfolgen (Castrillo *et al.*, 2003; Gullberg *et al.*, 2004). Bei massenspektrometrischen Analysemethoden sollte eine konstante Ionenkonzentration aufrechterhalten werden (Castrillo *et al.*, 2003; Gullberg *et al.*, 2004).

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Probenahmeverfahren wurden die Grundoperationen Probenahme, Quenching und Extraktion integriert (Abbildung 3-1 A). Die

Schritte Quenching und Extraktion wurden dabei erstmals indirekt durch einen definierten Wärmeübergang realisiert, indem das integrierte Probenahmesystem als Kapillar-Rohrwendel-Wärmeübertrager konstruiert wurde. Die Probenaufarbeitung kann dann auf einen einzigen Filtrationsschritt beschränkt werden. Diese Vorgehensweise ist in mehrfacher Hinsicht vorteilhaft. Erstens erhöht die Integration von drei Grundoperationen in eine Grundoperation sowie die Reduktion der Anzahl der insgesamt durchzuführenden Schritte auf zwei den Gesamtwirkungsgrad. Zweitens werden keinerlei chemische Reagenzien eingesetzt, die mit analytischen Methoden, z. B. enzymatischen Assays oder chromatografischen Methoden wie HPLC/HPIC, wechselwirken und aufwändige Probenaufarbeitungsprotokolle erforderlich machen. Untersucht wurde in diesem Zusammenhang auch der Einfluss der Probenaufarbeitung auf die in dieser Arbeit verwendete LC-MS Analysemethode. Drittens wurden die Schritte Probentransfer, Quenching und Extraktion automatisiert, wodurch die Reproduzierbarkeit verbessert werden kann. Insgesamt werden für die Durchführung der Grundoperationen Probentransfer, Quenching, Extraktion und Probenaufarbeitung lediglich 30 s je Probe benötigt. Bei einer Probenahmefrequenz des integrierten Probenahmeverfahrens von bis zu  $5 \text{ s}^{-1}$  können steady state und stimulus-response Experimente (Kapitel 5.3.2) durchgeführt werden. Im Folgenden ist die Analyse der einzelnen Grundoperationen sowie die verfahrenstechnische Auslegung des integrierten Probenahmeverfahrens dargestellt. Validiert wurde das Probenahmeverfahren durch die konsistente Bestimmung intrazellulärer steady state Metabolitkonzentrationen in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  mit früheren Messungen und Literaturdaten.

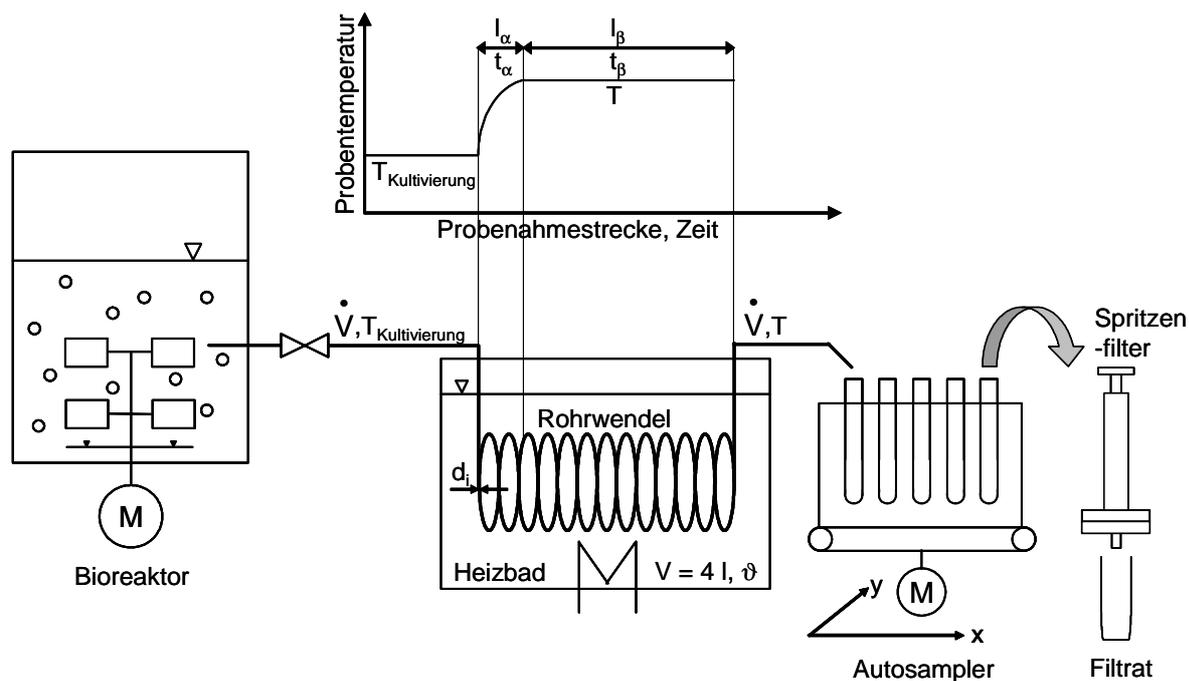
## 3.2 Material und Methoden

### Organismus und Kultivierung

Für die Entwicklung des integrierten Probenahmeverfahrens wurde der Mikroorganismus *E. coli* W3110 gemäß Kapitel 2.1.1 und die in Kapitel 2.1.2 beschriebenen Nährmedien verwendet, außerdem die in Kapitel 2.2 beschriebene Versuchsanlage und Prozessführung.

### Verfahrenstechnische Auslegung

Das integrierte Probenahmeverfahren ist als Kapillar-Rohrwendel-Wärmeübertrager konstruiert und schematisch in Abbildung 3-2 dargestellt. Diese Grundgeometrie wurde gewählt, um einerseits die radiale Durchmischung durch zentrifugalkraftbedingte Sekundärströmungen zu verbessern und andererseits kompakte Abmessungen zu realisieren.



**Abbildung 3-2.** Schematische Darstellung des integrierten Probenahmesystems. Die Größen für die Auslegung des Probenahmesystems sind im Text erläutert.

Zur Berechnung der geometrischen Größen Rohrwendelinnendurchmesser  $d_i$  und Aufheizstrecke entlang der Rohrachse  $l_\alpha$  wurde eine Wärmebilanz gemäß Gleichung 3-1 aufgestellt.

$$\rho \dot{V} c_p (T_{\text{Kultivierung}} - T) = -k A \Delta T_m \quad \text{mit} \quad k = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{s}{\lambda} + \frac{1}{\alpha_2}} \quad (3-1)$$

Darin sind  $\rho$  die Dichte,  $\dot{V}$  der Probenvolumenstrom,  $c_p$  die spezifische Wärmekapazität,  $T_{\text{Kultivierung}}$  die Kultivierungstemperatur,  $T$  die Temperatur der Probe,  $k$  die Wärmedurchgangszahl,  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  die Wärmeübergangszahlen zwischen Probe und Rohrwendelinnenwand bzw. Heizbad und Rohrwendelaußenwand,  $s$  die Wanddicke der Rohrwendelkapillare  $\lambda$  die Wärmeleitfähigkeit,  $A$  die Wärmeübertragungsfläche und  $\Delta T_m$  die mittlere logarithmische Temperaturdifferenz. Wegen der geringen Wanddicke der Rohrwendelkapillare von  $s = 1.1$  mm und der Beheizung des Kapillar-Rohrwendel-Wärmeübertragers in einem turbulenten 4 l Wasserbad wurde für die Auslegung die Wärmedurchgangszahl  $k$  gemäß Gleichung 3-1 durch die Wärmeübergangszahl  $\alpha_1$  zwischen Rohrwendelinnenwand und Probe approximiert ( $k \rightarrow \alpha_1$ ). Es wurde also vereinfachend angenommen, dass der Wärmeübergang zwischen Heizbad und Rohrwendelaußenwand sowie die Wärmeleitung in der Rohrwendelwand

unendlich und diese Widerstände beim Wärmedurchgang damit vernachlässigbar sind. Gleichung 3-1 lässt sich dann in Abhängigkeit der Nusselt-Zahl (Nu) ausdrücken.

$$\rho \dot{V} c_p (T_{\text{Kultivierung}} - T) = -\alpha_1 \pi d_i l_\alpha \Delta T_m$$

Mit  $Nu = \frac{\alpha_1 d_i}{\lambda}$  folgt

$$\rho \dot{V} c_p (T_{\text{Kultivierung}} - T) = -Nu \lambda \pi l_\alpha \Delta T_m \quad (3-2)$$

Die Berechnung der Nusselt-Zahl (Nu) erfolgte auf Basis temperaturgemittelter Stoffdaten von Wasser (spezifische Wärmekapazität  $c_p = 4.192 \text{ kJ}/(\text{kg K})$ , Wärmeleitfähigkeit  $\lambda = 0.648 \text{ W}/(\text{m K})$ , Dichte  $\rho = 979.0 \text{ kg}/\text{m}^3$ , kinematische Zähigkeit  $\nu = 0.52 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ ). Der für die Berechnung der Wärmeübertragung bei Strömung durch beheizte Rohrwendeln verwendete Ansatz nach Gnielinski (Gnielinski, 1986) lautet

$$Nu = \left( 3.66 + 0.08 \left[ 1 + 0.8 \left( \frac{d_i}{D_a} \right)^{0.9} \right] Re^m Pr^{1/3} \right) \left( \frac{Pr}{Pr_w} \right)^{0.14} \quad (3-3)$$

$$\text{mit } Nu = \frac{\alpha d_i}{\lambda}, \quad Re = \frac{w d_i}{\nu}, \quad Pr = \frac{\nu}{a}$$

$$\text{für } Re < Re_{\text{krit}} = 2300 [1 + 8.6 (d_i/D_a)^{0.45}]$$

und den Nebenbedingungen  $2 < Pr < 5$  bei temperaturgemittelten Stoffgrößen sowie den geometrischen Nebenbedingungen  $0.012 < d_i/D_a < 0.2$  und  $165 < l/d_i < 636$ ; für den Exponent  $m$  gilt  $m = 0.5 + 0.2903 (d_i/D_a)^{0.194}$ , für die Anzahl der Windungen  $2.5 < n < 15.5$ . In Gleichung 3-3 steht  $D_a$  für den Windungsdurchmesser,  $Re$  für die Reynolds-Zahl mit Strömungsgeschwindigkeit  $w$  und kinematischer Zähigkeit  $\nu$ ,  $Pr$  für die Prandtl-Zahl mit der Temperaturleitfähigkeit  $a = \lambda/c_p \rho$  und  $Pr_w$  für die Prandtl-Zahl bei Wandtemperatur.

Der Ansatz gemäß Gleichung 3-3 geht auf einen allgemeineren Ansatz zur Bestimmung des Wärmeübergangs in turbulenter Rohrströmung (Gnielinski, 1975) nach Gleichung 3-4 zurück.

$$Nu = \frac{\zeta/8 (Re - 1000) Pr}{1 + 12.7 \sqrt{\zeta/8} (Pr^{2/3} - 1)} \left( 1 + \left( \frac{d_i}{l_\alpha} \right)^{2/3} \right) \left( \frac{Pr}{Pr_w} \right)^{0.11} \quad \text{mit } \zeta = (1.82 \log_{10} Re - 1.64)^{-2} \quad (3-4)$$

als dimensionsloser Reibungszahl. Die Anlaufstrecke ist dabei so zu dimensionieren, dass die Strömung hydrodynamisch voll ausgebildet ist.

In Abhängigkeit von Probenvolumenstrom und Temperatur ist nun das Probenahmesystem geometrisch zu dimensionieren. Hierfür sind Rohrwendelinnendurchmesser  $d_i$  und Länge der Aufheizstrecke  $l_\alpha$  zu berechnen. Kann die zur Durchführung der Grundoperation Quenching benötigte Zeit  $t_\alpha$  ermittelt werden (siehe Diskussion auf S. 42), so steht neben der Gleichung 3-2 in Verbindung mit der Berechnungsgleichung für die Nusselt-Zahl (Gleichung 3-3) eine zweite Gleichung zur Ermittlung der beiden gesuchten geometrischen Größen Rohrwendelinnendurchmesser und Länge der Aufheizstrecke zur Verfügung. Die für das Quenching benötigte Zeit in der Probenschleife ergibt sich zu

$$t_\alpha = \frac{V}{\dot{V}} = \frac{\pi/4 d_i^2 l_\alpha}{\dot{V}} \quad (3-5)$$

Bei vorgegebener Zeit für das Quenching folgt aus Gleichung 3-5 für den Rohrwendelinnendurchmesser

$$d_i = \left( \frac{4 \dot{V} t_\alpha}{\pi l_\alpha} \right)^{0.5} \quad (3-6)$$

Zur Berechnung der Länge der Aufheizstrecke ist der Rohrwendelinnendurchmesser gemäß Gleichung 3-6 in Gleichung 3-2 einzusetzen, wobei für die Nusselt-Zahl der Zusammenhang nach Gleichung 3-4 verwendet wird.

### Thermische Stabilität der Metabolite

Stammlösungen der Metabolite G6P, F6P, FBP, DHAP, GAP, 2PG, 3PG, PEP, PYR, R5P, 6PG, Citrat, Succinat, Fumarat, Malat, AMP, ADP und ATP (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D) wurden mit einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  in Minimalmedium (Kapitel 2.1.2) angesetzt.

Die Verwendung eines thermischen Verfahrens für Quenching und Extraktion erfordert thermische Stabilität der untersuchten Metabolite. Die Metabolit-Stammlösungen wurden daher  $t = 0.5, 1, 3, 5$  min bei  $95^\circ\text{C}$  thermisch im Reagenzglas konditioniert und mit LC-MS (Kapitel 5) analysiert.

### Enzymatische Assays

Als Maß für die Effektivität der Grundoperation Quenching wurden die Enzymaktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und die ATPase Aktivität nach Durchführung des Quenching untersucht. Die Komponenten eines modifizierten enzymatischen Assays

(Bergmeyer *et al.*, 1998a) zur Untersuchung der Aktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase waren dabei wie folgt: 700  $\mu\text{l}$  2-Amino-2-methyl-1,3-propandiolpuffer (50 mM), 100  $\mu\text{l}$  NADP<sup>+</sup> (30 mM, gepuffert), 100  $\mu\text{l}$  Glucose-6-phosphat (200 mM, gepuffert) und 100  $\mu\text{l}$  Probe. Die Proben wurden  $t = 0, 5, 10, 15, 20, 25, 40$  min bei 37°C inkubiert und die Absorption bei 340 nm gemessen (Spektralphotometer UV-120-02, Shimadzu, Kyoto, Japan). Für jede Probe wurde die gemessene Absorption auf den bei der Inkubationszeit  $t = 0$  min ermittelten Wert normalisiert.

ATPase Aktivität wurde mit einem Biolumineszenz Assay bestimmt (Spielmann *et al.*, 1981). Für die Bestimmung von ATP wurde Puffer 1 (Hepes 25 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 9 mM, pH 7.75), für die Bestimmung von ATP+ADP Puffer 2 (Hepes 25 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 9 mM, PEP 2mM, Pyruvat-Kinase 200 U/ml, pH 7.75) verwendet. 20  $\mu\text{l}$  Filtrat (Spritzenfilter P664.1, 0.2  $\mu\text{m}$  Porendurchmesser, Carl Roth, Karlsruhe, D) wurde mit 180  $\mu\text{l}$  DMSO gemischt und 800  $\mu\text{l}$  Hepes-Puffer (Hepes 25 mM, pH 7.75) zugegeben. 100  $\mu\text{l}$  dieser Lösung wurden mit 100  $\mu\text{l}$  Puffer 1 bzw. Puffer 2 gemischt und 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je 50  $\mu\text{l}$  in Mikrotiterplatten transferiert und 50  $\mu\text{l}$  Luciferase (L9009, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D) zugegeben. Die Messung der Biolumineszenz wurde für die Beurteilung der ATPase Aktivität herangezogen und mit einem Luminometer (BMG Lumistar, BMG LABTECH, Offenburg, D) bestimmt.

### Zelluläre Assays

Zur weiteren Bewertung der Effizienz der Metabolitextraktion wurde die Zellmembranpermeabilität sowie die strukturelle Integrität der Zellen untersucht. Hierfür wurde ein Fluoreszenz Assay im Mikrotiterplattenformat (MTP) verwendet (L-7007 LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit, MoBiTec, Göttingen, D). Die beiden Farbstoffe des Assays führen im Falle einer intakten Zellmembran zu einer Grünfärbung (SYTO<sup>®</sup> 9 Farbstoff) bzw. bei Zellmembranpermeabilisierung zu einer Rotfärbung (Propidiumiodid) der Zellen. Die Zellsuspensionsproben wurden auf eine optische Dichte von  $\text{OD}_{600\text{ nm}} = 0.06$  mit 0.9% NaCl-Lösung verdünnt, aliquotiert und auf Eis gelagert. Je 100  $\mu\text{l}$  Probe wurden mit 100  $\mu\text{l}$  Fluoreszenzfarbstoff gemischt (SYTO<sup>®</sup> 9 Farbstoff, 10  $\mu\text{M}$ /Propidiumiodid, 10  $\mu\text{M}$ ) und bei Dunkelheit und einer Temperatur von 21°C für 15 min inkubiert. Die Anregungswellenlänge der Fluoreszenzmessung im MTP Fluoreszenz-Reader (Spectra Fluor, TECAN, Crailsheim, D) betrug 485 nm, die Emissionswellenlängen 535 nm (grün) bzw. 635 nm (rot).

Zur quantitativen Ermittlung der Metabolitextraktion infolge Zellmembranpermeabilisierung wurde als Kenngröße die prozentuale Metabolitextraktion (PME) definiert und nach Gleichung 3-7 ermittelt, die strukturelle Integrität (IS) der Zellen lässt sich mittels des eingeführten dimensionslosen Index IS nach Gleichung 3-8 beurteilen (Schaub *et al.*, 2006).

$$\text{PME [\%]} = \frac{\left[ \frac{G_{P,\text{unbehandelt}}}{R_{P,\text{unbehandelt}}} - \frac{G_{P,\text{behandelt}}}{R_{P,\text{behandelt}}} \right]}{\left[ \frac{G_{P,\text{unbehandelt}}}{R_{P,\text{unbehandelt}}} - \frac{G_{P,\text{Ultraschall}}}{R_{P,\text{Ultraschall}}} \right]} \cdot 100 \quad (3-7)$$

$$\text{IS [-]} = \frac{(R_{P,\text{behandelt}} - R_{\dot{U},\text{behandelt}}) - (R_{P,\text{unbehandelt}} - R_{\dot{U},\text{unbehandelt}})}{(G_{P,\text{unbehandelt}} - G_{\dot{U},\text{unbehandelt}})} \quad (3-8)$$

In Gleichungen 3-7 und 3-8 bezeichnen 'G' (grün) und 'R' (rot) die absoluten Fluoreszenz-messwerte der Probe ('P') bei 535 nm bzw. 635 nm. Hohe Werte für 'G' korrelieren dabei mit einer intakten Zellmembran, während hohe Werte für 'R' mit zunehmender Permeabilisierung der Zellmembran einhergehen. Proben, die thermisch gequenchet und extrahiert wurden, sind mit 'behandelt' bezeichnet, im Gegensatz zu 'unbehandelten' Proben, die ohne jede Proben-konditionierung der Kultivierung entnommen wurden. Um zwischen Zellmembranpermeabilisierung und Zellaufschluss durch vollständige Zelldisintegration zu unterscheiden, wurden Proben ('P') und Überstand ('Ü', Zentrifugation bei 14000 min<sup>-1</sup>, 4°C, 2 min) getrennt analysiert. Die Anzahl intakter Zellen wurde mit Phasenkontrastmikroskopie (BH2, Olympus, Tokyo, Japan) durch Zellzählung ermittelt. Als Referenz für eine vollständig aufgeschlossene Probe wurde je 1 ml verdünnte Zellsuspension (OD<sub>600 nm</sub> = 0.06) der thermisch gequenchten und extrahierten Proben zusätzlich 2 x 30 s mit Ultraschall behandelt ('Ultraschall').

### Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung umfasste die Trennung der Zellen vom Überstand durch Filtration. Untersucht wurden weiterhin die Konzentrierungsschritte Lyophilisierung und Konzentrierung im Vakuum, die prinzipiell geeignet sind, die niedrigen Metabolitkonzentration in der Probe zu erhöhen und damit die Analytik zu erleichtern.

### Filtration

Adsorption von Metaboliten an Filtermaterial kann die quantitative Metabolitanalyse beeinträchtigen. Um solche Effekte auszuschließen, wurden die Volumina 0.5 ml, 1.0 ml und 2.0 ml der Metabolit-Stammlösung mit verschiedenen Spritzenfiltern (P664.1, P811.1, P821.1, jeweils 0.2 µm Porendurchmesser, Carl Roth, Karlsruhe, D; FP30/0,2 CA-S, 0.2 µm Porendurchmesser, Schleicher & Schuell Microscience, Dassel, D) unterschiedlicher Materialien (Polyvinylidenfluorid, Polyethersulfon, Cellulosemischester, Celluloseacetat) filtriert und die Wiederfindung mit LC-MS (Kapitel 5) analysiert.

### Konzentrierungsschritte

Zur Erhöhung der niedrigen Metabolitkonzentrationen in der Probe wurden die Konzentrierung durch Lyophilisierung und Vakuum untersucht. Bei der Gefriertrocknung (Alpha I-5, Christ, Osterode, D) wurde 1 ml Zellsuspension vollständig innerhalb von 20 h lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde dann in 0.2 ml destilliertem Wasser resuspendiert. Bei der Vakuumkonzentrierung (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, D) wurde das gleiche Volumen aufgearbeitet (4.5 h, 20 mbar, 1400 min<sup>-1</sup>). Bei beiden Methoden wurde ein Konzentrierungsfaktor von 5 realisiert. Die anschließende Analyse der Wiederfindung erfolgte in beiden Fällen mit LC-MS (Kapitel 5). Es wurden die Metabolitkonzentrationen der auf diese Weise aufkonzentrierten Zellproben bestimmt und mit den erwarteten Konzentrationen der nicht aufkonzentrierten Ausgangslösungen verglichen.

### LC-MS Analyse

Die mit der integrierten Probenahme transferierten, gequenchten, extrahierten und aufgearbeiteten Proben wurden mit der in Kapitel 5 beschriebenen LC-MS Analysemethode quantifiziert.

## 3.3 Ergebnisse

### 3.3.1 Auslegung des Probenahmesystems

Die geometrischen Größen Rohrwendelinnendurchmesser und Länge der Aufheizstrecke wurden für einen Probenvolumenstrom von 3.5 ml/s und einer Temperatur der Probe von 90°C gemäß Gleichungen 3-2, 3-3 und 3-6 zu  $d_i = 2$  mm und  $l_\alpha = 30$  cm berechnet. Vorgegeben ist dabei auch die für die Grundoperation Quenching maximal zur Verfügung stehende Zeit  $t_\alpha$  (Gleichung 3-5). Diese wurde auf Basis des Turnover von ATP in *E. coli* abgeschätzt (Theobald *et al.*, 1993; Theobald *et al.*, 1997; Schaefer *et al.*, 1999; Chassagnole *et al.*, 2002). Geht man von einer ATP Poolkonzentration von  $c_{\text{ATP}} = 4.3$  mM (Chassagnole *et al.*, 2002) und  $q_{\text{ATP}} = 1.5$  mM/s (Theobald *et al.*, 1993; Theobald *et al.*, 1997; Schaefer *et al.*, 1999) in *E. coli* bei  $\mu = 0.1$  h<sup>-1</sup> aus, so berechnet sich der Turnover von ATP nach Gleichung 3-9 zu  $\tau_{\text{ATP}} = 2.8$  s.

$$\tau_{\text{ATP}} = \frac{c_{\text{ATP}}}{q_{\text{ATP}}} = \frac{c_{\text{ATP}}}{\sum_{i=1}^N r_{i,\text{ATP}}} \quad (3-9)$$

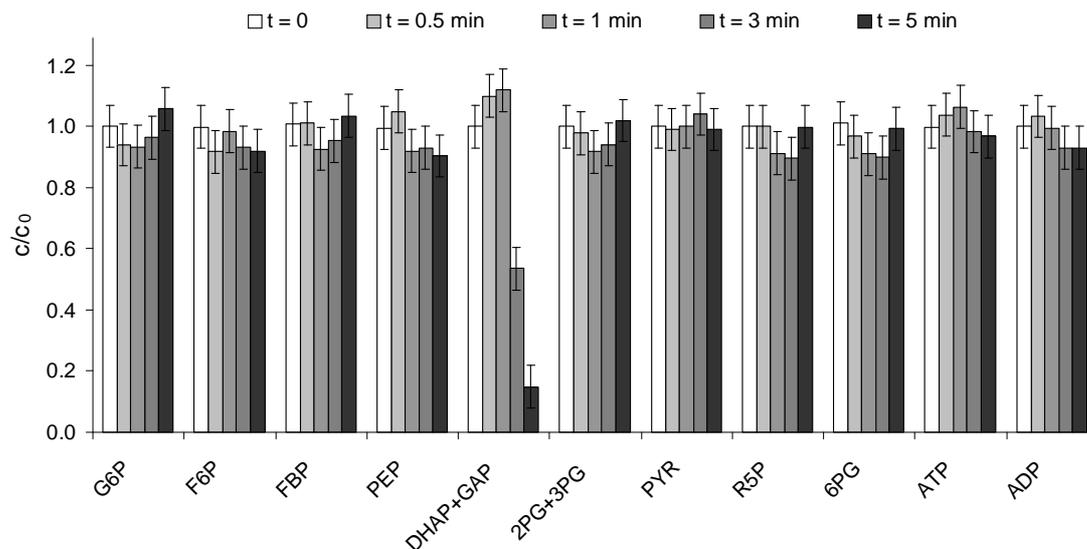
Wird in diesem Fall als maximal zulässige Zeit zur Durchführung der Grundoperation Quenching  $t_{\alpha} = 0.1 \times \tau_{\text{ATP}}$  definiert, so muss  $t_{\alpha}$  kleiner oder gleich 280 ms betragen. Bei einem signifikant höheren  $q_{\text{ATP}}$  als 1.5 mM/s müssen entweder größere Fehler als 10% akzeptiert werden oder die geometrische Auslegung unter Verwendung der Beziehungen gemäß Gleichungen 3-2, 3-3 und 3-6 modifiziert werden.

Als weitere Nebenbedingungen sind die Probenahmefrequenz, um dieses Probenahmeverfahren auch in stimulus-response Experimenten einsetzen zu können (Kapitel 5.3.2), und ein für die LC-MS Analytik ausreichendes Probenvolumen zu berücksichtigen. Als minimales Probenvolumen sind bei LC-MS Analyse 0.5 ml ausreichend. Die angestrebte Probenahmefrequenz war  $f = 5 \text{ s}^{-1}$ . Bei einem Probenvolumenstrom von 3.5 ml/s (Überdruck im Kopfraum des Fermenters 0.5 bar) betrug das durchschnittliche Probenvolumen 0.7 ml.

Die Länge der sich direkt anschließenden Heizstrecke gleichen Rohrwendelinnendurchmessers zur Durchführung der Grundoperation Extraktion ergibt sich bei einem Volumenstrom von 3.5 ml/s zu  $l_{\beta} = 2.7 \text{ m}$  (siehe Diskussion auf S. 46 und Abbildung 3-2). Die Anzahl der Windungen war  $n = 13$  bei einem Windungsdurchmesser von  $D_a = 63 \text{ mm}$ . Die dimensionslosen Kennzahlen betragen  $Re = 4300$ ,  $Pr = 3.6$  und  $Nu = 36$ . Die Verweilzeit während des Probentransfers vor Durchführung der Grundoperation Quenching betrug 200 ms. Innerhalb dieser Zeitspanne ist eine Sauerstofflimitierung nicht zu erwarten.

### 3.3.2 Thermische Stabilität

Die thermische Behandlung der Standardlösung im Reagenzglas bei 95°C für  $t = 0.5, 1, 3, 5$  min führte mit Ausnahme des DHAP+GAP Pools zu keinem temperaturbedingten Abbau der Metabolite (Abbildung 3-3). Für letzteren konnte eine signifikante Degradation bei einer Erhitzungsdauer größer 1 min festgestellt werden.



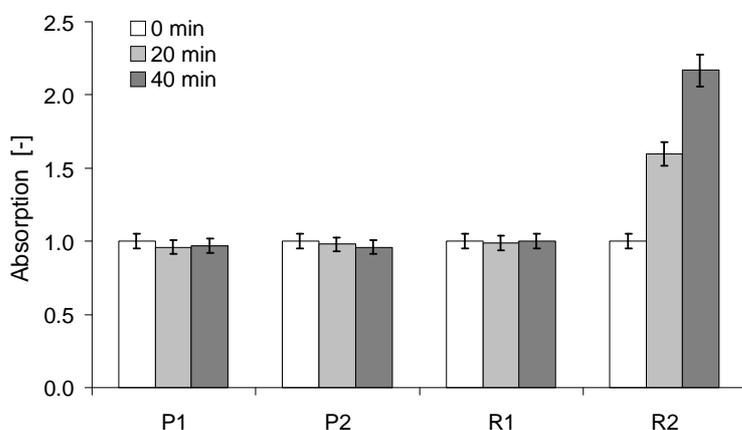
**Abbildung 3-3.** Thermische Stabilität von Metaboliten in Minimalmedium bei 95°C und Erhitzungsdauern von  $t = 0.5, 1, 3, 5$  min. Die Messungen wurden mit LC-MS durchgeführt und auf 1 normalisiert (Messung bei  $t = 0$  min). DHAP+GAP war bei dieser Temperatur und einer Erhitzungsdauer größer als 1 min instabil.

### 3.3.3 Quenching

Die Grundoperation Quenching soll zu einer schnellen Inaktivierung der Enzyme und damit des Metabolismus führen. Am weitesten verbreitet ist das Quenching bei niedrigen Temperaturen, um die Enzymaktivität herabzusetzen bzw. abzustoppen (Kapitel 3.1). Diese Inaktivierung ist nicht notwendigerweise irreversibel, so dass eine Abtrennung der Enzyme erforderlich werden kann oder die weitere Probenaufarbeitung bei tiefen Temperaturen durchzuführen ist. In dieser Arbeit wurde erstmals mittels indirekter Kurzzeiterhitzung gequenchet, um Proteine schnell und irreversibel thermisch zu denaturieren (Ahern *et al.*, 1985; Eijnsink *et al.*, 2004).

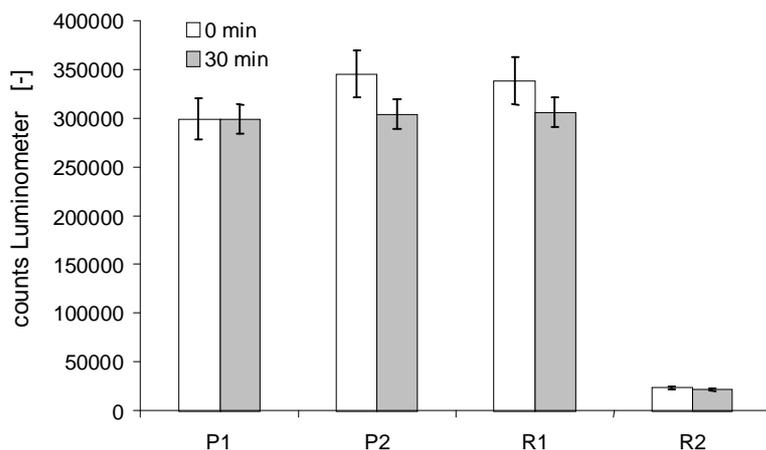
Untersuchungen der thermischen Enzyminaktivierung wurden für Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und ATPase durchgeführt. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase katalysiert die Umsetzung von Glucose-6-phosphat und  $\text{NADP}^+$  zu 6-Phosphogluconolacton und NADPH am Eintritt in den Pentosephosphat-Weg und wurde spektrometrisch detektiert (S. 39). ATPasen sind an einer Vielzahl von Reaktionen im zentralen Kohlenstoff- und Energiestoffwechsel beteiligt. Deren Aktivität wurde in Biolumineszenzuntersuchungen bestimmt. Es wurden *E. coli* Proben (P) bei einer Verdünnungsrate von  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  dem Fermenter mit dem integrierten Probenahmesystem entnommen. Thermisches Quenchen wurde bei  $\vartheta_W = 95^\circ\text{C}$  und Verweilzeiten von 0.5 s (P1) bzw. 2.5 s (P2) ausgeführt. Referenzproben wurden 1 min mit kochendem Wasser behandelt (R1) bzw. bei Raumtemperatur ohne weitere Probenkonditionierung belassen (R2). Um eine vollständige Enzymfreisetzung ohne Beeinträchtigung

ung der katalytischen Aktivität zu gewährleisten, wurden alle Proben zusätzlich mechanisch aufgeschlossen. Hierfür wurde je ein Eppendorfcup mit Glaskugeln (0.7 mm Durchmesser) auf ein Volumen von 1.5 ml befüllt, 1 ml Probe zugegeben und die Probe 4 min mit einem Vortexer aufgeschlossen. Es konnte keine Enzymaktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase bei Verweilzeiten von 0.5 s (P1) bzw. 2.5 s (P2) festgestellt werden (Abbildung 3-4). Eine Kurzzeiterhitzung von 0.5 s bei einer Temperatur von  $\vartheta_W = 95^\circ\text{C}$  war ausreichend, um Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase vollständig und dauerhaft zu inaktivieren wie die Messungen bei Inkubationszeiten von  $t = 20, 40$  min zeigten. Wie erwartet konnte bei der 1 min mit kochendem Wasser behandelten Referenzprobe R1 keine Aktivität festgestellt werden, wohingegen die nicht thermisch behandelte Referenzprobe R2 signifikante Enzymaktivität aufwies.



**Abbildung 3-4.** Enzymaktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase nach thermischem Quenchen. Temperatur/Verweilzeit von Proben (P) und Referenzproben (R) waren  $95^\circ\text{C}/0.5$  s (P1),  $95^\circ\text{C}/2.5$  s (P2),  $100^\circ\text{C}/60$  s (R1) und  $21^\circ\text{C}/-$  (R2). Die Inkubationszeiten bei  $37^\circ\text{C}$  waren  $t = 0, 20, 40$  min. In der normalisierten Darstellung bedeuten Werte gleich 1 inaktives Enzym und Werte größer 1 aktives Enzym (Normalisierung auf Messung bei  $t = 0$  min).

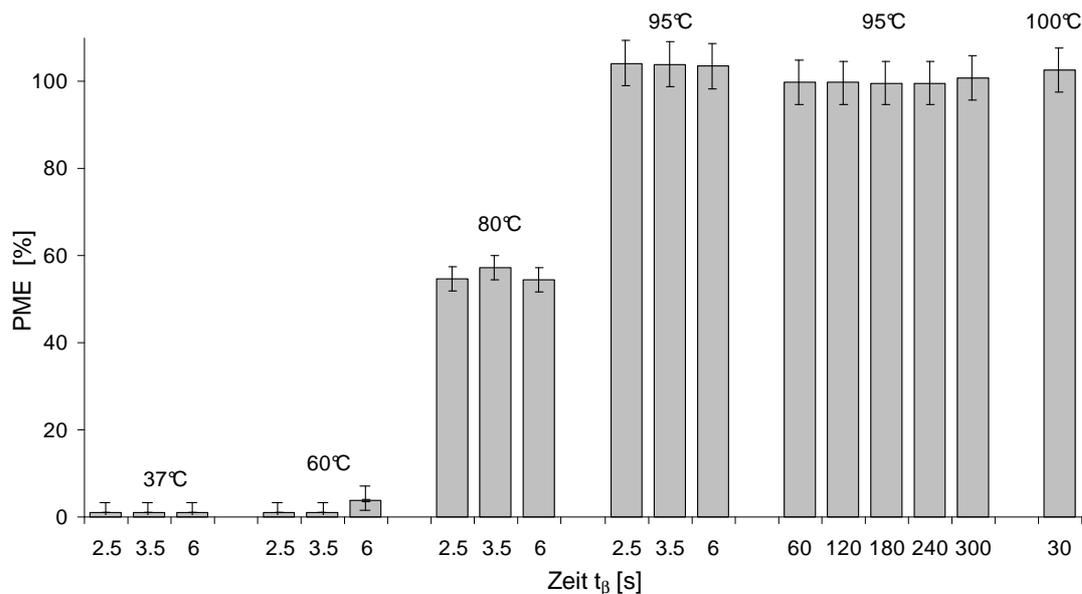
Die Untersuchung der ATPase Aktivität mittels Biolumineszenzbestimmung führte bei gleicher Vorgehensweise zu konsistenten Ergebnissen (Abbildung 3-5). Bei Kurzzeiterhitzung von 0.5 s bzw. 2.5 s (Temperatur  $\vartheta_W = 95^\circ\text{C}$ ) und thermischer Probenkonditionierung der Referenzprobe (60 s,  $100^\circ\text{C}$ ) wurde ein übereinstimmendes ATP Konzentrationsniveau gemessen, so dass von einer vollständigen ATPase Inaktivierung innerhalb von 0.5 s bei  $\vartheta_W = 95^\circ\text{C}$  ausgegangen werden konnte. Bei der nicht thermisch konditionierten Referenzprobe R2 fand dagegen ein signifikanter, schneller ATP Abbau statt. Eine ATPase Inaktivierung erfolgte dabei nicht.



**Abbildung 3-5.** Biolumineszenzbestimmung als Maß für die ATPase Aktivität nach thermischem Quenchen. Findet in der Probe kein ATP Abbau durch aktive ATPasen statt, beträgt die gemessene Biolumineszenz 300000 counts. Temperatur/Verweilzeit von Proben (P) und Referenzproben (R) waren 95°C/0.5 s (P1), 95°C/2.5 s (P2), 100°C/60 s (R1) und 21°C/- (R2). Die Inkubationszeiten bei 37°C waren  $t = 0, 30$  min. Bei der nur mechanisch aufgeschlossenen Referenzprobe R2 fand ein schneller ATP Abbau statt.

### 3.3.4 Extraktion

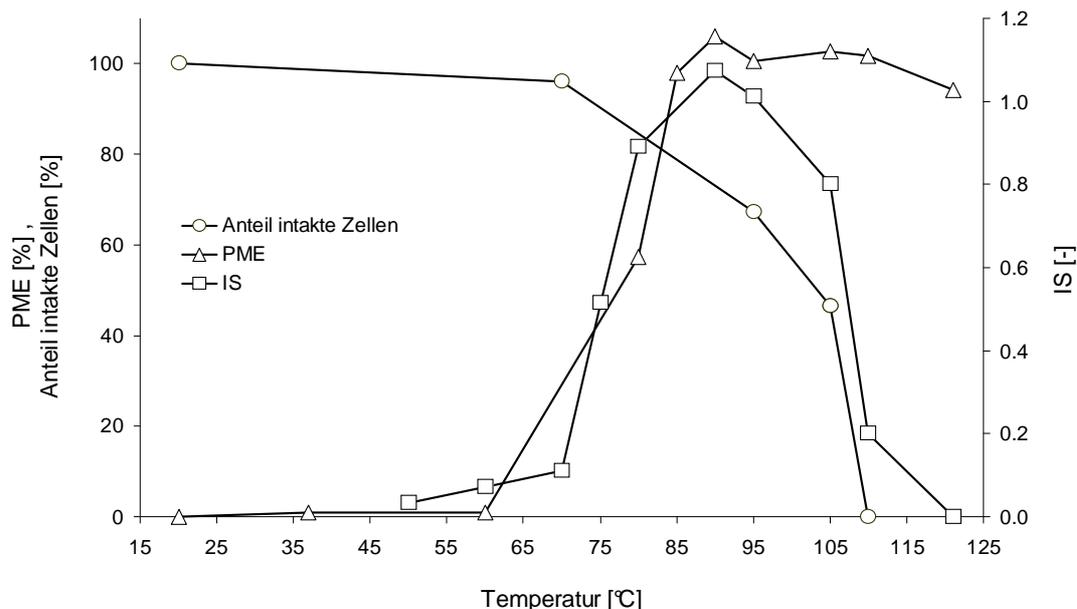
Die thermische Metabolitextraktion wird bei verschiedenen Probenahmeverfahren verwendet (Kapitel 3.1). Es wurde die prozentuale Metabolitextraktion (PME) in Abhängigkeit der Wandtemperatur  $\vartheta_w$  der integrierten Probenahme und der Verweilzeit bzw. Haltezeit  $t_\beta$  bei dieser Temperatur untersucht. Als Markermolekül wurde ATP verwendet und mit dem in Kapitel 3.2 beschriebenen Biolumineszenz Assay bestimmt. Die Ergebnisse bei unabhängiger Variation von Wandtemperatur und Verweilzeit sind in Abbildung 3-6 dargestellt. Diese zeigen, dass eine Wandtemperatur von 95°C und eine Verweilzeit  $t$  von 2.5 s ausreichend für eine vollständige Metabolitextraktion waren. Längere Verweilzeiten (3.5, 6, 60, 120, 180, 240, 300 s) oder eine weitere Temperaturerhöhung auf 100°C (Verweilzeit 30 s) waren nicht erforderlich.



**Abbildung 3-6.** Prozentuale Metabolitextraktion (PME) in Abhängigkeit von Wandtemperatur ( $\vartheta_W = 37, 60, 80, 95, 100^\circ\text{C}$ ) und Verweilzeit ( $t_\beta = 2.5, 3.5, 6, 30, 60, 120, 180, 240, 300$  s). Bei  $\vartheta_W = 95^\circ\text{C}$  und  $t_\beta = 2.5$  s fand eine vollständige Metabolitextraktion statt.

Ausgehend von den in Abbildung 3-6 gezeigten Daten konnte das Temperaturniveau als Haupteinflussfaktor auf die Metabolitextraktion identifiziert werden. Eine vollständige Metabolitfreisetzung fand bei einer Temperatur von  $95^\circ\text{C}$  statt. Dabei war eine Haltezeit  $t_\beta$  von nur 2.5 s auf der Heizstrecke ausreichend.

Die Extraktion der Metabolite erfolgte dabei unter weitgehender Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der Zellen. Abbildung 3-7 zeigt den Umfang der Metabolitfreisetzung aus den *E. coli* Zellen, ausgedrückt als prozentuale Metabolitextraktion (PME), die Anzahl der intakten Zellen sowie den die strukturelle Integrität der Zellen kennzeichnenden IS-Index in Abhängigkeit von der Wandtemperatur  $\vartheta_W$ . Untersucht wurde der Temperaturbereich zwischen  $20^\circ\text{C}$  und  $121^\circ\text{C}$ . Um isoliert den Temperatur effekt auf die Metabolitfreisetzung untersuchen zu können, wurde bei Temperaturen oberhalb des Siedepunktes ( $110^\circ\text{C}$ ,  $121^\circ\text{C}$ ) ein Blasensieden der Proben durch Drucküberlagerung verhindert, wobei die Proben bei diesen beiden Temperaturen nicht mit der integrierten Probenahme thermisch behandelt wurden.



**Abbildung 3-7.** Abhängigkeit der prozentualen Metabolitextraktion (PME,  $\Delta$ ), des Anteils intakter Zellen (o) und der strukturellen Zellintegrität (IS,  $\square$ ) von der Temperatur.

Der Umstand, dass bei einer vollständigen Metabolitfreisetzung (Messwert PME =  $104 \pm 10$  %) die mikroskopisch ermittelte Anzahl intakter Zellen bei einer Temperatur von  $95^\circ\text{C}$  noch bei ungefähr 70% lag und der aus den Fluoreszenzmessungen abgeleitete IS-Index in diesem Temperaturbereich seinen Maximalwert erreichte, deutet auf eine Metabolitfreisetzung durch Permeabilisierung der Zellmembran durch Öffnung bzw. Weitung der Zellmembranporen hin. Da die Zellen strukturell intakt bleiben, ist die Metabolitfreisetzung vermutlich auf niedermolekulare Substanzen beschränkt. Ein Aufplatzen der Zellen wird durch Anwendung von Temperaturen unterhalb des Siedepunktes verhindert, so dass diese durch Zentrifugation bzw. Filtration von der Probenlösung abgetrennt werden können. Dieser Umstand ist vorteilhaft für die Analytik.

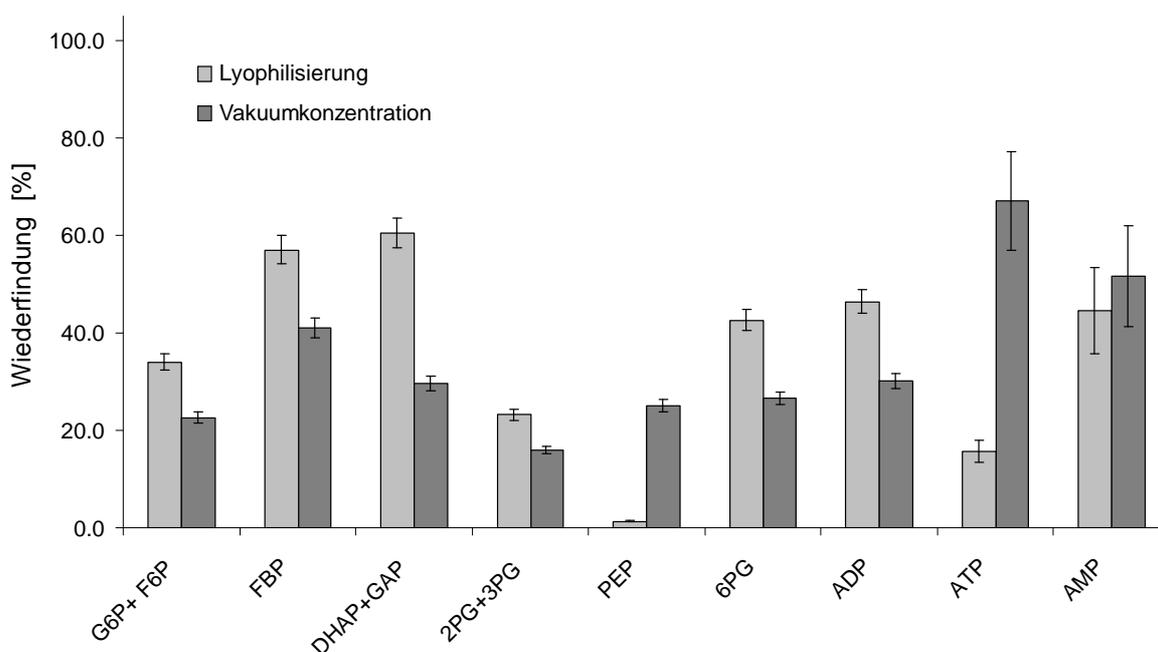
Eine Wandtemperatur der integrierten Probenahme von  $\vartheta_w = 95^\circ\text{C}$  war damit gleichermaßen zur Durchführung der Grundoperation Quenching (Kapitel 3.3.3) und Extraktion geeignet.

### 3.3.5 Filtration

Bei keinem der verwendeten Spritzenfilter konnte Adsorption von Metaboliten an das Filtermaterial festgestellt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Spritzenfilter Rotilabo P664.1 (Carl Roth, Karlsruhe, D) verwendet.

### 3.3.6 Konzentrierungsschritte und LC-MS Analytik

Ein für die vorliegende LC-MS Analytik wichtiges Ergebnis war die schlechte Wiederfindung bei den Konzentrierungsschritten Lyophilisierung und Vakuumkonzentrierung (Abbildung 3-8). Die beste Wiederfindung von 70% wurde für ATP bei Vakuumkonzentrierung erzielt. Typische Werte lagen zwischen 20% und 50%.



**Abbildung 3-8.** Wiederfindung von Metabolitstandards bei Aufkonzentrierung mit Lyophilisierung bzw. Vakuumkonzentrierung und LC-MS Analyse.

Problematisch war insbesondere, dass jeder Metabolit einen spezifischen Konzentrierungsfaktor aufwies. Bei manchen Metaboliten (G6P+F6P, FBP, DHAP+GAP, 2PG+3PG, 6PG und ADP) war die Lyophilisierung überlegen, bei anderen Metaboliten (PEP, ATP und AMP) war dagegen die Vakuumkonzentrierung vorteilhafter. Wegen der schlechten Wiederfindung und der damit nur niedrigen realisierbaren Aufkonzentrierung der Proben sowie der metabolit-spezifischen Konzentrierungsfaktoren wurde auf Lyophilisierung bzw. Vakuumkonzentrierung von Proben in Verbindung mit der etablierten LC-MS Analyse verzichtet. Mögliche Ursachen für die fehlende Reproduzierbarkeit der Konzentrierungsschritte werden in der Diskussion (Kapitel 3.4) erörtert. Messergebnisse für Absolutkonzentrationen und Massenisotopomere finden sich in den Kapiteln 3.3.7, 5 bzw. 6, ebenso ein Literaturvergleich.

### 3.3.7 Anwendung

Das integrierte Probenahmeverfahren wurde zur quantitativen Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen in *E. coli* bei einer Verdünnungsrate von  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  und Glucose-limitierung verwendet. Die Metabolitquantifizierung erfolgte mit der in Kapitel 5 beschriebenen LC-MS Analyseverfahren. Die ermittelten intrazellulären Metabolitkonzentrationen (Kapitel 5.3) sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

**Tabelle 3-1.** Intrazelluläre steady state Metabolitkonzentrationen in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ .

Metabolit	c [ $\mu\text{mol/g TS}$ ]	
	Integrierte Probenahme <sup>a)</sup>	Chassagnole <i>et al.</i> (2002) <sup>b)</sup>
G6P+F6P	$1.3 \pm 0.5$ <sup>c)</sup>	$6.2 \pm 1.2/1.1 \pm 0.2$
FBP	$3.0 \pm 0.8$	$0.5 \pm 0.1$
DHAP+GAP	$1.8 \pm 0.4$ <sup>c)</sup>	$-/0.4 \pm 0.1$
2PG+3PG	$10.9 \pm 3.0$ <sup>c)</sup>	-/-
PEP	$4.8 \pm 1.2$	$4.8 \pm 1.0$
PYR	$5.2 \pm 2.0$	$4.8 \pm 1.0$
P5P <sup>d)</sup>	$0.4 \pm 0.2$	-
6PG	$1.7 \pm 0.4$	$1.4 \pm 0.3$
AMP	$1.0 \pm 0.5$	$1.8 \pm 0.3$
ADP	$2.1 \pm 0.7$	$1.1 \pm 0.2$
ATP	$3.0 \pm 1.1$	$7.6 \pm 1.5$

<sup>a)</sup> Annahme eines systematischen Fehlers von 20%, zusätzlich zu bestimmten Messfehlern nach Kapitel 5.3

<sup>b)</sup> angenommener Messfehler von 20%

<sup>c)</sup> Poolkonzentration

<sup>d)</sup> Pentosephosphat Poolkonzentration

Die intrazellulären Metabolitkonzentrationen von PEP, PYR und 6PG waren in guter Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Chassagnole *et al.*, 2002). Die ermittelte Pentosephosphat Poolkonzentration war mit der von Buchholz (Buchholz *et al.*, 2001) bestimmten Konzentration von  $0.7 \mu\text{mol/g TS}$  vergleichbar. Abweichungen wurden für die intrazellulären Konzentrationen von G6P+F6P und FBP festgestellt. Die G6P+F6P Poolkonzentration war niedriger als der von Chassagnole (Chassagnole *et al.*, 2002) ermittelte Wert, deckte sich jedoch mit Messungen von Buchholz (Buchholz *et al.*, 2001), der ebenfalls eine Konzentration von  $1.3 \mu\text{mol/g TS}$  bestimmte. Die in der Literatur beschriebenen Konzentrationen von FBP reichen von  $0.5 \mu\text{mol/g TS}$  (Chassagnole *et al.*, 2002) bis  $11.8 \mu\text{mol/g TS}$  (Buchholz *et al.*, 2001). Bei den Nukleotiden war die AMP Konzentration mit der von Chassagnole vergleichbar und deutlich niedriger als der von Buchholz (Buchholz *et al.*, 2001) bestimmte Wert von  $7.0 \mu\text{mol/g TS}$ . Die gemessene ADP Konzentration war geringfügig größer als die publizierten Werte von Chassagnole (Chassagnole *et al.*, 2002) und Buchholz (Buchholz *et al.*, 2001), die übereinstimmend  $1.1 \mu\text{mol/g TS}$  gemessen haben. Die Konzentration von ATP war deutlich niedriger als der Wert von Chassagnole (Chassagnole

*et al.*, 2002), jedoch höher als der zu 0.9 µmol/g TS ermittelte Wert von Buchholz (Buchholz *et al.*, 2001).

### 3.4 Diskussion

Im Gegensatz zu anderen sequentiellen oder simultanen schnellen Probenahmeverfahren für die Analyse intrazellulärer Metabolite im Zeitbereich von Sekunden erfolgen bei dem integrierten Probenahmeverfahren die Grundoperationen Quenching und Extraktion indirekt durch einen definierten Wärmeübergang, d. h. ohne Verwendung zusätzlicher chemischer Reagenzien. Die meisten Probenahmeverfahren verwenden dagegen zur Durchführung der Grundoperation Quenching kaltes Methanol (Schaefer *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2001; Visser *et al.*, 2002). Da hierbei nicht von einer dauerhaften Inaktivierung aller Enzyme ausgegangen werden kann, sind die nachfolgenden Probenaufarbeitungsschritte bei tiefen Temperaturen durchzuführen (Theobald *et al.*, 1993; Lange *et al.*, 2001). Es ist darüber hinaus bekannt, dass Methanol zu einer Permeabilisierung der Zellwand und damit zu einer Metabolitfreisetzung führen kann (Gonzalez *et al.*, 1997; Lange *et al.*, 2001; Wittmann *et al.*, 2004b). Die Grundoperation Extraktion findet bei anderen Probenahmeverfahren ebenfalls unter Verwendung chemischer Reagenzien statt wie kochendes Methanol (Shyrock *et al.*, 1986), kochendes Ethanol (Gonzalez *et al.*, 1997; Lange *et al.*, 2001; Visser *et al.*, 2002), saure Lösungen (Theobald *et al.*, 1993; Schaefer *et al.*, 1999; Chassagnole *et al.*, 2002) oder Methanol/Chloroform Lösungen (de Koning *et al.*, 1992; Sato *et al.*, 2004). Um bei Extraktion mit sauren Lösungen eine vollständige Metabolitextraktion zu gewährleisten, sind zusätzlich Gefrier-Tau-Zyklen durchzuführen (Theobald *et al.*, 1993; Schaefer *et al.*, 1999; Chassagnole *et al.*, 2002). Außerdem ist die Stabilität der Metabolite bei extremen pH-Werten zu beachten. So sind beispielsweise DHAP und PEP bei sehr hohen und sehr niedrigen pH-Werten instabil (de Koning *et al.*, 1992; Sato *et al.*, 2004). PYR, NAD, NADH<sup>+</sup>, phosphorylierte Deoxyadenosin-Zucker und Indol werden bei extrem niedrigen oder extrem hohen pH-Werten zerstört (Shyrock *et al.*, 1986; Theobald *et al.*, 1993; Gonzalez *et al.*, 1997). Bei Neutralisierung der Proben kann ein Metabolitverlust dadurch auftreten, dass eine Adsorption an den entstehenden Niederschlag auftritt. So adsorbieren Nukleotide an KClO<sub>4</sub> Präzipitat, wenn KOH oder K<sup>+</sup>-Salze für die Neutralisierung von Perchlorsäure verwendet werden (Chen *et al.*, 1977). Technisch ist die Probenneutralisierung sowohl unter sauren als auch unter alkalischen Bedingungen aufwändig, da große Mengen an Niederschlag entstehen. Im Fall des integrierten Probenahmeverfahrens können pH-Wert Schwankungen vermieden werden, da einerseits die Schritte Quenching und Extraktion indirekt erfolgen, andererseits das Medium, das in einem Phosphatpuffer angesetzt ist, als Puffer fungiert. Die

pH-Wert Änderung durch Temperaturerhöhung liegt bei ungefähr 0.1 - 0.2 Einheiten, so dass auch eine direkte enzymatische Quantifizierung von Metaboliten möglich ist.

Sollen massenspektrometrische Verfahren für die Metabolitquantifizierung eingesetzt werden, so ist der Einfluss der Ionenkonzentration der Probe auf die Messung zu berücksichtigen (Niessen, 1999). Auch können Pufferlösungen wie Phosphatpuffer, Hepes oder PIPES bei der massenspektrometrischen Quantifizierung zu unerwünschten Unterdrückungseffekten der zu analysierenden Ionen führen (Gaskell, 1997; Sterner *et al.*, 2000). Diese Aspekte können zumindest teilweise die nicht reproduzierbaren Konzentrierungsschritte Lyophilisierung und Vakuumkonzentrierung bei LC-MS Analyse erklären.

Die Anwendung von Temperaturen unterhalb des Siedepunktes führt dazu, dass die Zellen nicht vollständig zerstört, jedoch permeabilisiert werden. Auf diese Weise können die Zellen von der Probenlösung leicht durch Zentrifugation oder Filtration abgetrennt und Beeinträchtigungen der Analytik, z. B. durch ungelöste Phospholipide (Sato *et al.*, 2004), minimiert werden. Da die Grundoperationen Proben transfer, Quenching und Extraktion integriert wurden, können kurze Inaktivierungszeiten erzielt werden. Die Verweilzeit in der Proben schleife vor Durchführung der Grundoperation Quenching betrug bei der vorliegenden Rohrwendelgeometrie und einem Volumenstrom von 3.5 ml/s ungefähr 200 ms, so dass keine Sauerstofflimitierung zu erwarten ist. Die Zeit für die Durchführung des Schrittes Quenching während des Proben transfers betrug ungefähr 300 ms. In Theobald (Theobald *et al.*, 1993; Theobald *et al.*, 1997) erfolgte der Proben transfer aus dem Bioreaktor in ein Reagenzglas in 200 ms, der Zeitbedarf für das anschließende Quenching wurde mit 500 ms abgeschätzt. Die Zeitenkonstanten des integrierten Probenahmesystems für Proben transfer und Quenching sind mit jenen anderer Probenahmesysteme vergleichbar, die zur Bestimmung von Metabolitkonzentrationen im Sekundenbereich entwickelt worden sind (Theobald *et al.*, 1993; Schaefer *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2001). Kennzeichen dieser Probenahmesysteme sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst. Die wesentlichen Unterschiede betreffen die Anzahl der Grundoperationen, die Art ihrer Durchführung (z. B. die Verwendung chemischer Reagenzien) und daraus folgend der experimentelle und zeitliche Aufwand der Proben aufarbeitung.

**Tabelle 3-2.** Kennzeichen von Probenahmeverfahren zur quantitativen Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen im Zeitbereich von Sekunden.

	Probenahmeverfahren			
	Integrierte Probenahme	Theobald <i>et al.</i> (1993)	Schäfer <i>et al.</i> (1999)	Lange <i>et al.</i> (2001)
Probentransfer	kontinuierlich	diskontinuierlich	kontinuierlich	diskontinuierlich
Quenching	thermisch	gekühlte Perchlorsäure	gekühltes Methanol	gekühltes Methanol
Extraktion	thermisch	gekühlte Perchlorsäure, 3 Gefrier-Tau-Zyklen	gekühlte Perchlorsäure, 1 Gefrier-Tau-Zyklus	kochendes Ethanol
integrierte Grundoperationen	Probentransfer, Quenching, Extraktion	Quenching, Extraktion	-	-
Anzahl Grundoperationen <sup>a)</sup>	2	5	8	7
Zeitbedarf Probenaufarbeitung	< 30 s	≅ 60-90 min	≅ 60-90 min	≅ 13 h

<sup>a)</sup> vom Bioreaktor bis zur aufgearbeiteten Probe für die Analytik

Die Schwierigkeit bei der Entwicklung von Probenahmeverfahren besteht dabei darin, einerseits den Metabolismus schnell und dauerhaft zu inaktivieren und möglichst viele Metabolite quantitativ zu extrahieren, andererseits den Einsatz chemischer Reagenzien (z. B. von Lösungsmitteln) zu minimieren, hinsichtlich Temperatur, pH-Wert und Ionenkonzentration möglichst physiologische Bedingungen aufrechtzuerhalten und die Metabolite nicht zu zerstören. Diese Komplexität ist auch der Grund dafür, dass verschiedene Probenahmeverfahren existieren, deren jeweiliger Einsatz von der Aufgabenstellung, d. h. den zu quantifizierenden Metaboliten, dem verwendeten Zellsystem, der Analysemethode sowie der gewünschten zeitlichen Auflösung bei Pulsexperimenten abhängt.

Zielsetzung dieser Arbeit war die quantitative Analyse intrazellulärer Metabolitkonzentrationen (Kapitel 5) und Markierungsmuster (Kapitel 4 und 6) der zentralen Kohlenstoffwechselwege für die isotopisch instationäre <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse in dem gram-negativen Bakterium *E. coli* bei einer Verdünnungsrate von  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ . Die ermittelten steady state Konzentrationen von G6P+F6P, FBP, DHAP+GAP, 2PG+3PG, PEP, PYR, R5P, 6PG, AMP, ADP und ATP befanden sich in der erwarteten Größenordnung und waren in ausreichend guter Übereinstimmung mit Literaturdaten. Vorläufige Untersuchungen in dem gram-positiven Bakterium *B. subtilis* und der eukaryotischen Hefe *S. cerevisiae* deuteten darauf hin, dass das integrierte Probenahmeverfahren auch bei diesen Organismen eingesetzt werden kann (Steiner, persönliche Mitteilung). Aufgrund der niedrigeren Toleranz gegenüber

---

Temperatur und hydrodynamischer Beanspruchung (Chisti, 2001) erscheint auch die Anwendung in tierischen Zellkulturen realistisch, wobei eine adäquate Anpassung von Geometrie, Temperatur und Volumenstrom erfolgen muss.

Insgesamt wurde bei dem vorgestellten Probenahmeverfahren durch die Integration der Schritte Probentransfer, Quenching und Extraktion die Anzahl der Grundoperationen auf zwei Grundoperationen reduziert, wodurch der Gesamtwirkungsgrad, der sich aus dem Produkt der Wirkungsgrade der einzelnen Grundoperationen ergibt, gegenüber anderen Probenahmetechniken, die bis zu neun Schritte umfassen, verbessert werden kann. Dies hängt maßgeblich damit zusammen, dass die Schritte Quenching und Extraktion indirekt durch Wärmeübergang erfolgten. Die thermische Probenkonditionierung weist weitere Vorteile auf. Erstens kann auf eine Verwendung chemischer Reagenzien, deren Abtrennung eine aufwändige Probenaufarbeitung erforderlich macht, verzichtet werden. Zweitens findet eine selektive Metabolitextraktion statt, bei der keine Zelltrümmer entstehen. Drittens finden die Schritte Quenching und Extraktion bei physiologischem pH-Wert statt und die Ionenkonzentration der Probe bleibt nahezu konstant. Dies hat zur Folge, dass zum einen die weitgehend intakten Zellen auf einfache Weise in einem einzigen Filtrationsschritt abgetrennt werden konnten, zum anderen die Proben einer Vielzahl von Analysetechniken ohne weitere Aufarbeitung zugänglich sind und insbesondere die LC-MS Analyse unverzerrt stattfinden konnte. Außerdem können mit dem integrierten Probenahmeverfahren beliebig große Probenvolumina aufgearbeitet werden. Die Schritte Probentransfer, Quenching und Extraktion wurden automatisiert und waren damit sehr gut reproduzierbar. Die Integration ermöglichte die Durchführung der Schritte Probentransfer, Quenching, Extraktion und Filtration innerhalb von 30 s je Probe unter Berücksichtigung des Zeitbedarfs für den manuellen Filtrationsschritt. Bei einer Probenahmefrequenz von bis zu  $5 \text{ s}^{-1}$  (Schritte Probentransfer, Quenching, Extraktion) kann auch die Antwort intrazellulärer Metabolitpools auf äußere Stimuli mit einer zeitlichen Auflösung im Sekundenbereich untersucht werden (Kapitel 5).

## 4 GC-MS basierte Bestimmung von Massenisotopomeren proteinogener und freier Aminosäuren in *E. coli*

### 4.1 Einleitung

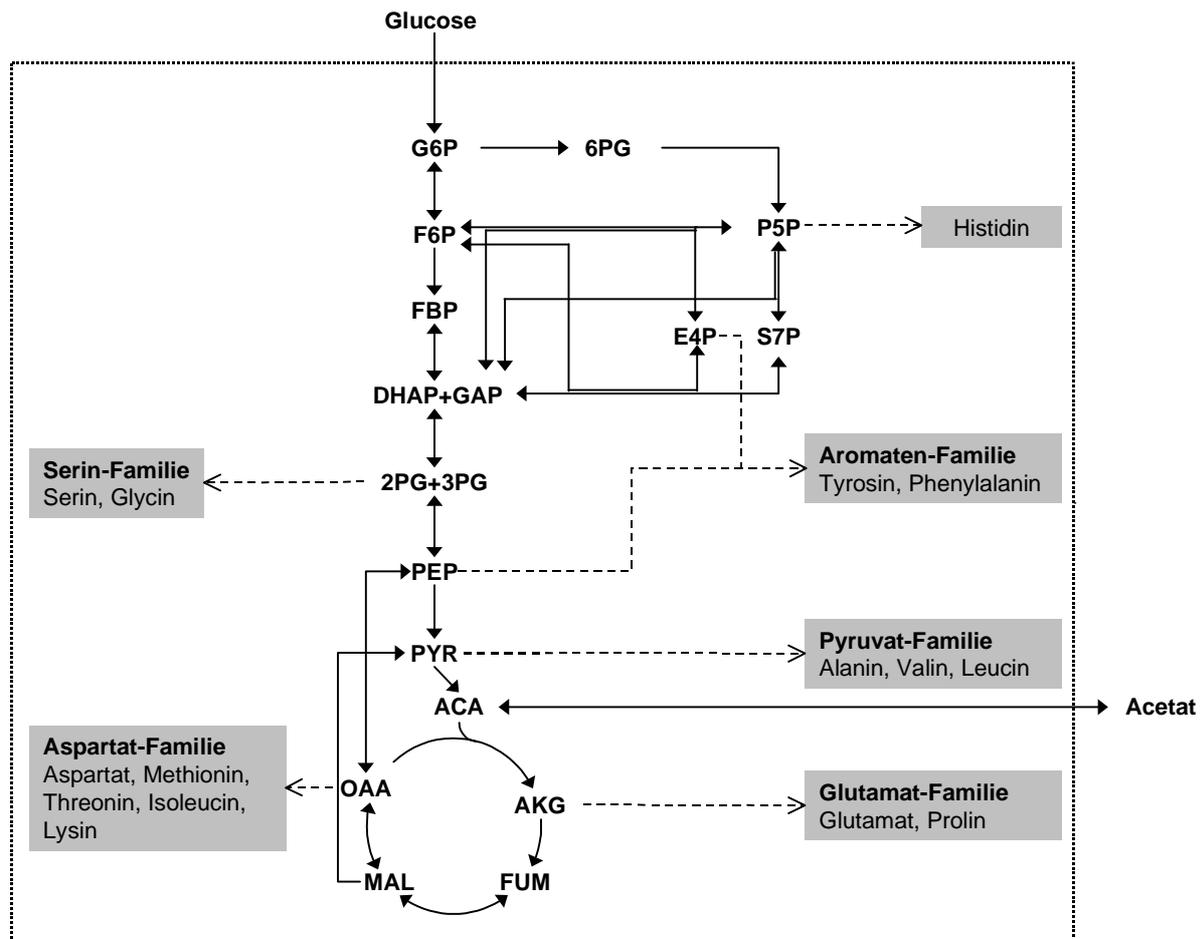
Relative Messinformationen zu Massenisotopomerenverteilungen am Stoffwechsel beteiligter Metabolite oder Makromoleküle für die  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse wurden außer mit LC-MS (Kapitel 5 und 6) auch mit GC-MS ermittelt. Einen Überblick über die bei der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse eingesetzten Analysemethoden und die verwendete Terminologie gibt Kapitel 6.1. Gegenüber LC-MS Techniken, die die Analyse der Markierungsmuster von Metaboliten der zentralen Kohlenstoffwechselwege zum Ziel haben, werden GC-MS Analysemethoden schon seit längerem für die Quantifizierung von Massenisotopomerenverteilungen proteinogener Aminosäuren eingesetzt (Park *et al.*, 1997; Christensen *et al.*, 1999; Dauner *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2003). Diese gelten hinsichtlich der Quantifizierung von Aminosäuren aus Proteinhydrolysat als einfach und robust (Christensen *et al.*, 1999). Der Grund hierfür ist, dass die intrazelluläre Proteinkonzentration und damit die Konzentration proteinogener Aminosäuren im Vergleich zu den intrazellulären Metabolitkonzentrationen um ein Vielfaches höher ist, so dass GC-MS Messungen auf Basis von Proteinhydrolysat mit großer Genauigkeit durchgeführt werden können. Diese Untersuchungen bleiben jedoch auf den isotopisch stationären Zustand beschränkt (Christensen *et al.*, 1999; Dauner, 2000; Shimizu, 2004; Siddiquee *et al.*, 2004). Sie erfordern wegen des niedrigen Turnover von Proteinen außerdem sehr lange Markierungsexperimente. Mit GC-MS können durch Messung der freien Aminosäuren auch Untersuchungen im isotopisch instationären Zustand durchgeführt werden (Wittmann *et al.*, 2002a). Hierbei besteht allerdings die Schwierigkeit, dass die Massenisotopomerenverteilungen der freien Aminosäuren zum einen das Produkt der Markierungsmuster der Precursor-Metabolite des zentralen Kohlenstoffwechsels sind, zum anderen aber auch aus komplexen Abbaureaktionen der Proteine entstehen, was im isotopisch instationären Zustand zu schwer interpretierbaren Zeitkonstanten führt (Wiechert *et al.*, 2005).

Dieses Kapitel hat die GC-MS basierte Bestimmung von Massenisotopomerenverteilungen proteinogener Aminosäuren (Kapitel 4.1.2) und freier Aminosäuren (Kapitel 4.1.3) in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  zum Gegenstand. Zunächst wird kurz auf die Biosynthese der Aminosäuren

eingegangen (Kapitel 4.1.1). Bei der Etablierung einer GC-MS Analysemethode (Kapitel 4.2.4) sind Fragen der Derivatisierung und Fragmentierung (Kapitel 4.2.1), der Linearität des MS-Detektors (Kapitel 4.2.2) sowie der Isotopenfraktionierung zu klären (Kapitel 4.2.3). Die Identifikation der Aminosäuren erfolgte mittels charakteristischer Massenspektren und Retentionszeiten (Kapitel 4.2.5). Als Folge der Derivatisierung der Proben tritt bei GC-MS Analyse eine Verschiebung in den Massenisotopomerenverteilungen auf, die korrigiert werden muss (Kapitel 4.2.6). Die Probenvorbereitung ist in Kapitel 4.2.7 beschrieben. Da der isotopisch stationäre Zustand in den Markierungsmustern der proteinogenen Aminosäuren bei einem typischen Markierungsexperiment erst nach mehreren Stunden erreicht wird, ist ein vorheriger Abbruch des Markierungsexperimentes und eine Extrapolation auf den isotopisch stationären Zustand unter Verwendung einer Auswaschkinetik üblich (Kapitel 4.2.8), um die Kosten eines Markierungsexperimentes in Grenzen zu halten. Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung von Massenisotopomeren sind im metabolisch und isotopisch stationären Fall für die proteinogenen Aminosäuren in Kapitel 4.3.1 und im metabolisch stationären und isotopisch stationären und instationären Fall für die freien Aminosäuren in Kapitel 4.3.2 dargestellt. Eine Zusammenfassung findet sich in Kapitel 4.4.

#### **4.1.1 Biosynthese der Aminosäuren**

Proteinogene Aminosäuren sind experimentell leicht zugänglich und liegen in der Zelle, verglichen mit den Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels, in hohen Konzentrationen vor. Die Kohlenstoffskelette der Aminosäuren leiten sich aus den Intermediärprodukten der zentralen Kohlenstoffwechselwege Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus ab und enthalten somit Informationen über den Markierungszustand ihrer jeweiligen Precursor-Metabolite (Abbildung 4-1).



**Abbildung 4-1.** Die Aminosäuren leiten sich aus den Intermediärprodukten der zentralen Kohlenstoffwechselwege Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus ab. Vereinfacht dargestellt sind die Synthesewege der gemessenen 15 Aminosäuren.

Da bei der Bildung von Aminosäuren vielfach gemeinsame Synthesewege genutzt werden, die die gleichen Precursor-Metabolite der zentralen Kohlenstoffwechselwege als Ausgangsstoffe haben, sind diese Messinformationen teilweise redundant und damit vor allem für die statistische Analyse relevant (Wiechert *et al.*, 1997a; Wiechert *et al.*, 1997b). Bleibt bei der Aminosäuresynthese das Kohlenstoffskelett der Ausgangsmetabolite unverändert oder finden ausschließlich Abspaltungsreaktionen statt, kann unmittelbar auf die Massenisotopomerenverteilung der Precursor-Metabolite geschlossen werden. Bei bi- oder mehrmolekularen Reaktionen in der Aminosäuresynthese sind die Markierungsmuster der Precursor dagegen nicht mehr unmittelbar zugänglich (Wahl *et al.*, 2004).

Die Markierungsmuster der Metabolite R5P und E4P des Pentosephosphat-Weges sind durch Messung der Aminosäuren Histidin bzw. der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin bestimmbar. Die Synthese von Tyrosin und Phenylalanin erfordert zwei Moleküle PEP und ein Molekül E4P und umfasst in *E. coli* eine Sequenz von 11 Reaktionsschritten. Da diese beiden Aminosäuren zur gleichen Aminosäure-Familie gehören und bis

auf die letzten beiden Reaktionsschritte auf dem gleichen Syntheseweg entstehen, liefern Tyrosin und Phenylalanin redundante Messinformationen.

Precursor-Metabolit der Aminosäuren der Serin-Familie ist 3PG. Ohne Änderung des C-Atomskeletts entsteht dabei Serin in einer dreistufigen linearen Reaktionssequenz. In einem weiteren Schritt entsteht durch Demethylierung des C3-Kohlenstoffs aus Serin Glycin. Zu beachten ist in diesem Zusammenhang, dass einzelne Aminosäuren nicht nur aus den Intermediärprodukten des zentralen Kohlenstoffwechsels synthetisiert werden, sondern auch auf alternativen Reaktionswegen bzw. als Abbauprodukte entstehen. So ist beispielsweise Glycin auch ein Abbauprodukt des aus der Aspartat-Familie stammenden Threonins bzw. dieser Weg ein alternativer Glycin-Syntheseweg (Keseler *et al.*, 2005; van Winden *et al.*, 2005). Die gemessenen Glycin-Massenisotopomere wurden daher bei der Schätzung der intrazellulären Flussverteilung nicht herangezogen.

Die Analyse der Aminosäuren der Pyruvat-Familie liefert Informationen über die Massenisotopomerenverteilung von PYR. Bei Valin und Leucin finden eine bzw. zwei bimolekulare Syntheseschritte statt, in denen jeweils eine Addition von Acetylgruppen stattfindet. Alanin dagegen entsteht in einem Reaktionsschritt direkt durch Transaminierung aus PYR.

Von den Aminosäuren der Aspartat-Familie entsteht zunächst Aspartat in einer Einschrittreaktion durch Transaminierung direkt aus dem gemeinsamen Precursor OAA. Aspartat bildet den Ausgangspunkt für die nachfolgende Synthese von Threonin, Isoleucin, Methionin sowie Lysin. Threonin wird in einer fünf Schritte umfassenden linearen Reaktionssequenz ohne Veränderungen am C-Skelett gebildet und hat redundanten Informationsgehalt zu Aspartat. Isoleucin entsteht durch Acetylierung von Threonin in weiteren fünf Schritten. Bei Methionin wird eine Methylgruppe von 5-Methyltetrahydrofolat transferiert. Lysin wird bei Bakterien in zehn Reaktionen aus PYR und Aspartat auf dem Diaminopimilatweg synthetisiert und liefert daher redundante Informationen.

Zugang zum Tricarbonsäure-Zyklus ermöglichen auch die Aminosäuren der Glutamat-Familie.  $\alpha$ -Ketoglutarat wird in Gegenwart von Ammonium durch die Glutamat-Dehydrogenase in einem Schritt zu Glutamat umgewandelt. Prolin entsteht in vier Folgeschritten aus Glutamat, wobei das Kohlenstoffgerüst unverändert bleibt, so dass die Analyse dieser beiden Aminosäuren redundante Messinformationen liefert.

#### 4.1.2 Aminosäuren aus Proteinhydrolysat

Die  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse basierend auf der Analyse von Massenisotopomeren proteinogener Aminosäuren mittels GC-MS hat zunächst den Vorteil, dass die proteinogenen Aminosäuren in hoher Konzentration vorliegen. Da der Turnover der Proteine niedrig ist, kann zudem auf aufwändige Probenahmeverfahren (Kapitel 3) verzichtet werden. Bei kontinuierlicher Pro-

zessführung wird ein isotopisch stationärer Zustand in den proteinogenen Aminosäuren bei einem typischen Markierungsexperiment mit einer Markierungsdauer kleiner der Verweilzeit  $\Theta$ , z. B.  $0.8 \times \Theta$  (Dauner *et al.*, 2001a), nicht erreicht und das Markierungsexperiment abgebrochen, da die eingesetzten Substrate sehr teuer sind. Daher wird mit einer Auswaschkinetik (Wiechert *et al.*, 1996) der isotopisch stationäre Zustand berechnet (Kapitel 4.2.8). Aus den großen Zeitkonstanten folgt auch unmittelbar die beschränkte Anwendbarkeit der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse in ihrer bisherigen Form auf die industriell relevanten Prozessführungen Fed Batch und Batch sowie das Bestreben  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente wegen der hohen Kosten zu miniaturisieren (Wiechert *et al.*, 2005). Nicht einsetzbar ist diese Vorgehensweise auch bei systembiologischen Untersuchungen, bei denen unter den Bedingungen einer Kultivierung die Proteinbiosynthese unzureichend ist, wie dies z. B. bei primären Hepatozyten der Fall ist (Maier *et al.*, 2006).

### 4.1.3 Freie Aminosäuren

Bei den freien Aminosäuren besteht die analytische Schwierigkeit, dass deren Konzentrationen um mindestens ein bis zwei Größenordnungen niedriger als bei den proteinogenen Aminosäuren sind (Neidhardt *et al.*, 1996; Wittmann *et al.*, 2002; Wiechert *et al.*, 2005). Erschwerend kommt hinzu, dass bei der Verwendung von N-Methyl-N-(tert-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamid (MTBSTFA) als Derivatisierungsmittel auch Medienkomponenten wie Phosphat und Sulfat derivatisiert werden (Rühl, 2004). Dies führte beispielsweise bei der Untersuchung der Hefe *S. cerevisiae* WCG4 dazu, dass von den identifizierbaren Aminosäuren Alanin, Glutamat, Glycin, Prolin und Serin eine quantitative Bestimmung nur für die beiden Aminosäuren Alanin und Glutamat möglich war (Rühl, 2004). Prinzipiell können mit der beschriebenen Analyseverfahren auch organische Säuren des Tricarbonsäure-Zyklus wie Citrat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, Succinat, Fumarat und Malat detektiert werden, wobei diese Metabolite im Überstand und nach Zellaufschluss mit ähnlichen Intensitäten gemessen wurden und damit einer Interpretation nicht zugänglich waren (Rühl, 2004).

## 4.2 Material und Methoden

### 4.2.1 Derivatisierung und Fragmentierung

Wegen ihrer zwitterionischen Struktur sind Aminosäuren einer unmittelbaren GC Analyse nicht zugänglich (Chaves Das Neves *et al.*, 1987). Durch geeignete Derivatisierung können jedoch funktionelle Gruppen wie OH-,  $\text{NH}_2$ - und SH-Gruppen durch Silylierung „geblockt“

werden, wodurch die Polarität dieser Gruppen wesentlich herabgesetzt sowie die Flüchtigkeit erhöht wird, so dass eine gaschromatografische Auftrennung möglich ist (Poole *et al.*, 1980). Als besonders effizient hat sich dabei die Verwendung von N-Methyl-N-(tert-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamid (MTBSTFA) für die Derivatisierung von Aminosäuren erwiesen (Dauner *et al.*, 2000). Vorteilhaft bei der Verwendung von MTBSTFA ist die hohe Effizienz bei der Derivatisierung von Alkoholen, Thiolen, Carboxylgruppen sowie primärer/sekundärer Amine, der Umstand, dass größtenteils ungeladene, flüchtige tert-Butyldimethylsilyl-Derivate (TBDMS-Derivate) entstehen (Evershed, 1993), Mehrfach-Silylierungen der Aminogruppe vermieden werden sowie diese Derivatisierungsreaktion in einem Schritt durchgeführt werden kann (Dauner *et al.*, 2000). Bei ausreichender Energie der Elektronenstossionisierung entstehen an definierten Bruchstellen charakteristische Fragmente der TBDMS-Aminosäuren (Dauner *et al.*, 2000). So resultieren durch Abspaltung einer Methylgruppe TBDMS-derivatisierter Aminosäuren das (M-15)-Fragment bzw. durch Abspaltung einer tert-Butylgruppe das (M-57)-Fragment, wobei der Kohlenstoffgrundkörper der Aminosäuren in beiden Fällen vollständig erhalten bleibt. Weitere Fragmente entstehen unter Abspaltung von CO aus der Carboxylgruppe der derivatisierten Aminosäure verbunden mit molekularen Umlagerungen (M-85) sowie unter Abspaltung von COO-TBDMS (M-159), wobei der Kohlenstoff ebenfalls aus dem C-Atomskelett der Aminosäure stammt. Das sogenannte (f302)-Fragment entsteht, wenn die TBDMS-derivatisierte Aminosäure doppelt silyliert vorliegt und die Seitenkette der Aminosäure zwischen  $\alpha$ -C und  $\beta$ -C abgespalten wird. Das (sc)-Fragment besteht nur noch aus der abgespaltenen Seitenkette. Durch diese Fragmentierung einer Aminosäure entsteht ein charakteristisches Massenspektrum, das die eindeutige Identifikation einer Aminosäure wesentlich erleichtert (Kapitel 4.2.5). Diese zusätzlichen Informationen können auch für die statistische Analyse genutzt werden.

#### 4.2.2 Detektorlinearität

Bei GC-MS Analyse sind nichtlineare Detektorantworten bei unterschiedlichen Probenkonzentrationen und Massenisotopomenverhältnissen zu beachten (Hellerstein *et al.*, 1999). Dies ist insbesondere bei Proben aus hydrolysiertem Protein zu berücksichtigen, da die Konzentrationen von Aminosäuren hierbei einerseits hoch sind, andererseits aber von der Proteinkonzentration und -zusammensetzung, von der Effizienz der Derivatisierungs- und Hydrolysereaktion und von der Stabilität einzelner Aminosäuren abhängen und daher nur ungenau vorherzusagen sind. Eine Abhängigkeit des Messergebnisses von der Probenmenge konnte von Dauner (Dauner *et al.*, 2000) nicht festgestellt werden. Die Linearität der Detektorantwort war bei der verwendeten Analyseverfahren bis zu einer Konzentration von 7.5 mg/ml BSA (das entspricht einer Messintensität von ca. 800000 counts) gewährleistet

(Rühl, 2004). Da das Derivatisierungsgagens im Überschuss vorlag, konnte von konzentrationsunabhängiger Derivatisierungseffizienz ausgegangen werden. Bei Intensitäten größer 800000 counts sind die Proben gegebenenfalls mit Tetrahydrofuran (THF) zu verdünnen.

### 4.2.3 Isotopenfraktionierung

Bei GC Analyse derivatisierter Aminosäuren findet eine Fraktionierung von Massenisotopomeren TBDMS-derivatisierter Aminosäuren statt (Dauner *et al.*, 2000). Hierbei eluieren schwerere Massenisotopomere früher als leichtere. Aus diesem Grund ist für jede detektierte Aminosäure das Messsignal über den gesamten Peak zu integrieren, d. h. es sind alle einer Aminosäure eindeutig zuzuordnenden scans bei der Auswertung zu berücksichtigen.

### 4.2.4 GC-MS Analysemethode

Die GC-MS Analyse erfolgte zweistufig mittels Gaschromatograf (AutoSystem XL GC, Perkin Elmer, Wellesley, USA) sowie direkt gekoppeltem Quadrupol-Massenspektrometer (TurboMass, Perkin Elmer, Wellesley, USA) nach einer von Rühl (Rühl, 2004) im Rahmen einer Studienarbeit am IBVT etablierten Methode. Als Trennsäule wurde eine Equity-1 Kapillarsäule (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm Filmdicke, Supelco, Sigma-Aldrich Chemie, München, D), als Trägergas Helium mit einer Flussrate von 2 ml/min und einem Teilungsverhältnis von 1:20 verwendet. Die Ofentemperatur wurde ausgehend von 150°C (2 min) mit einem Gradienten von 3°C/min auf 280°C erhöht und nach Erreichen dieser Temperatur 5 min konstant gehalten, so dass sich eine Analysezeit je Probe von 50 min ergab. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl. Für die MS-Analyse wurden folgende Parameter verwendet: Injektortemperatur 280°C, Kupplungstemperatur 290°C, Temperatur der Ionenquelle 225°C, Elektronenstossionisierung (EI) mit 70 eV, Analyse der Massenspektren im „Fullscan“-Modus (40 - 650 amu) mit 120 scans/min. Die MS-Rohdaten wurden mit der Software TurboMass 4.1 (Perkin Elmer, Wellesley, USA) ausgewertet.

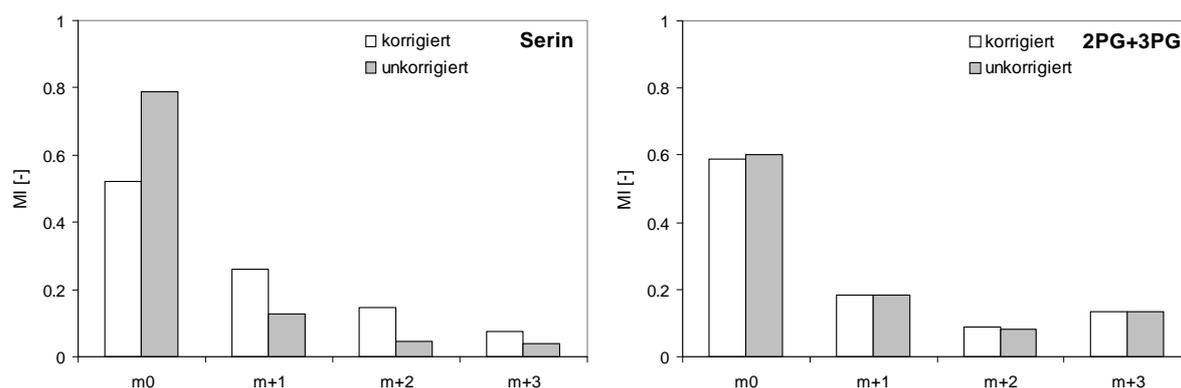
### 4.2.5 Identifikation

Bei der MTBSTFA-Derivatisierung (Kapitel 4.2.1) entstehen charakteristische Fragmente sowohl bei den Aminosäuren - mit zwei Bruchstellen im Kohlenstoffgrundkörper und zwei weiteren Bruchstellen je tert-Butyldimethylsilyl-Gruppe (Dauner *et al.*, 2000) - als auch bei den Carbonsäuren des Tricarbonsäure-Zyklus (Chance *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998). Zur

Identifikation der Amino- und Carbonsäuren in den gemessenen Massenspektren wurden zudem die in die GC-MS Software integrierte NIST-Substanzbibliothek sowie die von Konfiguration und Methode des verwendeten GC-MS Gerätes (Kapitel 4.2.4) abhängigen Retentionszeiten herangezogen (Rühl, 2004).

#### 4.2.6 Korrektur der Massenisotopenverschiebung

Die  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse beruht allein auf den bilanzierten Isotopomeren der Kohlenstoffgrundkörper, d. h. auf den Markierungsmustern der Kohlenstoffatome (Kapitel 7.3). Bei der massenspektrometrischen Detektion findet eine Verzerrung der Messung infolge von Massenisotopeneffekten der nicht C-Skelett Atome statt. Diese resultieren aus den natürlich vorkommenden stabilen Isotopen von Wasserstoff ( $^1\text{H}$  99.985%,  $^2\text{H}$  0.0155%), Stickstoff ( $^{14}\text{N}$  99.6%,  $^{15}\text{N}$  0.4%), Sauerstoff ( $^{16}\text{O}$  99.76%,  $^{17}\text{O}$  0.04%,  $^{18}\text{O}$  0.2%) sowie Schwefel ( $^{32}\text{S}$  > 95%,  $^{34}\text{S}$  4.2%,  $^{33}\text{S}$  0.75%,  $^{36}\text{S}$  0.02%). Bei GC-MS Analytik entstehen zum einen durch die notwendigen Derivatisierungsreaktionen (Kapitel 4.2.1) relative große Fragmente, zum anderen sind zusätzlich die Massenisotopeneffekte von Silizium ( $^{28}\text{Si}$  92.23%,  $^{29}\text{Si}$  4.67% und  $^{30}\text{Si}$  3.10%) zu berücksichtigen, wodurch insgesamt eine gegenüber der LC-MS Analytik (Kapitel 6) signifikante Verschiebung der Rohdaten zustande kommt. Abbildung 4-2 zeigt exemplarisch die Messwertverzerrung durch Massenisotopeneffekte für die Aminosäure Serin bei GC-MS Analyse sowie zum Vergleich für 2PG+3PG bei LC-MS Analytik (Kapitel 6.3.1) und macht die Notwendigkeit einer Massenisotopenkorrektur deutlich.



**Abbildung 4-2.** Unkorrigierte und um Massenisotopeneffekte korrigierte Massenisotopomerenverteilung bei GC-MS Analytik der Aminosäure Serin (links) und bei LC-MS Analytik des Precursorpools Phosphoglycerat (rechts).

Für die Korrektur der Massenisotopeneffekte bestehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten (Wahl *et al.*, 2004). Zum einen kann eine Korrektur direkt im Isotopomerenmodell erfolgen, das dann um einen Baustein zu erweitern ist, der die simulierten Isotopomere entsprechend ihrer Zusammensetzung aus Nicht-Kohlenstoffisotopen linear verschiebt und die so verschobenen Messwerte für die Berechnung der Zielfunktion verwendet. Zum anderen können die gemessenen Rohdaten a priori um die Massenisotopeneffekte der Nicht C-Skelett Atome korrigiert werden, so dass eine Erweiterung des eigentlichen Isotopomerenmodells nicht erforderlich ist. Für die Korrektur der Massenisotopenverschiebung wurde die zweite Vorgehensweise gewählt, wobei ein MATLAB-Korrekturprogramm von Wahl (Wahl *et al.*, 2004) verwendet werden konnte, das auf dem Korrekturalgorithmus von Lee (Lee *et al.*, 1992) beruht.

## 4.2.7 Probenvorbereitung

### Proteinogene Aminosäuren

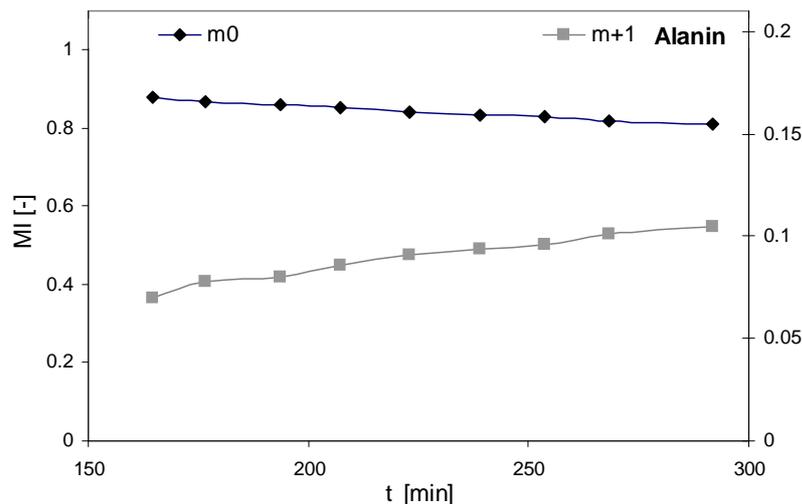
Die Probenvorbereitung für die Analyse proteinogener Aminosäuren erfolgte wie bei Rühl (Rühl, 2004) beschrieben. Hierzu wurde zunächst 1 ml Zellsuspension (Biotrockenmassekonzentration 2.14 g TS/l) in einem Eppendorfreaktionsgefäß bei  $14000 \text{ min}^{-1}$  und einer Temperatur von  $-4^\circ\text{C}$  für 2 min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg, D). Das Zellpellet wurde mit 1.0 ml 6M HCl versetzt, durch Vortexen (5 min) resuspendiert und 18 h bei  $96^\circ\text{C}$  hydrolysiert. Anschließend wurde das Hydrolysat filtriert (Spritzenfilter, Rotilabo 13 mm,  $0.2 \mu\text{m}$  PTFE, Carl Roth, Karlsruhe, D), 900  $\mu\text{l}$  Filtrat in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß transferiert und die Probe in einem Heizblock (Thermomixer compact, Eppendorf AG, Hamburg, D) bei  $80^\circ\text{C}$ ,  $800 \text{ min}^{-1}$  und Druckluftüberlagerung innerhalb von 5 h vollständig eingedampft. Für die Derivatisierung wurde dem entstandenen schwarzen Pellet 100  $\mu\text{l}$  Tetrahydrofuran (87367, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D) sowie 100  $\mu\text{l}$  des Derivatisierungsmittels N-Methyl-N-(tert-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamid (375934, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D) zugegeben und das Pellet durch Vortexen (3 x 3 min) und Ultraschallbad (10 min) resuspendiert. Wegen der Flüchtigkeit von THF sind die Eppendorfreaktionsgefäße geschlossen zu halten. Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit  $14000 \text{ min}^{-1}$  bei  $20^\circ\text{C}$  für 1 min zentrifugiert und zur Derivatisierung 1 h im Heizblock bei  $80^\circ\text{C}$  und  $500 \text{ min}^{-1}$  inkubiert, wobei aus den Aminosäuren die entsprechenden tert-Butyldimethylsilyl-Derivate (TBDMS-Derivate) entstehen. 100  $\mu\text{l}$  der auf diese Weise derivatisierten Proben wurden in versiegelbare Glasprobengefäße mit Einsatz (vial 27330 bzw. insert 24717, Supelco, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D) überführt und entweder sofort analysiert oder wenige Tage bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

## Freie Aminosäuren

Ausgangspunkt für die GC-MS Analyse freier Aminosäuren sind die gemäß Kapitel 3 gezogenen, gequenchten, aufgeschlossenen und konditionierten Proben. Um die Konzentration an Gelöstprotein zu reduzieren, wurden die Proben (500  $\mu\text{l}$  je Eppendorfreaktionsgefäß) in einem ersten Schritt mit einer Ausschlussgrenze von 3 kDa (Vivaspin 0.5 ml Concentrator 3000 MWCO PES, Viva-Science, Hannover, D) bei 4°C und 14000  $\text{min}^{-1}$  für 1 h ultrafiltriert (Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg, D). Zur Vermeidung von Spuren an Glycerin in den Ultrafiltrationsmembranen wurden die Filtereinheiten zuvor mit je 500  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O gewaschen (14000  $\text{min}^{-1}$ , 30 min). Je 500  $\mu\text{l}$  Probenfiltrat wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß transferiert, bei -72°C für 1 h gefroren und anschließend innerhalb von 16 h vollständig lyophilisiert (Alpha I-5, Christ, Osterode, D). Es findet keine saure Hydrolyse statt (Kapitel 4.2.7). Für die Derivatisierung wurde den gefriergetrockneten Proben 100  $\mu\text{l}$  Tetrahydrofuran (87367, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D) sowie 100  $\mu\text{l}$  Derivatisierungsgagens N-Methyl-N-(tert-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamid (375934, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D) zugegeben. Nach Vortexen (1 min), Ultraschallbehandlung (10 min) und erneutem Vortexen (1 min) wurden die Proben mit 14000  $\text{min}^{-1}$  bei 20°C für 1 min zentrifugiert. Zur vollständigen Derivatisierung erfolgte eine Inkubation der Proben im Heizblock für 1 h bei 80°C und 500  $\text{min}^{-1}$ . Aus diesen Reaktionsansätzen wurden je 100  $\mu\text{l}$  der derivatisierten Proben in versiegelbare Glasprobengefäße mit Einsatz (vial 27330 bzw. insert 24717, Supelco, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D) überführt und anschließend analysiert bzw. wenige Tage bei -20°C gelagert. Zur Erhöhung der Intensität des Messsignals wurden die Ausgangsproben in einer zweiten Messreihe zusätzlich durch Lyophilisierung und anschließende Resuspension in ddH<sub>2</sub>O um einen Faktor von 5 aufkonzentriert. Außerdem wurde das Injektionsvolumen in Abweichung der Standardanalysemethode (Kapitel 4.2.4) in 1  $\mu\text{l}$  - Schritten ausgehend von 1  $\mu\text{l}$  sukzessive bis auf 5  $\mu\text{l}$  erhöht.

### 4.2.8 Ermittlung des isotopisch stationären Zustandes

Bei einem typischen <sup>13</sup>C-Markierungsexperiment mit einer Gesamtmarkierungsdauer kleiner der mittleren Verweilzeit  $\Theta$  wird kein isotopisch stationärer Zustand in den Proteinpools erreicht (Wiechert *et al.*, 1996; Dauner *et al.*, 2001a). Abbildung 4-3 zeigt exemplarisch den Verlauf der m0 und m+1 Massenisotopomere von proteinogenem Alanin in *E. coli* bei  $D = 0.1\text{h}^{-1}$  zwischen 2.5 und 5 h nach Mediuumstellung auf markiertes Substrat.



**Abbildung 4-3.** Verlauf der  $m_0$  (linke y-Achse) und  $m_{+1}$  (rechte y-Achse) Massenisotopomerenanteile von proteinogenem Alanin in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  während eines  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimentes. Auch nach 5 h Prozesszeit ist noch kein isotopisch stationärer Zustand erreicht.

Bei der Bestimmung der Markierungsanteile von proteinogenen Aminosäuren ist daher auf den isotopisch stationären Zustand zu extrapolieren. Hierfür wird eine Auswaschkinetik angesetzt (Wiechert *et al.*, 1996; Wiechert *et al.*, 2005). Für den Molenbruch der  $i$ -ten unmarkierten Aminosäure  $x_{i,\text{unmarkiert}}$  gilt bei kontinuierlicher Fermentation in Abhängigkeit der Verdünnungsrate  $D$  und der Dauer des Markierungsexperimentes  $t$  Gleichung 4-1.

$$x_{i,\text{unmarkiert}} = e^{-Dt} \quad (4-1)$$

Der isotopisch stationäre Massenisotopomerenanteil der  $i$ -ten Aminosäure  $m_{i,t \rightarrow \infty}$  lässt sich aus dem zum Zeitpunkt  $t$  gemessenen Anteil  $m_{i,t}$  und dem unmarkierten Zustand  $m_{i,t=0}$  zum Zeitpunkt  $t = 0$  nach Gleichung 4-2 berechnen.

$$x_{i,\text{unmarkiert}} m_{i,t=0} + x_{i,\text{markiert}} m_{i,t \rightarrow \infty} = m_{i,t} \quad (4-2)$$

Dabei gilt

$$x_{i,\text{unmarkiert}} + x_{i,\text{markiert}} = 1 \quad (4-3)$$

Die Molenbrüche  $x_{i,\text{unmarkiert}}$  und  $x_{i,\text{markiert}}$  sind definiert als molares Verhältnis von unmarkierter zu unmarkierter und markierter  $i$ -ter proteinogener Aminosäure bzw. als molares Verhältnis von markierter zu unmarkierter und markierter  $i$ -ter proteinogener Aminosäure.

Bei einer Verdünnungsrate von  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  und einer Gesamtdauer des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimentes von  $t = 4.86 \text{ h}$  wurden  $x_{i,\text{unmarkiert}}$  zu 0.591 und  $x_{i,\text{markiert}}$  zu 0.409 ermittelt. Der

Massenisotopomerenanteil  $m_{i,t=0}$  ergibt sich unmittelbar aus den natürlich vorkommenden Kohlenstoffisotopen. Nach Korrektur des experimentell ermittelten Massenisotopomerenanteils  $m_{i,t}$  um die Massenisotopomerenverschiebung (Kapitel 4.2.6) kann der isotopisch stationäre Massenisotopomerenanteil der  $i$ -ten proteinogenen Aminosäure  $m_{i,t} \rightarrow \infty$  aus Gleichung 4-2 berechnet werden. Die Ergebnisse sind in Kapitel 4.3.1 dargestellt.

## 4.3 Ergebnisse

### 4.3.1 Proteinogene Aminosäuren

Von den 20 proteinogenen Aminosäuren konnten von 15 Aminosäuren die Massenisotopomere quantitativ bestimmt werden. Die um Massenisotopenverschiebungen (Kapitel 4.2.6) bereinigten Massenisotopomerenverteilungen der proteinogenen Aminosäuren sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

**Tabelle 4-1.** Massenisotopomere proteinogener Aminosäuren in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ .

Aminosäure	C-Atome	Fragment	$m_{\text{ges}}$	m0	m+1	m+2	m+3	m+4	m+5
Alanin	Ala	C-3	M-57	1.0002	0.5844	0.2093	0.0604	0.1461	
Aspartat	Asx <sup>a)</sup>	C-4	M-15	1.0000	0.4119	0.3074	0.1860		
			M-57	1.0000	0.3980	0.2961	0.1836	0.0954	0.0269
Glutamat	Glx <sup>a)</sup>	C-5	M-15	1.0002	0.2863	0.3106	0.2537	0.1260	
			M-57	0.9998	0.2824	0.2927	0.2473	0.1265	0.0404
			M-57	1.0002	0.7574	0.0844	0.1584		0.0105
Glycin	Gly	C-2	M-15	1.0000	0.7290	0.0996	0.1714		
			M-57	1.0000	0.7574	0.0844	0.1584		
Histidin	His	C-6	M-15	1.0000	0.4194	0.3211	0.1623		
Isoleucin	Ile	C-6	M-15	0.9998	0.3063				
Leucin	Leu	C-6	M-15	1.0000	0.2574	0.2274	0.2808		
Lysin	Lys	C-6	M-57	1.0000	0.2481	0.3062	0.2282		
Methionin	Met	C-5	M-57	1.0015	0.3083	0.3213	0.2157	0.1182	0.0379
Phenylalanin	Phe	C-9	M-57	0.9998	0.2158	0.2116	0.1606	0.1553	0.1121
Prolin	Pro	C-5	M-57	1.0000	0.3176	0.2829	0.2351	0.1182	0.0362
Serin	Ser	C-3	M-57	0.9998	0.5291	0.2675	0.1109	0.0923	
Threonin	Thr	C-4	M-57	1.0000	0.3821	0.3169	0.1899	0.0972	0.0140
Tyrosin	Tyr	C-9	M-57	0.9998	0.2214	0.2201	0.1780	0.1609	0.1128
Valin	Val	C-5	M-15	0.9998	0.4140	0.2609	0.1582		
			M-57	1.0002	0.3746	0.2496	0.1746	0.1402	0.0365

<sup>a)</sup> Asx und Glx bezeichnen Pools von Asp+Asn bzw. Glu+Gln

Dass eine Bestimmung nicht aller Aminosäuren möglich war, lag in der Probenaufarbeitung begründet. So wird unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse Asparagin zu Aspartat sowie Glutamin zu Glutamat desamidiert (Lottspeich, 1998), so dass diese Aminosäuren nur als Pools gemessen werden können. Cystein und Tryptophan werden unter diesen Bedingungen sogar zerstört (Lottspeich, 1998). Arginin konnte mit der verwendeten GC-MS Analysemethode nicht detektiert werden (Rühl, 2004). Da die Intensitäten der Messsignale bei den M-15 und M-57 Fragmenten am stärksten sind und bei diesen Fragmenten zudem der Kohlenstoffgrundkörper der Aminosäuren vollständig erhalten ist (Kapitel 4.2.1), sind nur diese Massenisotopomere in Tabelle 4-1 dargestellt. Wegen der höheren Intensität der

Messsignale für die M-57 Fragmente wurden diese, soweit keine Überlagerungen zu Fragmenten anderer Substanzen vorlagen (Rühl, 2004), als Messdatensatz ausgewählt. Bei Isoleucin und Leucin war nur die Auswertung der M-15 Fragmente möglich. Bei den Aminosäuren Aspartat, Glutamat und Valin konnten aufgrund der stärkeren Messsignale im Falle der M-57 Fragmente mehr Massenisotopomere ermittelt werden als bei den M-15 Fragmenten. Sind in Tabelle 4-1 für Aminosäuren mit  $n$  C-Atomen weniger als  $n+1$  Massenisotopomere angegeben, so entstanden diese Massenisotopomere in zu geringem Umfang, als dass eine quantitative Bestimmung möglich war.

Über die Ermittlung des Markierungsmusters von Histidin war die isotopisch stationäre Massenisotopomerenverteilung des P5P-Pools zugänglich. Die zur Aromaten-Familie gehörenden Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin liefern redundante Messinformationen hinsichtlich der Metabolite E4P und PEP. Dies zeigte auch die gute Übereinstimmung der gemessenen Massenisotopomerenverteilungen dieser beiden Aminosäuren, deren Anteile aufgrund der gleichen C-Atomzahl unmittelbar verglichen werden können (Tabelle 4-1). Die Fehler, angegeben als relative, auf den Mittelwert bezogene Standardabweichungen (Variationskoeffizienten), dieser Aminosäuren auf Basis der M-57 Fragmente betrugen 1.3% (m0), 2.0% (m+1), 5.1% (m+2), 1.8% (m+3) und 0.3% (m+4) und waren damit sehr niedrig. Wegen des um Faktor 1.7 stärkeren Messsignals wurden im weiteren die Messungen von Phenylalanin verwendet. Vollständige Messinformationen über die Massenisotopomerenverteilung von 3PG liefert in der Serin-Familie die Analyse von Serin. Glycin sollte hierfür nicht verwendet werden (Kapitel 4.1.1). In der Pyruvatfamilie entsteht Alanin durch eine einzige Transaminierungsreaktion direkt aus PYR. Da das Messsignal von Alanin bei der verwendeten GC-MS Analyseverfahren gegenüber Valin 4.5fach und gegenüber Leucin 71fach stärker war, war bei Alanin im Gegensatz zu Valin und Leucin eine quantitative Auswertung aller Massenisotopomere möglich. Da bei diesen beiden Aminosäuren zudem jeweils eine Addition von Acetylgruppen mit unbekanntem Markierungsmuster stattfindet, wurde ausschließlich Alanin für die Ermittlung der Massenisotopomerenverteilung von PYR herangezogen. In der Aspartat-Familie erlaubten die vollständig ermittelten Massenisotopomere von Aspartat einfachen Rückschluss auf die Massenisotopomerenverteilung von OAA. Die Massenisotopomerenverteilung von Threonin, das redundante Messinformationen zu Aspartat aufweist, war hierbei in guter Übereinstimmung. Die Variationskoeffizienten dieser Aminosäuren betrugen auf Basis der M-15 und M-57 Fragmente 3.1% (m0), 2.8% (m+1), 1.4% (m+2), 0.9% (m+3) und 31.7% (m+4) und waren damit mit Ausnahme des m+4 Massenisotopomers sehr niedrig. Der große Fehler des m+4 Massenisotopomers war darin begründet, dass nur die M-57 Fragmente berücksichtigt werden konnten und insbesondere das Messsignal für dieses Massenisotopomer sehr schwach war. Wegen Reaktionspartner mit unbekanntem Markierungsmuster, schwächerer Messsignale und/oder redundanter Messinformationen wurden die

Messergebnisse für Isoleucin, Methionin sowie Lysin nicht weiter verwendet. Die Aminosäuren Glutamat und Prolin der Glutamat-Familie spiegeln den Markierungszustand von AKG wider. Die unabhängige Bestimmung der Massenisotopomerenverteilungen dieser beiden Aminosäuren zeigte konsistente Messergebnisse mit Variationskoeffizienten dieser Aminosäuren auf Basis der M-15 und M-57 Fragmente von 5.3% (m0), 3.9% (m+1), 3.1% (m+2), 3.1% (m+3) und 5.4% (m+4).

## 4.3.2 Freie Aminosäuren

### 4.3.2.1 Metabolisch stationär, isotopisch stationär

Von den 5 detektierbaren freien Aminosäuren Alanin, Glutamat, Glycin, Prolin und Serin konnten nur die Massenisotopomere von Alanin und Glutamat quantifiziert werden (Tabelle 4-2).

**Tabelle 4-2.** Massenisotopomere freier Aminosäuren in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ .

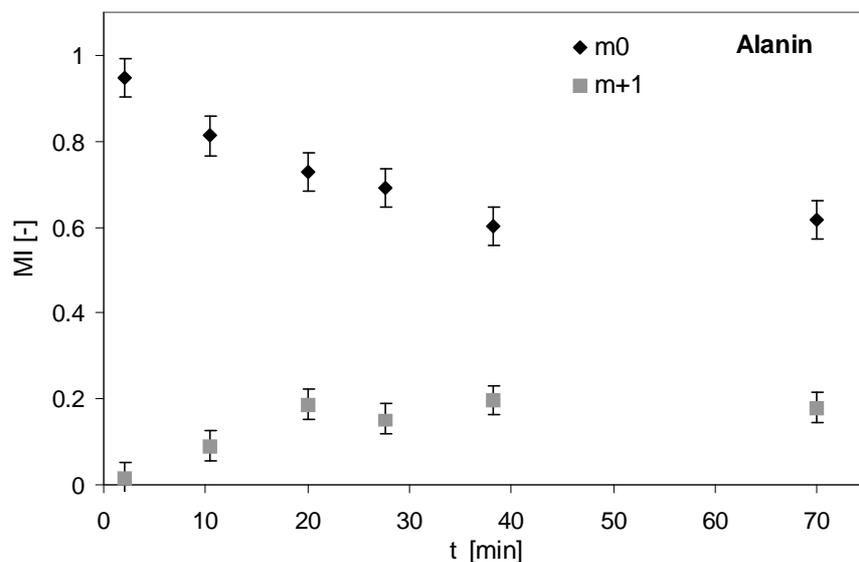
	m0	m+1	m+2
Alanin	$0.618 \pm 0.045$	$0.179 \pm 0.041$	-
Glutamat	$0.340 \pm 0.035$	$0.298 \pm 0.039$	$0.220 \pm 0.030$

Die relativen Standardabweichungen betragen bei Alanin 7.3% (m0) und 23.1% (m+1) bzw. bei Glutamat 10.4% (m0), 12.9% (m+1) und 13.7% (m+2). Diese resultierten aus der geringen, von m0 bis m+2 abnehmenden Intensität der Messsignale sowie aus der geringen Anzahl an Einzelbestimmungen (Alanin 3, Glutamat 5). Die isotopisch stationären Werte von freiem Alanin und Glutamat befanden sich, mit Ausnahme des m0 Massenisotopomers von Glutamat, in guter Übereinstimmung mit den aus dem Proteinhydrolysat ermittelten Massenisotopomeren (Tabelle 4-1). Eine Aufkonzentrierung der Proben durch Lyophilisierung sowie eine Erhöhung des Injektionsvolumens führte nicht dazu, dass Massenisotopomere weiterer freier Aminosäuren quantitativ bestimmt werden konnten. Zu einem hinsichtlich der quantifizierbaren freien Aminosäuren vergleichbaren Ergebnis kam Rühl (Rühl, 2004) bei Untersuchungen mit der Hefe *S. cerevisiae*.

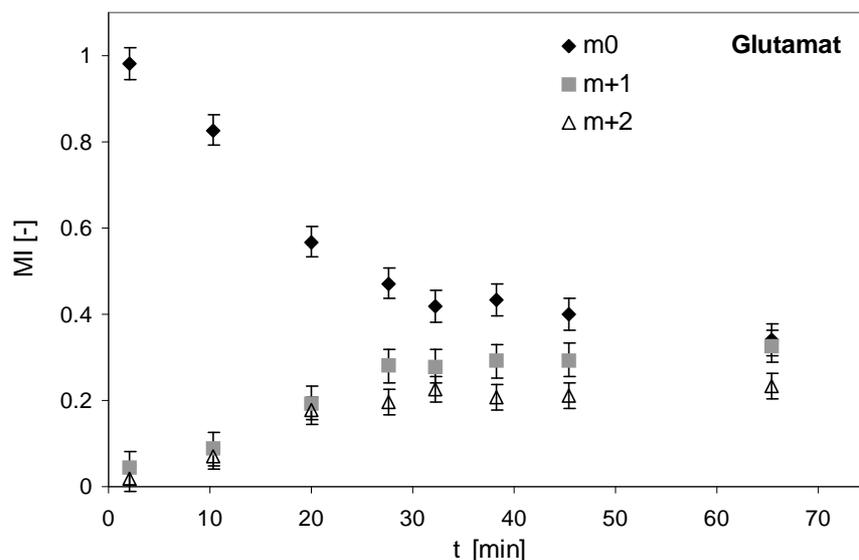
### 4.3.2.2 Metabolisch stationär, isotopisch instationär

Wie im isotopisch stationären Fall waren von den 5 detektierbaren freien Aminosäuren Alanin, Glutamat, Glycin, Prolin und Serin auch unter isotopisch instationären Bedingungen

erwartungsgemäß nur die Intensitäten der Messsignale von Alanin (Abbildung 4-4) und Glutamat (Abbildung 4-5) für eine quantitative Auswertung ausreichend.



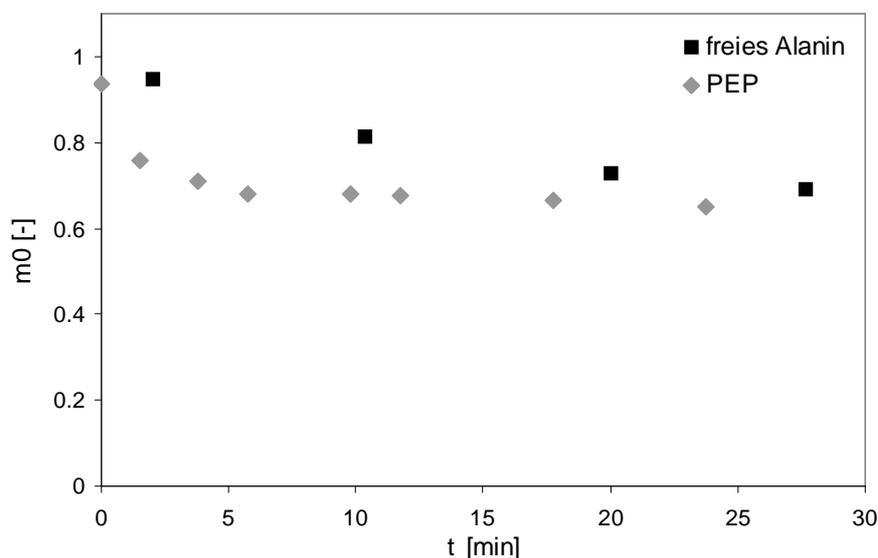
**Abbildung 4-4.** Isotopisch instationäre Markierungsdynamik der  $m_0$  und  $m_{+1}$  Massenisotopomere bei der freien Aminosäure Alanin in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ .



**Abbildung 4-5.** Isotopisch instationäre Markierungsdynamik der  $m_0$ ,  $m_{+1}$  und  $m_{+2}$  Massenisotopomere bei der freien Aminosäure Glutamat in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ .

Die Zeitkonstanten zur Erreichung eines isotopisch stationären Zustandes bei den freien Aminosäuren Alanin und Glutamat in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  lagen mit ca. 35-45 min für Alanin und ca. 55-65 min für Glutamat bei beiden Aminosäuren deutlich oberhalb der für die glykolytischen Metabolite ermittelten Werte (Kapitel 6.3.2). Dies wird deutlich, wenn man die

Markierungsdynamik der  $m_0$  Massenisotopomere von PEP, das mit LC-MS quantifiziert wurde (Kapitel 6.3.2), und der freien Aminosäure Alanin vergleicht (Abbildung 4-6). Dieses grundsätzliche Ergebnis stimmte mit früheren experimentellen Untersuchungen in *S. cerevisiae* (Rühl, 2004) und theoretischen Betrachtungen überein (Wiechert *et al.*, 2005).



**Abbildung 4-6.** Vergleich der isotopisch instationären Markierungsdynamik des  $m_0$  Massenisotopomers bei der freien Aminosäure Alanin und bei PEP in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ .

#### 4.4 Zusammenfassung

Kapitel 4 hatte die GC-MS basierte quantitative Bestimmung von Massenisotopomeren in proteinogenen und freien Aminosäuren zum Gegenstand. Je nachdem, ob proteinogene oder freie Aminosäuren analysiert werden sollen, sind unterschiedliche Protokolle zur Probenaufarbeitung durchzuführen. Die Analyse der proteinogenen Aminosäuren kann dadurch gekennzeichnet werden, dass die isotopisch stationären Massenisotopomere von 15 der 20 Aminosäuren mit hoher Genauigkeit quantifiziert werden konnten. Diese Analysen sind allerdings auf den isotopisch stationären Zustand beschränkt. Der Robustheit und Genauigkeit der Methode stehen der hohe experimentelle Aufwand, die lange Markierungsdauer, die Extrapolation auf einen isotopisch stationären Zustand sowie Limitierungen bei der Anwendung infolge großer Zeitkonstanten bis zum Erreichen eines isotopisch stationären Zustandes gegenüber. Die Analyse der freien Aminosäuren ermöglicht die Bestimmung von Massenisotopomerenverteilungen im isotopisch stationären und instationären Zustand. Aufgrund der niedrigen Konzentrationen war jedoch eine quantitative Auswertung nur bei den Aminosäuren Glutamat und Alanin möglich. Die Messfehler waren dementsprechend größer

als bei der Analyse der proteinogenen Aminosäuren. Der isotopisch instationäre Markierungsaufbau bei diesen beiden freien Aminosäuren wurde für die isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse (Kapitel 9) wegen der mangelnden Interpretierbarkeit der Zeitkonstanten (Wiechert *et al.*, 2005) nicht verwendet.

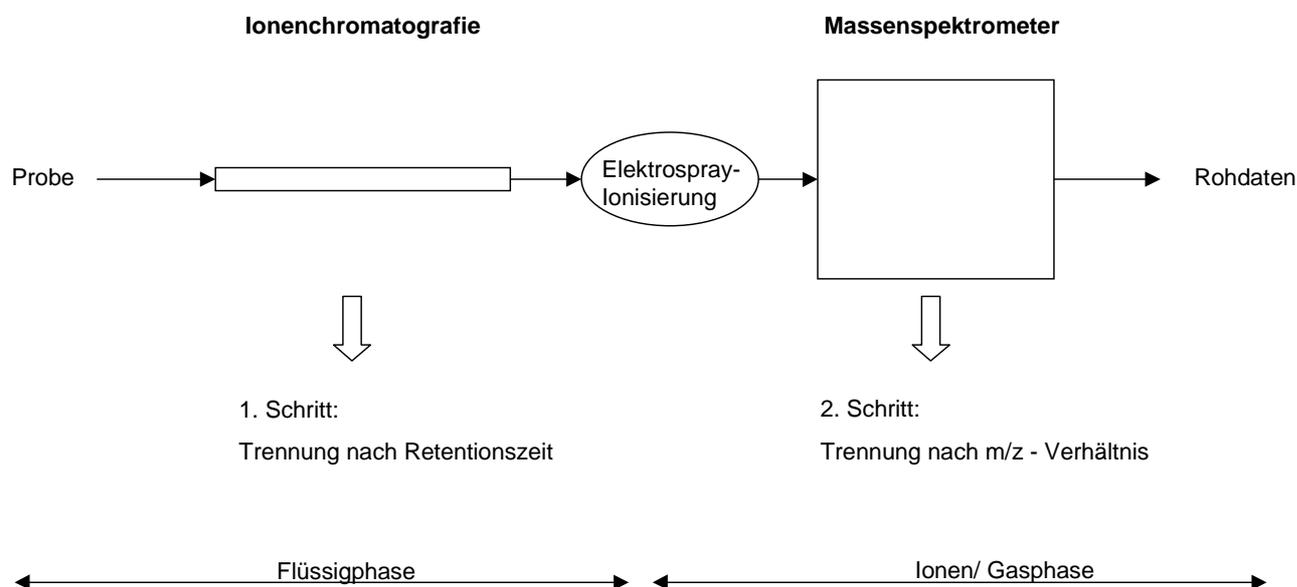
## 5 LC-MS basierte Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen in *E. coli* im steady state und nach stimulus-response Experimenten

### 5.1 Einleitung

Die quantitative Bestimmung intrazellulärer Metabolit-, Nukleotid- und Kofaktorkonzentrationen erfolgt enzymatisch (Theobald *et al.*, 1997; Bergmeyer *et al.*, 1998a; Bergmeyer *et al.*, 1998b; Bergmeyer *et al.*, 1998c; Schaefer *et al.*, 1999; Chassagnole *et al.*, 2002), mit HPLC/HPIC (Theobald *et al.*, 1993; Bhattacharya *et al.*, 1995; Hans *et al.*, 2001; Chassagnole *et al.*, 2002; Kromer *et al.*, 2005), NMR (Grivet *et al.*, 2003; Krishnan *et al.*, 2005; Ratcliffe *et al.*, 2005), GC-MS (Fiehn *et al.*, 2000; Wittmann *et al.*, 2004b), MALDI-TOF Massenspektrometrie (Wittmann *et al.*, 2001b), direct infusion Massenspektrometrie (Smedsgaard *et al.*, 2005), CE-MS (Sato *et al.*, 2004; Soo *et al.*, 2004) und LC-MS<sup>n</sup> (Buchholz *et al.*, 2001; Lange *et al.*, 2001; Visser *et al.*, 2002; Mashego *et al.*, 2004).

Zur Bestimmung intrazellulärer Konzentrationen von Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels, insbesondere von phosphorylierten Molekülen, die wegen ihrer Polarität, strukturellen Ähnlichkeit sowie nicht charakteristischer UV-Absorption nur schwer zu analysieren sind, wurde die Detektion mit LC-MS vorgeschlagen (Buchholz *et al.*, 2001; Lange *et al.*, 2001; Mashego *et al.*, 2004). Von Buchholz (Buchholz *et al.*, 2001) wurde eine HPLC-MS-MS (ESI, Ion Trap) verwendet, Lange (Lange *et al.*, 2001) und Mashego (Mashego *et al.*, 2004) benutzten eine HPIC-MS-MS (ESI). Gegenüber enzymatischen Assays haben LC-MS Methoden den Vorteil, dass die einzusetzenden Probenmengen sehr gering und parallele Metabolitanalysen möglich sind. Gegenüber der Analyse mit HPLC/HPIC wird durch Kopplung mit einem Massenspektrometer neben der Retentionszeit ein zusätzlicher m/z-spezifischer Trennschritt eingeführt, so dass eine zweidimensionale Auftrennung erfolgt. Als Vorteile der LC-MS Analytik sind die hohe Sensitivität anzuführen und insbesondere das Potential zur Quantifizierung von Absolutkonzentrationen und Massenisotopomerenverteilungen. Nachteilig ist die (gerätespezifisch) abnehmende Messpräzision bei hoher Probenanzahl, die zu schlecht reproduzierbaren Einzelmessungen führen kann.

Zielsetzung war die Etablierung einer LC-MS Analyseverfahren zur Quantifizierung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen im zentralen Kohlenstoffwechsel bestehend aus Ionenchromatografie und gekoppeltem MS-Detektor. Das Grundprinzip ist in Abbildung 5-1 dargestellt. Diese Analyseverfahren sollte auch für die quantitative Bestimmung von Massenisotopomeren eingesetzt werden (Kapitel 6).



**Abbildung 5-1.** Zweidimensionale Auftrennung der Analyte nach Retentionszeit bei der Ionenchromatografie und nach Massen-/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) im Massenspektrometer. Durch Elektrospray-Ionisierung (ESI) findet der Übergang von der Flüssig- in die Gasphase statt.

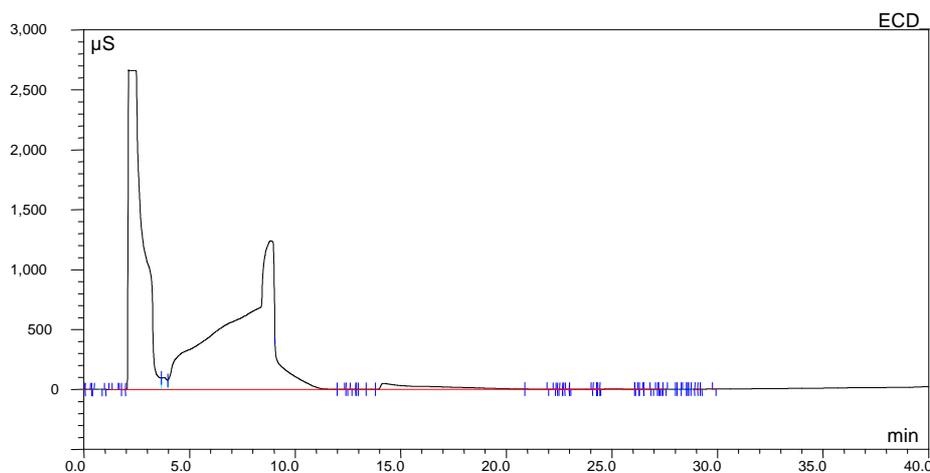
LC-MS Analyseverfahren und die vorhergehenden Grundoperationen Probenahme, Quenching, Extraktion und Probenaufarbeitung (Kapitel 3) sind aufeinander abzustimmen. Ein Beispiel aus dieser Arbeit ist die Abhängigkeit der LC-MS Analyseverfahren von den Konzentrierungsschritten Lyophilisierung und Vakuumkonzentrierung bei der Probenaufarbeitung. So haben sich wegen der schlechten Wiederfindung infolge metabolitspezifischer Konzentrierungsfaktoren diese beiden Konzentrierungsschritte als kritisch für die LC-MS basierte quantitative Metabolitbestimmung erwiesen (Kapitel 3.3.6). Zur Durchführung der Grundoperationen Quenching und Extraktion wurden in dieser Arbeit keinerlei chemische Reagenzien (z. B. Säuren, organische Lösungsmittel) benötigt, so dass dadurch bedingte Wechselwirkungen mit der Analytik ausgeschlossen werden konnten. Da diese Grundoperationen indirekt durch Wärmeübertragung realisiert wurden, traten außerdem keine Verdünnungsschritte auf. Die im Folgenden beschriebene LC-MS Analyseverfahren verwendete unverdünnte, nicht aufkonzentrierte Proben und das in Kapitel 3 beschriebene integrierte Probenahmeverfahren.

In der ersten Trennstufe erfolgte die Auftrennung der Metabolite mittels High Performance Ion Chromatography (HPIC) nach der Retentionszeit und Detektion mittels Leitfähigkeitsmessung (Kapitel 5.1.1). Wegen hoher Begleitsalzkonzentrationen durch das Nährmedium war die quantitative Auswertung allein auf Basis der Leitfähigkeitsmessung nicht möglich. Durch die Kopplung des Ionenchromatografie-Systems mit einem Massenspektrometer (Kapitel 5.1.2) erfolgte jedoch eine zweite, m/z-spezifische Trennung, die die quantitative Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen ermöglichte (Kapitel 5.1.3). Hierfür waren zunächst die Grundeinstellungen des Massenspektrometers auf die Fragestellung der Metabolitanalyse zu optimieren (Kapitel 5.2.1). In einem nächsten Schritt wurde untersucht, welche Metabolite mit dieser LC-MS Konfiguration detektiert und quantifiziert werden konnten (Kapitel 5.2.2). Neben von der Analyseverfahren unabhängigen Einflussfaktoren wie untersuchtes biologisches System, Kultivierungsbedingungen (Zelldichte, Medium) und Probenkonditionierung sind hierfür die vorgeschaltete ionenchromatografische Trennmethode (z. B. Eluent und Fließrate) und insbesondere MS-Gerätespezifika von Bedeutung. Dazu zählen MS-Ionisierungsmechanismus (z. B. Electron Impact EI, Electrospray Ionization ESI, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization MALDI, Atmospheric Pressure Chemical Ionization APCI), Art des Massenanalysators (z. B. Quadrupol-, Ion Trap-, Time-of-Flight-Analysatoren) sowie Anzahl n der Massenanalysatoren (z. B. Tandem-MS, allgemein (MS)<sup>n</sup> Technologien) (Niessen, 1999). In diesem Zusammenhang wurden auch die Bestimmungsgrenzen für die quantitative Metabolitanalyse ermittelt (Kapitel 5.2.2). Der Einfluss der Salzkonzentration auf die LC-MS Analyse wurde dabei gesondert untersucht (Kapitel 5.2.3). Für die Metabolitidentifikation (Kapitel 5.2.4) wurden Retentionszeiten und m/z-spezifische Massenspektren herangezogen. Substanzabhängige Ionisierungseffizienzen und mit zunehmender Probenanzahl abnehmende Messpräzision machen bei LC-MS die Verwendung interner Standards (Kapitel 5.2.5) bei der Metabolitquantifizierung (Kapitel 5.2.6) erforderlich. Angewendet wurde die etablierte Methode zur Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen in *E. coli* bei unterschiedlichen Verdünnungsraten  $D = 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 \text{ h}^{-1}$  im steady state (Kapitel 5.3.1) sowie zur Ermittlung von Konzentrations-Zeitverläufen nach einem stimulus-response Experiment bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  (Kapitel 5.3.2). Die Kenntnis von steady state Konzentrationen wird neben Informationen über die relativen Massenisotopomerenverteilungen (Kapitel 6) bei der isotopisch instationären <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse (Kapitel 9) benötigt. Eine Zusammenfassung findet sich in Kapitel 5.4.

### 5.1.1 Ionenchromatografie

Verwendet wurde das HPIC Ionenchromatografie-System DX500 (Dionex, Sunnyvale, USA) bestehend aus Autosampler AS50, Gradientenpumpe GP50, Leitfähigkeitsdetektor ED40

und dem Suppressor SRS-ULTRA (2 mm). Der analytischen Trennsäule IonPac AS11 (2 mm), temperiert bei 30°C, sind die Vorsäulen IonPac ATC (2 mm) und IonPac AG11 (2 mm) vorgeschaltet. Die Flussrate war 0.23 ml/min. Es wurde folgender auf die vorliegende analytische Fragestellung optimierter NaOH-Gradient verwendet (Ederle, 2000): Lineare Zunahme der NaOH-Konzentration von 2 mM auf 8 mM bei  $t = 0$  bis 9 min, von 8 mM auf 12 mM bei  $t = 9$  bis 15 min, von 12 mM auf 20 mM bei  $t = 15$  bis 25 min und von 20 mM auf 70 mM bei  $t = 25$  bis 35 min. Bei  $t = 35$  bis 40 min wurde ein Waschschrift bei 100 mM NaOH durchgeführt und die Säulen von  $t = 40$  bis 50 min bei 2 mM wieder equilibriert. Dadurch konnte zwar eine Auftrennung nach der Retentionszeit erreicht werden, jedoch war eine quantitative Auswertung wegen ausgeprägter Peaküberlagerungen infolge hoher Begleitsalzkonzentrationen des Mediums nicht möglich. Abbildung 5-2 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Leitfähigkeitsmessung einer *E. coli* Probe bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  und Kultivierung, Probenahme, Quenching, Extraktion und Probenaufarbeitung wie in Kapitel 2 und 3 beschrieben. Da bei dem verwendeten integrierten Probenahmeverfahren keine Trennung von Medium und Probenmatrix stattfindet, war die resultierende Ionenkonzentration der Probe für eine allein auf Leitfähigkeitsmessung basierende quantitative Analyse zu hoch.



**Abbildung 5-2.** Hohe Salzkonzentrationen des Nährmediums führten zu einer starken Überlagerung von Metabolitpeaks in *E. coli* ( $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ ) bei Leitfähigkeitsmessung. Eine quantitative Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen war nicht möglich.

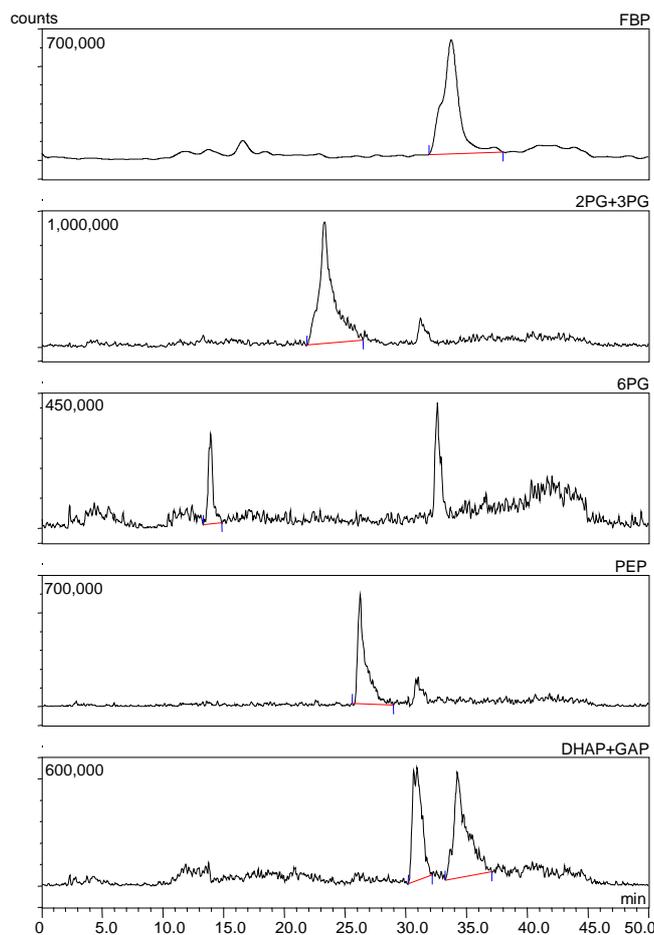
### 5.1.2 LC-MS Kopplung

Ionisierung und Überführung der Analyte von der Flüssig- in die Gasphase erfolgten durch Elektrospray-Ionisierung (ESI) am LC-MS Interface. ESI ist eine "soft ionization"-Technik (Niessen, 1999) und ermöglicht die sensitive Analyse polarer Substanzen nach  $m/z$ -Verhältnis. Da bei den zu analysierenden Metaboliten von einer Deprotonierung auszugehen

ist (Buchholz *et al.*, 2001), wurde ESI mit negativer Spannung gewählt. Typischerweise entstehen dabei einfach negative geladene Metabolitionen. Dabei wird die Probe durch eine Kapillare gepumpt, an der eine hohe Spannung (3-5 kV) angelegt ist. In diesem starken elektrischen Feld werden die Flüssigkeitstropfen, die durch Vernebelung mittels eines überlagerten Stickstoffstroms hoher Temperatur (ca. 200 – 350°C) entstehen, geladen. Durch Verdampfen der Trägerflüssigkeit nimmt die Oberflächenladungsdichte stetig zu, bis es bei Erreichung des Rayleigh-Limits zu einer Coulomb-Explosion kommt. Im weiteren Verlauf entstehen immer feinere Tröpfchen und die Ionen gelangen schließlich gasförmig durch einen Eintrittskonus in das Massenspektrometer. HPIC und Massenspektrometer wurden mit einer PEEK Kapillare (0.9 m Länge, 0.25 mm Innendurchmesser) verbunden. Die Flussrate betrug 0.23 ml/min.

### 5.1.3 Massenspektrometrie

Im LC-MS Detektor (Finnigan AQA, ThermoQuest, Manchester, UK) werden die Ionen im Hexapol fokussiert, bevor eine vom Massen-/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) des Analyten abhängige Auftrennung im Quadrupol erfolgt. Durch diesen zweiten Trennschritt kann zu jedem detektierbaren Metabolit die zugehörige Massenspur, d. h. ein Massenchromatogramm, erzeugt werden. Abbildung 5-3 zeigt exemplarisch die extrahierten Massenspuren von FBP, 2PG+3PG, 6PG, PEP, DHAP+GAP der gleichen Probe wie in Abbildung 5-2. Im Gegensatz zur Leitfähigkeitsmessung mittels Ionenchromatografie konnten die Metabolitpeaks nach der MS-Auftrennung quantitativ ausgewertet werden.



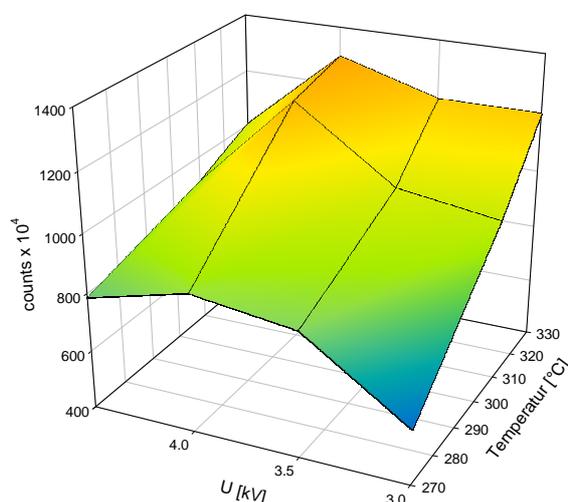
**Abbildung 5-3.** M/z-spezifische Separation von Metabolitpeaks in *E. coli* ( $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ ) bei LC-MS Analyse. Dieser zweite Trennschritt ermöglichte die quantitative Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen.

## 5.2 Material und Methoden

### 5.2.1 MS-Einstellungen

Das LC-MS Analyseergebnis hängt zum einen von den Einstellungen des Quadrupol-Massenfilters, zum anderen von der Konfiguration des LC-MS Interfaces ab. Die werksseitig voroptimierten Grundeinstellungen des Quadrupol (Linsenspannung RF lens = 0.3 V, Massenresolution high HM = 12.5, low LM = 12.5, Detektorspannung = 650 V, Rampenspannung IE ramp = 0V, Ionenenergie = 1.0 V) wurden nicht verändert. Kapillarspannung, Temperatur /Volumenstrom der Stickstoffvernebelung sowie analytabhängige Spannung zwischen Eintrittskonus und Hexapol ( $AQA_{\max}$ ) wurden auf die Erfordernisse der Metabolitanalyse und der ionenchromatografischen Auftrennung (Kapitel 5.1.1) abgestimmt. Die analytabhängige  $AQA_{\max}$ -Spannung ist für die Fragmentierung von Metaboliten verantwortlich. Bei den Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels handelt es sich um niedermolekulare

Moleküle, die sehr kleine und schwer zu analysierende Fragmente bilden, wobei hauptsächlich Phosphatgruppen (Buchholz *et al.*, 2001) abgespalten werden. Da der verwendete Detektor keine (LC-MS)<sup>n</sup>-Detektion ( $n = 1$ ) ermöglichte, wurde die AQA<sub>max</sub>-Spannung so eingestellt, dass die Fragmentierung minimal war. Maximale Sensitivität bei dem untersuchten Metabolitspektrum konnte bei einer Spannung von AQA<sub>max</sub> = 20 V erzielt werden. Aus der unabhängigen Variation von Temperatur (270, 290, 310, 330°C) und Kapillarspannung (3.0, 3.5, 4.0, 4.5 kV) wurde als optimale Temperatur-/Kapillarspannungskombination 330°C/4.0 kV identifiziert. Dies zeigt Abbildung 5-4 exemplarisch für eine G6P-Standardlösung (30 µM, Minimalmedium). Eine Temperaturerhöhung über 330°C hinaus führte zu keiner weiteren Erhöhung der gemessenen counts. Der Volumenstrom des Stickstoffgenerators ist geregelt.



**Abbildung 5-4.** Bei optimierten MS-Einstellungen (Kapillarspannung 4.0 kV, Interface-Temperatur 330°C) entspricht eine G6P-Konzentration von 30 µM = 13 x 10<sup>6</sup> counts.

## 5.2.2 Detektierbare Metabolite und Bestimmungsgrenzen

Untersucht wurden Metabolite der zentralen Kohlenstoffwechselwege Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus. Zusätzlich betrachtet wurden die Adenosinphosphate aus dem Energiestoffwechsel der Zelle. Hierfür wurde eine Metabolit-Stamm-lösung (10 mM), enthaltend G6P, F6P, FBP, DHAP, GAP, 2PG, 3PG, PEP, PYR, R5P, 6PG, Citrat, Succinat, Fumarat, Malat, AMP, ADP und ATP (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D), in Minimalmedium (Kapitel 2.1.2) angesetzt und bei -72°C gelagert. Die Ermittlung der detektierbaren Metabolite und ihrer Bestimmungsgrenzen erfolgte mit den optimierten LC-MS Einstellungen (Kapitel 5.2.1).

## Detektierbare Metabolite

Qualitativ konnten bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  (Minimalmedium) sämtliche Metabolite der Stammlösung (G6P, F6P, FBP, DHAP, GAP, 2PG, 3PG, PEP, PYR, R5P, 6PG, Citrat, Succinat, Malat, AMP, ADP und ATP) bis auf Fumarat, außerdem die Guanin-Nukleotide GDP, GTP sowie der Kofaktor NADP nachgewiesen werden.

## Bestimmungsgrenzen

Für die Metabolite G6P, F6P, FBP, DHAP, GAP, 2PG, 3PG, PEP, PYR, R5P, 6PG, Citrat, Succinat, AMP, ADP und ATP wurden die Bestimmungsgrenzen in Minimalmedium ermittelt (Tabelle 5-1), deren Kenntnis für die quantitative Metabolitbestimmung (Kapitel 5.2.6) erforderlich ist.

**Tabelle 5-1.** Bestimmungsgrenzen quantifizierbarer Metabolite bei LC-MS Analyse. Diese sind unter den Bedingungen eines Markierungsexperimentes ( $c_{\text{Glucose}} = 5.0 \text{ g/l}$ ,  $c_x = 2.3 \text{ g TS/l}$ ) entweder bezogen auf die Biomasse [ $\mu\text{mol/g TS}$ ] oder als intrazelluläre Konzentration [ $\text{mM}_{\text{cyto}}$ ] angegeben. G6P und F6P, DHAP und GAP sowie 2PG und 3PG konnten nur als Poolkonzentrationen bestimmt werden.

Metabolit	Bestimmungsgrenze		
	[ $\mu\text{M}$ ]	[ $\mu\text{mol/g TS}$ ] bei 2.3 g TS/l	[ $\text{mM}_{\text{cyto}}$ ] <sup>a)</sup> bei 2.3 g TS/l
G6P+F6P	1.8	0.8	0.45
FBP	2.1	0.9	0.52
DHAP+GAP	1.9	0.8	0.47
2PG+3PG	2.5	1.1	0.60
PEP	1.1	0.5	0.27
PYR	11.1	4.8	2.72
R5P	0.9	0.4	0.21
6PG	3.2	1.4	0.77
Citrat	2.3	1.0	0.56
Succinat	10.0	4.3	2.45
AMP	2.1	0.9	0.52
ADP	1.9	0.8	0.47
ATP	2.1	0.9	0.51

<sup>a)</sup> spezifisches Gewicht der Biomasse  $\rho_x = 564 \text{ g TS/l}_{\text{cyto}}$  (Chassagnole *et al.*, 2002)

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenzen wurde eine Verdünnungsreihe (2.5, 5, 10, 12.5, 20, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) der Metabolit-Stammlösung verwendet und die Metabolite mit LC-MS unter Verwendung der in Kapitel 5.2.5 beschriebenen internen Standards quantifiziert. Da bei G6P und F6P, DHAP und GAP sowie 2PG und 3PG eine ionenchromatografische Auftrennung in Minimalmedium nach der Retentionszeit nicht möglich war und diese Substanzen jeweils das gleiche Molekulargewicht besitzen (Kapitel 5.2.4), konnten für diese Metabolite nur die Bestimmungsgrenzen der Poolkonzentrationen (G6P+F6P, DHAP+GAP und 2PG+3PG) angegeben werden. Diese wurden aus linearer Regression nach der Standard-Additionsmethode unter Berücksichtigung der Standardabweichungen ermittelt (Buchholz *et al.*,

2001). Es wurden zwei unterschiedliche Trennläufe zur Bestimmung der Standardabweichungen durchgeführt. Jede Probe wurde dreifach bestimmt. Aus dem Vergleich mit Literaturdaten von *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  (Schaefer *et al.*, 1999; Buchholz *et al.*, 2001; Chassagnole *et al.*, 2002) folgt, dass auf Basis der ermittelten Bestimmungsgrenzen mit der entwickelten LC-MS Analysemethode und unter den experimentellen Bedingungen eines Markierungsexperimentes (Kapitel 2.1.2) eine quantitative Metabolitbestimmung von FBP, DHAP+GAP, 2PG+3PG, PEP und 6PG möglich sein sollte, wobei die für G6P+F6P, PYR, R5P, AMP, ADP und ATP veröffentlichten intrazellulären Konzentrationen teilweise nahe an den ermittelten Bestimmungsgrenzen liegen. Zu Citrat und Succinat liegen keine vergleichbaren Literaturdaten vor, für Succinat war die Bestimmungsgrenze mit  $4.3 \mu\text{mol/g TS}$  jedoch relativ hoch.

### 5.2.3 Einfluss der Salzkonzentration

Hohe Begleitsalzkonzentrationen sind kritisch für die quantitative Metabolitanalyse bei Ionenchromatografie und Leitfähigkeitsmessung (Bhattacharya *et al.*, 1995). Dies wurde für die hier vorliegenden Verhältnisse bereits einleitend gezeigt (Kapitel 5.1.1). An dieser Stelle wurde der Einfluss unterschiedlicher Salzkonzentrationen auf die MS-Analyse untersucht. Dazu wurden Metabolit-Stammlösungen (30, 50, 100  $\mu\text{M}$ ), enthaltend G6P, F6P, FBP, DHAP, GAP, 2PG, 3PG, PEP, R5P, 6PG und Citrat, einmal in einer 1 : 1 - Mischung aus Minimalmedium (Kapitel 2.1.2) und  $\text{ddH}_2\text{O}$  und einmal in unverdünntem Minimalmedium angesetzt und mit LC-MS analysiert. Das Verhältnis der Steigungen aus linearer Regression ist ein Maß dafür, um welchen Faktor  $\pi$  das Messsignal im Falle unverdünnten Mediums gegenüber dem 1 : 1 - Ansatz aus Medium und  $\text{ddH}_2\text{O}$  schwächer ist. Das Ergebnis ist in Tabelle 5-2 dargestellt.

**Tabelle 5-2.** LC-MS Analyse führte bei in unverdünntem Medium angesetzten Metabolitstandards zu einem um Faktor  $\pi$  schwächeren Messsignal gegenüber in einer 1 : 1 - Mischung aus Medium und  $\text{ddH}_2\text{O}$  angesetzten Metabolitstandards.

Metabolit	Faktor $\pi$
G6P+F6P	1.6
FBP	1.1
DHAP+GAP	1.4
2PG+3PG	2.2
PEP	1.1
R5P	1.3
6PG	1.1
Citrat	1.1

Im Gegensatz zur Ionenchromatografie mit Leitfähigkeitsmessung war der Einfluss hoher Begleitsalzkonzentrationen bei LC-MS Analyse weit weniger signifikant. Bei einer Halbierung der Konzentration aller Mediumbestandteile nahm die Stärke des Messsignals metabolit-spezifisch um Faktoren zwischen 1.1 und 2.2 ab. Zwischen einem Ansatz in ddH<sub>2</sub>O und dem 1 : 1 Ansatz aus Medium und ddH<sub>2</sub>O lag ein weiterer Sensitivitätsverlust von ungefähr Faktor 2.5 (Daten nicht gezeigt). Die Abtrennung hoher Salzfrachten durch einen zusätzlichen m/z-spezifischen Trennschritt im Massenspektrometer geht zwar mit einem nicht unerheblichen Sensitivitätsverlust einher, jedoch ist eine quantitative Metabolitanalyse bei LC-MS-Kopplung auch bei hohen Salzkonzentrationen möglich. Auf das Problem metabolitspezifischer Konzentrationsfaktoren bei veränderten Ionenkonzentrationen der Probe wurde bereits in Kapitel 3.3.6 bei der Untersuchung der Konzentrierungsschritte Lyophilisierung und Vakuumkonzentrierung hingewiesen.

#### 5.2.4 Metabolitidentifikation

Für die Metabolitidentifikation wurden die metabolitspezifischen Retentionszeiten der ionenchromatografischen Auftrennung (Kapitel 5.1.1) sowie die Massenspektren charakteristischer Massen-/Ladungsverhältnisse (m/z) aus der Massenspektrometrie (Kapitel 5.2.1) herangezogen (Tabelle 5-3).

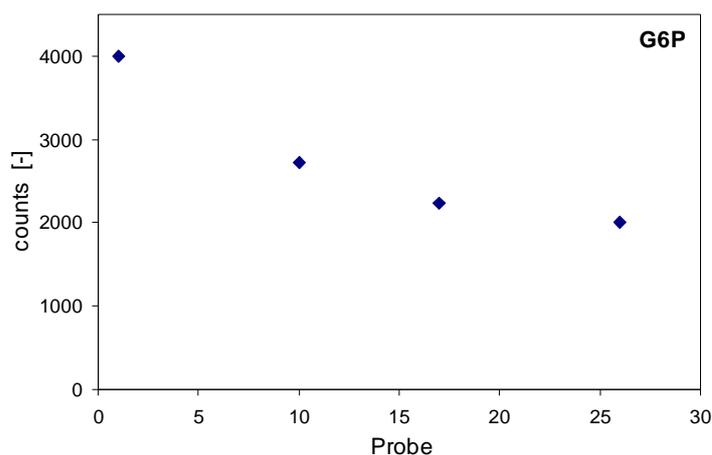
**Tabelle 5-3.** Retentionszeiten quantifizierbarer Metabolite bei LC-MS Analyse und charakteristische Massen-/Ladungsverhältnisse einfach deprotonierter Metabolitionen (M-H)<sup>-</sup>.

Metabolit	Retentionszeit [min]	m/z [M-H]
G6P	4.0	259.14
F6P	4.0	259.14
FBP	32.3	339.12
DHAP	32.0	169.06
GAP	32.0	169.06
2PG	21.0	185.06
3PG	21.0	185.06
PEP	24.1	167.04
PYR	24.0	87.06
R5P	27.0	229.11
6PG	19.2	275.14
Citrat	22.2	191.13
AMP	27.1	346.20
ADP	27.0	426.20
ATP	34.2	506.18

Eine Auftrennung von G6P und F6P, DHAP und GAP sowie 2PG und 3PG war weder über die Retentionszeit noch über das Molekulargewicht möglich. Diese Metabolite werden im Folgenden daher als gepoolte Größen (G6P+F6P, DHAP+GAP und 2PG+3PG) angegeben. Zur Bestimmung der Retentionszeiten wurden Proben einer Verdünnungsreihe (2.5, 5, 10, 12.5, 20, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) der Metabolit-Stammlösung (Kapitel 5.2.2) sowie gemäß Kapitel 2 und 3 kultivierte und aufgearbeitete *E. coli* Proben verwendet. Aufgestockte Proben auf Basis von *E. coli* Probenmatrix (2.5, 5, 10, 12.5, 20, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) lieferten identische Retentionszeiten. Mit den optimierten LC-MS Einstellungen (Kapitel 5.2.1) entstehen unter Deprotonierung einfach negativ geladene Molekülonen ( $(\text{M}-\text{H})^-$ ), die charakteristische Massenspektren aufweisen. Bei LC-MS Analyse von *E. coli* Proben wurden Abweichungen in den Retentionszeiten innerhalb einer Probensequenz (30 Proben) von ca. 0.9 min, bei unterschiedlichen Läufen von ca. 2 - 3 min festgestellt.

### 5.2.5 Interne Standards

Kennzeichnend für die LC-MS Analyse sind von der zu ionisierenden Substanz und von der Probenmatrix abhängige Ionisierungseffizienzen (Niessen, 1999). Bei der in dieser Arbeit verwendeten LC-MS Analysemethode wurde zudem eine mit der Probenanzahl abnehmende Messgenauigkeit beobachtet. Dies ist in Abbildung 5-5 exemplarisch für den Fall gezeigt, dass ein G6P-Standard (30  $\mu\text{M}$ , Minimalmedium) innerhalb einer Probensequenz von 30 *E. coli* Proben wiederholt gemessen wird.



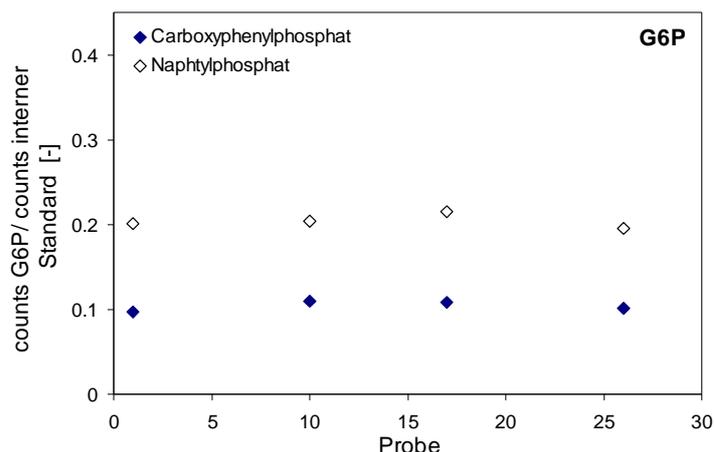
**Abbildung 5-5.** In einer Sequenz von 30 Proben wurde ein G6P-Standard (30  $\mu\text{M}$ , Minimalmedium) wiederholt gemessen (Sequenzpositionen 1, 10, 17, 26). Die Abnahme der Messsignalstärke führt dazu, dass ohne internen Standard vermeintlich abnehmende Konzentrationen ermittelt werden.

Eine zuverlässige Metabolitquantifizierung erfordert daher die Verwendung eines internen Standards. Dieser muss folgende Kriterien erfüllen:

- die Messsignalstärken von zu analysierendem Metabolit und internem Standard müssen in gleichem Verhältnis abnehmen, d. h. das Verhältnis der Messsignalstärken beider Substanzen muss stets konstant sein
- der interne Standard darf weder extrazellulär noch intrazellulär vorliegen und
- muss mit LC-MS sensitiv bestimmbar sein.

Buchholz (Buchholz *et al.*, 2001) konnte zeigen, dass diese Kriterien durch die Verwendung eines einzigen internen Standards, eingesetzt wurde cGMP, erfüllt werden und mit diesem die quantitative Bestimmung 15 intrazellulärer Metabolitkonzentrationen möglich ist. Mashego (Mashego *et al.*, 2004) verwendet für jeden Metabolit dessen vollständig markiertes  $^{13}\text{C}$ -Isotop (abgekürzt  $u\text{-}^{13}\text{C}$ -Isotop), wobei die  $u\text{-}^{13}\text{C}$ -Metabolite fermentativ durch den Einsatz vollständig markierter Substrate ( $u\text{-}^{13}\text{C}$ -Glucose und  $u\text{-}^{13}\text{C}$ -Ethanol) gewonnen werden. Da jeder Metabolit quasi sein eigener Standard ist, hat diese Vorgehensweise den Vorteil, dass konzentrationsunabhängig und auch bei abnehmenden Messsignalstärken das Verhältnis von Metabolit zu internem Standard notwendigerweise konstant ist. Problematisch ist, dass die experimentelle Darstellung der  $u\text{-}^{13}\text{C}$ -Metabolite sehr aufwändig ist und sichergestellt werden muss, dass neben den Substraten auch alle übrigen C-Quellen (z. B.  $\text{CO}_2$ ) vollständig markiert vorliegen.

In dieser Arbeit wurden die beiden Substanzen Carboxyphenylphosphat und Naphtylphosphat (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D) auf ihre Eignung als interne Standards untersucht. Beide sind weder Bestandteil der Zelle (Keseler *et al.*, 2005) noch des Mediums und sensitiv mit LC-MS quantifizierbar. Für den G6P-Standard (30  $\mu\text{M}$ , Minimalmedium) konnten konstante Verhältnisse der Messsignalstärken ermittelt werden wie Abbildung 5-6 in Ergänzung zu Abbildung 5-5 zeigt.



**Abbildung 5-6.** In einer Sequenz von 30 Proben wurde ein G6P-Standard (30  $\mu\text{M}$ , Minimalmedium) wiederholt gemessen (Sequenzpositionen 1, 10, 17, 26). Der Effekt abnehmender Messsignalstärken konnte durch die Verwendung der internen Standards Carboxyphenylphosphat bzw. Naphtylphosphat verhindert werden, da die Verhältnisse der Messsignale von G6P zu internem Standard über die Probensequenz konstant blieben.

Wegen substanzabhängiger Ionisierungseffizienzen wurden die metabolitspezifischen Korrelationskoeffizienten von G6P, F6P, FBP, DHAP, GAP, 2PG, 3PG, PEP, PYR, R5P, 6PG, Citrat, AMP, ADP und ATP bei verschiedenen Konzentrationen (2.5, 5, 10, 12.5, 20, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ , Minimalmedium) und den internen Standards Carboxyphenylphosphat und Naphtylphosphat (200  $\mu\text{M}$  in ddH<sub>2</sub>O) ermittelt. Diese sind in Tabelle 5-4 zusammengefasst.

**Tabelle 5-4.** Korrelationskoeffizienten von Metaboliten aus linearer Regression bei Verwendung von Carboxyphenylphosphat und Naphtylphosphat (200  $\mu\text{M}$ ) als internen Standards und Analyse mit LC-MS.

Metabolit	$R^2$	
	Carboxyphenylphosphat	Naphtylphosphat
G6P+F6P	0.9884	0.9869
FBP	0.9962	0.9961
DHAP+GAP	0.9923	0.9903
2PG+3PG	0.9940	0.9938
PEP	0.9942	0.9927
PYR	0.9850	0.9814
R5P	0.9866	0.9859
6PG	0.9966	0.9942
Citrat	0.9988	0.9981
AMP	0.9960	0.9966
ADP	0.9918	0.9922
ATP	0.9972	0.9959

Die Verhältnisse der Messergebnisse von Metaboliten zu internen Standards waren über den untersuchten Konzentrationsbereich von 2.5 - 100  $\mu\text{M}$  für die Metabolitquantifizierung ausreichend gut korreliert wie die ermittelten Korrelationskoeffizienten (Bestimmtheitsmaß  $R^2$ ) zeigen (Buchholz *et al.*, 2001). Carboxyphenylphosphat und Naphtylphosphat waren beide als interne Standards geeignet, wobei die Korrelationen, außer für AMP und ADP, bei Carboxyphenylphosphat geringfügig besser waren. Bestimmtheitsmaße kleiner 0.990 wurden für die Metabolite G6P+F6P, PYR und R5P ermittelt. Durch die parallele Verwendung der internen Standards Carboxyphenylphosphat und Naphtylphosphat können zwei unabhängige Regressionen ermittelt werden. Insgesamt waren damit nicht nur Proben innerhalb einer Sequenz, sondern auch unterschiedliche LC-MS Analyseläufe vergleichbar.

### 5.2.6 Metabolitquantifizierung

Die quantitative Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen erfolgte mit der ionenchromatografischen Trennmethode nach Kapitel 5.1.1 und den LC-MS Einstellungen nach Kapitel 5.2.1. Vor jedem LC-MS Messlauf wurden Kalibriergeraden der Metabolite G6P, F6P, FBP, DHAP, GAP, 2PG, 3PG, PEP, PYR, R5P, 6PG, Citrat, AMP, ADP und ATP (Konzentrationen 2.5, 5, 10, 12.5, 20, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ , Minimalmedium) aufgenommen. Hierfür wurden interne Standards parallel verwendet (Kapitel 5.2.5). Zu 100  $\mu\text{l}$  Metabolitstandard wurde jeweils 10  $\mu\text{l}$  interner Standard (2.5 mM, ddH<sub>2</sub>O) zugegeben. Die gleiche Vorgehensweise wurde bei *E. coli* Proben gewählt. Bei Aufnahme der Kalibriergeraden wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Messung erfolgte im Fullscan-Modus (20 - 620 amu bei 0.5 scans/s). Es wurden jeweils die Massenspuren des deprotonierten, einfach negativ geladenen Molekülions  $(\text{M-H})^-$  detektiert und quantifiziert, wobei ausgehend vom Molekülpeak der Massenbereich  $\pm 0.5$  amu berücksichtigt wurde. So hat Phosphoenolpyruvat ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_6\text{P}$ ) beispielsweise ein Molekulargewicht von 168.04 g/mol. Das unmarkierte, deprotonierte Molekül hat seinen Massenpeak im LC-MS-Spektrum bei 167.04 amu und ist einfach negativ geladen. Der Peak wurde von 166.54 - 167.54 amu integriert.

## 5.3 Ergebnisse

### 5.3.1 Steady state

Es wurden die intrazellulären Metabolitkonzentrationen von G6P+F6P, FBP, DHAP+GAP, 2PG+3PG, PEP, PYR, P5P, 6PG, Citrat, AMP, ADP und ATP in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  bestimmt. Probenahme, Quenching, Extraktion und Probenaufarbeitung erfolgten wie in

Kapitel 3 beschrieben. Die Quantifizierung erfolgte mit LC-MS gemäß Kapitel 5.2. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5-5 zusammengefasst. Die Konzentrationen von G6P+F6P, DHAP+GAP und 2PG+3PG sind gepoolt (Kapitel 5.2.4).

**Tabelle 5-5.** Intrazelluläre steady state Metabolitkonzentrationen in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ .

	c [ $\mu\text{mol/g TS}$ ]	VK <sup>a)</sup> [%]
G6P+F6P	$1.3 \pm 0.3$	22.6
FBP	$3.0 \pm 0.2$	5.6
DHAP+GAP	$1.8 \pm 0.05$	1.7
2PG+3PG	$10.9 \pm 0.9$	8.1
PEP	$4.8 \pm 0.3$	5.5
PYR	$5.2 \pm 1.0$	20.0
P5P <sup>b)</sup>	$0.4 \pm 0.1$	37.3
6PG	$1.7 \pm 0.1$	3.6
Citrat	$1.1 \pm 0.2$	14.2
AMP	$1.0 \pm 0.3$	30.0
ADP	$2.1 \pm 0.3$	15.6
ATP	$3.0 \pm 0.5$	14.7

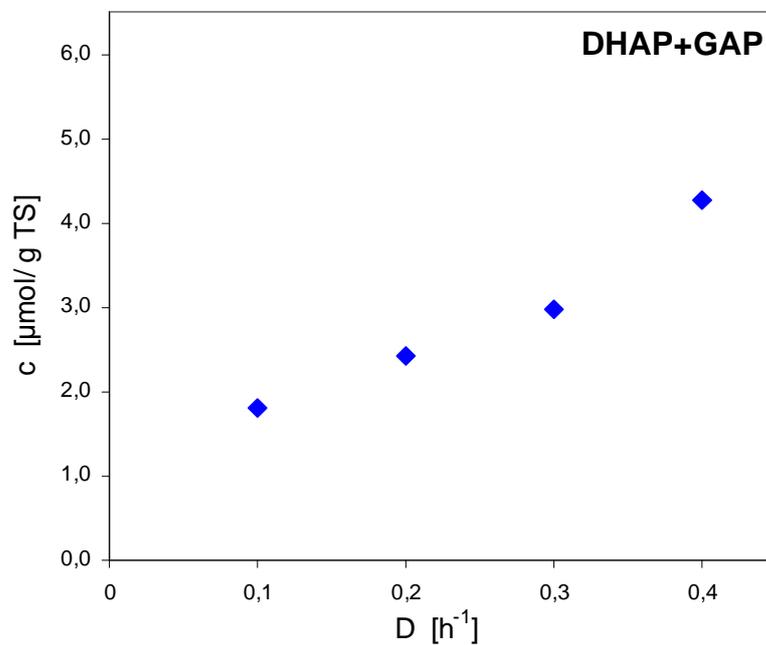
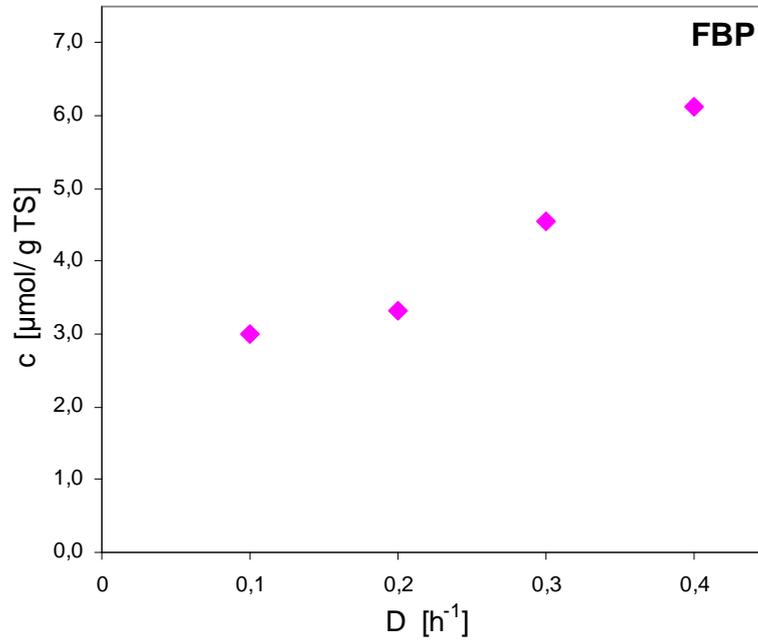
<sup>a)</sup> Variationskoeffizient (VK) relative, auf den Mittelwert bezogene Standardabweichung

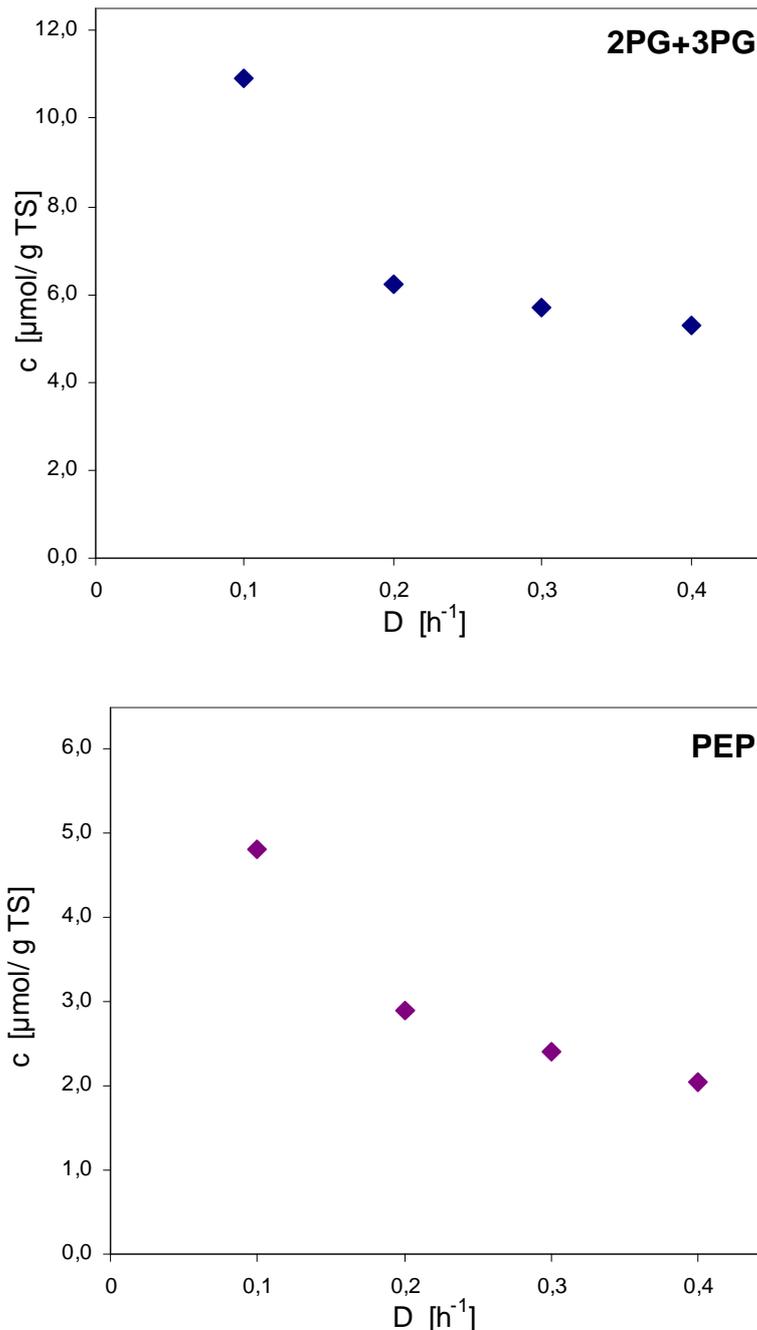
<sup>b)</sup> P5P Pentosephosphat Poolkonzentration

Die intrazellulären Metabolitkonzentrationen wurden aus drei verschiedenen Experimenten ermittelt. Es wurden zwei verschiedene LC-MS Analyseläufe durchgeführt. Jede Probe wurde dreifach bestimmt. In Tabelle 5-5 sind jeweils die Standardabweichungen  $\sigma$  angegeben. Da sich die Konzentrationen um bis zu zwei Größenordnungen unterscheiden, sind außerdem die Variationskoeffizienten angegeben. Gute Reproduzierbarkeit mit relativen Standardabweichungen unter 10% wurde für FBP (5.6%), DHAP+GAP (1.7%), 2PG+3PG (8.1%), PEP (5.5%) und 6PG (3.6%) erzielt. Größere Abweichungen bei G6P+F6P (22.6%), bei PYR (20%) und insbesondere bei P5P (37.3%) sowie AMP (30%) sind darauf zurückzuführen, dass die intrazellulären Konzentrationen dieser Metabolite unter den gewählten experimentellen Bedingungen eines Markierungsexperimentes (Eintrittskonzentration der  $c_{\text{Glucose}} = 5.0 \text{ g/l}$ ) nahe an der Bestimmungsgrenze lagen (Kapitel 5.2.2). Der energy charge ist mit 0.66 sehr niedrig. Chassagnole (Chassagnole *et al.*, 2002) ermittelte in *E. coli* einen energy charge von 0.78, Buchholz (Buchholz *et al.*, 2001) dagegen einen energy charge von nur 0.15.

Insgesamt konnten in einem Analyselauf parallel die intrazellulären Konzentrationen von 12 Metaboliten bzw. Metabolitpools quantitativ mit LC-MS bestimmt werden. Die intrazellulären steady state Metabolitkonzentrationen in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  wurden bereits im Zusammenhang mit dem integrierten Probenahmeverfahren (Kapitel 3.3.7) diskutiert.

Für die Metabolite FBP, DHAP+GAP, 2PG+3PG und PEP wurden zusätzlich die intrazellulären steady state Konzentrationen bei Variation der Verdünnungsrate von  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  bis  $D = 0.4 \text{ h}^{-1}$  ermittelt (Abbildung 5-7).





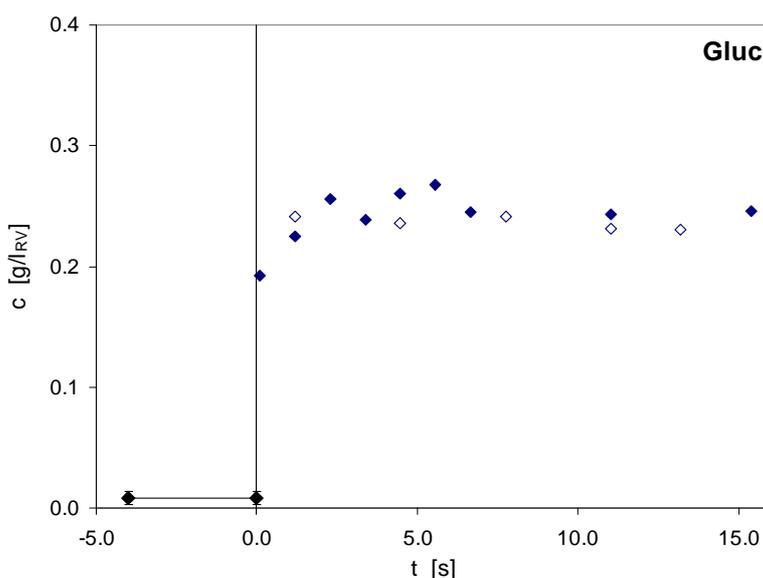
**Abbildung 5-7.** Intrazelluläre steady state Metabolitkonzentrationen in *E. coli* bei Variation der Verdünnungsrate ( $D = 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 \text{ h}^{-1}$ ).

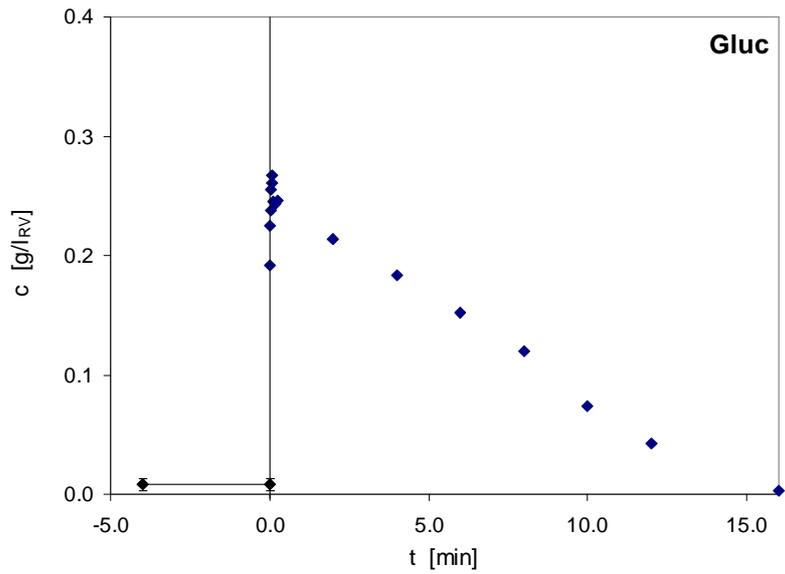
Eine Erhöhung der Verdünnungsrate führte bei den untersuchten Metaboliten FBP und DHAP+GAP im oberen Teil der Glykolyse zu zunehmenden intrazellulären Metabolitkonzentrationen, während bei 2PG+3PG und PEP im unteren Teil der Glykolyse abnehmende Konzentrationen gemessen wurden. Im einzelnen änderten sich die intrazellulären Konzentrationen bei Erhöhung der Verdünnungsrate von  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  auf  $D = 0.4 \text{ h}^{-1}$  wie folgt: Bei FBP Zunahme von 3.0 auf 6.1  $\mu\text{mol/g TS}$ , bei DHAP+GAP Zunahme von 1.8 auf 4.3

$\mu\text{mol/g TS}$ , bei 2PG+3PG Abnahme von 10.9 auf 5.3  $\mu\text{mol/g TS}$ , bei PEP Abnahme von 4.8 auf 2.0  $\mu\text{mol/g TS}$ .

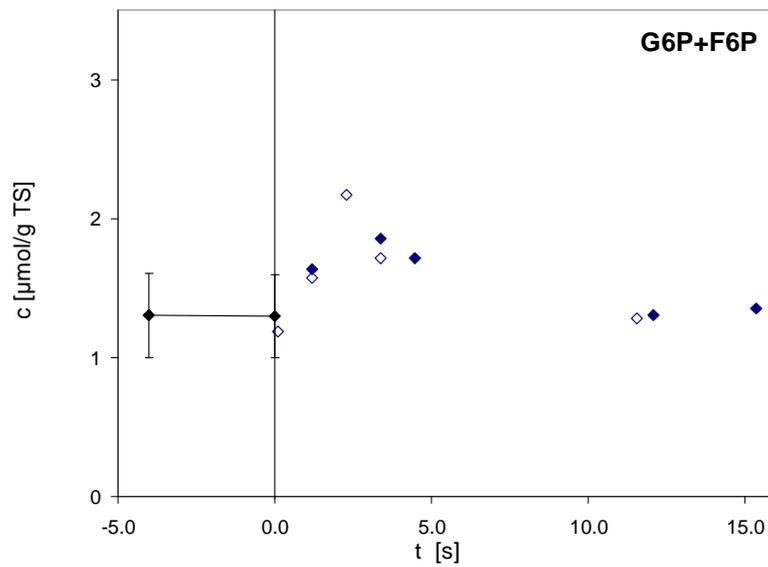
### 5.3.2 Stimulus-response

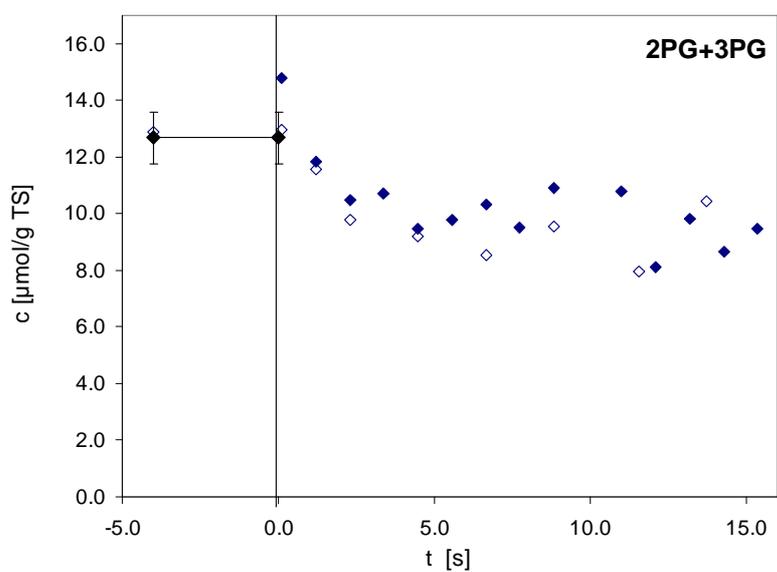
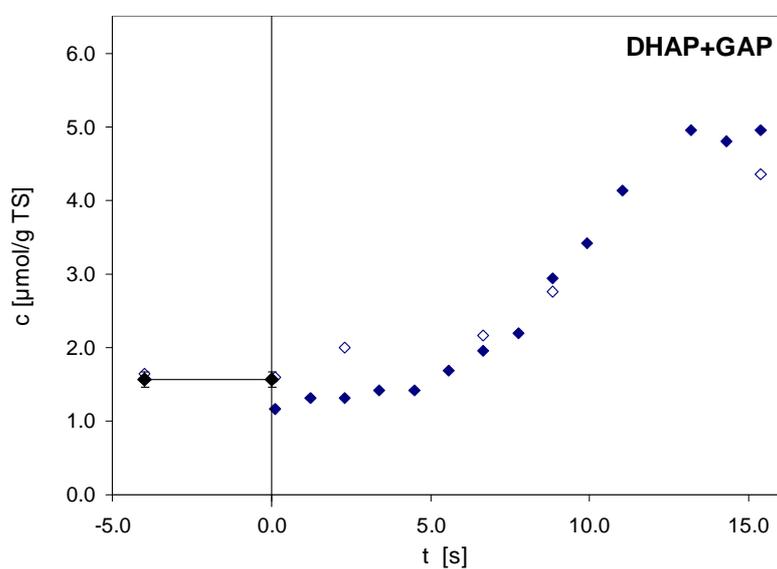
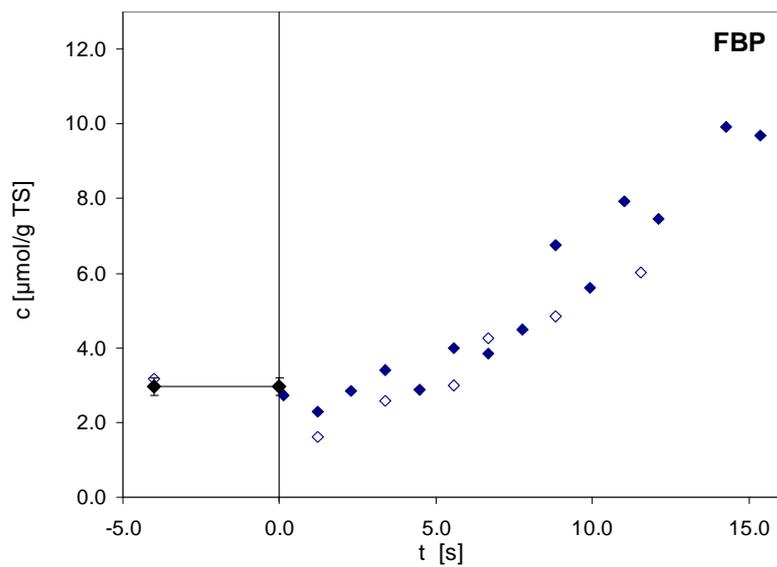
Es wurden die Antworten der intrazellulären Metabolite G6P+F6P, FBP, DHAP+GAP, 2PG+3PG, PEP, PYR, Citrat, AMP, ADP und ATP in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  auf ein Glucose-Pulseexperiment untersucht. Hierfür wurde die Glucosekonzentration im Bioreaktor durch die in Kapitel 2.2.2 beschriebene Pulsaufgabeneinheit nach 6.5 Verweilzeiten sprunghaft von  $8 \pm 2 \text{ mg/l}$  im Zustand der Glucoselimitierung auf 0.30 g/l (Zugabe von 0.9 ml 50%-Glucoselösung) erhöht und die zeitliche Veränderung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen im Zeitbereich von  $0 \leq t \leq 15 \text{ s}$  untersucht. Die Auswertung der Pulsantwort mittels LC-MS Analytik erfolgte im Sekundenbereich zu den Zeitpunkten  $t = 0.1, 1.2, 2.3, 3.4, 4.5, 5.6, 6.7, 7.7, 8.8, 9.9, 11.0, 12.1, 13.2, 14.3$  und 15.4 s, wobei die Probenahmefrequenz bei diesem Experiment  $2 \text{ s}^{-1}$  betrug. Probenahme, Quenching, Extraktion und Probenaufarbeitung erfolgten wie in Kapitel 3 beschrieben, die LC-MS Analyse gemäß Kapitel 5.2. Es wurden zwei unabhängige stimulus-response Experimente und LC-MS Analyseläufe durchgeführt. Die Konzentrations-Zeitverläufe sind in Abbildung 5-8 für die extrazelluläre Glucose und in Abbildung 5-9 für die intrazellulären Metabolite G6P+F6P, FBP, DHAP+GAP, 2PG+3PG, PEP, PYR, Citrat, AMP, ADP und ATP dargestellt. Die Konzentrationen von G6P+F6P, DHAP+GAP und 2PG+3PG sind gepoolt (Kapitel 5.2.4).

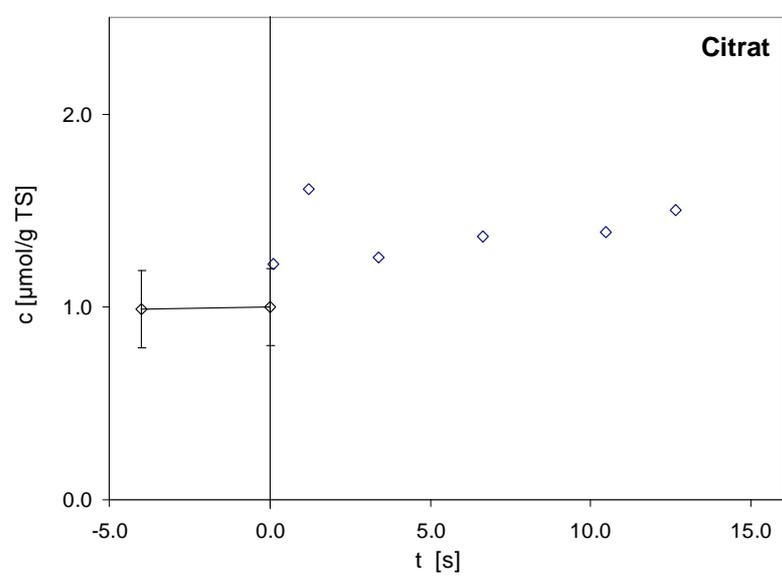
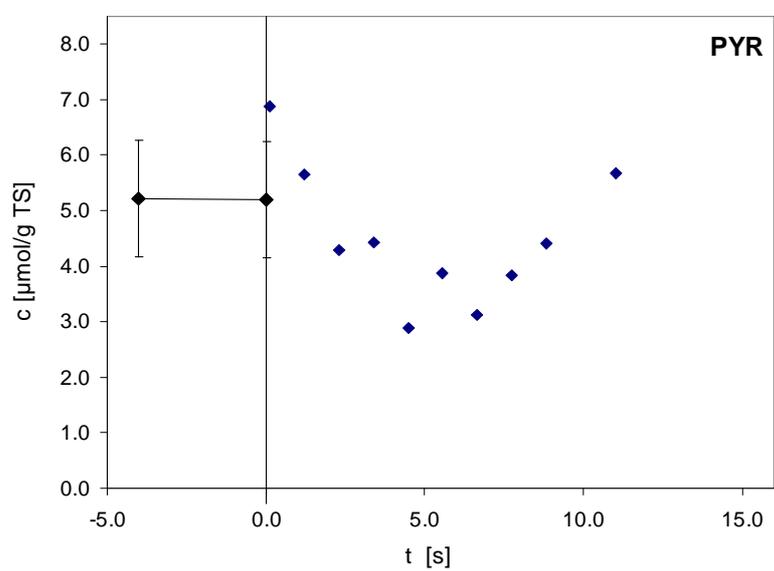
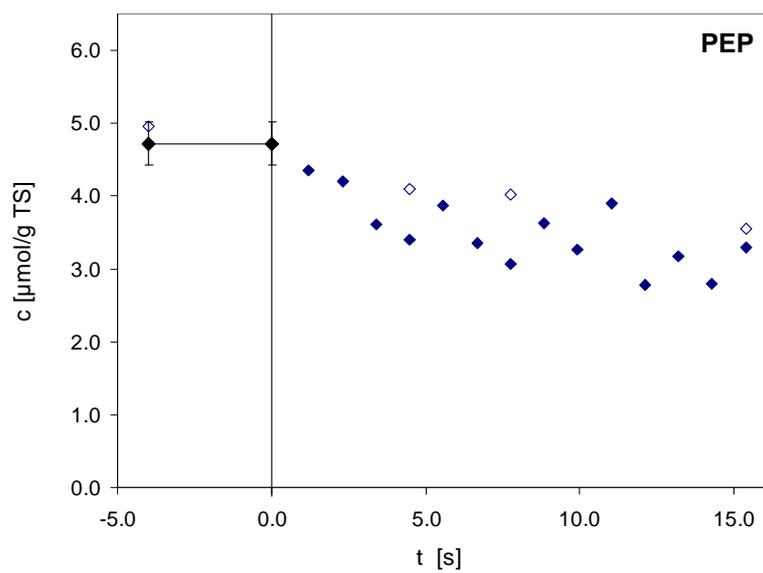


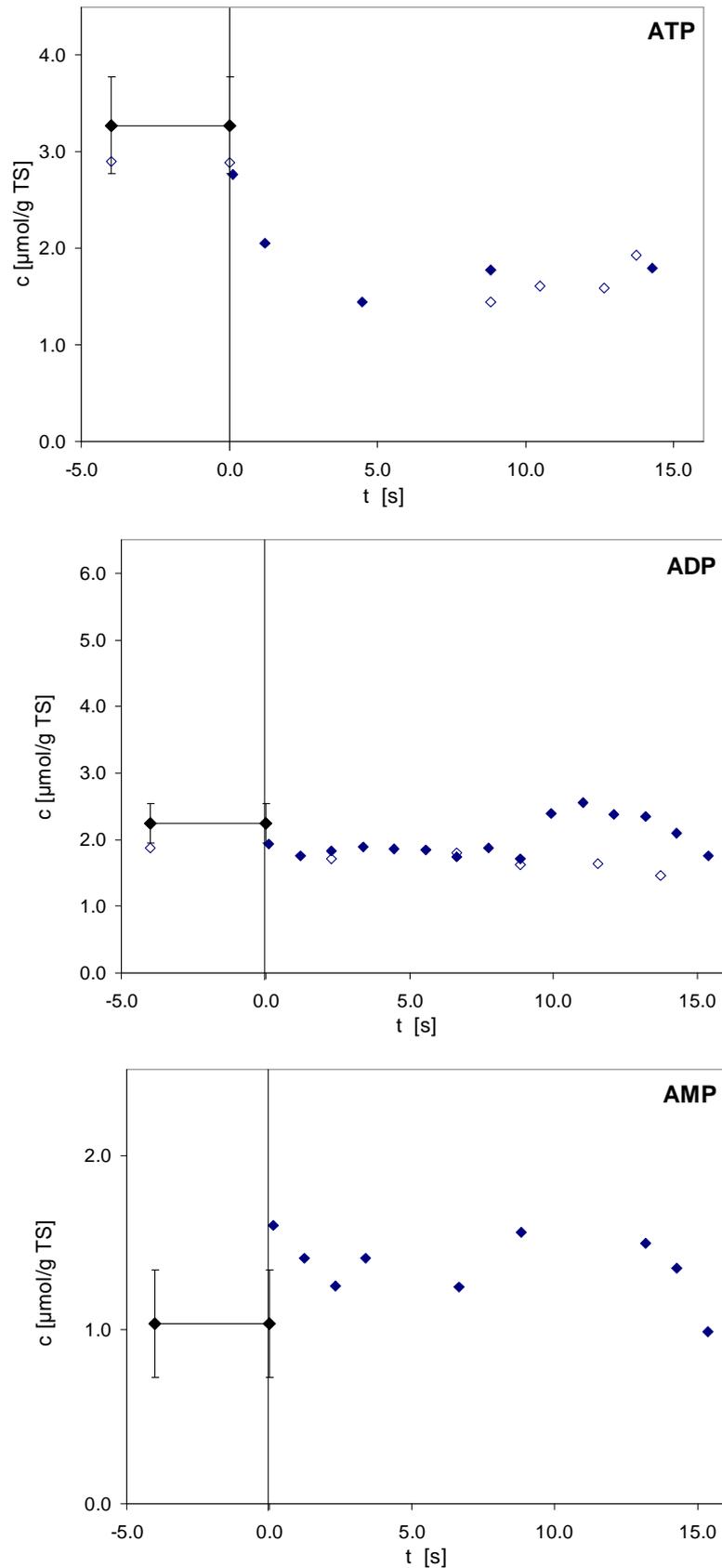


**Abbildung 5-8.** Verlauf der extrazellulären Glucosekonzentration nach einem zum Zeitpunkt  $t = 0$  s durchgeführten stimulus-response Experiment bei *E. coli* ( $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ ). Dargestellt sind die Zeitbereiche bis 15 s (oben) und bis 15 min (unten) nach Aufgabe der Glucose. Es wurden zwei unabhängige stimulus-response Experimente (◆ bzw. ◇) durchgeführt.









**Abbildung 5-9.** Verlauf intrazellulärer Metabolitkonzentrationen in *E. coli* nach einem zum Zeitpunkt  $t = 0$  s durchgeführten stimulus-response Experiment bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ . Es wurden zwei unabhängige stimulus-response Experimente (◆ bzw. ◇) durchgeführt. Bei PYR, Citrat und AMP konnte nur ein Datensatz ausgewertet werden.

Die automatisierte Pulsaufgabeneinheit (Kapitel 2.2.2) ermöglichte reproduzierbare stimulus-response Experimente wie der gemessene Verlauf der extrazellulären Glucosekonzentration in Abbildung 5-8 zeigt. Ein Wiederholungsexperiment demonstrierte bis auf einzelne Messpunkte gute Reproduzierbarkeit der Konzentrations-Zeitverläufe von G6P+F6P, FBP, DHAP+GAP, 2PG+3PG, PEP, ADP und ATP. Für die Konzentrations-Zeitverläufe wurden keine Standardabweichungen ermittelt, da nur zwei stimulus-response Experimente durchgeführt worden sind.

Bei G6P+F6P wurde unmittelbar nach dem stimulus-response Experiment eine Zunahme der intrazellulären Poolkonzentration mit einem Maximum bei ungefähr  $t = 2$  bis  $4$  s ermittelt, gefolgt von abnehmenden Konzentrationen bis im Bereich von ungefähr  $t = 5$  bis  $10$  s wieder das steady state Konzentrationsniveau erreicht wurde. Die Konzentration von FBP nahm bis ungefähr  $2$  s nach dem stimulus-response Experiment ab und stieg im weiteren Verlauf deutlich an. DHAP+GAP wies einen vergleichbaren Verlauf auf. Die Metabolite 2PG+3PG und PEP wiesen abnehmende Konzentrationen nach dem stimulus-response Experiment auf. Die Konzentration von PYR nahm kurzzeitig ab und stieg ab ungefähr  $t = 4$  bis  $6$  s wieder an. Im Bereich  $t < 2$  s ist bei PYR eine kurzfristige Zunahme der Konzentration möglich, jedoch war die zeitliche Auflösung unzureichend und es lag nur ein singulärer Messpunkt vor. Die Konzentration von Citrat im Tricarbonsäure-Zyklus nahm nach dem Glucose-Puls zu, allerdings deutlich geringer als dies bei G6P+F6P, FBP und DHAP+GAP der Fall war. Bei den Adenosinphosphaten konnte für ATP eine sofortige signifikante Abnahme der intrazellulären Metabolitkonzentration festgestellt werden, während sich die intrazelluläre Konzentration von ADP kaum veränderte. Die Konzentration von AMP nahm zunächst zu und ab ungefähr  $t = 10$  s wieder ab.

Die grundsätzlichen zeitlichen Verläufe von G6P+F6P, FBP, PEP, PYR und ATP waren in guter Übereinstimmung mit früheren Messungen (Chassagnole *et al.*, 2002) und Literaturdaten (Schaefer *et al.*, 1999). Die deutliche Zunahme der Konzentration des DHAP+GAP Pools deutet in Verbindung mit der gemessenen geringen Zunahme von GAP (Chassagnole *et al.*, 2002) darauf hin, dass auch DHAP bei einem Glucose-Pulsexperiment zunimmt. Für 2PG+3PG lagen keine Vergleichsmessungen in *E. coli* vor. Jedoch wurde von Schäfer (Schaefer *et al.*, 1999) für 3PG ebenfalls eine deutliche Zunahme der intrazellulären Konzentration nach einem stimulus-response Experiment gemessen. Ein Vergleich des Konzentrations-Zeitverlaufs von Citrat war nicht möglich. AMP zeigte den aus früheren Untersuchungen bekannten Verlauf, die Werte für ADP wiesen dagegen bei schwach ausgeprägter Dynamik eine geringfügige Abnahme der Konzentration auf, während von Chassagnole (Chassagnole *et al.*, 2002) bei ebenfalls schwacher Dynamik eine geringfügige Konzentrationszunahme beobachtet wurde. Unterschiede bestanden bei den untersuchten Metaboliten hinsichtlich der betragsmäßigen Konzentrationsänderungen sowie des Zeit-

punktes auftretender Konzentrationsmaxima bzw. -minima nach einem stimulus-response Experiment. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die stimulus-response Experimente dieser Arbeit zwar bei der gleichen Verdünnungsrate von  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  und der gleichen absoluten Pulshöhe (0.30 g/l) durchgeführt wurden wie in Chassagnole (Chassagnole *et al.*, 2002), jedoch unterschiedliche Biomassekonzentrationen vorlagen. Die Biomassekonzentration betrug hier 2.3 g TS/l, während bei Chassagnole 8.7 g TS/l (Glucoseeintrittskonzentration 20 g/l) verwendet wurde. Unterschiedliche Pulshöhen und Biomassekonzentrationen erschweren auch den Vergleich mit anderen Literaturdaten z. B. von Schäfer (Schaefer *et al.*, 1999). Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die hier gezeigten Konzentrations-Zeitverläufe aller Metabolite aus einem einzigen Experiment stammten, während bei Chassagnole (Chassagnole *et al.*, 2002) mehrere Glucose-Puls-experimente bzw. Fermentationen durchgeführt wurden. Als mögliche Erklärung für die beobachteten Abweichungen kann auch der Zeitpunkt des Glucose-Pulsexperimentes, d. h. das unterschiedliche Alter der Kultur bzw. die Generationszahl, angeführt werden (Mashego *et al.*, 2005). So wurde von Mashego (Mashego *et al.*, 2005) bei der Hefe *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D bei  $D = 0.052 \text{ h}^{-1}$  nach 90 Generationen eine Abnahme der intrazellulären Metabolitkonzentrationen um einen Faktor von 5 bis 10 festgestellt. Insgesamt ist vor diesem Hintergrund ein Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit anderen Arbeiten und der Literatur nur sehr eingeschränkt möglich.

Bei den vorgestellten Messergebnissen lag für  $t < 1 \text{ s}$  lediglich ein Messpunkt bei  $t = 0.1 \text{ s}$  nach einem Glucose-Pulsexperiment vor. Für eine Analyse der zeitlichen Konzentrationsänderungen intrazellulärer Metabolite im Millisekundenbereich sollten daher wegen der höheren Probenahmefrequenz stopped-flow Probenahmesysteme wie z. B. das von Buziol (Buziol *et al.*, 2002) eingesetzt werden.

Die LC-MS Analytik weist bei stimulus-response Experimenten spezifische Vorteile auf. Da nur geringe Probenvolumina benötigt werden, sind hohe Probenahmefrequenzen und prinzipiell Mehrfachbestimmungen auch unter dynamischen Bedingungen möglich. Durch Parallelbestimmungen können außerdem die Konzentrations-Zeitverläufe aller quantifizierbaren Metabolite konsistent in einem einzigen Versuch ermittelt werden.

## 5.4 Zusammenfassung

In Kapitel 5 wurde eine LC-MS Analysemethode zur quantitativen Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen vorgestellt. Ausführlich beschrieben wurden die ionenchromatografische Trennmethode, die LC-MS Kopplung und insbesondere die massenspektrometrische Detektion mit für die quantitative Analyse intrazellulärer Metabolite aus Glykolyse

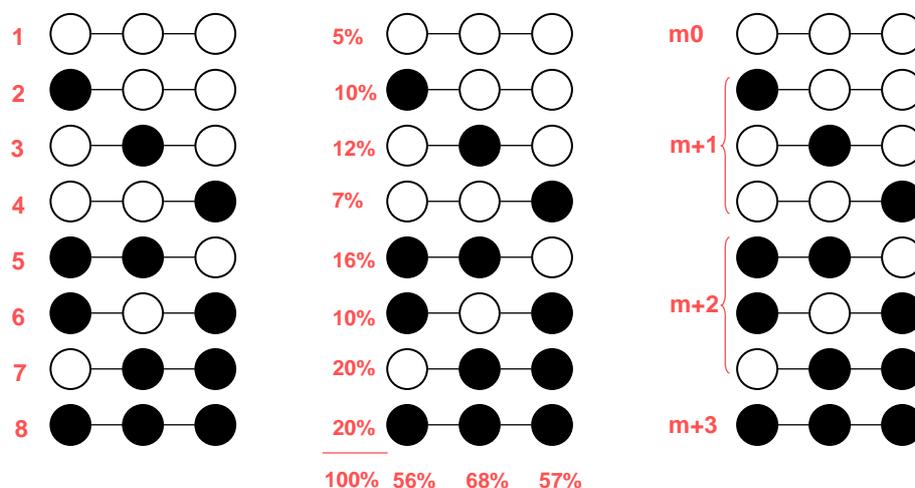
und Pentosephosphat-Weg optimierten MS-Einstellungen. Eine Analyseverfahren muss sowohl externe Faktoren wie untersuchtes Zellsystem, Biomassekonzentration und mögliche Wechselwirkungen durch Probenahme, Quenching, Extraktion und Probenaufarbeitung als auch interne Faktoren wie beispielsweise Notwendigkeit eines internen Standards und Einfluss der Probenmatrix auf das Messergebnis berücksichtigen. Unter den experimentellen Randbedingungen dieser Arbeit (Kapitel 2) wurde zunächst untersucht, welche Metabolite mit der entwickelten LC-MS Analyseverfahren bei optimierten MS-Einstellungen detektiert und welche quantitativ bestimmt werden konnten. Für letztere wurden Bestimmungsgrenzen der etablierten LC-MS Analyseverfahren angegeben. Die Metabolitidentifikation erfolgte auf Basis der metabolitspezifischen Retentionszeiten und der Massenspektren bei charakteristischen Massen-/Ladungsverhältnissen. Die Metabolitquantifizierung bedarf interner Standards. Hierfür wurden mit Carboxyphenylphosphat und Naphtylphosphat zwei geeignete interne Standards gefunden. Im Vergleich zur Ionenchromatografie zeigte sich, dass der Einfluss hoher Salzkonzentrationen auf die Sensitivität der Analyse weit weniger ausgeprägt ist. Jedoch ist eine Veränderung der Ionenkonzentration der Probe kritisch für die Metabolitquantifizierung mit LC-MS (Kapitel 3.3.6). Die etablierte LC-MS Analyseverfahren konnte erfolgreich zur Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  im steady state und nach einem stimulus-response Experiment eingesetzt werden.

## 6 LC-MS basierte Bestimmung isotopisch stationärer und isotopisch instationärer Massenisotopomere in *E. coli* im steady state

### 6.1 Einleitung

Relative Messinformationen zu Positions-Markierungsanteilen oder Massenisotopomerenverteilungen am Stoffwechsel beteiligter Metabolite oder Makromoleküle sind eine Voraussetzung für die Durchführung von  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen. Analysetechniken können danach unterschieden werden, welche relativen Messinformation sie bereitstellen. Dagegen erfolgt die Modellierung (Kapitel 7) üblicherweise in der allgemeinsten Darstellung auf Basis von Isotopomeren, so dass Messdatensätze unterschiedlicher Analysetechniken integriert werden können. Der Begriff des Isotopomers setzt sich zusammen aus Isotop, das sind Elemente mit unterschiedlicher Anzahl von Neutronen im Atomkern, also unterschiedlicher Massenzahl, und Isomer, das sind chemische Verbindungen der gleichen Summenformel, aber unterschiedlicher chemischer Struktur. Die eingesetzten Messtechniken erfassen jeweils eine Teilmenge der bei einem Molekül mit  $n$  C-Atomen möglichen  $2^n$  Markierungszustände oder Isotopomere. So werden mit NMR-Techniken wie  $^{13}\text{C}$  NMR (Malloy *et al.*, 1988),  $^1\text{H}$  NMR (Marx *et al.*, 1996) und zweidimensionaler [ $^{13}\text{C},^1\text{H}$ ]-COSY NMR (Szyperski, 1995) Positions-Markierungsanteile gemessen, d. h. bei einem Molekül mit  $n$  C-Atomen können maximal  $n$  positionale Messinformationen gewonnen werden. Zur Bestimmung von Massenisotopomeren, das sind Isotopomere gleicher Masse, wobei ein Molekül mit  $n$  C-Atomen  $n+1$  Massenisotopomere besitzt, werden bereits seit längerem GC-MS-Techniken (Park *et al.*, 1997; Christensen *et al.*, 1999; Dauner *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2003) zur Analyse proteinogener Aminosäuren eingesetzt (Kapitel 4). Mit LC-MS wurden zunächst Absolutkonzentrationen bestimmt (Buchholz *et al.*, 2001; Lange *et al.*, 2001; Visser *et al.*, 2002; Mashego *et al.*, 2005; Schaub *et al.*, 2006), siehe auch Ergebnisse dieser Arbeit (Kapitel 5), bevor mit dieser Analysemethode auch Massenisotopomerenverteilungen von Metaboliten der zentralen Kohlenstoffwechselwege Glykolyse und Pentosephosphat-Weg (van Winden *et al.*, 2005) sowie im Tricarbonsäure-Zyklus (van Winden, 2002) quantifiziert wurden. Ebenfalls zur Bestimmung von Absolutkonzentrationen und Massenisotopomerenverteilungen wurde die MALDI-TOF Massenspektrometrie verwendet (Wittmann *et al.*,

2001a; Wittmann *et al.*, 2001b). Die Zusammenhänge zwischen Analysetechnik und gewinnbaren Messinformationen zeigt am Beispiel eines C<sub>3</sub>-Moleküls Abbildung 6-1.



**Abbildung 6-1.** Ein C<sub>3</sub>-Molekül hat  $2^3 = 8$  mögliche Markierungszustände oder Isotopomere (links). Prinzipiell können mit NMR die Positions-Markierungsanteile der 3 C-Atome (Mitte) und mit Massenspektrometrie die Anteile der 4 Massenisotopomere (m<sub>0</sub>, m<sub>+1</sub>, m<sub>+2</sub>, m<sub>+3</sub>) bestimmt werden.

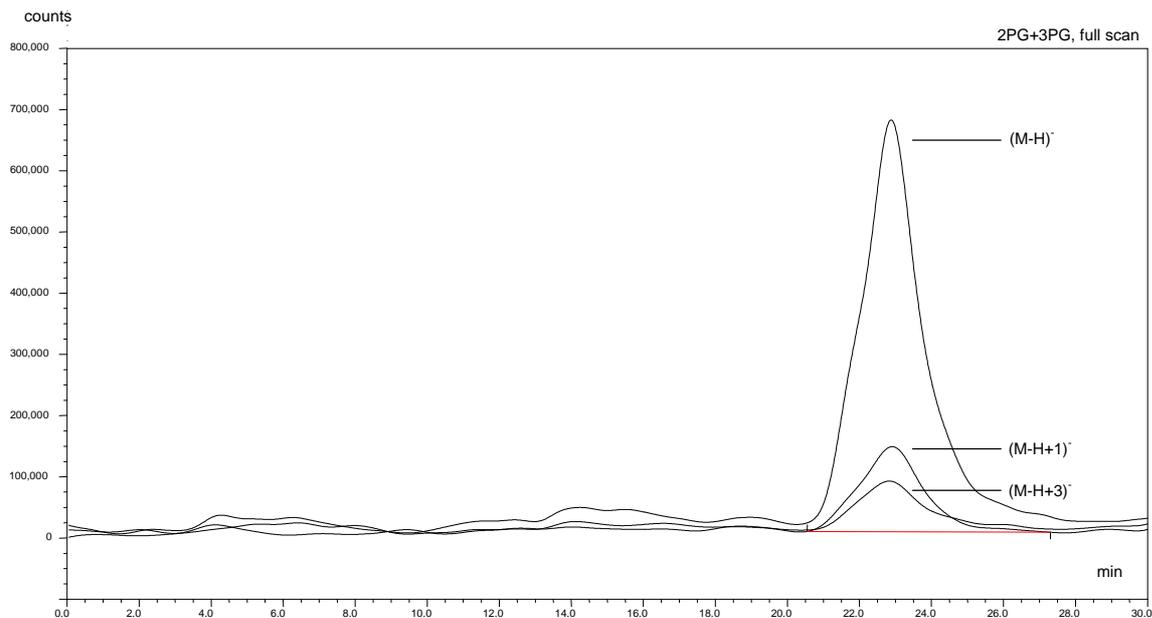
Bei der <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse haben sich die MS-Techniken gegenüber den NMR-Techniken weitgehend durchgesetzt (Wiechert *et al.*, 2005). Nachteile der NMR sind dabei die geringe Sensitivität (Wiechert *et al.*, 2005), der hohe experimentelle Aufwand bei Verwendung eines NMR-Bioreaktors (de Graaf *et al.*, 1992) sowie die schwierige Interpretierbarkeit der Messdaten (Wiechert, 2001; Wiechert *et al.*, 2001; Wiechert *et al.*, 2005). Aufgrund der langen Messzeiten zur Aufnahme eines Einzelspektrums (bis zu 10 min) und des damit verbundenen Problems schlechter Signal-Rausch-Verhältnisse sind NMR-Messungen im isotopisch instationären Zustand zudem sehr unsicher (Wiechert, 1995). Hinzu kommt, dass bei größeren Molekülen die Auswertung aufgrund von Spin-Spin-Kopplungen die Analyse von Multipletts erfordert, was bereits bei Molekülen mit mehr als drei C-Atomen außerordentlich schwierig ist (Christensen *et al.*, 1999). Gegenüber GC-MS Methoden sind LC-MS Technologien dabei insofern vorteilhaft, als mit einer Analysemethode Absolutkonzentrationen und Massenisotopomerenverteilungen von Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels ermittelt werden können. Eine aufwändige Probenaufarbeitung ist nicht erforderlich (Kapitel 4.2.7). Da die Analyse in den zentralen Kohlenstoffwechselwegen direkt auf Ebene der Metabolite stattfindet, entfällt das Problem unterschiedlicher Zeitskalen beim Turnover von Metaboliten und Proteinen (Wiechert *et al.*, 2005), so dass mit LC-MS prinzipiell sowohl der isotopisch stationäre als auch der isotopisch instationäre Zustand unmittelbar zugänglich sind. Markierungsdaten aus diesem isotopisch instationären Übergangsbereich können als zusätzliche Messinformationen für die Schätzung intrazellulärer Raten bei der isotopisch instationären

$^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse, die Gegenstand dieser Arbeit ist, genutzt werden (Kapitel 9). Lange und teure Experimente sowie eine Extrapolation zur Berechnung des isotopisch stationären Zustandes wie bei GC-MS sind nicht erforderlich (Kapitel 4.2.8). Die in dieser Arbeit durchgeführten GC-MS Messungen sind Gegenstand eines eigenen Kapitels (Kapitel 4). Soll mittels LC-MS das isotopisch instationäre Übergangsverhalten messtechnisch erfasst werden, so sind wegen des hohen Turnover von Metaboliten schnelle Probenahmeverfahren erforderlich (Kapitel 3).

Dieses Kapitel hat die LC-MS basierte Bestimmung von Massenisotopomerenverteilungen intrazellulärer Metabolite in *E. coli* zum Gegenstand. Es sollten die charakteristischen Markierungsmuster bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  sowohl im metabolisch und isotopisch stationären Fall als auch im metabolisch stationären und isotopisch instationären Fall quantitativ ermittelt werden. Bevor die entwickelte LC-MS Analysemethode (Kapitel 5) zur Quantifizierung von Massenisotopomerenverteilungen eingesetzt werden konnte, war zunächst zu klären, ob Konzentrationseffekte (Kapitel 6.2.1) oder Isotopenfraktionierung (Kapitel 6.2.2) zu Verzerrungen der Messungen führten. Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung von Massenisotopomeren sind für den metabolisch und isotopisch stationären Fall in Kapitel 6.3.1 und für den metabolisch stationären und isotopisch instationären Fall in Kapitel 6.3.2 dargestellt. Eine Zusammenfassung findet sich in Kapitel 6.4.

## 6.2 Material und Methoden

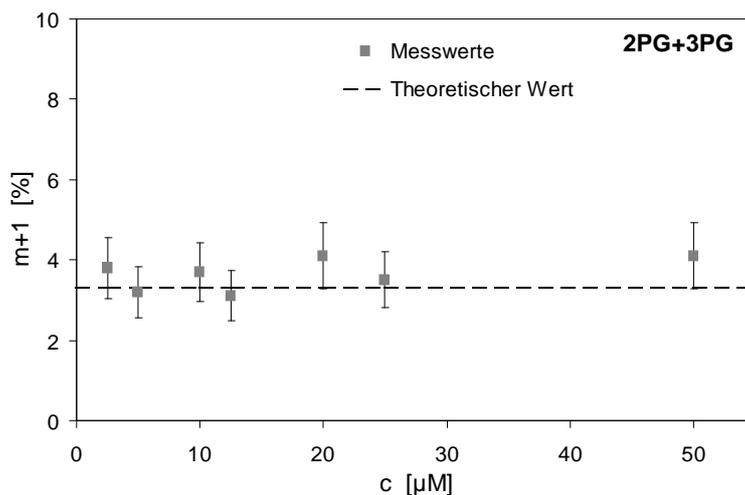
Die LC-MS Analyse erfolgte mit der in Kapitel 5 beschriebenen zweistufigen Trennmethode aus Ionenchromatografie und Massenspektrometrie mit den MS-Einstellungen gemäß Kapitel 5.2.1. Wird ein  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment durchgeführt, können bei einem Metabolit mit  $n$  C-Atomen neben dem Molekülpeak zur Quantifizierung der intrazellulären Metabolitkonzentration (Kapitel 5) insgesamt  $n+1$  Messinformationen zur Ermittlung der Massenisotopomerenverteilung extrahiert werden (Kapitel 6.1). Abbildung 6-2 zeigt exemplarisch ein Chromatogramm des 2PG+3PG Pools mit den Massenspuren  $(\text{M}-\text{H})^-$ ,  $(\text{M}-\text{H}+1)^-$  und  $(\text{M}-\text{H}+3)^-$ , nicht dargestellt ist die Massenspur für  $(\text{M}-\text{H}+2)^-$ . Aus den Peakflächen kann auf die relativen Massenisotopomere  $m_0$ ,  $m+1$ ,  $m+2$  und  $m+3$  geschlossen werden (Kapitel 6.2.3).



**Abbildung 6-2.** Bei 2PG+3PG (C3-Molekül) sind die Chromatogramme der extrahierten Massenspuren  $(M-H)^{-}$ ,  $(M-H+1)^{-}$ ,  $(M-H+2)^{-}$  und  $(M-H+3)^{-}$  die Basis für die Ermittlung von Massenisotopomerenverteilungen. Nicht dargestellt ist die  $(M-H+2)^{-}$  Massenspur.

### 6.2.1 Konzentrationseffekte

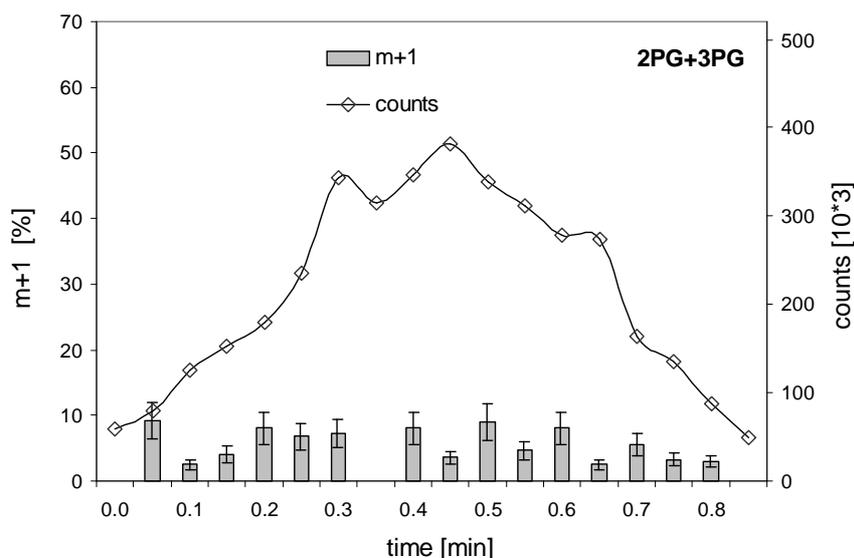
Bei den vorliegenden niedrigen Konzentrationen intrazellulärer Metabolite waren Konzentrationseffekte, die entstehen, wenn für eine Massenspur der lineare Bereich des Detektors überschritten wird, nicht zu erwarten. Hierzu wurden für die Metabolite G6P, F6P, FBP, DHAP, GAP, 2PG, 3PG, PEP, PYR, R5P, 6PG, Citrat, Succinat, Fumarat, Malat, AMP, ADP und ATP die Anteile natürlich vorkommender  $m+1$  Massenisotopomere bei unterschiedlichen Konzentrationen (2.5, 5, 10, 12.5, 20, 25, 50  $\mu\text{M}$ , Minimalmedium) mit LC-MS ermittelt. Im betrachteten Konzentrationsbereich bis zu 50  $\mu\text{M}$  traten für keinen der untersuchten Metabolite Konzentrationseffekte auf. Dies zeigt beispielhaft Abbildung 6-3 für den 2PG+3PG Pool.



**Abbildung 6-3.** Konzentrationseffekt bei LC-MS Analyse von 2PG+3PG. Dargestellt sind die gemessenen  $m+1$  Massenisotopomere bei Variation der Konzentration und Verwendung von natürlich markiertem 2PG+3PG. Der theoretische Wert von 3.3% konnte im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich innerhalb der Messgenauigkeit ermittelt werden.

### 6.2.2 Isotopenfraktionierung

Isotopenfraktionierung, das ist die Fraktionierung der verschiedenen Massenisotopomere innerhalb eines Analyselaufs, kann konzentrationsunabhängig auftreten (Kapitel 4.2.3). Untersucht wurden die natürlich vorkommenden Anteile der  $m+1$  Massenisotopomere von G6P, F6P, FBP, DHAP, GAP, 2PG, 3PG, PEP, PYR, R5P, 6PG, Citrat, Succinat, Fumarat, Malat, AMP, ADP und ATP zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb der Peakbasis jedes Metaboliten bei LC-MS Analytik. Im Gegensatz zur GC-MS Analytik (Kapitel 4.2.3) ist die Anzahl der theoretischen Trennstufen bei LC-MS gering. Für keinen der untersuchten Metabolite konnten Isotopenfraktionierungseffekte festgestellt werden. Dies zeigt exemplarisch Abbildung 6-4 für den 2PG+3PG Pool.



**Abbildung 6-4.** Isotopenfraktionierung von 2PG+3PG. Dargestellt sind die Anteile der natürlichen m+1 Massenisotopomere (linke y-Achse) zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb der Peakbasis. Eine Isotopenfraktionierung fand nicht statt. Die maximale Stärke des Messsignals (rechte y-Achse) wird in der Mitte der Peakbasis erreicht.

### 6.2.3 Quantifizierung von Massenisotopomeren

Massenisotopomere sind Isotopomere gleicher Masse, wobei ein Molekül mit n C-Atomen n+1 Massenisotopomere besitzt (Kapitel 6.1). Ausgangspunkt bei der Quantifizierung von Massenisotopomerenverteilungen bei einem  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment sind die n+1 extrahierten Massenspuren bei einem Molekül mit n C-Atomen. Dabei wird von dem einfach negativ geladenen Moleküllion  $(\text{M}-\text{H})^-$  ausgegangen, das die Massenspur des unmarkierten Moleküls darstellt. Für den Anteil des i-ten Massenisotopomers eines Moleküls mit n C-Atomen gilt allgemein Gleichung 6-1.

$$m + i = \frac{(\text{M} - \text{H} + i)^-}{\sum_{i=0}^n (\text{M} - \text{H} + i)^-} \quad (6-1)$$

Mit  $m_0$  wird derjenige Massenisotopomerenanteil bezeichnet, bei dem alle n C-Atome des betrachteten Moleküls unmarkiert als  $^{12}\text{C}$ -Isotope vorliegen. Der Massenisotopomerenanteil m+1 bedeutet, dass von den n C-Atomen ein C-Atom markiert ist, d. h. als  $^{13}\text{C}$ -Isotop vorliegt. Welches der n C-Atome dabei markiert ist, lässt sich mit LC-MS nicht unterscheiden. Bei dem Massenisotopomerenanteil m+2 sind beispielsweise zwei der n C-Atome markiert, bei dem Massenisotopomerenanteil m+3 sind es drei der n C-Atome.

Sind bei einem Molekül mit insgesamt  $n$  C-Atomen  $k$  C-Atome markiert, so existieren hierfür

$$\frac{n!}{k!(n-k)!} \quad (6-2)$$

mögliche Markierungsmuster. Diese sind mit LC-MS messtechnisch nicht unterscheidbar.

Als Beispiel sei 2PG+3PG mit  $n = 3$  C-Atomen betrachtet. Für die  $n + 1 = 4$  Massenisotopomere gilt

$$m_0 = \frac{(M-H)^-}{(M-H)^- + (M-H+1)^- + (M-H+2)^- + (M-H+3)^-}$$

$$m_{+1} = \frac{(M-H+1)^-}{(M-H)^- + (M-H+1)^- + (M-H+2)^- + (M-H+3)^-}$$

$$m_{+2} = \frac{(M-H+2)^-}{(M-H)^- + (M-H+1)^- + (M-H+2)^- + (M-H+3)^-}$$

$$m_{+3} = \frac{(M-H+3)^-}{(M-H)^- + (M-H+1)^- + (M-H+2)^- + (M-H+3)^-}$$

Die Summe der Massenisotopomerenanteile addiert sich dabei zu 1, da das Molekül entweder unmarkiert oder an einem, zwei bzw. drei C-Atomen  $^{13}\text{C}$ -markiert ist.

Die theoretischen Wahrscheinlichkeiten bei einer natürlichen Isotopomerenverteilung von  $^{12}\text{C}$  (98.892%) und  $^{13}\text{C}$  (1.108%) betragen bei Berücksichtigung von Gleichung 6-2 für die vier Massenisotopomere dieses Beispiels

$$m_0 = 0.98892^3 \approx 96.713\%$$

$$m_{+1} = 0.98892^2 \cdot 0.01108^1 \cdot 3 \approx 3.251\%$$

$$m_{+2} = 0.98892^1 \cdot 0.01108^2 \cdot 3 \approx 0.036\%$$

$$m_{+3} = 0.01108^3 \approx 0.0001\%$$

Bei der LC-MS Analyse wurden die betreffenden Massenspuren (Kapitel 5.2.4) extrahiert und die Verhältnisse der ermittelten Peakflächen zur Ermittlung der Massenisotopomerenanteile gemäß Gleichung 6-1 verwendet. Im Unterschied zur Metabolitquantifizierung bei der Ermittlung von Absolutkonzentrationen wurde die LC-MS Analyse sowohl im Fullscan-Modus (20 - 620 amu bei 0.5 scans/s) als auch im sensitiveren Selected Ion Monitoring- bzw. SIM-

Modus (zyklische Messung der definierten SIM Massenspuren, Messdauer jeweils 0.37 s) durchgeführt. In beiden Fällen wurde ausgehend vom Molekülpeak für jede Massenspur der Massenbereich  $\pm 0.5$  amu berücksichtigt. Bei sehr schwachen Signalen, z. B. bei den natürlich vorkommenden Massenisotopomerenverteilungen, wurde bei der Auswertung gegebenenfalls um das Rauschen korrigiert. Dies ist in Gleichung 6-1 nicht berücksichtigt. Da bei LC-MS im Gegensatz zu GC-MS keine Derivatisierung stattfindet, ist der Einfluss von Verzerrungen bei der massenspektrometrischen Detektion infolge von Massenisotopeneffekten (Kapitel 4.2.6) der nicht C-Skelett Atome wie Wasserstoff ( $^1\text{H}$  99.985%,  $^2\text{H}$  0.0155%) und Sauerstoff ( $^{16}\text{O}$  99.76%,  $^{17}\text{O}$  0.04%,  $^{18}\text{O}$  0.2%) erheblich geringer. Die Korrektur erfolgte dabei wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben, wobei die Messwertverzerrungen bei den Massenisotopomerenanteilen im Bereich  $<1\%$  lagen. Die quantitative Bestimmung relativer Massenisotopomerenanteile ist für jeden detektierbaren Metabolit getrennt aus jeder Einzelmessung möglich. Substanzabhängige Ionisierungseffizienzen und eine mit der Probenanzahl abnehmende Messpräzision sind im Gegensatz zur Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen (Kapitel 5.2.5) für die Quantifizierung unkritisch. Daher konnte bei der Ermittlung von Massenisotopomerenanteilen auf die Verwendung interner Standards verzichtet werden.

## 6.3 Ergebnisse

### 6.3.1 Metabolisch stationär, isotopisch stationär

Es wurden die isotopisch stationären Massenisotopomerenverteilungen von G6P+F6P, FBP, DHAP+GAP, 2PG+3PG, PEP, P5P und 6PG in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  bestimmt. Hierzu wurde die Versuchsanordnung nach Kapitel 2.2.3 verwendet und nach 6.5 Verweilzeiten das unmarkierte Medium durch markiertes Medium ersetzt (Kapitel 2.1.2). Das  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment zur LC-MS basierten Ermittlung isotopisch stationärer Massenisotopomerenverteilungen wurde parallel zu den GC-MS Analysen proteinogener (Kapitel 4.1.2) und freier (Kapitel 4.1.3) Aminosäuren durchgeführt. Probenahme, Quenching, Extraktion und Probenaufarbeitung erfolgten wie in Kapitel 3 beschrieben. Die Quantifizierung mit LC-MS erfolgte gemäß Kapitel 5.2. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6-1 zusammengefasst. Die Massenisotopomere von G6P+F6P, DHAP+GAP und 2PG+3PG sind gepoolt.

**Tabelle 6-1.** Massenisotopomere von Metaboliten in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ .

	m0	m+1	m+2	m+3	m+6
G6P+F6P	0.368 ± 0.018	0.282 ± 0.011	0.167 ± 0.018	0.080 ± 0.013	
FBP	0.254 ± 0.029	0.235 ± 0.013	0.173 ± 0.015	0.124 ± 0.013	0.071 ± 0.014
DHAP+GAP	0.534 ± 0.020	0.236 ± 0.017	0.134 ± 0.019	0.095 ± 0.010	
2PG+3PG	0.651 ± 0.031	0.159 ± 0.016	0.085 ± 0.011	0.114 ± 0.014	
PEP	0.589 ± 0.031	0.200 ± 0.028	0.094 ± 0.007	0.112 ± 0.012	
P5P <sup>a)</sup>	0.465 ± 0.033	0.227 ± 0.020			
6PG	0.352 ± 0.041	0.270 ± 0.035	0.061 ± 0.021	0.049 ± 0.009	0.172 ± 0.042

<sup>a)</sup> P5P Pentosephosphat Pool

Die Massenisotopomerenverteilungen der in Tabelle 6-1 angegebenen Metabolite entstammen dem gleichen  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment. Jede Probe wurde dreifach bestimmt. Es wurden drei verschiedene LC-MS Analyseläufe durchgeführt. Aufgrund der eingesetzten Glucosemischung bei den  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimenten (Kapitel 2.1.2) entstanden bei den Metaboliten mit mehr als drei C-Atomen die m+4 und m+5 Massenisotopomere in nur geringem Umfang. Wegen der damit verbundenen großen Messfehler (Variationskoeffizienten zwischen 20 und 60%) sind diese in Tabelle 6-1 nicht angegeben. Neben den Standardabweichungen (Tabelle 6-1) wurden auch die Variationskoeffizienten berechnet. Diese betragen bei G6P+F6P 5.0% (m0), 3.9% (m+1), 10.6% (m+2) und 15.9% (m+3), bei FBP 11.5% (m0), 5.5% (m+1), 8.7% (m+2), 10.8% (m+3) und 20.3% (m+6), bei DHAP+GAP 3.7% (m0), 7.1% (m+1), 14.0% (m+2) und 11.0% (m+3), bei 2PG+3PG 4.8% (m0), 10.3% (m+1), 13.3% (m+2) und 12.3% (m+3), bei PEP 5.2% (m0), 14.2% (m+1), 7.7% (m+2) und 11.1% (m+3), bei P5P 7.1% (m0) und 8.6% (m+1) sowie bei 6PG 11.5% (m0), 13.1% (m+1), 34.5% (m+2), 18.0% (m+3) und 24.4% (m+6). Eine quantitative Bestimmung der Massenisotopomere von PYR, Citrat, AMP, ADP und ATP war nicht möglich. Niedrige Messfehler lagen bei der verwendeten Markierung im allgemeinen für die m0 und m+1 Massenisotopomere vor, deren Anteile gegenüber den m+2, m+3 und m+6 Massenisotopomeren relativ groß waren. Dies führte bei P5P dazu, dass bei diesem C5-Molekül eine Quantifizierung nur der m0 und m+1 Massenisotopomere möglich war.

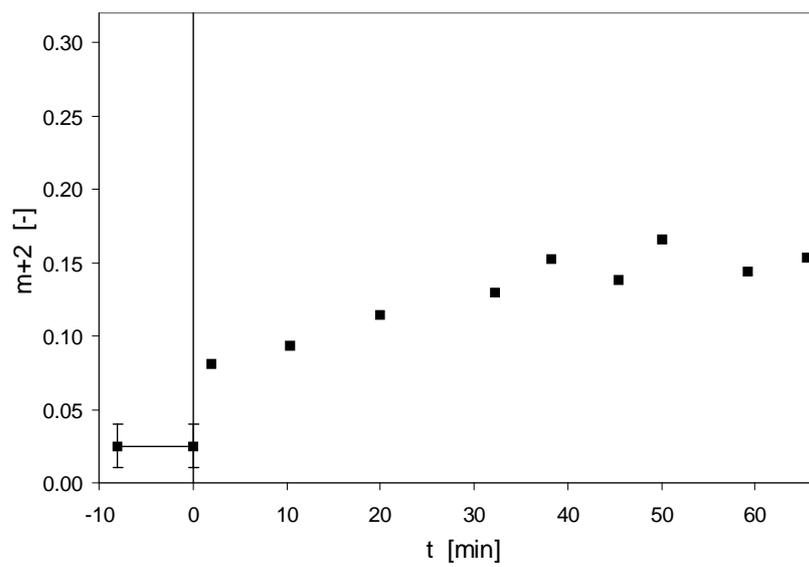
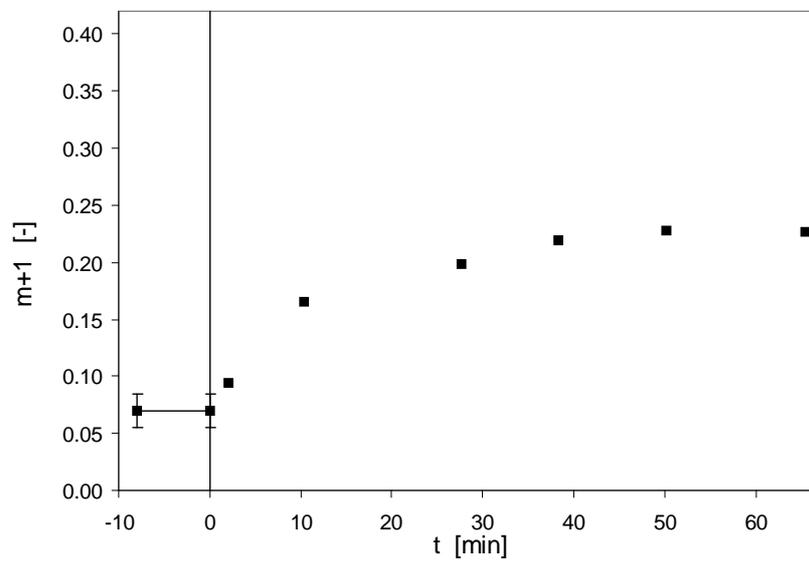
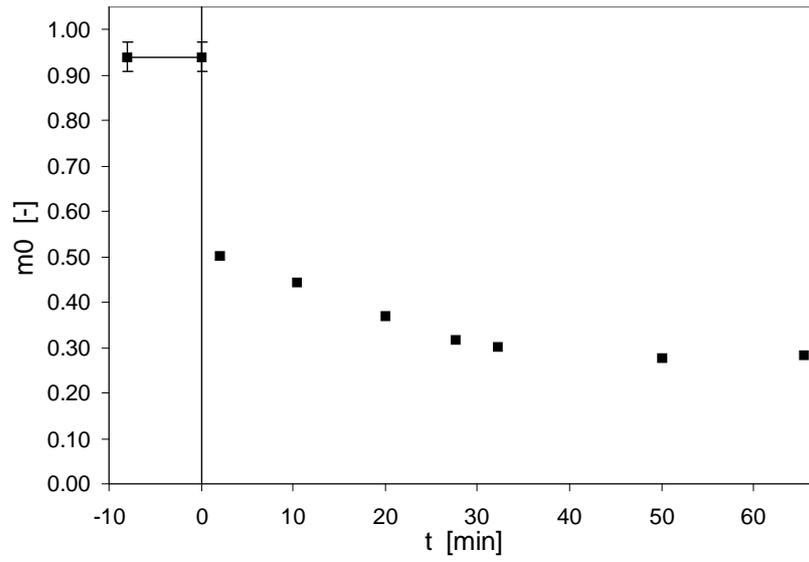
Im Vergleich zur GC-MS Analyse proteinogener Aminosäuren (Kapitel 4.3.1) waren die Messfehler bei LC-MS Analyse infolge der niedrigen intrazellulären Metabolitkonzentrationen erwartungsgemäß größer. Gegenüber der GC-MS Analyse freier Aminosäuren (Kapitel 4.3.2) konnten die Markierungsmuster dagegen genauer bestimmt werden, insbesondere konnten mehr Metabolite quantifiziert werden.

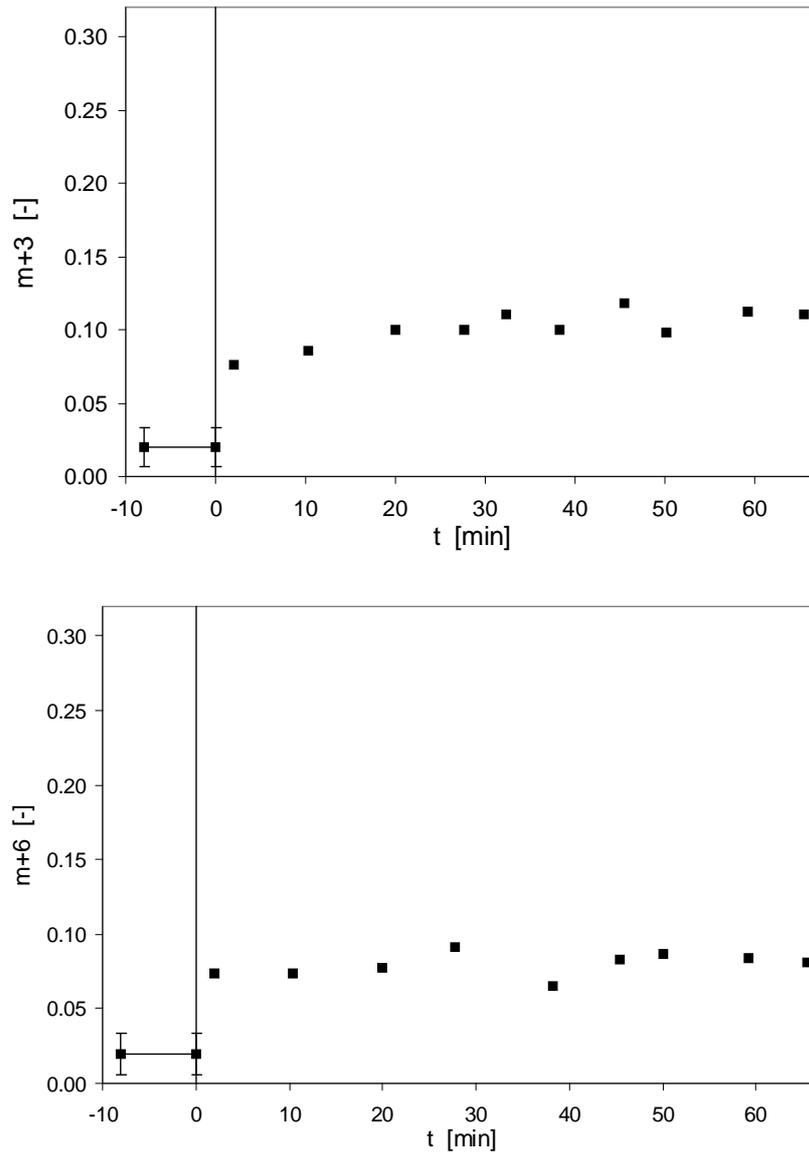
Bei LC-MS Analyse mittels eines Tripel-Quadrupol konnte van Winden (van Winden *et al.*, 2005) in der Hefe *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D außerdem Massenisotopomere von E4P und S7P quantitativ bestimmen. In anderen Untersuchungen konnten mit LC-MS<sup>n</sup> Technologien auch Massenisotopomere von Citrat, Glyoxylat, Succinat, Fumarat und Malat im Tricarbonsäure-Zyklus quantifiziert werden (van Winden, 2002). Allerdings konnten auch mit diesen

LC-MS<sup>n</sup> Analysemethoden bei einem Metabolit mit  $n$  C-Atomen nicht alle  $n+1$  Massenisotopomere bestimmt werden. Welche Metabolite quantitativ bestimmt werden können, hängt neben der LC-MS bzw. LC-MS<sup>n</sup> Analysemethode auch von Kultivierungsbedingungen, <sup>13</sup>C-Markierungsexperiment, Probenaufarbeitung und insbesondere vom untersuchten Mikroorganismus ab. So konnten bei Proben der Hefe *S. cerevisiae* WCG4 (Rühl, 2004) Massenspuren der Metabolite PYR, S7P, Citrat, Glyoxylat, Succinat, Fumarat, Malat und OAA extrahiert werden, die im Gegensatz zu *E. coli* W3110 quantitativ auswertbar waren.

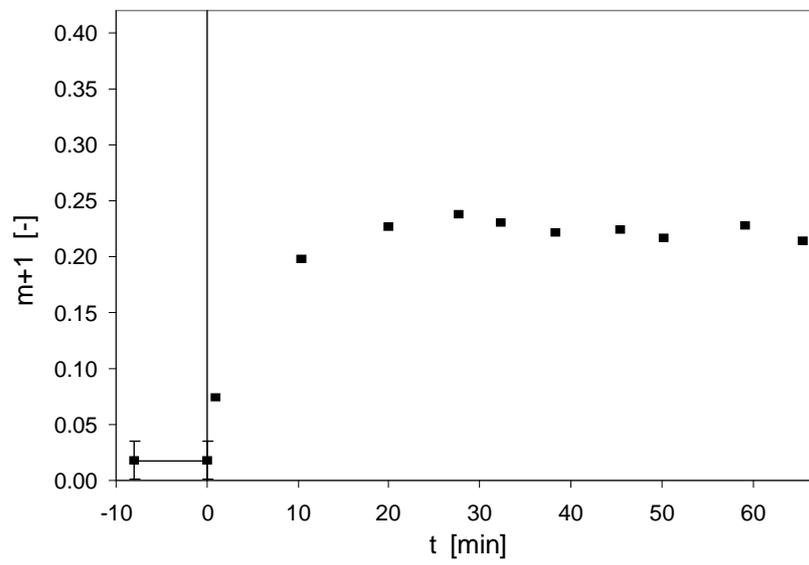
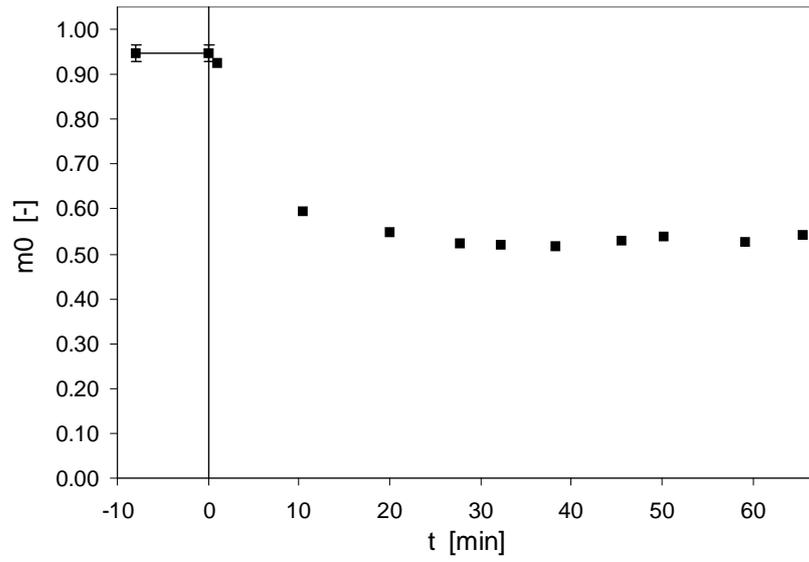
### 6.3.2 Metabolisch stationär, isotopisch instationär

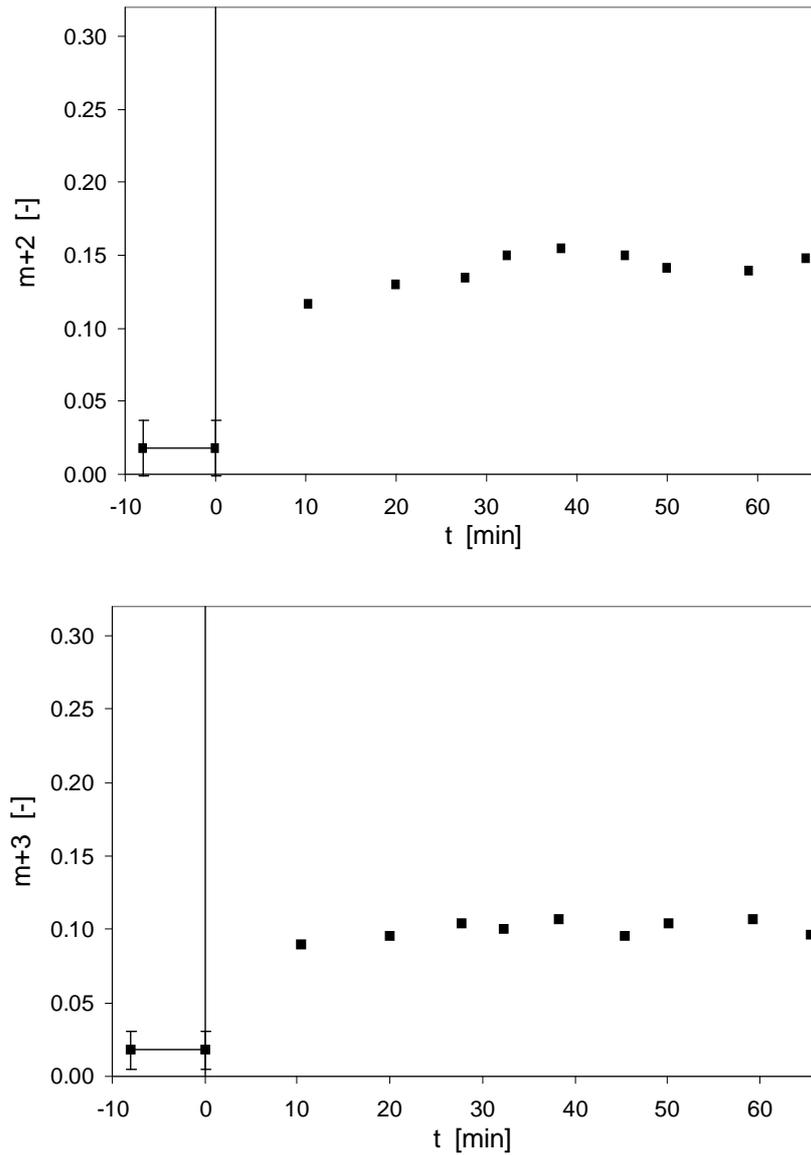
Es sollten die isotopisch instationären Markierungsdynamiken der Massenisotopomere von G6P+F6P, FBP, DHAP+GAP, 2PG+3PG, PEP, P5P und 6PG in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  bestimmt werden. Hierzu wurde die Versuchsanordnung nach Kapitel 2.2.3 verwendet und nach 6.5 Verweilzeiten das unmarkierte Medium durch markiertes Medium ersetzt (Kapitel 2.1.2). Ein <sup>13</sup>C-Markierungsexperiment zur LC-MS basierten Ermittlung der isotopisch instationären Markierungsdynamiken (Markierungsexperiment M1) wurde parallel zur LC-MS basierten Ermittlung des isotopisch stationären Zustandes (Kapitel 6.3.1) sowie parallel zu den GC-MS Analysen proteinogener (Kapitel 4.1.2) und freier Aminosäuren (Kapitel 4.1.3) durchgeführt. Es wurden Messungen in einem Zeitbereich bis ca. 5 h nach Medienumstellung durchgeführt. In zwei weiteren <sup>13</sup>C-Markierungsexperimenten (Markierungsexperimente M2 und M3) wurde der Zeitbereich bis 60 min nach Medienumstellung untersucht. Die isotopisch instationären Markierungsdynamiken der Massenisotopomere von FBP, DHAP+GAP, 2PG+3PG, PEP und P5P dieser Experimente zeigen Abbildung 6-5 bis Abbildung 6-12. Die Ergebnisse des ersten <sup>13</sup>C-Markierungsexperimentes (M1) sind bis 65 min nach Medienumstellung dargestellt. Die Ergebnisse der beiden weiteren <sup>13</sup>C-Markierungsexperimente (M2 und M3), die durch eine hohe Probenahmefrequenz in einem Zeitbereich bis 60 min gekennzeichnet sind, sind bis 10 min nach Medienumstellung dargestellt. Probenahme, Quenching, Extraktion und Probenaufarbeitung erfolgten wie in Kapitel 3 beschrieben. Die LC-MS Analyse erfolgte gemäß Kapitel 5.2.



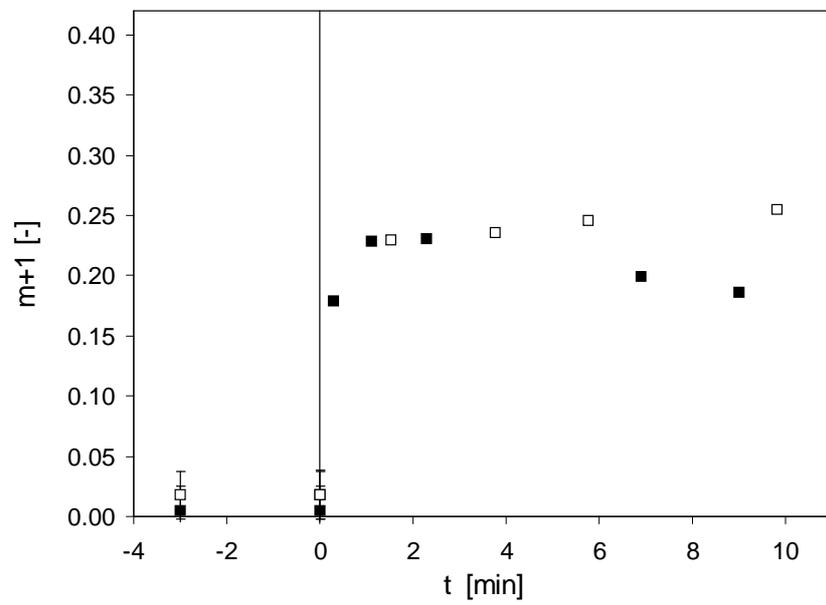
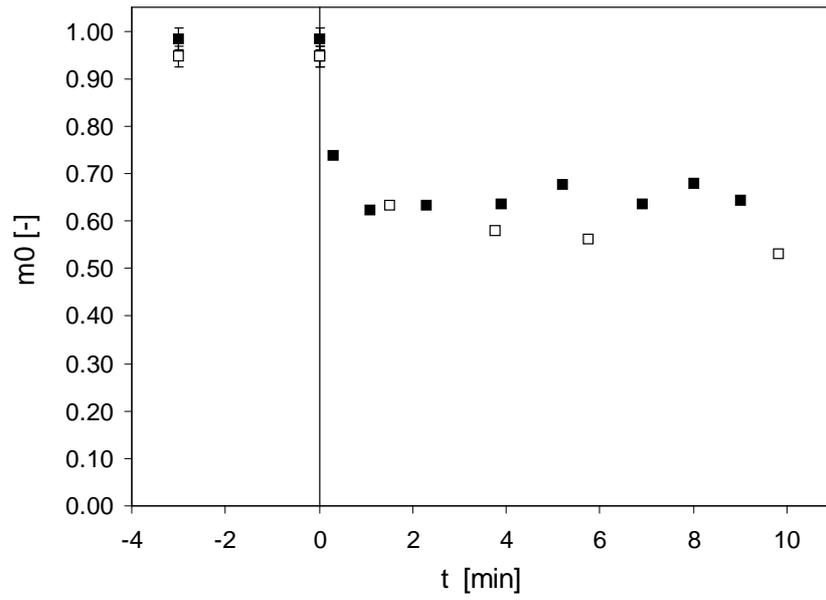


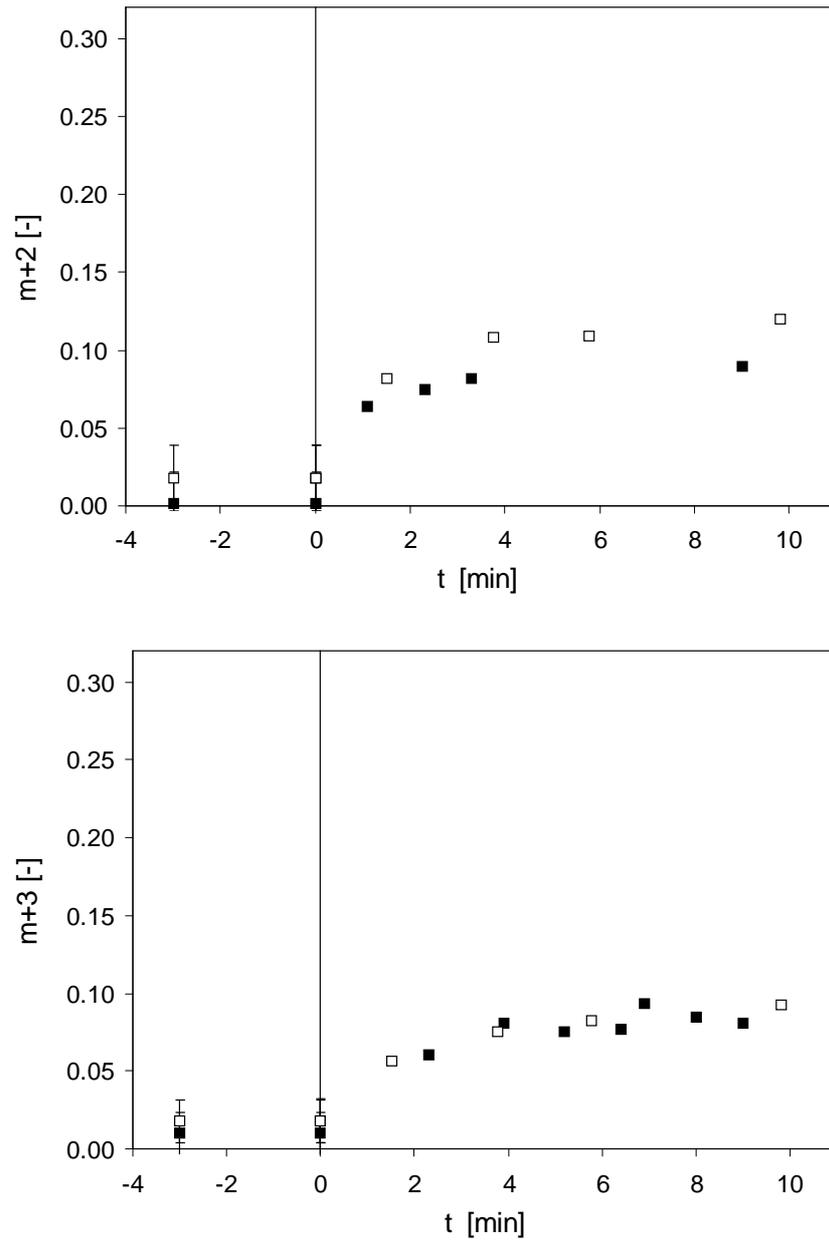
**Abbildung 6-5.** Isotopisch instationäre Markierungsdynamik der m0, m+1, m+2, m+3 und m+6 Massen-isotopomere von FBP in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  im Zeitbereich bis 65 min nach Beginn des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimentes (Markierungsexperiment M1).



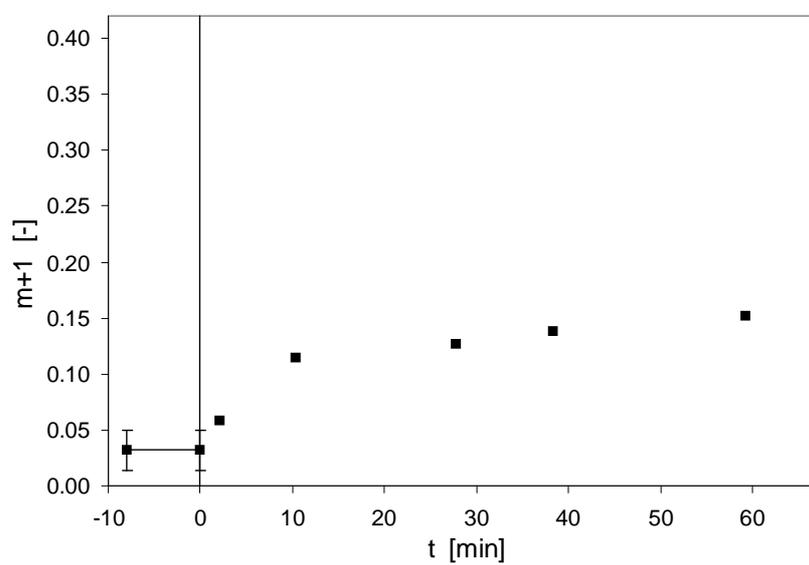
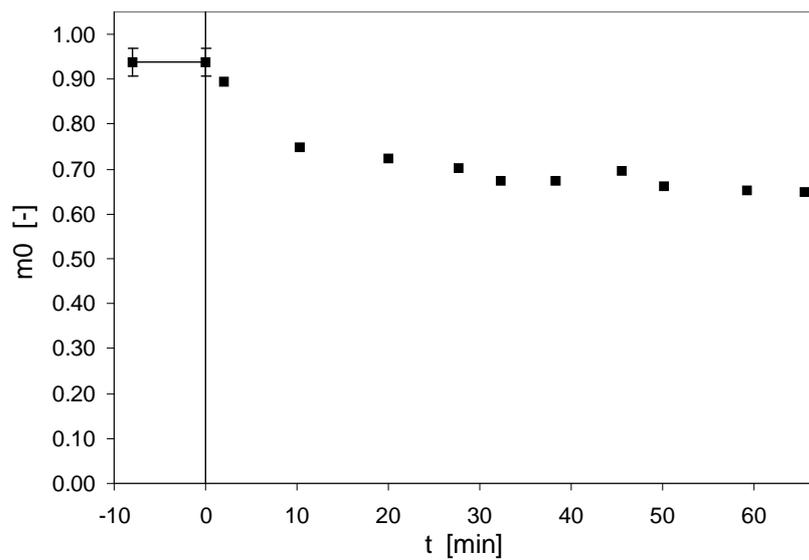


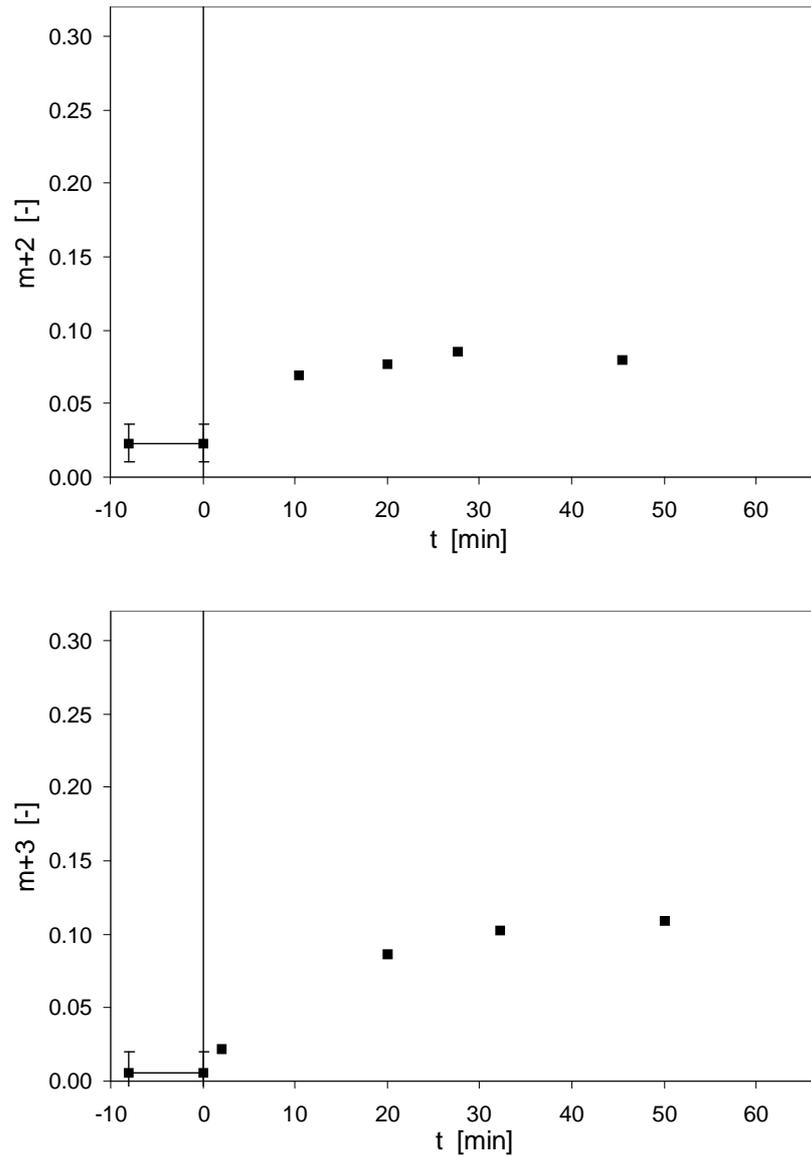
**Abbildung 6-6.** Isotopisch instationäre Markierungsdynamik der m0, m+1, m+2 und m+3 Masseniso-  
topomere von DHAP+GAP in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  im Zeitbereich bis 65 min nach Beginn des <sup>13</sup>C-  
Markierungsexperimentes (Markierungsexperiment M1).



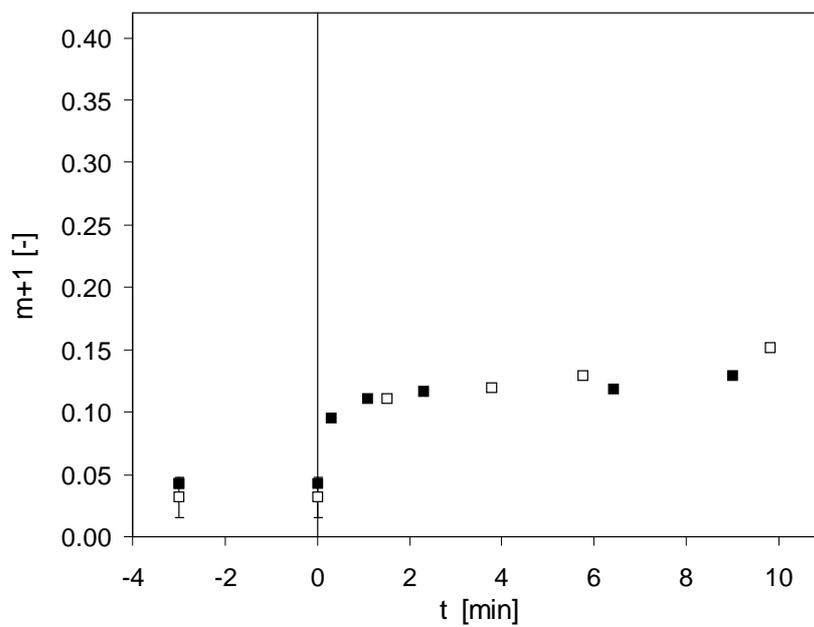
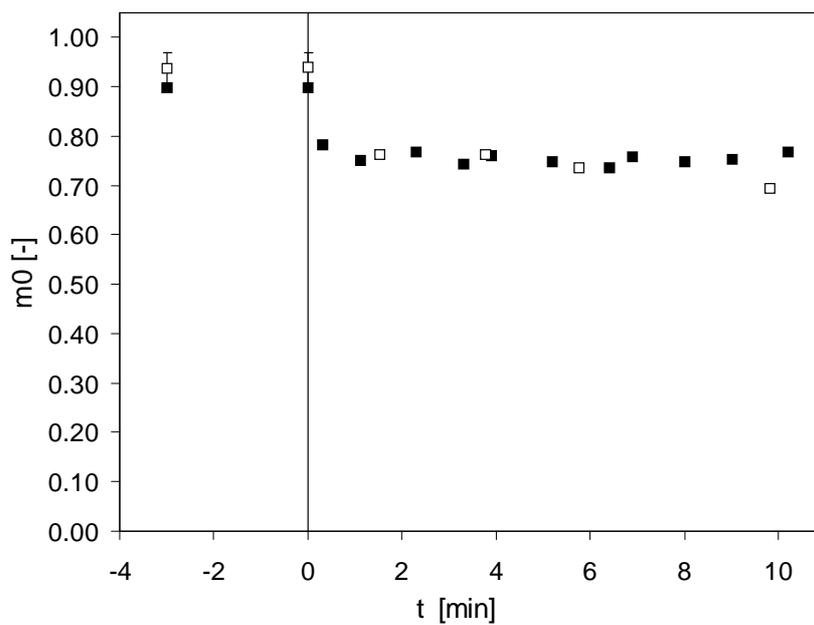


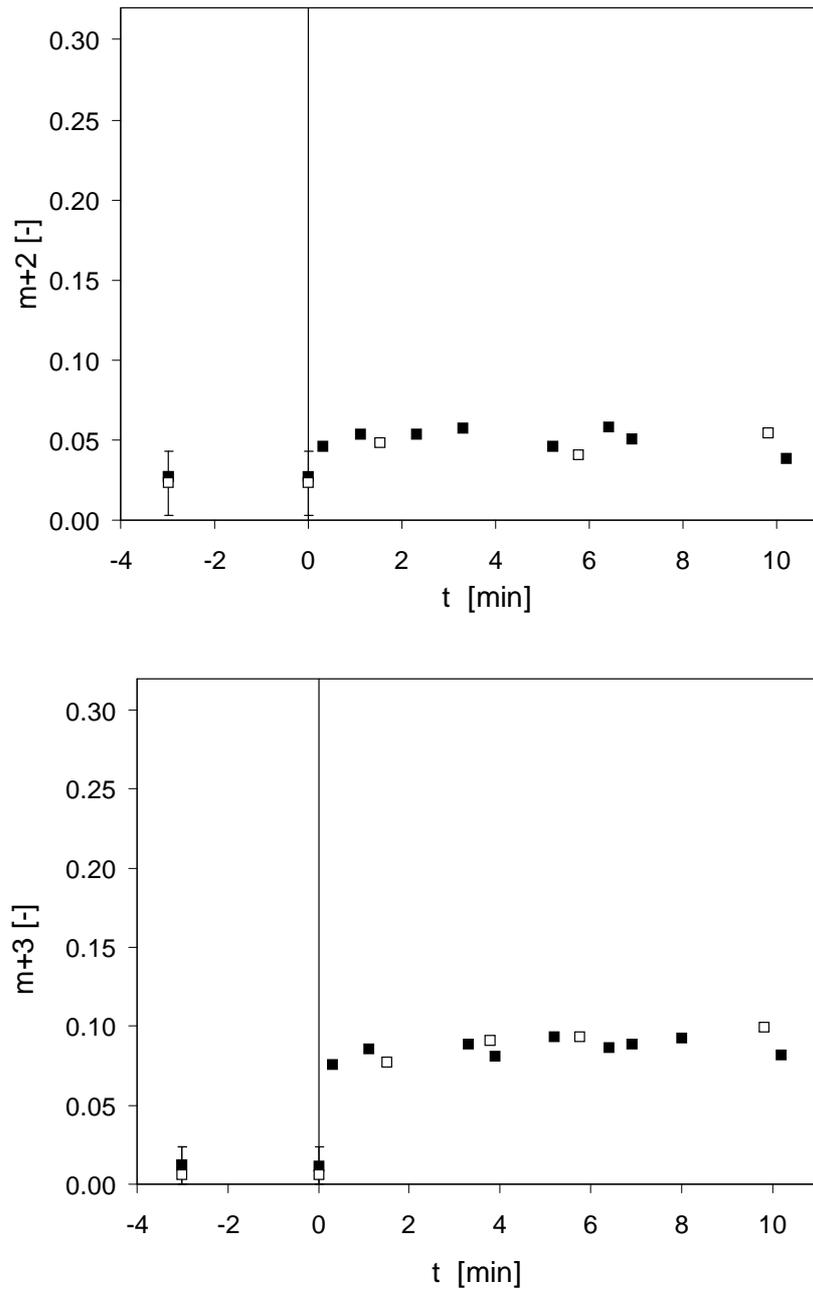
**Abbildung 6-7.** Isotopisch instationäre Markierungsdynamik der m0, m+1, m+2 und m+3 Masseniso-  
topomere von DHAP+GAP in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  im Zeitbereich bis 10 min nach Beginn des  $^{13}\text{C}$ -  
Markierungsexperimentes. Es wurden zwei unabhängige  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente ( $\square$  Markier-  
ungsexperiment M2 bzw.  $\blacksquare$  Markierungsexperiment M3) durchgeführt.



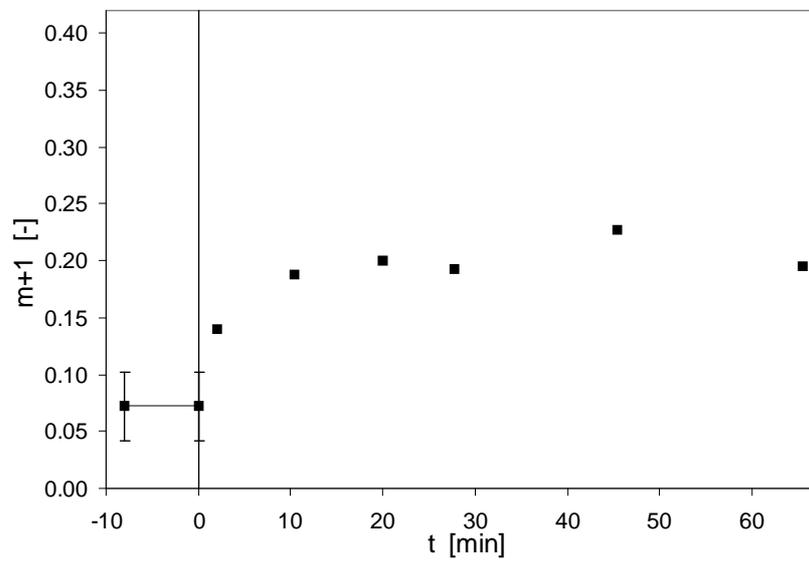
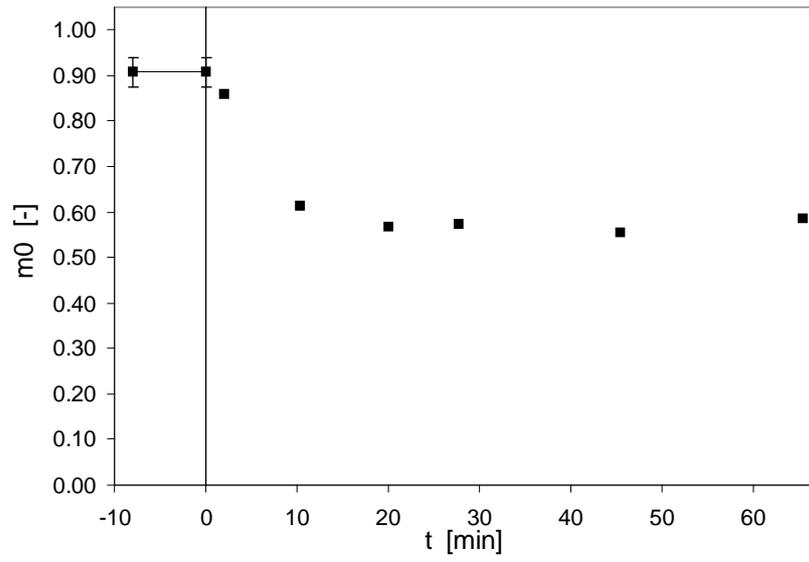


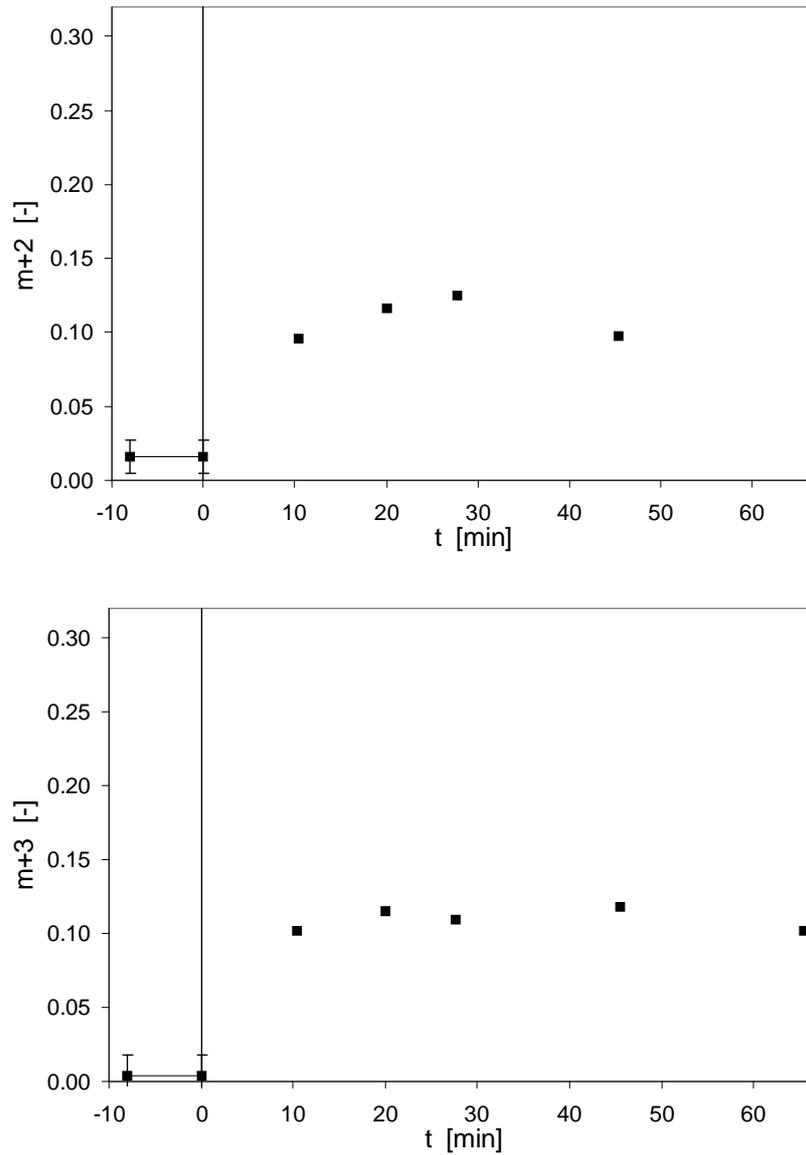
**Abbildung 6-8.** Isotopisch instationäre Markierungsdynamik der m0, m+1, m+2 und m+3 Massen-isotopomere von 2PG+3PG in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  im Zeitbereich bis 65 min nach Beginn des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimentes (Markierungsexperiment M1).



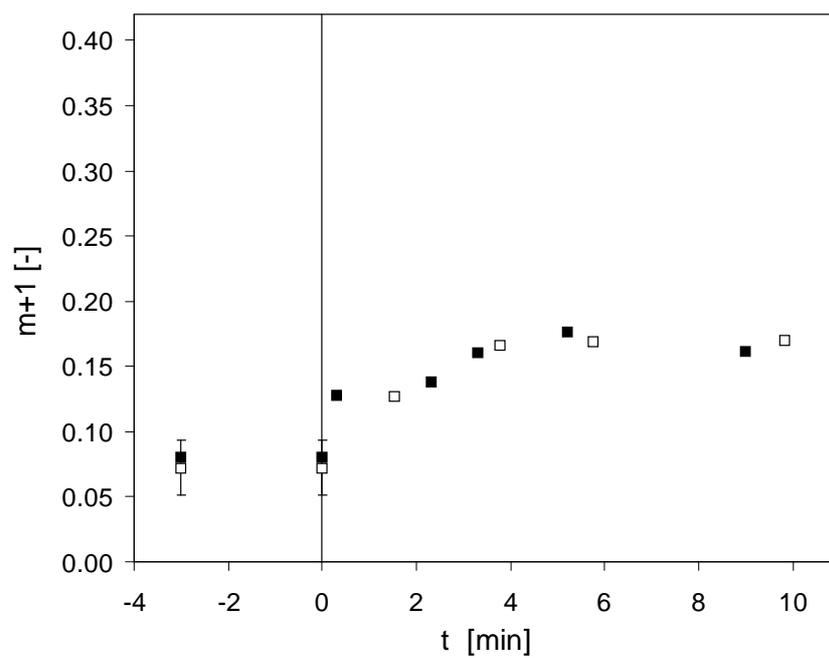
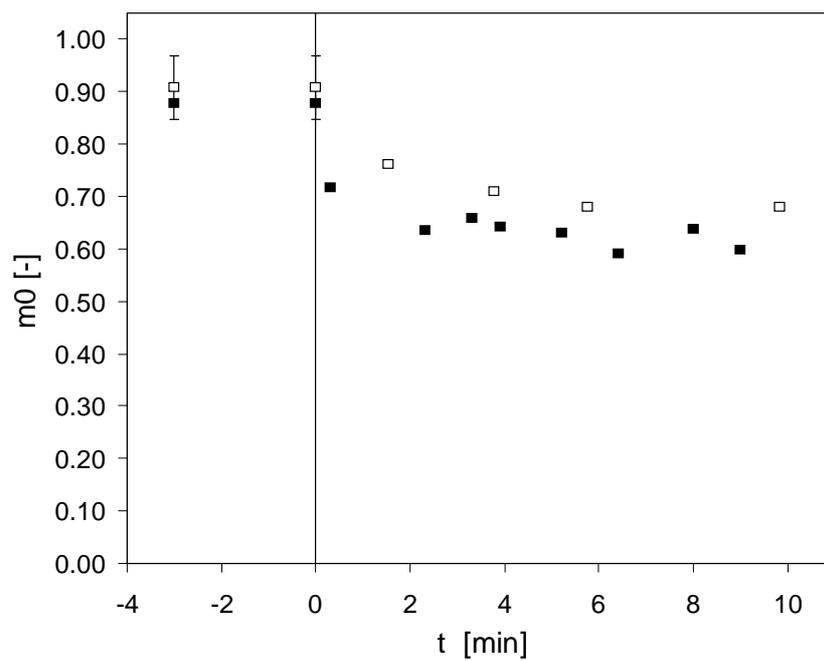


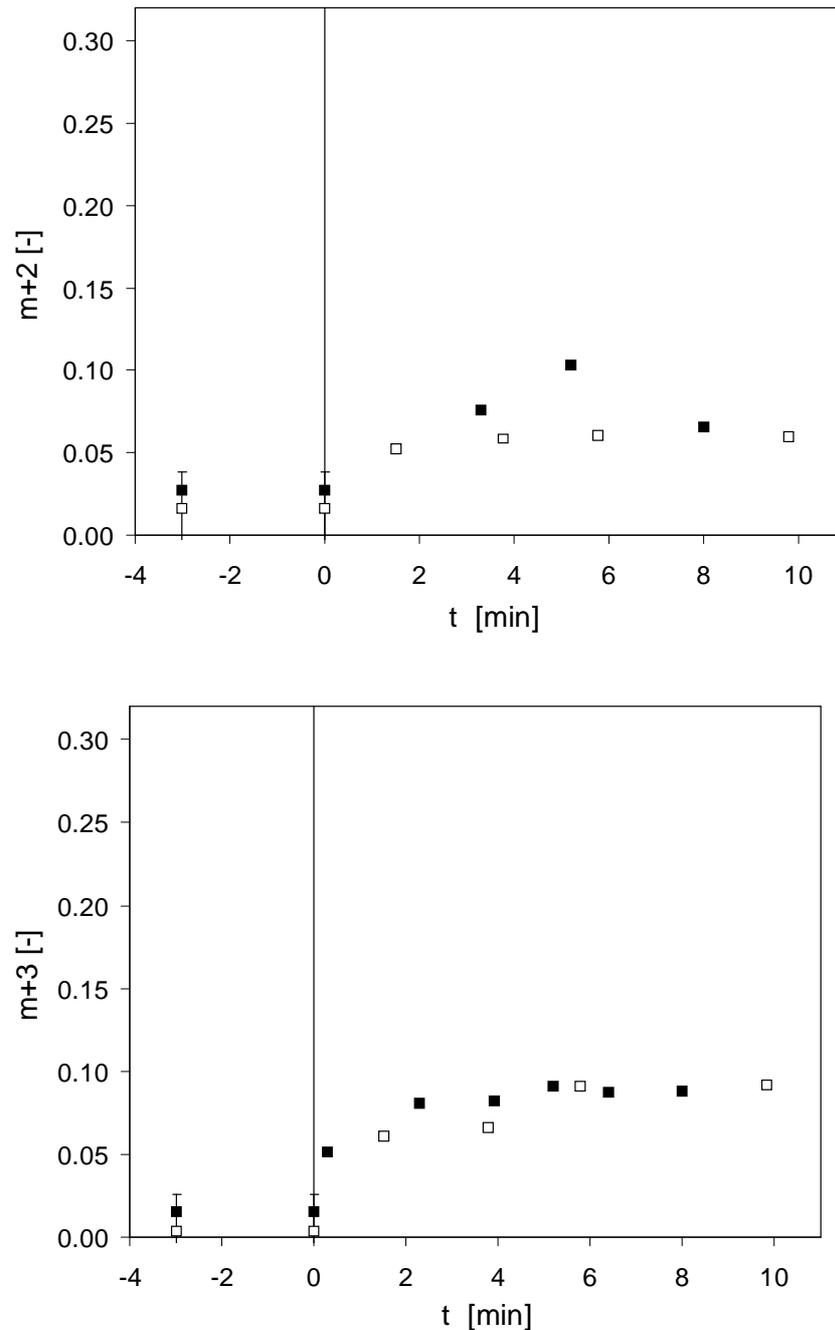
**Abbildung 6-9.** Isotopisch instationäre Markierungsdynamik der m0, m+1, m+2 und m+3 Massen-isotopomere von 2PG+3PG in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  im Zeitbereich bis 10 min nach Beginn des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimentes. Es wurden zwei unabhängige  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente ( $\square$  Markierungsexperiment M2 bzw.  $\blacksquare$  Markierungsexperiment M3) durchgeführt.



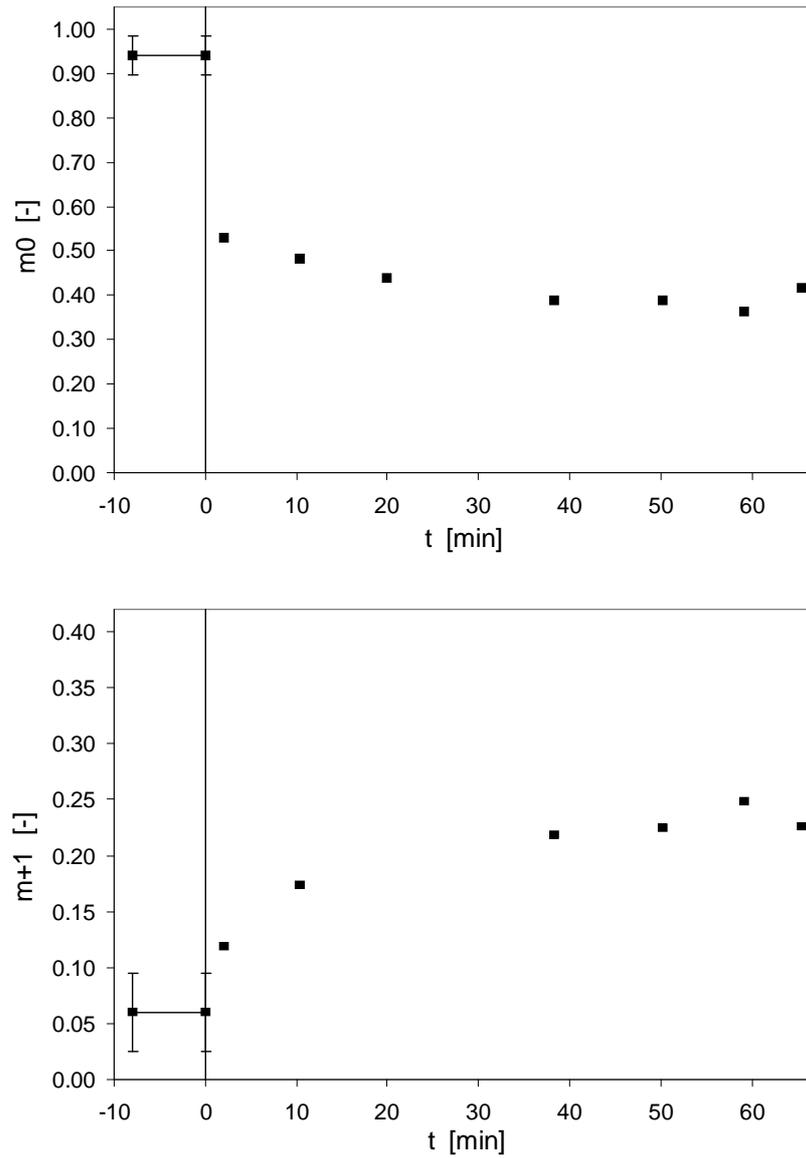


**Abbildung 6-10.** Isotopisch instationäre Markierungsdynamik der  $m_0$ ,  $m+1$ ,  $m+2$  und  $m+3$  Massen-isotopomere von PEP in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  im Zeitbereich bis 65 min nach Beginn des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimentes (Markierungsexperiment M1).





**Abbildung 6-11.** Isotopisch instationäre Markierungsdynamik der  $m_0$ ,  $m+1$ ,  $m+2$  und  $m+3$  Massen-isotopomere von PEP in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  im Zeitbereich bis 10 min nach Beginn des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimentes. Es wurden zwei unabhängige  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente (□ Markierungsexperiment M2 bzw. ■ Markierungsexperiment M3) durchgeführt.



**Abbildung 6-12.** Isotopisch instationäre Markierungsdynamik der  $m_0$  und  $m_{+1}$  Massenisotopomere von P5P in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  im Zeitbereich bis 65 min nach Beginn des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimentes (Markierungsexperiment M1).

Die Ergebnisse der Massenisotopomerenverteilungen nach Erreichen des isotopisch stationären Zustandes waren in guter Übereinstimmung mit den zuvor ermittelten Werten (Kapitel 6.3.1). Aus den Messungen des Markierungsexperimentes M1 folgte, dass der isotopisch stationäre Zustand von FBP, DHAP+GAP, 2PG+3PG, PEP und P5P in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  in weniger als ca. 20 min erreicht wird. Die Ergebnisse von DHAP+GAP, 2PG+3PG und PEP deuteten auf noch kürzere Zeitkonstanten hin. Allerdings war die Probenahmefrequenz des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimentes M1 mit drei Messpunkten innerhalb der ersten 20 min nach Medienumstellung für genauere Aussagen zu niedrig.

Problematisch bei der quantitativen Bestimmung der Massenisotopomere von FBP und P5P war, dass es sich bei diesen Metaboliten um C-6 bzw. C-5 Moleküle handelte, deren m+4 und m+5 bzw. m+2, m+3, m+4 und m+5 Massenisotopomere nur in geringem Umfang entstanden und deren Messsignale teilweise verwaschen waren, was für die Quantifizierung von Massenisotopomerenverteilungen nachteilig ist (Kapitel 6.3.1). Dieser Umstand kann auch ursächlich dafür sein, dass die Ergebnisse von FBP bei den m0, m+1 und m+2 Massenisotopomeren auf ein langsames, bei den m+3 und m+6 Massenisotopomeren dagegen auf ein schnelleres Erreichen des isotopisch stationären Zustandes hindeuteten. Nicht quantitativ bestimmt werden konnten die isotopisch instationären Markierungsdynamiken von G6P+F6P und 6PG, obwohl die isotopisch stationären Massenisotopomere dieser Metabolite quantifiziert werden konnten (Tabelle 6-1). Als Grund hierfür ist das relative starke Rauschen bei den betreffenden Massenspuren dieser beiden Metabolite anzuführen, das insbesondere beim Markierungsaufbau und den damit verbundenen noch niedrigen Massenisotopomerenanteilen besonders stark ins Gewicht fällt. Die  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente M2 und M3 wurden mit höherer Probenahmefrequenz durchgeführt. Die Ergebnisse dieser beiden Experimente waren mit Ausnahme geringfügiger Abweichungen der m0 und m+1 Massenisotopomere von 2PG+3PG und des m+2 Massenisotopomers von PEP in guter Übereinstimmung mit dem Markierungsexperiment M1. Die  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente M2 und M3 zeigten insgesamt eine gute Reproduzierbarkeit von experimenteller Durchführung und LC-MS basierter Quantifizierung von Massenisotopomeren. Abweichungen einzelner Messpunkte wurden bei den m0 und m+1 Massenisotopomeren von DHAP+GAP festgestellt, die, da es sich um singuläre Messpunkte einzelner Massenspuren handelte, vermutlich auf die chromatografische Auswertung zurückzuführen sind. Der erste Messpunkt bei 20 s nach Medienumstellung beim Markierungsexperiment M3 ist als kritisch zu betrachten wie die ermittelten m0 und m+1 Massenisotopomere von PEP zeigen. Im Gegensatz zu dem Markierungsexperiment M1 konnten die Markierungsdynamiken von FBP und P5P bei den Experimenten M2 und M3 nicht bestimmt werden. Als Ursache wurde eine unzureichende ionenchromatografische Auftrennung vermutet. Im Hinblick auf das Erreichen des isotopisch stationären Zustandes ist bei den untersuchten Metaboliten von niedrigen Zeitkonstanten

auszugehen. So wurde isotopische Stationarität bei DHAP+GAP nach ca. 2-4 min, bei 2PG+3PG nach ca. 2-3 min und bei PEP nach ca. 3-5 min nach Beginn des Markierungsexperimentes erreicht.

Mittels intrazellulärer Absolutkonzentrationen und Flussverteilungen wurden bei einer Verdünnungsrate von  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  Zeitkonstanten zur Erreichung eines isotopisch stationären Zustandes in den Pools der zentralen Kohlenstoffwechselwege Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus zwischen 30 und 40 min geschätzt (Dauner *et al.*, 2001a; van Winden *et al.*, 2005; Wiechert *et al.*, 2005). Bei LC-MS basierter Untersuchung isotopisch stationärer Markierungsmuster in der Hefe *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D wurde isotopische Stationarität bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  nach 40 min festgestellt (van Winden *et al.*, 2005), wobei Messungen bei  $t = 40 \text{ min}$  und  $60 \text{ min}$  nach Beginn des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimentes durchgeführt worden sind. Mit großen Zeitkonstanten ist dabei vor allem im Tricarbonsäure-Zyklus zu rechnen (Grotkjaer *et al.*, 2004). Vorteile der LC-MS basierten Bestimmung von Massenisotopomeren sind, dass auf Annahmen bei der Aminosäuresynthese (z. B. mehrere, alternative Synthesewege) oder bei der Kompartimentierung von Stoffwechselwegen in Eukaryonten verzichtet werden kann (van Winden *et al.*, 2005). Außerdem können Messungen in Zellsystemen mit nur sehr geringen Proteinbiosyntheseraten wie tierische Zellkulturen durchgeführt werden. Jedoch ist die Annahme zu treffen, dass der Protein-Turnover vernachlässigbar klein ist (Wiechert *et al.*, 2005). Der Turnover von Metaboliten ist im Vergleich zum Turnover von Proteinen um ca. zwei bis drei Größenordnungen größer (Wiechert *et al.*, 2005). Die Durchführung isotopisch instationärer Stoffflussanalysen wurde von Wiechert (Wiechert *et al.*, 2005) diskutiert. Die Annahme, dass bei einem  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment der Protein-Turnover vernachlässigbar klein gegenüber dem Turnover von Metaboliten ist, ist umso eher gerechtfertigt, je kürzer die Markierungsdauer gewählt wird. Auch vor dem Hintergrund dieser Zeitkonstanten sind möglichst kurze isotopisch stationäre und isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente mit LC-MS Messung von Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels anzustreben.

## 6.4 Zusammenfassung

Kapitel 6 hatte die LC-MS basierte quantitative Bestimmung der Massenisotopomere von Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  im isotopisch stationären und isotopisch instationären Zustand zum Gegenstand. Da weder Konzentrationseffekte auftraten noch Isotopenfraktionierung bei der Analyse beobachtet wurde, konnte die bereits in Kapitel 5 beschriebene und für die Bestimmung von Absolutkonzentrationen verwendete LC-MS Analyseverfahren auch zur Quantifizierung von Massenisotopomeren

benutzt werden. Im metabolisch und isotopisch stationären Zustand wurden insgesamt 28 Massenisotopomere der Metabolite G6P+F6P, FBP, DHAP+GAP, 2PG+3PG, PEP, P5P und 6PG quantitativ bestimmt. Die Markierungsdynamiken unter metabolisch stationären und isotopisch instationären Bedingungen konnten von FBP, DHAP+GAP, 2PG+3PG, PEP und P5P ermittelt werden, wobei die Massenisotopomere der Metabolite DHAP+GAP, 2PG+3PG und PEP mit einer zeitlichen Auflösung von bis zu  $1 \text{ min}^{-1}$  bestimmt wurden. Als für die Markierungsdynamik in den zentralen Kohlenstoffwechselwegen Glykolyse und Pentosephosphat-Weg in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  besonders interessant erwies sich dabei der Zeitbereich kleiner als 10 min nach Beginn des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimentes. Insgesamt wurden die Markierungsdynamiken von 19 Massenisotopomeren quantifiziert. Die Zeitkonstanten zur Erreichung des isotopisch stationären Zustandes betragen bei den gemessenen Metaboliten aus Glykolyse und Pentosephosphat-Weg in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  zwischen 2 und 5 min.

Mit der Versuchsanlage zur Durchführung von  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimenten, dem integrierten Probenahmeverfahren und der etablierten LC-MS Analyseverfahren waren die experimentellen und analytischen Voraussetzungen zur quantitativen Bestimmung von intrazellulären Absolutkonzentrationen (Kapitel 5) sowie von Massenisotopomerenverteilungen sowohl im metabolisch und isotopisch stationären als auch im metabolisch stationären und isotopisch instationären Zustand geschaffen. Die in den Kapiteln 5 und 6 dargestellten Messergebnisse konnten damit für die isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse verwendet werden (Kapitel 9). Vom Einsatz hochsensitiver LC-MS<sup>n</sup> Technologien ist zu erwarten, dass in Zukunft die Anzahl quantifizierbarer Metabolite weiter zunehmen wird (van Winden *et al.*, 2005).

## 6.5 Vergleich der Analysemethoden

Die verwendeten massenspektrometrischen LC-MS und GC-MS Analysemethoden sollen abschließend tabellarisch gegenübergestellt werden (Tabelle 6-2).

**Tabelle 6-2.** Vergleich von LC-MS und GC-MS Analysemethoden.

	LC-MS		GC-MS	
	isotopisch stationär	isotopisch instationär	isotopisch stationär	isotopisch instationär
<b>Probenaufarbeitung</b>				
saure Hydrolyse	nein	nein	ja	nein
Derivatisierung	nein	nein	ja	ja
<b>Messungen</b>				
gemessene Substanzen	G6P+F6P, FBP, DHAP+GAP, 2PG+3PG, PEP, P5P <sup>a)</sup> , 6PG		15 proteinogene Aminosäuren	freie Aminosäuren (Alanin, Glutamat)
Absolutkonzentration	ja <sup>b)</sup>	ja <sup>b)</sup>	nein	nein
Massenisotopomere	ja	ja	ja	ja <sup>c)</sup>

<sup>a)</sup> Pentosephosphat Pool

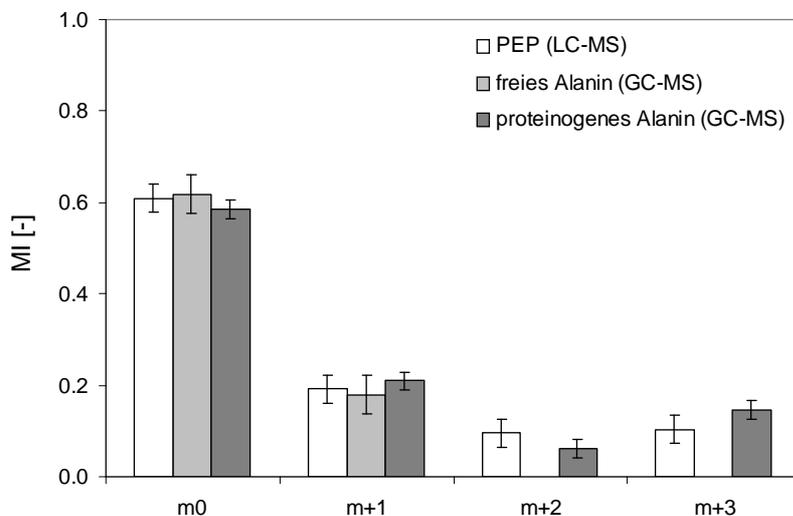
<sup>b)</sup> nicht während eines Markierungsexperimentes

<sup>c)</sup> nicht für isotopisch instationäre <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse verwendbar

Die LC-MS Analytik war die einzige Messmethode, die sowohl eine quantitative Bestimmung von Absolutkonzentrationen ermöglichte als auch eine Quantifizierung von Massenisotopomeren im isotopisch stationären und isotopisch instationären Zustand. Die Probenaufarbeitung war dabei mit deutlich geringerem Aufwand verbunden als bei den GC-MS Analysemethoden.

Können mit den unterschiedlichen LC-MS und GC-MS Analysemethoden Massenisotopomere gleicher Substanzen quantifiziert werden, so können diese Messungen für die Validierung der Analysemethoden herangezogen werden. Dies soll nachfolgend für PEP und Alanin im isotopisch stationären Zustand gezeigt werden. Dieses Beispiel wurde gewählt, da die Massenisotopomere von PEP mit LC-MS und die Massenisotopomere von Alanin - als proteinogene und freie Aminosäure - mit GC-MS quantitativ bestimmt werden konnten. Alanin entsteht in einem Reaktionsschritt direkt durch Transaminierung aus PYR (Kapitel 4.1.1), dessen Massenisotopomerenverteilung mit LC-MS nicht bestimmt werden konnte. Bei der hier vorliegenden geringen Aktivität des Malatenzyms sollten sich die Massenisotopomerenverteilungen von PYR und PEP nur unwesentlich unterscheiden. Dies wurde in Simulationsstudien überprüft. Die Messergebnisse von PEP mit LC-MS (Kapitel 6.3.1), von

proteinogenem Alanin mit GC-MS (Kapitel 4.3.1) und von freiem Alanin mit GC-MS (Kapitel 4.3.2) sind in Abbildung 6-13 zusammengefasst.



**Abbildung 6-13.** Vergleich der m0, m+1, m+2 und m+3 Massenisotopomere von PEP (LC-MS Analyse) und von freiem bzw. proteinogenem Alanin (GC-MS Analyse) in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ .

Die entwickelte LC-MS Analyseverfahren sowie die GC-MS Analyseverfahren ermöglichten konsistente Messungen der m0 und m+1 Massenisotopomere von PEP und Alanin. Die GC-MS Analysen von freiem bzw. proteinogenem Alanin führten bei diesen beiden Massenisotopomeren zu den gleichen Ergebnissen. Die LC-MS basierte Quantifizierung der Massenisotopomere von PEP stimmte mit diesen Resultaten ebenfalls überein. Die nur in geringerem Umfang entstehenden m+2 und m+3 Massenisotopomere konnten auf Basis der freien Aminosäuren mit GC-MS nicht quantifiziert werden. Dagegen wiesen die GC-MS Analyse proteinogenen Alanins und die LC-MS Analyse von PEP gute Übereinstimmung auf. Im Hinblick auf die isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse (Kapitel 9) ist die LC-MS Analyseverfahren nicht nur wegen der unmittelbaren Interpretierbarkeit der Zeitkonstanten bei einem  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment (Wiechert *et al.*, 2005), sondern auch wegen der höheren Sensitivität der Messungen der GC-MS Analyse überlegen.

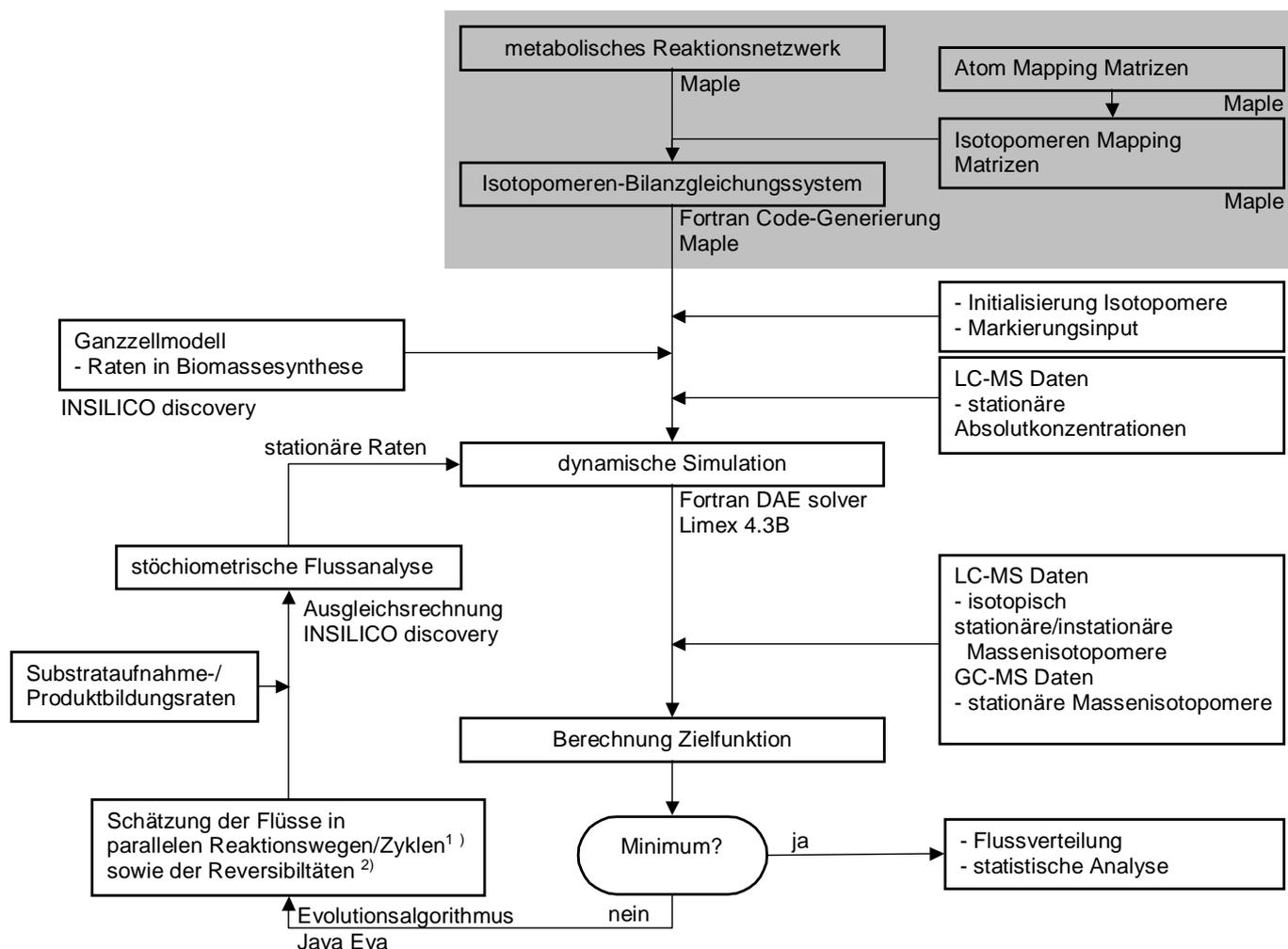
## 7 Modellierung von Isotopomeren-Netzwerken

### 7.1 Einleitung

Die Modellierung von Isotopomeren-Netzwerken basiert auf dem stöchiometrischen Modell des untersuchten Reaktionsnetzwerkes und dem Isotopomerenmodell. Letzteres erfordert die Kenntnis der C-Atom Transitionen bzw. des Atom Mapping aller beteiligten Reaktionen. Unter Verwendung von C-Atom-Zuordnungsmatrizen (Zupke *et al.*, 1994) können die Isotopomeren-Zuordnungsmatrizen bzw. die Isotopomer Mapping Matrizen berechnet werden (Schmidt *et al.*, 1997). Diese ermöglichen die Modellierung eines Reaktionsnetzwerkes auf Basis der C-Atome in der allgemeinsten Form als Isotopomerenmodell, welches alle möglichen Markierungszustände berücksichtigt und insbesondere Messdaten unterschiedlicher Analysetechniken wie NMR oder Massenspektrometrie integrieren kann (Kapitel 6.1). Da ein Isotopomerenmodell bereits bei kleineren Netzwerken mehrere hundert Bilanzgleichungen umfasst, ist die Erstellung des Isotopomeren-Bilanzgleichungssystems zu automatisieren. Die Vorgehensweise bei der Modellierung des Isotopomeren-Netzwerkes der zentralen Kohlenstoffwechselwege Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus (Abbildung 7-1) sowie dessen charakteristische Eigenschaften sind Gegenstand dieses Kapitels. Detailliert beschrieben sind das biochemische Reaktionsmodell (Kapitel 7.2.2), die Abgrenzung dieses Teilmodells von einem Ganzzellmodell (Kapitel 7.2.1), die Ermittlung der Raten in die Biomassesynthese (Kapitel 7.2.3) und der verwendete Ansatz zur Formulierung des Isotopomeren-Differentialgleichungssystems bei bimolekularen Reaktionen (Kapitel 7.3). Das Isotopomerenmodell des bilanzierten Teilsystems wird ausführlich in Kapitel 7.4 dargestellt. Bei der Modellierung von reversiblen Reaktionen (Kapitel 7.2.2 und 7.4.2) und von Sonderfällen wie Scrambling-Reaktionen bei rotationssymmetrischen Molekülen (Kapitel 7.4.3) sind bei der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse spezifische Annahmen zu treffen. Die automatisierte Erstellung der Modellgleichungen erfolgte mit dem Computer-Algebra-System Maple (Kapitel 7.4.4). Die topologische Analyse des stöchiometrischen Modells und des Isotopomerenmodells wird in Kapitel 7.5 behandelt.

Ein wesentliches Kennzeichen von Isotopomerenmodellen ist, dass es sich hinsichtlich der gesuchten intrazellulären Raten um überbestimmte Systeme handelt. Folglich kann auf kritische Bilanzen von Nukleotiden und Kofaktoren verzichtet werden (Marx *et al.*, 1996; Sauer *et al.*, 1999; Petersen *et al.*, 2000). Dagegen müssen solche Annahmen bei der

stöchiometrischen Flussanalyse getroffen werden, um dem Problem der Unterbestimmtheit zu begegnen.



<sup>1)</sup> Flüsse in parallelen Reaktionswegen:  $\mathbf{r} = (r_2, r_{13})^T$

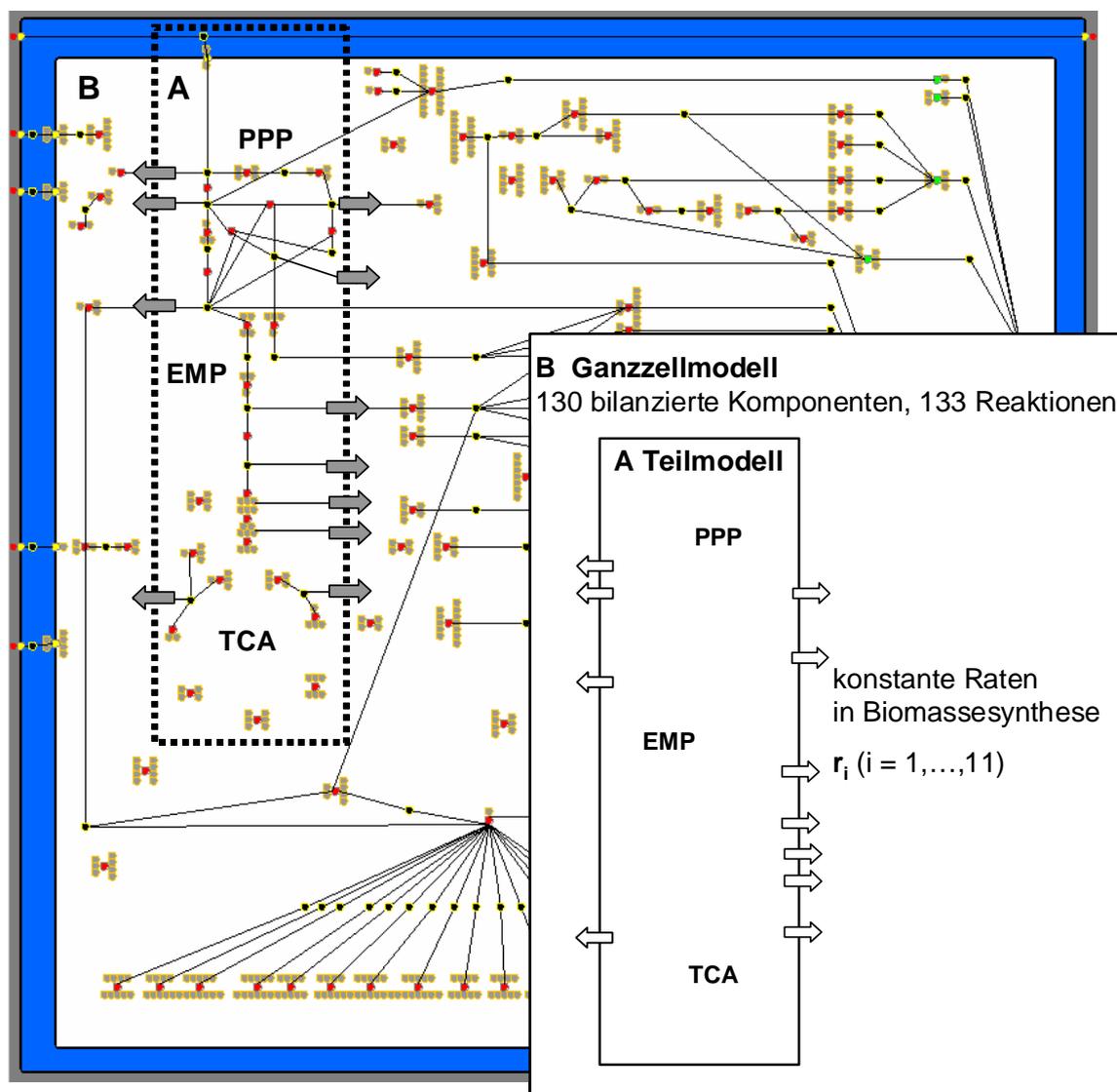
<sup>2)</sup> Reversible Flüsse:  $\mathbf{r} = (r_2, r_4, r_7, r_8, r_9, r_{10}, r_{11}, r_{13}, r_{16}, r_{17})^T$

**Abbildung 7-1.** Die isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse umfasst Modellierung (grau hinterlegt), dynamische Simulation von  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimenten und Schätzung der intrazellulären Raten (Kapitel 8). Die Eingabe des metabolischen Reaktionsnetzwerkes und der C-Atom-Zuordnungsmatrizen erfolgte in dem Computer-Algebra-System Maple. Mit diesen Informationen wurde unter Verwendung eines Algorithmus zur Erzeugung von Isotopomeren-Zuordnungsmatrizen (Schmidt *et al.*, 1997) das Isotopomeren-Bilanzgleichungssystem automatisiert in Fortran-Code generiert.

## 7.2 Modell

### 7.2.1 Teilmodell und Ganzzellmodell

Das untersuchte Modell umfasst die zentralen Kohlenstoffwechselwege Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus. Es handelt sich um ein Isotopomerenmodell, dem ein stöchiometrisches Modell zugrunde liegt. Isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen, die Gegenstand dieser Arbeit sind, wurden auf Basis dieses Isotopomerenmodells durchgeführt (Kapitel 9). Die Verbindungen zwischen dem hier betrachteten Modell und einem modifizierten stöchiometrischen Ganzzellmodell von *E. coli* nach Chassagnole (Chassagnole *et al.*, 2002), das sowohl die katabolischen als auch die anabolischen Reaktionen berücksichtigt, sind in Abbildung 7-2 dargestellt.

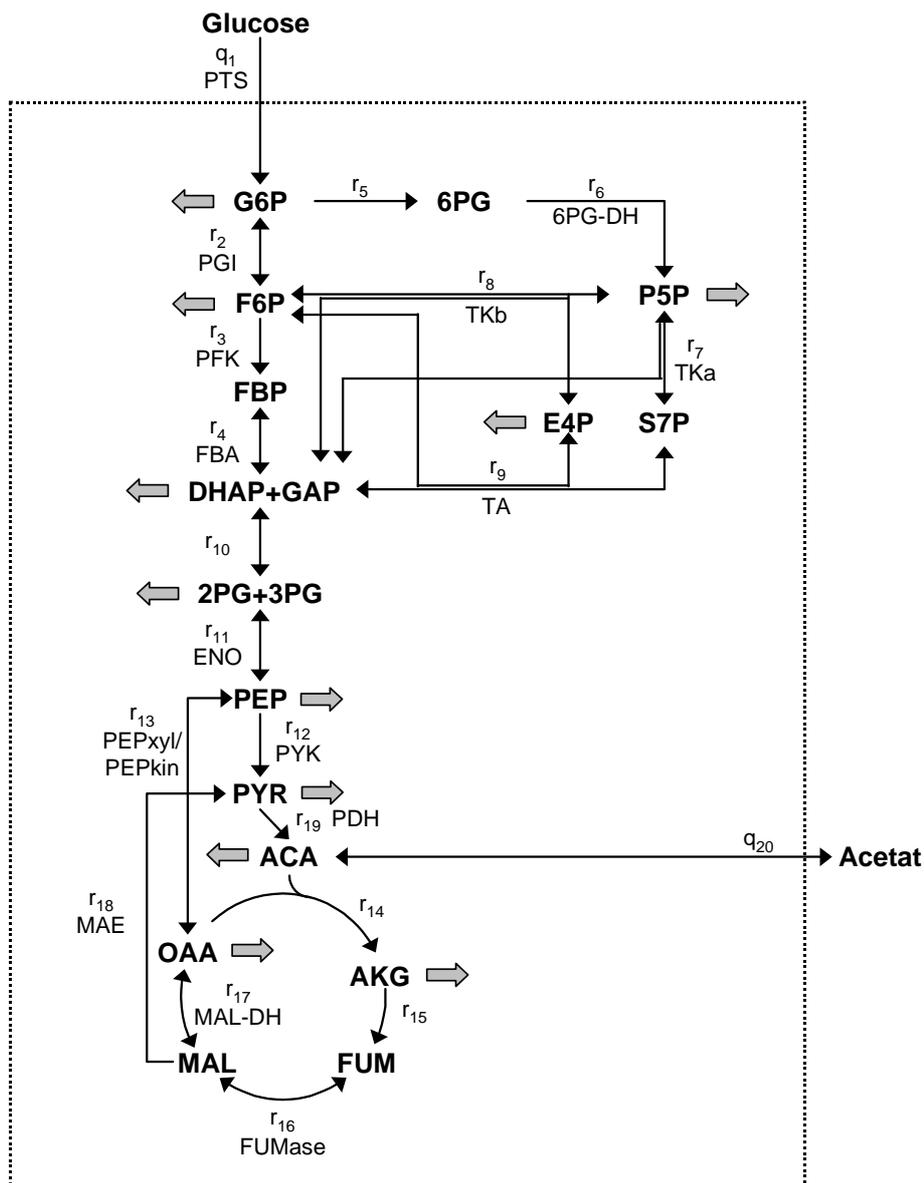


**Abbildung 7-2.** Das Isotopomerenmodell (A) der zentralen Kohlenstoffwechselwege Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus in *E. coli* ist über die Flüsse in die Biomasse-synthese (graue Pfeile) mit dem stöchiometrischen Ganzzellmodell (B) verbunden (Chassagnole *et al.*, 2002). Grafische Repräsentation: Insilico discovery (Modellierungs- und Simulationssoftware der Firma Insilico biotechnology GmbH)

Bei isolierter Betrachtung von Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus stellen die Raten in die Biomassesyntese *äußere* Freiheitsgrade des Isotopomerenmodells dar (Kapitel 7.5). Diese Flüsse sind jedoch nicht messbar, da sie keine äußeren Freiheitsgrade des Ganzzellmodells darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Ermittlung der Raten in die Biomassesyntese daher das Ganzzellmodell von *E. coli* nach Chassagnole (Chassagnole *et al.*, 2002) verwendet, das in geringem Umfang an die spezifischen Erfordernisse der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse angepasst wurde (Kapitel 7.2.3).

## 7.2.2 Biochemisches Reaktionsmodell

Das bereits in Abbildung 7-2 dargestellte Modell A der zentralen Kohlenstoffwechselwege Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus zeigt detailliert Abbildung 7-3. Bei der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse sind insbesondere die Reversibilitäten der beteiligten Reaktionen zu berücksichtigen. Das erstellte Reaktionsmodell A geht auf die publizierten *E. coli* Modelle von Emmerling (Emmerling *et al.*, 2002) und Dauner (Dauner, 2000) zurück und wurde auf Basis von Fachbüchern (Fraenkel, 1996; Cronan *et al.*, 1996) und der EcoCyc-Datenbank (Keseler *et al.*, 2005) aufgestellt.



**Abbildung 7-3.** Metabolisches Reaktionsmodell A von *E. coli*. Dieses umfasst die zentralen Kohlenstoffwechselwege Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus. Die Pfeilspitzen zeigen an, ob die enzymatischen Reaktionen reversibel bzw. irreversibel modelliert wurden. Flüsse in die Biomassesynthese sind grau gekennzeichnet. Wurden lineare Reaktionssequenzen zusammengefasst, so sind nur die entsprechenden Raten ohne Benennung des beteiligten Enzyms angegeben (Nomenklatur, siehe Anhang A1).

Zwei Arten von Modellreduktionen wurden durchgeführt. Erstens wurden lineare Reaktionssequenzen in Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus zusammengefasst. Diese bei der stöchiometrischen Flussanalyse übliche Vorgehensweise ist auch bei der isotopomerenbasierten Flussanalyse unproblematisch, wobei stattfindende C-Atom Transitionen zu berücksichtigen sind (Wiechert, 1995). Zweitens wurden im Pentosephosphat-Weg die Metabolite Ribulose-5-phosphat, Xylulose-5-phosphat und Ribose-5-phosphat zu einem Pool zusammengefasst. Bei diesen hochreversiblen enzymatischen Reaktionen finden Hin-

und Rückreaktionen mit großen Raten statt, so dass die Annahme eines rapid equilibrium getroffen werden kann (Wood, 1985). In gleicher Weise wurde gemäß Emmerling (Emmerling *et al.*, 2002) auch für die durch Triosephosphat-Isomerase katalysierte Reaktion zwischen DHAP und GAP und für die durch Phosphoglyceromutase katalysierte Reaktion zwischen 2PG und 3PG verfahren. Im allgemeinen wurde von reversiblen Reaktionen ausgegangen. So wurden die durch die Enzyme Glucose-6-phosphat-Isomerase (PGI), Fructosebisphosphat-Aldolase (FBA), Transketolase Reaktion a (TKa), Transketolase Reaktion b (TKb), Transaldolase (TA), Enolase (ENO), Fumarase (FUMase) und Malat-Dehydrogenase (MAL-DH) katalysierten Umsetzungen sowie die Reaktionssequenz von DHAP/GAP zu 2PG/3PG reversibel modelliert (Emmerling *et al.*, 2002). Dies erfolgte auf Basis der thermodynamischen Eigenschaften der Enzyme unter Heranziehung von freien Standardenthalpien (Stryer, 1996; Lehninger, 2000). Acetat kann von der Zelle gebildet und aufgenommen werden (Chassagnole *et al.*, 2002). Irreversibel angesetzt wurde die Glucoseaufnahmerate über das PTS-System (Chassagnole *et al.*, 2002; Emmerling *et al.*, 2002) sowie, aufgrund großer negativer freier Standardenthalpien, die Reaktionen im oxidativen Teil des Pentosephosphat-Weges, die durch die Enzyme 6-Phosphofruktokinase (PFK), Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEP<sub>xyl</sub>), Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPkin), Pyruvat-Kinase (PYK), Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) und Malatenzym (MAE) katalysierten Reaktionen sowie die Reaktionssequenz zur Synthese von  $\alpha$ -Ketoglutarat und Fumarat. Da der Fluss durch den Entner-Doudoroff-Weg nur ca. 1% der Glucoseaufnahmerate beträgt (Dauner, 2000), blieb dieser im Modell unberücksichtigt. Im Anhang A1 sind die Bezeichnungen von Metaboliten, Nettoraten und Enzymen zusammenfassend dargestellt.

### 7.2.3 Precursorbedarf für Biomassesynthese

Der Precursorbedarf für die Biomassesynthese wurde aus einem modifizierten *E. coli* Ganzzellmodell nach Chassagnole (Chassagnole *et al.*, 2002) ermittelt (Abbildung 7-2). Dieses Modell umfasst neben den zentralen Kohlenstoffwechselwegen Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus die Protein-, RNA-, Fettsäuren-, Polysaccharid- und Mureinsynthese, den Nukleotidmetabolismus, die Regeneration der C1-Metabolite, die oxidative Phosphorylierung und die Biomassesynthese. Insgesamt wurden 130 Komponenten bilanziert. Malatenzym und Transhydrogenase ( $\text{NADPH} + \text{NAD} = \text{NADP} + \text{NADH}$ ) wurden darin nicht berücksichtigt, so dass das Modell von Chassagnole (Chassagnole *et al.*, 2002) keine inneren Freiheitsgrade (Kapitel 7.5.1) aufwies.

Gegenüber dem Ausgangsmodell wurden folgende Modifikationen vorgenommen. Erstens wurde das Modell um die Enzyme Malatenzym und Transhydrogenase erweitert. Dies hat zwei innere Freiheitsgrade zur Folge (Kapitel 7.5.1). Zweitens wurden die Metabolite

Ribulose-5-phosphat, Xylulose-5-phosphat und Ribose-5-phosphat, DHAP und GAP sowie 2PG und 3PG jeweils zu einem Pool zusammengefasst (Kapitel 7.2.2). Bei Variation der freien Flüsse (Wiechert *et al.*, 1997a) über die Enzyme Phosphoglucose Isomerase ( $r_2$ ) und Phosphoenolpyruvat-Carboxylase/Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase ( $r_{13}$ ) ändern sich die Flüsse in die Biomasse geringfügig, da z. B. im Pentosephosphat-Weg  $\text{CO}_2$  abgespalten wird, das dann nicht mehr für die Biomassesynthese zur Verfügung steht. Diese Flüsse wurden im Isotopomerenmodell konstant gesetzt. Zur Ermittlung dieser Biomasseabflüsse aus dem Ganzzellmodell wurden iterativ die freien Flüsse aus der Optimierung (Kapitel 8.3.3) des Isotopomerenmodells für stöchiometrische Flussanalysen im Ganzzellmodell verwendet. Die Abweichungen bei den auf diese Weise angepassten Biomasseabflüssen betragen weniger als 5%. Stöchiometrische Flussanalysen im Ganzzellmodell wurden mit dem Softwarepaket INSILICO discovery (INSILICO discovery, INSILICO biotechnology, Stuttgart, D) durchgeführt, das eine Ausgleichsrechnung (Stephanopoulos, 1998) unter Heranziehung der gemessenen extrazellulären Raten bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  (Glucoseaufnahmerate, Sauerstoffaufnahmerate, Kohlendioxidbildungsrate, Biomassebildungsrate, Acetatausscheidungsrate) ermöglicht. Die Flüsse in die Biomassesynthese sind in Tabelle 7-1 zusammengefasst.

**Tabelle 7-1.** Precursorbedarf für die Biomassesynthese in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ . Die Werte sind auf die Glucoseaufnahmerate (= 100%) bezogen.

	[%]
G6P	1
P5P	5
E4P	4
F6P	<1
DHAP+GAP	<1
2PG+3PG	10
PEP	8
PYR	28
ACA	22
OAA	23
AKG	5

Alternativ kann der Precursorbedarf für die Biomassesynthese auch aus Konzentrationsbestimmungen der Makromoleküle wie Protein, RNA, DNA, Lipide, Lipopolysaccharide, Peptidoglykan, Glykogen, Polyamine, Informationen über Zusammensetzung der Biomasse und Anteile der Precursor an den Makromolekülen (Ingraham, 1983; Neidhardt *et al.*, 1996) sowie Kenntnis der Biosynthesewege und deren Stöchiometrie erfolgen (Pramanik *et al.*, 1997). Die Biomassezusammensetzung hängt dabei von der spezifischen Wachstumsrate ab (Bremer *et al.*, 1996). Diese Vorgehensweise wurde beispielsweise von Marx (Marx *et al.*, 1996) bei *Corynebacterium glutamicum*, von Emmerling (Emmerling *et al.*, 2002) bei *Escherichia coli* und von Dauner (Dauner *et al.*, 2001b) bei *Bacillus subtilis* verwendet. Eine Ausgleichsrechnung (Stephanopoulos, 1998) findet dabei in der Regel nicht statt.

### 7.3 Bilanzgleichungssystem

Das Bilanzgleichungssystem besteht aus (i) dem Isotopomerenmodell von Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus und (ii) dem zugehörigen stöchiometrischen Modell dieses Teilsystems. Zustandsgrößen sind die Isotopomere, Parameter des Isotopomerenmodells sind die gesuchten intrazellulären Raten, die dem stöchiometrischen Modell genügen müssen.

Für die Bilanzierung der Isotopomere gilt

$$c_i \cdot \frac{d_i}{dt} = \sum_j r_j (\mathbf{IMM}_{i \pm 1 \rightarrow i})_j + \sum_j r_j \left( \sum_{n=1}^2 (\mathbf{IMM}_{i \pm 1 \rightarrow i})_n \right)_j + \sum_j r_j \left( \otimes_{n=1}^2 (\mathbf{IMM}_{i \pm 1 \rightarrow i})_n \right)_j - \sum_j v_{ij} r_j \quad (7-1)$$

Darin ist mit  $I_i$  nach Schmidt (Schmidt *et al.*, 1997) der sogenannte Isotopomer Distribution Vector des  $i$ -ten Metabolit bezeichnet, der die molaren Isotopomerenanteile enthält, und mit  $\mathbf{IMM}$  die sogenannten Isotopomer Mapping Matrices, das sind die Isotopomeren-Zuordnungsmatrizen, die die Transitionen der Isotopomeren beschreiben. Mit dem von Schmidt (Schmidt *et al.*, 1997) entwickelten Algorithmus können diese Isotopomeren-Zuordnungsmatrizen auf einfache Weise aus den sogenannten Atom Mapping Matrices oder C-Atom-Zuordnungsmatrizen, die von Zupke (Zupke *et al.*, 1994) eingeführt worden sind und C-Atom Transitionen beschreiben, generiert werden. In dieser Notation ist je bilanziertem Metabolit eine vektorielle Bilanzgleichung zu formulieren. Mit  $c_i$  wird die intrazelluläre Konzentration des  $i$ -ten Metabolit bezeichnet, mit  $r_j$  die Rate der  $j$ -ten Reaktion. Deren Richtung (Hinreaktion  $\vec{r}_j$ , Rückreaktion  $\bar{r}_j$ ) ist dabei zu spezifizieren. Durch Anwendung des Operators  $\otimes$  erfolgt die elementweise Multiplikation gleich großer Vektoren. Der Ansatz nach Gleichung 7-1 ist auf bimolekulare Reaktionen beschränkt ( $n = 2$ ). Da bei bimolekularen Reaktionen unter Beteiligung von Nukleotiden und/oder Kofaktoren bei den beiden letztgenannten keine C-Atom Transitionen stattfinden, ist dieser Formalismus in dem betrachteten Reaktionsnetzwerk ausreichend. Da im vorliegenden Modell (Kapitel 7.4) bei einer Umsetzung die maximale Anzahl der Reaktionspartner (Substrate bzw. Produkte) mit C-Atom Transitionen zwei beträgt, weist das Isotopomeren-Bilanzgleichungssystem eine bilineare Struktur auf. Es sind drei Fälle zu unterscheiden. Erstens monomolekulare Reaktionen (beschrieben durch den ersten Term in Gleichung 7-1), zweitens spaltende Reaktionen (zweiter Term in Gleichung 7-1) und drittens bimolekulare Reaktionen (dritter Term in Gleichung 7-1). Die Stöchiometrie dieser drei Terme ist dabei implizit durch die Anzahl  $n$  der Reaktionspartner gegeben. Als Beispiel für eine monomolekulare Reaktion kann die Reaktion von G6P zu 6PG an-

geführt werden, als Beispiel für eine spaltende Reaktion die Umwandlung des C-6 Moleküls FBP in die beiden Triosen DHAP und GAP sowie als Beispiel für eine bimolekulare Reaktion die Reaktion  $\text{OAA} + \text{ACA} \rightarrow \text{AKG}$  im Tricarbonsäure-Zyklus. Bei den verbrauchenden Reaktionen (vierter Term in Gleichung 7-1) ist die Stöchiometrie durch den stöchiometrischen Faktor  $v_{ij}$  explizit angegeben.

Das Isotopomerenmodell und die Formulierung des Isotopomeren-Bilanzgleichungssystems sind ausführlich in Kapitel 7.4 beschrieben. Die C-Atom-Zuordnungsmatrizen und Details des Isotopomerenmodells finden sich in Anhang A3 bzw. A4.

Das Bilanzgleichungssystem für die bilanzierten Metabolite lautet

$$\frac{dc_i}{dt} = \sum_j v_{ij} \cdot r_j - \mu \cdot c_i \quad (7-2)$$

Darin ist  $\mu$  die spezifische Wachstumsrate.

Das verwendete stöchiometrische Modell der zentralen Kohlenstoffwechselwege Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus (Modul A in Abbildung 7-2) findet sich in Anhang A2.

Ein zentraler Unterschied zwischen Isotopomerenmodellen und stöchiometrischen Modellen besteht darin, dass bei der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse ein nichtlineares (bilineares), gekoppeltes und steifes Differentialgleichungssystem (Gleichung 7-1) zu lösen ist, während sich die intrazelluläre Flussverteilung bei der stöchiometrischen Flussanalyse durch Lösung eines linearen Gleichungssystems (Gleichung 7-2) ergibt. Dies hat Konsequenzen für die Ermittlung der intrazellulären Raten bei der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse (Kapitel 8).

## 7.4 Isotopomerenmodell

### 7.4.1 Bilanziertes Teilsystem

Das Isotopomerenmodell zur Durchführung von isotopisch stationären und instationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen umfasste die zentralen Kohlenstoffwechselwege Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus.

Die Formulierung des Isotopomerenmodells als Differentialgleichungssystem (Gleichung 7-1) erlaubt die Verwendung isotopisch stationärer und isotopisch instationärer Massen-

isotopomerenverteilungen für die Bestimmung der intrazellulären Flüsse. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Messdaten verwendet

- isotopisch instationäre und stationäre Massenisotopomere von Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels, gemessen mit LC-MS (Kapitel 9.2)
- isotopisch stationäre Massenisotopomere von Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels, gemessen mit LC-MS (Kapitel 9.3.1)
- isotopisch stationäre Massenisotopomere proteinogener Aminosäuren, gemessen mit GC-MS (Kapitel 9.3.2)
- isotopisch stationäre Massenisotopomere von Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels und proteinogener Aminosäuren (Kapitel 9.3.3)

Das Teilmodell A in Abbildung 7-2 wurde gewählt, da die Metabolite dieser Stoffwechselwege mit LC-MS sowohl hinsichtlich der benötigten Absolutkonzentrationen (Kapitel 5) als auch hinsichtlich der metabolisch und isotopisch stationären sowie der metabolisch stationären und isotopisch instationären Massenisotopomere (Kapitel 6) größtenteils messtechnisch zugänglich waren.

Mittels GC-MS konnten außerdem die Markierungsmuster proteinogener und freier Aminosäuren bestimmt werden (Kapitel 4). Die Massenisotopomerenverteilungen der Aminosäuren werden durch die Markierungsmuster der entsprechenden Precursor-Metabolite aus den zentralen Kohlenstoffwechselwegen bestimmt. So entsteht Alanin in einem Reaktionsschritt aus PYR, Aspartat in einer Einschrittreaktion aus OAA, AKG wird in Gegenwart von Ammonium in einem Schritt zu Glutamat umgewandelt, Serin entsteht ohne Änderungen am C-Atomskelett in einer dreistufigen linearen Reaktionssequenz aus 3PG (Kapitel 4.1.1). Dagegen werden bei der Synthese von Phenylalanin zwei Moleküle PEP und ein Molekül E4P benötigt, bei der C-6 Aminosäure Histidin stammen 5 C-Atome von R5P und ein C-Atom von ATP (Moran, 1994; Stryer, 1996; Lengeler, 1999). Problematisch bei den Markierungsmustern der Aminosäuren ist, dass einzelne Aminosäuren wie Glycin nicht nur aus den Intermediärprodukten des zentralen Kohlenstoffwechsels synthetisiert werden, sondern auch auf alternativen Reaktionswegen bzw. als Abbauprodukte entstehen (Keseler *et al.*, 2005). Bei anderen Aminosäuren wie Valin, Leucin, Methionin und Histidin finden Additionsreaktionen von Acetylgruppen, Methylgruppen bzw. C-Atom Transitionen von ATP statt (Kapitel 4.1.1). Der Markierungszustand dieser Reaktionspartner war als Messinformation jedoch nicht vorhanden. Ebenfalls in Kapitel 4.1.1 wurde darauf hingewiesen, dass die Messinformationen vieler Aminosäuren redundant sind. Bei der isotopisch instationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse (Kapitel 9) kommt erschwerend hinzu, dass die einzelnen Synthesewege vollständig zu modellieren und zu bilanzieren sind, wobei insbesondere Informationen zu den

Poolgrößen aller Zwischenprodukte benötigt werden, wenn diese nicht geschätzt werden sollen. Im Falle der Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin müssten beispielsweise 11 zusätzliche Pools quantifiziert werden. Auf die problematische Interpretierbarkeit der Markierungsdynamiken der freien Aminosäuren wurde bereits in Kapitel 4.1.3 eingegangen. Neben dem Vorhandensein quantitativer Messinformationen zu Konzentrationen und Markierungsmustern sind zur Schätzung intrazellulärer Raten darüber hinaus weitere Informationen erforderlich. Diese betreffen notwendigerweise Informationen zu den C-Atom Transitionen aller modellierten Reaktionen, außerdem Informationen zum Umfang der Reversibilität der beteiligten Reaktionen (Kapitel 7.2.2), wenn man die Anzahl der inneren Freiheitsgrade möglichst gering halten will. Aus diesen Gründen blieben die bisher durchgeführten  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen meist auf die zentralen Kohlenstoffwechselwege beschränkt. So umfassten isotopisch stationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen in *Corynebacterium glutamicum* (Marx *et al.*, 1996; Wittmann *et al.*, 2002b; Kromer *et al.*, 2004), in *Escherichia coli* (Schmidt *et al.*, 1999a; Emmerling *et al.*, 2002) und in *Bacillus subtilis* (Dauner *et al.*, 2001b) im wesentlichen die Analyse von Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus. LC-MS basierte, isotopisch stationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen in der Hefe *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D, die eine detaillierte Analyse von Glykolyse und Pentosephosphat-Weg zum Gegenstand hatten, wurden von van Winden (van Winden *et al.*, 2005) durchgeführt. Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels isotopisch instationärer  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen die zentralen Kohlenstoffwechselwege Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus in *E. coli* W3110 untersucht (Kapitel 9). Das Modell umfasste 16 bilanzierte Metabolite und 20 Nettoraten (Kapitel 7.5.1), von denen 10 Reaktionen reversibel angesetzt wurden (Kapitel 7.2.2). Auf die Bilanzierung der Nukleotide AMP, ADP und ATP sowie von Kofaktoren wie NAD(H) und NADP(H) und den damit verbundenen Unsicherheiten - wie nicht schließende Bilanzen von NADH und NADPH (Marx *et al.*, 1996), bestehende Unsicherheiten bei der Effizienz der Bildung von ATP in der Atmungskette (Sauer *et al.*, 1999) und das Vorhandensein starker futile cycles bei den anaplerotischen Reaktionen (Petersen *et al.*, 2000) - kann bei der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse verzichtet werden (Wiechert, 2001). Die Bilanzierung von  $\text{CO}_2$  blieb ebenfalls auf das Teilmodell der zentralen Kohlenstoffwechselwege Glykolyse, Pentosephosphat-Weg, Tricarbonsäure-Zyklus und anaplerotische Reaktionen beschränkt. Diese Vorgehensweise wurde auch in anderen Untersuchungen gewählt (Marx *et al.*, 1996; Dauner *et al.*, 2001a; Emmerling *et al.*, 2002). Theoretische Untersuchungen zu einer umfassenderen Modellierung der Carboxylierungs- und Decarboxylierungsreaktionen im zentralen Kohlenstoffwechsel und den anabolischen Reaktionswegen wurden von Yang (Yang *et al.*, 2005) durchgeführt. Die große Anzahl von Reaktionen, bei denen  $\text{CO}_2$  als Reaktionspartner auftritt (Keseler *et al.*, 2005), macht die Notwendigkeit eines Gesamtmodells auch bei der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse deutlich.

### 7.4.2 Modellierung reversibler Reaktionen

Wegen ihres unmittelbaren Einflusses auf die Massenisotopomere sind bei der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse die Reversibilitäten der beteiligten Reaktionen zu berücksichtigen und Hin- und Rückreaktionen reversibler Reaktionen getrennt zu modellieren (Kapitel 7.2.2). Die numerische Integration des zugrunde liegenden nichtlinearen Isotopomeren-Bilanzgleichungssystems (Kapitel 7.3) wird durch dessen Steifheit in Gegenwart betragsmäßig hoher Raten von Hin- und Rückreaktionen bei gleichzeitig niedrigen Nettoraten erschwert (Schmidt *et al.*, 1999a). Wegen der Nichtlinearität des Bilanzgleichungssystems und der damit verbundenen numerischen Probleme bei großen, nicht beschränkten Austauschflüssen hat Wiechert (Wiechert *et al.*, 1997a) im Falle der isotopisch stationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse eine Kompaktifizierung von Hin- und Rückreaktionen auf den Wertebereich  $[0,1]$  durch eine hyperbolische Transformation vorgeschlagen. Bei einem Wertebereich von  $[0,0.95]$  führt dies dazu, dass Hin- bzw. Rückreaktionen betragsmäßig 19 mal größer als die entsprechenden Nettoraten sein können (Schmidt *et al.*, 1999a; Dauner *et al.*, 2001a). In dieser Arbeit wurden Hin- und Rückreaktionen gemäß Gleichungen 7-3 bis 7-5 modelliert.

$$\text{Nettorate} \quad r_j = \bar{r} - \bar{r}_j \quad (7-3)$$

$$\text{Hinreaktion} \quad \bar{r}_j = \beta_j r_j \quad \text{mit } \beta_j \geq 1 \quad (7-4)$$

$$\text{Rückreaktion} \quad \bar{r}_j = \bar{r}_j - r_j \quad (7-5)$$

Der Koeffizient  $\beta_j$  gibt an, um welchen Faktor die Hinreaktion der  $j$ -ten Reaktion maximal größer als die zugehörige Nettorate sein darf. Beschränkungen des Wertebereichs von  $\beta_j$  wurden im Hinblick auf die Stabilität der numerischen Integration vorgenommen (Kapitel 8.2.2.2).

### 7.4.3 Modellierung von Scrambling-Reaktionen

Unter Scrambling-Reaktionen sind Reaktionen unter Beteiligung rotationssymmetrischer Moleküle zu verstehen (Wiechert *et al.*, 1996). Im vorliegenden Modell handelt es sich bei der durch das Enzym Fumarase katalysierten Reaktion von Fumarat zu Malat um eine Scrambling-Reaktion, d. h. das Molekül vermag sich im Raum um  $180^\circ$  zu drehen, wodurch sich die C-Atom Positionen 1 bis 4 umkehren, ohne dass eine chemische Reaktion stattfindet. Ein üblicher Modellierungsansatz bei solchen Reaktionen ist die Annahme, dass die Wahrscheinlichkeit für ein Scrambling 50% beträgt (Wiechert *et al.*, 1996). Bei der Modellierung wurde dieses Scrambling in der Malatbildungsrate ( $r_{16}$ ) durch zwei Isotopomeren-

Zuordnungsmatrizen berücksichtigt. Weitere Sonderfälle bei der Modellierung von Isotopomeren-Netzwerken sind in der Literatur beschrieben (Christensen *et al.*, 1999; van Winden *et al.*, 2001a).

#### 7.4.4 Formulierung und automatisierte Erstellung der Modellgleichungen

Das Bilanzgleichungssystem umfasst das Isotopomerenmodell mit dem zugrunde liegenden stöchiometrischen Modell (Kapitel 7.3). Bei der Erstellung des Bilanzgleichungssystems sind die Schritte

- Formulierung des stöchiometrischen Modells
- Definition der C-Atom-Zuordnungsmatrizen
- Berechnung der Isotopomeren-Zuordnungsmatrizen
- Formulierung des Isotopomerenmodells

durchzuführen. Die Definition der C-Atom-Zuordnungsmatrizen oder Atom Mapping Matrices erfolgte in der Matrixnotation nach Zupke (Zupke *et al.*, 1994). Diese beschreiben die C-Atom Transitionen der einzelnen Reaktionen und sind für das verwendete Modell im Anhang A3 aufgeführt. Zur Formulierung der Isotopomeren-Zuordnungsmatrizen bzw. Isotopomer Mapping Matrices, die sämtliche Transitionen der Isotopomeren im betrachteten Netzwerk beschreiben, wurde der von Schmidt (Schmidt *et al.*, 1997) entwickelte Algorithmus implementiert. Die Definition der C-Atom-Zuordnungsmatrizen, die Implementierung des Algorithmus zur automatisierten Erstellung der Isotopomeren-Zuordnungsmatrizen sowie die Formulierung des stöchiometrischen Modells erfolgte mit dem Computer-Algebra-System Maple (Maple V Release 5, Maplesoft, Kanada). Als Output wurde das Isotopomeren-Bilanzgleichungssystem (Kapitel 7.3) in Fortran-Code (siehe Anhang A4) für die numerische Integration generiert (Kapitel 8.2.2). Nach Eingabe von stöchiometrischem Modell und C-Atom-Zuordnungsmatrizen wurde auf diese Weise das Isotopomeren-Bilanzgleichungssystem automatisiert in Maple erstellt.

## 7.5 Topologische Modellanalyse

### 7.5.1 Stöchiometrisches Modell

#### Ganzzellmodell

Im Ganzzellmodell (Abbildung 7-2) nach Chassagnole (Chassagnole *et al.*, 2002) wurden insgesamt 130 Komponenten, darunter Nukleotide wie AMP, ADP und ATP sowie Kofaktoren wie NAD(H) und NADP(H) bilanziert (Kapitel 7.2.1). Bei 133 Reaktionen ergeben sich aus der topologischen Analyse drei äußere Freiheitsgrade und kein innerer Freiheitsgrad (Gleichung 7-6).

$$\text{Anzahl Freiheitsgrade (FG)} = \text{Anzahl Stoffflüsse (Nettoraten)} \\ - \text{Anzahl bilanzierte Komponenten} \quad (7-6)$$

Die Anzahl der äußeren Freiheitsgrade kann durch zusätzliche Messung von Austauschflüssen reduziert werden. Die Anzahl der inneren Freiheitsgrade kann nicht durch Messungen verkleinert werden, da intrazelluläre Raten, z. B. in parallelen Reaktionswegen oder Zyklen, nicht gemessen werden können.

Den drei äußeren Freiheitsgraden ( $\text{FG} = 133 - 130 = 3$ ) standen insgesamt vier gemessene Austauschflüsse, nämlich Glucoseaufnahme, Sauerstoffaufnahme, Kohlendioxidbildungsrate und Acetatbildungsrate (Kapitel 2.3.6), gegenüber, die für die metabolische Flussanalyse verwendet wurden. Mit diesen Messungen war das Ganzzellmodell einfach überbestimmt. Außerdem konnten redundante Messinformationen für die Ausgleichsrechnung (least square fit) und zur Modellvalidierung bzw. zur Überprüfung der Messdaten auf Konsistenz (Chi-Quadrat-Test) verwendet werden (Kapitel 8.3.4). Das Ganzzellmodell wurde so formuliert, dass keine parallelen Reaktionswege oder innere Zyklen auftraten. Sämtliche intrazellulären Flüsse waren beobachtbar.

Die Berücksichtigung zusätzlicher durch die Enzyme Malatenzym und Transhydrogenase katalysierten Reaktionen (Kapitel 7.2.2) ging einher mit zwei inneren Freiheitsgraden im Ganzzellmodell. Die intrazellulären Flüsse in den auftretenden beiden Zyklen sind auf Basis einer stöchiometrischen Flussanalyse nicht beobachtbar.

#### Teilmodell A

Das aus Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus bestehende untersuchte Teilmodell A umfasste 16 bilanzierte Metabolite und 20 Nettoraten (Kapitel 7.2.2, Abbildung 7-3). Auf eine Bilanzierung von Nukleotiden wie AMP, ADP und ATP sowie Kofaktoren wie NAD(H) und NADP(H) kann bei der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse verzichtet werden. Diese Vorgehensweise ist vorteilhaft, um Probleme durch nicht schließende Bilanzen von NADH und NADPH (Marx *et al.*, 1996), durch Unsicherheiten bei der Effizienz der Um-

wandlung von NADH zu ATP (Sauer *et al.*, 1999) und bei Vorhandensein starker futile cycles bei den anaplerotischen Reaktionen (Petersen *et al.*, 2000) zu vermeiden. Damit hat das betrachtete Teilmodell A insgesamt 15 Freiheitsgrade ( $FG = 20 \text{ Nettoraten} + 11 \text{ Raten Biomassessynthese} - 16 \text{ bilanzierte Metabolite} = 15$ ), davon einen inneren Freiheitsgrad (innerer Zyklus durch Malatenzym) und 14 äußere Freiheitsgrade (Glucoseaufnahme, Kohlendioxidbildungsrate, Acetatbildungsrate, 11 Biomassessyntheseraten). Abzüglich der 11 Biomassessyntheseraten (Kapitel 7.2.3) verbleiben insgesamt 4 Freiheitsgrade ( $FG = 20 \text{ unbekannte Nettoraten} - 16 \text{ bilanzierte Metabolite} = 4$ ). Mit den gemessenen Raten von Glucoseaufnahme und Acetatbildung, die äußere Freiheitsgrade des Teilsystems darstellen, ist das Teilmodell A also zweifach unterbestimmt. Den 16 Bilanzgleichungen stehen 18 unbekannte Nettoraten gegenüber ( $FG = 18 \text{ unbekannte Nettoraten} - 16 \text{ bilanzierte Metabolite} = 2$ ).

### 7.5.2 Isotopomerenmodell

Im Gegensatz zur stöchiometrischen Flussanalyse werden bei der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse nicht die Metabolite, sondern deren Isotopomere bilanziert (Kapitel 7.3). Dabei sind unterschiedliche Messdaten (Raten und Massenisotopomere) und unterschiedliche Gleichungssysteme zu betrachten (Marx *et al.*, 1996). Es gibt 3 Sätze von Gleichungen:

#### 1) Stöchiometrisches Modell

Dieses ist bezüglich der Flüsse meist unterbestimmt. Unterbestimmtheit tritt bei Vorliegen paralleler Reaktionswege und metabolischer Zyklen ohne zusätzliche gemessene Raten in diesen parallelen Reaktionswegen bzw. Zyklen, bei reversiblen Reaktionen, wenn diese getrennt modelliert werden, sowie bei verzweigten Reaktionswegen ohne zusätzliche Bilanzierung z. B. von Kofaktoren auf (Wiechert, 2001). Der letztgenannte Punkt betrifft beispielsweise den G6P-Knoten an der Verzweigung von Glykolyse und Pentosephosphat-Weg sowie die Abflüsse aus den zentralen Kohlenstoffwechselwegen Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus in die Biomassessynthese.

Das vorliegende stöchiometrische Teilmodell A (Abbildung 7-3) war bezüglich der Nettoraten zweifach unterbestimmt (Kapitel 7.5.1). Die Modellierung der Malatenzym-Reaktion stellt einen parallelen Reaktionsweg dar und geht mit einem inneren Freiheitsgrad einher. Der zweite Freiheitsgrad ist darauf zurückzuführen, dass bei der isotopomerenbasierten Modellierung im Pentosephosphat-Weg die Kofaktoren NAD(H) und NADP(H) nicht bilanziert wurden.

Bei der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse sind im Isotopomerenmodell die reversiblen Reaktionen zu berücksichtigen. Diese stellen zusätzliche Freiheitsgrade dar

$$\begin{aligned} \text{Anzahl Freiheitsgrade (FG)} &= \text{Anzahl irreversible Raten} \\ &+ \text{Anzahl reversible Raten (Hinreaktionen+Rückreaktionen)} \\ &- \text{Anzahl bilanzierte Komponenten} \end{aligned} \quad (7-7)$$

Die Berücksichtigung der Reversibilität von 10 Raten im stöchiometrischen Teilmodell A (Abbildung 7-3) führt zu weiteren 10 Freiheitsgraden ( $\text{FG} = 10 \text{ irreversible Raten} + 10 \text{ Hinreaktionen} + 10 \text{ Rückreaktionen} - 16 \text{ bilanzierte Metabolite} = 14$ ). Mit den gemessenen Raten von Glucoseaufnahme und Acetatbildung reduziert sich die Anzahl der Freiheitsgrade um zwei ( $\text{FG} = 8 \text{ unbekannte irreversible Raten} + 10 \text{ Hinreaktionen} + 10 \text{ Rückreaktionen} - 16 \text{ bilanzierte Metabolite} = 12$ ).

## 2) Isotopomerenbilanzen

Sind alle Flüsse bekannt, dann gibt es genauso viele Gleichungen wie Zustandsgrößen. Das Gleichungssystem ist für diesen Fall eindeutig bestimmt. Das vorliegende Modell umfasste 550 bilanzierte Isotopomere (Anhang A4).

## 3) Messgleichungen

Diese stellen die Beziehung zwischen bilanzierten Isotopomeren und messbaren Massen-isotopomeren her. Zur Schätzung der intrazellulären Flüsse wurden im isotopisch stationären Fall 23 Massenisotopomere aus LC-MS Messungen (Kapitel 6.3.1) und/oder 28 Massenisotopomere aus GC-MS Messungen (Kapitel 4.3) verwendet. Im isotopisch instationären Fall wurden außerdem weitere 48 Massenisotopomere aus LC-MS basierten Messungen der isotopisch instationären Markierungs-dynamik herangezogen (Kapitel 6.3.2). Dieses System war hinsichtlich der Isotopomere unterbestimmt, im Hinblick auf die gesuchten Flüsse jedoch überbestimmt.

Zusammenfassend folgten aus 1) 30 zu bestimmende Flüsse. Werden, entsprechend den Freiheitsgraden des untersuchten Teilmodells A (Abbildung 7-3), zwei Raten (hier  $r_2$  und  $r_{13}$ ) und die 10 Reversibilitätsfaktoren der reversiblen Reaktionen (Gleichung 7-4) geschätzt und auf diese Weise eine Anfangsflussverteilung für den ersten Iterationszyklus ermittelt, können die 550 bilanzierten Isotopomere nach 2) berechnet werden (Kapitel 8). Nach 3) gab es mehr Messungen als unbekannte Flüsse (30 Raten-2 gemessene Raten, wobei das Modellsystem zwei innere Freiheitsgrade aufwies und die Reversibilitäten von 10 Raten zu identifizieren waren). Daraus folgt, dass das Modellsystem bei der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse bezüglich der gesuchten Flüsse überbestimmt, bei der stöchiometrischen Flussanalyse dagegen unterbestimmt war.

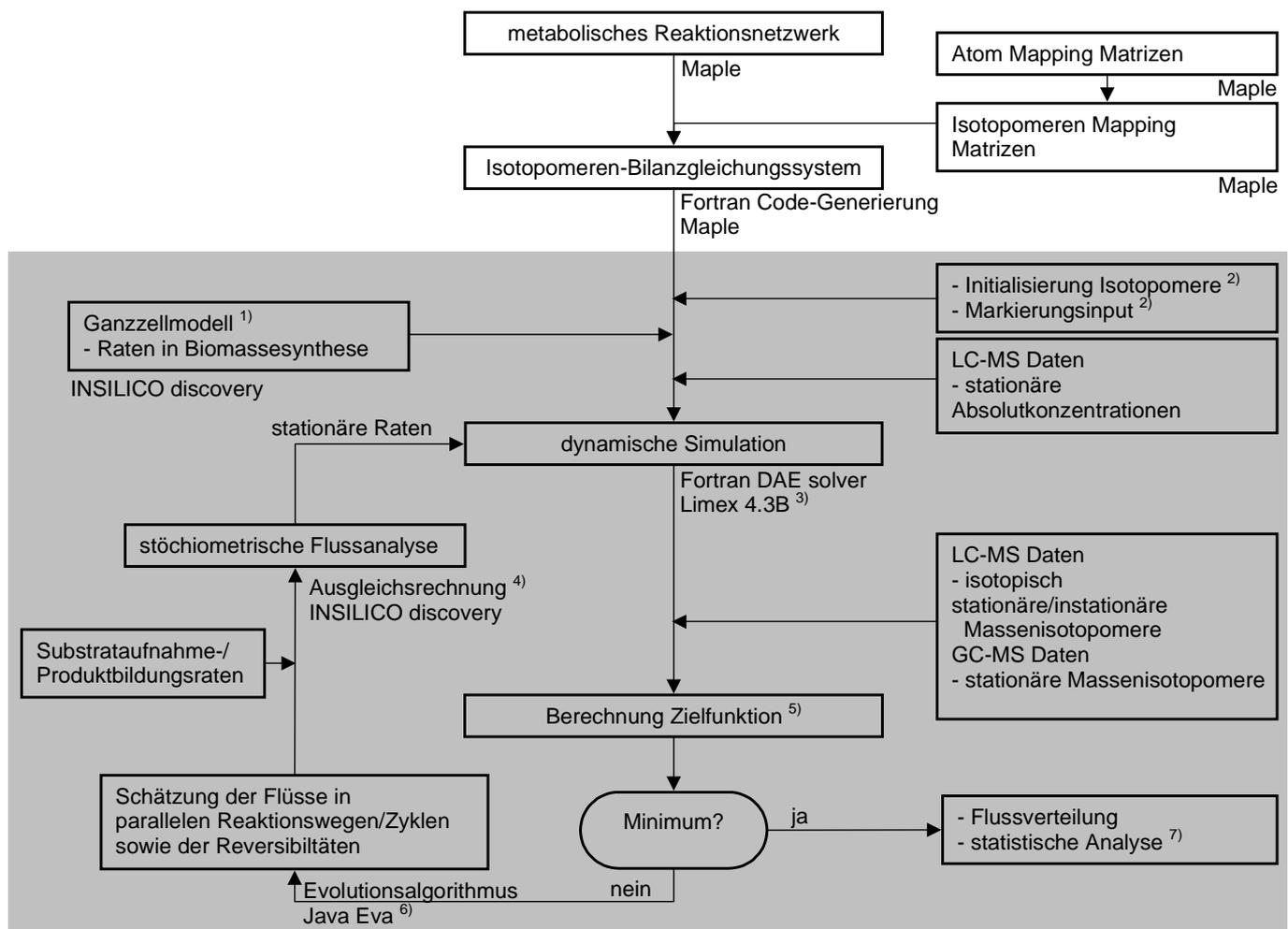
## 7.6 Zusammenfassung

Dieses Kapitel hatte die Erstellung eines Isotopomerenmodells der zentralen Kohlenstoffwechselwege Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus in *E. coli* zum Gegenstand. Durch Verwendung eines von Schmidt (Schmidt *et al.*, 1997) entwickelten Algorithmus konnten mit dem Computer-Algebra-System Maple die benötigten Isotopomeren-Zuordnungsmatrizen automatisiert erstellt und in Verbindung mit dem stöchiometrischen Modell das Isotopomerenmodell in Fortran-Code generiert werden. Der Fortran-Code wird für die Simulation von  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimenten benötigt (Kapitel 8). Durch die Ermittlung der Flüsse in die Biomassensynthese aus einem modifizierten *E. coli* Modell nach Chassagnole (Chassagnole *et al.*, 2002) konnte die Anzahl der äußeren Freiheitsgrade des Isotopomerenmodells um 11 Freiheitsgrade reduziert werden. Aus der topologischen Analyse des stöchiometrischen Modells folgte unter Berücksichtigung der gemessenen Raten zweifache Unterbestimmtheit, wobei Nukleotide und Kofaktoren nicht bilanziert wurden. Ein Freiheitsgrad ging auf die Modellierung der Malatenzym-Reaktion zurück, der zweite Freiheitsgrade auf den Umstand, dass im Pentosephosphat-Weg keine Kofaktorbilanzierung von NAD(P) durchgeführt wurde. Eine stöchiometrische Flussanalyse war in diesem Teilsystem nicht möglich. Bei einem Isotopomerenmodell sind reversible Reaktionen getrennt als Hin- und Rückreaktionen zu modellieren, wodurch zusätzliche Freiheitsgrade entstehen. Außerdem sind Besonderheiten wie rotationssymmetrische Moleküle zu beachten. Bei dem betrachteten Isotopomerenmodell standen 550 Bilanzgleichungen zur Schätzung von 30 Raten (davon 10 reversible Reaktionen) zur Verfügung. Dieses Problem ist hinsichtlich der gesuchten Raten überbestimmt.

## 8 Simulation von $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimenten und Schätzung intrazellulärer Raten

### 8.1 Einleitung

Im Unterschied zur stöchiometrischen Flussanalyse muss die gesuchte intrazelluläre Flussverteilung bei der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse durch Lösen eines nichtlinearen Gleichungssystems ermittelt werden. Im vorliegenden Modell wies das Isotopomeren-Bilanzgleichungssystem eine bilineare Struktur auf (Kapitel 7.3). Allgemein ist zur expliziten Berechnung der intrazellulären Raten ein nichtlineares Inversenproblem zu lösen. Im isotopisch stationären Fall hat sich dabei das sogenannte iterative-averaging-Verfahren, ein modifiziertes Jakobi-Iterationsverfahren, bewährt (Schmidt *et al.*, 1999a). Eine analytische, explizite Lösung von nichtlinearen Isotopomeren-Bilanzgleichungssystemen erlaubt nach einer linearen Transformation das sogenannte Cumomeren-Konzept (Wiechert *et al.*, 1999). Sollen Messinformationen aus der isotopisch instationären Markierungsdynamik (Kapitel 6) bei einem  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment für die Schätzung intrazellulärer Raten genutzt werden, so ist das nichtlineare, gekoppelte und steife Isotopomeren-Bilanzgleichungssystem numerisch zu integrieren. Hierfür werden neben den intrazellulären Raten (Nettoraten bzw. Raten von Hin-/Rückreaktionen) auch die Konzentrationen intrazellulärer Metabolite, die hier mit LC-MS gemessen wurden (Kapitel 5), sowie die Raten in die Biomassesynthese (Kapitel 7.2) benötigt, sollen letztere nicht geschätzt werden. Die Vorgehensweise dieser Arbeit zeigt Abbildung 8-1. Der Ansatz der numerischen Integration kann auch bei der isotopisch stationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse angewendet werden, wobei Informationen über die Größe der Metabolitpools in diesem Fall entbehrlich werden.



<sup>1)</sup> Ganzzellmodell nach Abbildung 7-2

<sup>2)</sup> Bei der Initialisierung der Simulation des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimentes werden die Startwerte für die Isotopomere übergeben. Als Markierungsinput wurde  $^{13}\text{C}$  markierte Glucose in den Anteilen (Mol-%) unmarkiert :  $1\text{-}^{13}\text{C}$  markiert :  $u\text{-}^{13}\text{C}$  markiert = 40 : 40 : 20 verwendet (Kapitel 2.1.2).

<sup>3)</sup> Ehrig *et al.*, Konrad-Zuse-Zentrum für Informationstechnik (ZIB), Berlin

<sup>4)</sup> Ausgleichsrechnung (Stephanopoulos, 1998)

<sup>5)</sup> Minimierung der relativen Fehlerquadratsumme (Kapitel 8.3.3)

<sup>6)</sup> Streichert *et al.*, Computer Science Department, Universität Tübingen

<sup>7)</sup> siehe Kapitel 8.3.4

**Abbildung 8-1.** Die isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse umfasst Modellierung (Kapitel 7), dynamische Simulation von  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimenten und Schätzung der intrazellulären Raten (jeweils grau hinterlegt). Die Identifikation der intrazellulären Raten erfolgte iterativ. In jedem Iterationszyklus wurde das nichtlineare, gekoppelte und steife Isotopomeren-Bilanzgleichungssystem mit dem Extrapolationsintegrator LIMEX gelöst. Für die Identifikation der Parameter, das sind die intrazellulären Raten und Reversibilitäten, wurde der Evolutionsalgorithmus JavaEva verwendet.

Simulation von  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimenten durch numerische Integration und Schätzung der intrazellulären Raten sind gekoppelt (Abbildung 8-1). Jeder Iterationszyklus beginnt mit einer Schätzung der Raten in den parallelen Stoffwechselwegen, in den metabolischen Zyklen und mit einer Schätzung der Reversibilitäten. Bei der stöchiometrischen Flussanalyse zur Ermittlung der stationären Nettoraten und der reversiblen Raten findet eine Ausgleichs-

rechnung (Stephanopoulos, 1998) statt, die in der Modellierungs- und Simulationssoftware *Insilico discovery* implementiert ist. Nach der dynamischen Simulation der Isotopomerenverteilungen erfolgt im nächsten Schritt der Vergleich zwischen simulierten und experimentell ermittelten Markierungsverläufen für die Optimierung, bevor ein neuer Iterationszyklus beginnt.

Wegen der gekoppelten, nichtlinearen Gleichungsstruktur werden zur Schätzung intrazellulärer Raten unabhängig von den oben genannten Strategien zur Lösung von Isotopomeren-Bilanzgleichungssystemen Parameterschätzverfahren eingesetzt (Marx *et al.*, 1996; Wiechert *et al.*, 1997b; Schmidt *et al.*, 1999a; Dauner *et al.*, 2001b; Wittmann *et al.*, 2002b; van Winden *et al.*, 2005). Während die gesuchte intrazelluläre Ratenverteilung den Markierungszustand des Systems eindeutig bestimmt, gilt die Umkehrung nicht, d. h. abhängig von dem untersuchten Isotopomeren-Netzwerk können Raten nicht eindeutig identifiziert werden und es können mehrere Lösungen auftreten (Wiechert *et al.*, 1997a). Dies wurde zum Beispiel bei Glykolyse und Pentosephosphat-Weg in *Zymomonas mobilis* (Wiechert *et al.*, 1997a) oder bei den Stoffwechselwegen Glykolyse, Pentosephosphat-Weg, Tricarbonsäure-Zyklus und Glutaminstoffwechsel in Hybridomazellen (Zupke *et al.*, 1994) gezeigt. Zur Schätzung intrazellulärer Raten werden bei der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse als Optimierungsstrategien Evolutionäre Algorithmen (Schmidt *et al.*, 1999a; Dauner *et al.*, 2001a), Simulated Annealing (Schmidt *et al.*, 1999a; Dauner *et al.*, 2001a) und in MATLAB implementierte Optimierungsverfahren (Wittmann *et al.*, 2002b; van Winden *et al.*, 2005) verwendet.

## 8.2 Lösung von Isotopomeren-Bilanzgleichungssystemen

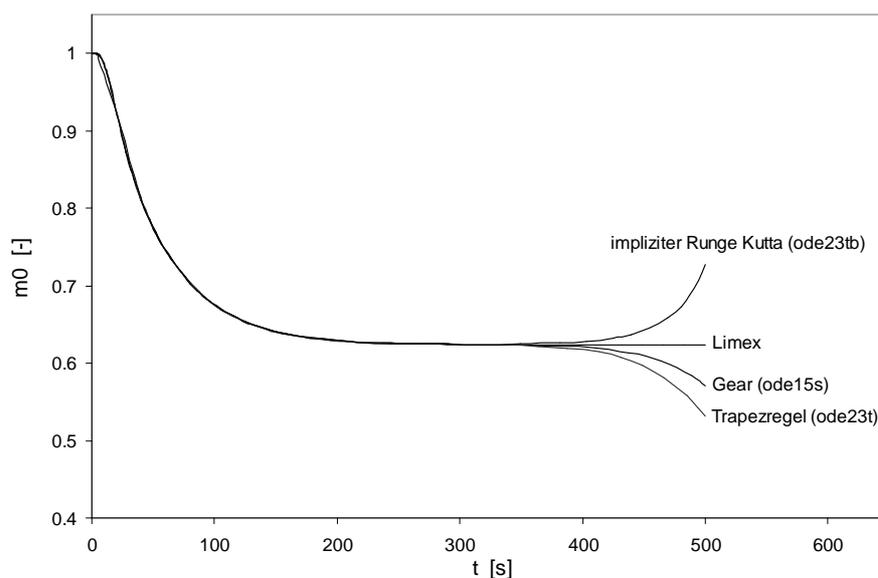
### 8.2.1 Lösungsansätze für stationäre Systeme

Während bei der stöchiometrischen Flussanalyse die gesuchte intrazelluläre Flussverteilung durch Lösung eines linearen Gleichungssystems ermittelt werden kann, muss bei der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse ein nichtlineares Isotopomeren-Bilanzgleichungssystem gelöst werden, das als Zustandsgrößen die bilanzierten Isotopomere und als Parameter die gesuchten intrazellulären Raten, gegebenenfalls auch die Poolkonzentrationen der Metabolite, umfasst (Kapitel 7.3). Wegen der nichtlinearen Struktur von Isotopomeren-Bilanzgleichungssystemen sind die Methoden der linearen Algebra, die bei der stöchiometrischen Flussanalyse verwendet werden (Varma *et al.*, 1994; van Heijden *et al.*, 1994a; van Heijden *et al.*, 1994b), nicht anwendbar. Die Komplexität des zu lösenden nichtlinearen Gleichungssystems hängt von Struktur und Größe des Netzwerkes sowie von bilanzierten Zustandsgrößen wie positionale Anreicherung, Massenisotopomere oder im allgemeinsten Fall Isotopomere ab. Zur Schätzung der intrazellulären Raten existieren verschiedene Ansätze. Im isotopisch

stationären Fall blieb die explizite Lösung von nichtlinearen Isotopomeren-Bilanzgleichungssystemen zunächst auf kleine Netzwerke mit wenigen bilanzierten Metaboliten beschränkt, da zur expliziten Berechnung intrazellulärer Raten ein nichtlineares Inversenproblem gelöst werden muss, für das bei größeren Netzwerken wegen der Komplexität der Gleichungsstruktur zunächst keine geeigneten algebraischen Algorithmen verfügbar waren (Wiechert *et al.*, 1997a; Wiechert *et al.*, 1997b). Eine analytische Lösung erlaubt die Formulierung von Isotopomeren-Bilanzgleichungssystemen auf Basis sogenannter Cumomere, die eine messtechnisch nicht erfassbare Aggregation bestimmter Isotopomere darstellen, wobei durch eine lineare Transformation die Anzahl bimolekularer Reaktionsschritte deutlich reduziert werden kann und die gesuchten Raten dann aus einer Kaskade linearer Gleichungen berechnet werden können (Wiechert *et al.*, 1999). Die Ermittlung einer inversen Matrix ist nicht erforderlich. Diese Vorgehensweise wurde auch von van Winden (van Winden *et al.*, 2005) verwendet. Ebenfalls zur Berechnung von isotopisch stationären Isotopomerenverteilungen werden schon seit längerem iterative Lösungsverfahren eingesetzt. So verwendete Zupke (Zupke *et al.*, 1994) ein Gauss-Seidel-Verfahren. Schmidt (Schmidt *et al.*, 1999a) führte das sogenannte iterative-averaging-Verfahren ein. Bei diesem handelt es sich um ein modifiziertes Jakobi-Iterationsverfahren. Dieses iterative Verfahren erlaubt eine numerisch stabile Simulation von Isotopomeren (Schmidt *et al.*, 1999a) und wurde daher in mehreren weiteren Untersuchungen eingesetzt (Dauner *et al.*, 2001a; Emmerling *et al.*, 2002). Es wurde auch in dieser Arbeit implementiert und zur Validierung verwendet (Kapitel 8.2.3). Eine weitere Möglichkeit zur Lösung von Isotopomeren-Bilanzgleichungssystemen besteht darin, die Relaxation von Isotopomeren durch numerische Integration des Bilanzgleichungssystems zu erfassen (Schmidt *et al.*, 1999a; Wittmann *et al.*, 1999; Wittmann *et al.*, 2002b). Die numerische Integration wird durch die Steifheit des zugrunde liegenden nichtlinearen Isotopomeren-Bilanzgleichungssystems in Gegenwart hoher Austauschflüsse bei den reversiblen Reaktionen erschwert. Ein weiteres Problem betrifft die numerische Stabilität (Schmidt *et al.*, 1999a). Jedoch hat diese Vorgehensweise den Vorteil, dass isotopisch instationäre Messdaten aus dem dynamischen Markierungsaufbau als zusätzliche Messinformationen für die Flussschätzung genutzt werden können. Das Problem numerischer Instabilität ist nicht auf numerische Integrationsverfahren beschränkt. Auch bei den erwähnten iterativen Ansätzen zur Lösung von nichtlinearen Isotopomeren-Bilanzgleichungssystemen im isotopisch stationären Fall besteht das Hauptproblem in der numerischen Stabilität bei hochreversiblen Reaktionen (Wiechert *et al.*, 1997b). Daher werden bei dem iterativen Verfahren von Schmidt (Schmidt *et al.*, 1999a) nach jedem Iterationsschritt die Isotopomere aller bilanzierten Metabolite auf eins normiert, so dass ein Vorteil gegenüber den numerischen Integrationsverfahren daher vor allem in der benötigten Rechenzeit und weniger in der Konvergenz der Lösungen zu sehen ist (Schmidt *et al.*, 1999a).

## 8.2.2 Numerische Integration

Bei der Simulation von  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimenten durch numerische Integration ist in der Regel ein steifes Isotopomeren-Differentialgleichungssystem zu lösen (Schmidt *et al.*, 1999a). Ursache dieser Steifheit sind große Austauschflüsse, d. h. große Raten für Hin- und Rückreaktionen, einzelner reversibler Reaktionen bei gleichzeitig niedrigen Nettoraten dieser oder anderer Umsetzungen im Netzwerk. Es wurden mehrere Integratoren hinsichtlich numerischer Stabilität und Rechenzeit verglichen. Hierfür wurde das Isotopomerenmodell (Kapitel 7) mit dem Integrator LIMEX (Deuflhard *et al.*, 1987; Ehrig *et al.*, 1999) und mit für steife Systeme geeigneten Integratoren in MATLAB (MATLAB 5.2, The MathWorks, Natick, USA) gelöst. Bei dem Integrator LIMEX handelt es sich um einen Extrapolationsintegrator zur Lösung linear-impliziter Differential-Algebra-Systeme (DAE-Systeme). In MATLAB sind die Integratoren ode15s, ode23s, oder 23t und ode23tb zur Lösung steifer Differentialgleichungssysteme geeignet (Shampine *et al.*, 1996; Shampine *et al.*, 1997; Shampine *et al.*, 1999). Bei dem Integrator ode15s handelt es sich um ein Gear-Verfahren (Mehrschritt-Verfahren), das auch von Wittmann (Wittmann *et al.*, 2002b) verwendet wurde. Der Integrator ode23t ist nur für moderat steife Probleme geeignet und basiert auf der Trapezregel (Einschritt-Verfahren), während es sich bei dem Integrator ode23tb um ein implizites Runge-Kutta-Verfahren 2. Ordnung handelt. Als repräsentatives Ergebnis der numerischen Integration mit den genannten Integratoren zeigt Abbildung 8-2 den simulierten Verlauf des  $m_0$  Massenisotopomers von PEP bei einem  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment (Lösung des Isotopomeren-Bilanzgleichungssystems gemäß Gleichung 7-1).



**Abbildung 8-2.** Zur Lösung des Isotopomeren-Differentialgleichungssystems war der Extrapolationsintegrator LIMEX in Bezug auf numerische Stabilität den Integrationsverfahren Gear, Trapezregel und implizitem Runge-Kutta-Verfahren überlegen wie das Beispiel des  $m_0$  Massenisotopomers von PEP zeigt. Es wurden identische Integrationseinstellungen gewählt und ein Reversibilitätsfaktor aller reversiblen Reaktionen von  $\beta_j = 10$  (Gleichung 7-4) angenommen.

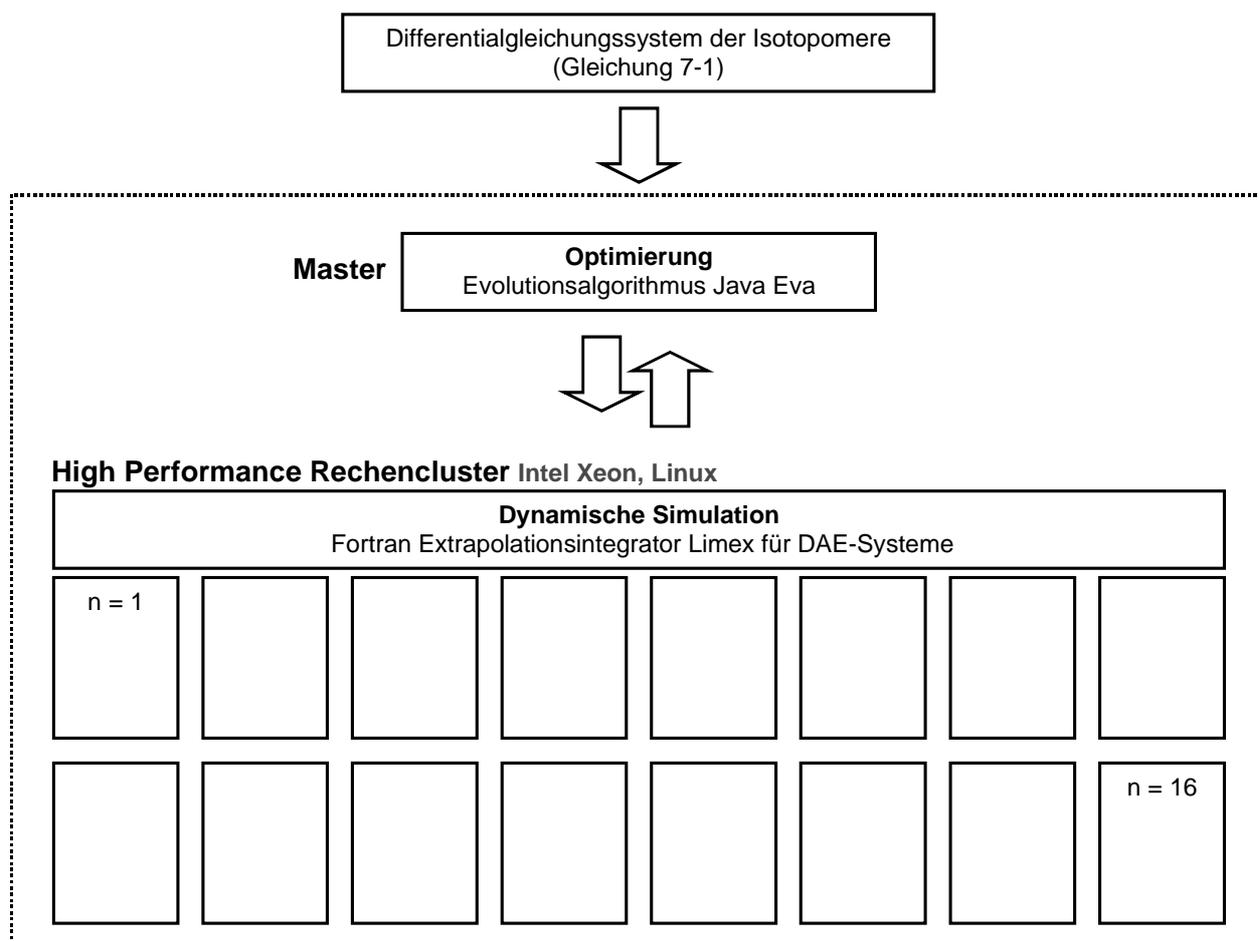
Bei den reversiblen Reaktionen wurde ein Reversibilitätsfaktor (Kapitel 7.4.2, Gleichung 7-4) von  $\beta_j = 10$  angenommen. Bei allen Integratoren wurden die MATLAB Standardeinstellungen zur Fehlerkontrolle (absolute Fehlertoleranz  $aTol = 1.0^{-6}$ , relative Fehlertoleranz  $rTol = 1.0^{-3}$ , minimale Schrittweite  $h = 1.0^{-12}$ ) verwendet. Geringfügige Abweichungen bei den simulierten Verläufen wurden im Zeitbereich kleiner 20 s festgestellt. Als Ursache hierfür können steile Gradienten im Anfangsbereich der Integration angeführt werden. Konvergenz der MATLAB-Integrationsverfahren konnte nur bis zu einer Simulationszeit von ca. 350 s beobachtet werden. Bei längeren Simulationszeiten erlaubt keiner der MATLAB-Integratoren eine numerisch stabile Integration. Bei hohen Genauigkeitsanforderungen und steifen Systemen sind die Integrationsverfahren Trapezregel und implizites Runge-Kutta-Verfahren dem Gear-Verfahren unterlegen (Taubert *et al.*, 2005). Abbildung 8-2 zeigt, dass dies auch für das untersuchte Isotopomeren-Differentialgleichungssystem (Kapitel 7) gilt und bei Verwendung von MATLAB das Gear-Integrationsverfahren eingesetzt werden sollte. Das Gear-Verfahren wurde auch von Wittmann (Wittmann *et al.*, 2002b) benutzt. Allerdings ist bei gleichen Einstellungen das LIMEX-Extrapolationsverfahren dem Gear-Verfahren überlegen (Abbildung 8-2). Die Integration mit LIMEX wurde erst im Bereich von ca. 700 s Simulationszeit instabil (Daten in Abbildung 8-2 nicht gezeigt). Daher wurde zur Lösung des Isotopomeren-Bilanzgleichungssystems in dieser Arbeit der Extrapolationsintegrator LIMEX verwendet (Kapitel 8.2.2.1). Grundsätzlich kann die Vorgehensweise der numerischen Integration auch für die isotopisch stationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse verwendet werden, indem in den isotopisch stationären Zustand integriert wird. Informationen aus der Markierungsdynamik bleiben in diesem Fall jedoch für die Identifikation intrazellulärer Raten ungenutzt.

### 8.2.2.1 Dynamische Simulationen

Der Extrapolationsintegrator LIMEX (Deuffhard *et al.*, 1987; Ehrig *et al.*, 1999) ist zur Lösung linear-impliziter Differential-Algebra-Systeme geeignet. LIMEX steht dabei für *Extrapolationsintegrator* für *Linear Implizite* DAE-Systeme. Dieses Einschritt-Verfahren basiert auf einer semi-impliziten Euler-Diskretisierung und ist als Extrapolationsverfahren angelegt, wobei die Schrittweite sukzessiv verkleinert wird und aus den für die verschiedenen Schrittweiten  $h$  erhaltenen Lösungen eine Lösung für  $h = 0$  extrapoliert wird. Bei LIMEX bildet dabei die Fehlerschätzung die Grundlage für die Schrittweiteschätzung, d. h. durch Vorgabe einer gewünschten Genauigkeitsschranke wird mittels eines adaptiven Gittergenerierungsalgorithmus gewährleistet, dass die geforderte Genauigkeit innerhalb des nächsten Integrationsschrittes erreicht wird. Da sich die Verteilung der Stützstellen im allgemeinen nach jedem Integrationsschritt ändern wird und LIMEX auf einer Fehlerschätzung basiert, wird kein Mehrschritt-Verfahren verwendet. Wegen der impliziten Formulierung ist LIMEX zur

Lösung steifer DAE-Systeme geeignet. Durch das Extrapolationsverfahren kann eine hohe Genauigkeit bei gleichzeitig verhältnismäßig geringer Rechenzeit erreicht werden.

Bei der Identifikation der intrazellulären Raten ist in jedem Iterationszyklus ein nichtlineares, gekoppeltes und steifes Isotopomeren-Differentialgleichungssystem zu lösen (Kapitel 8.1). Der zeitkritische Schritt bei einem aus Optimierung (Kapitel 8.3.3) und numerischer Integration des Isotopomeren-Differentialgleichungssystems bestehenden Iterationszyklus ist die numerische Integration. Aus diesem Grund wurden die Berechnungen auf einem Rechencluster durchgeführt, wobei die dynamischen Simulationen der Isotopomerenverteilungen parallelisiert wurden, während die Optimierung von einem Master-Rechner gesteuert wurde. Auf diese Weise konnten 16 dynamische Simulationen parallel durchgeführt werden. Die verwendete Rechnerarchitektur zeigt Abbildung 8-3. Die mittlere Auswertzeit zur Lösung der 550 Isotopomeren-Bilanzgleichungen bei numerischer Integration mit LIMEX bei einer Simulationszeit von 600 s betrug ungefähr 15 s.



**Abbildung 8-3.** Verwendete Rechnerarchitektur zur dynamischen Simulation von Isotopomeren-Bilanzgleichungssystemen und Parameteridentifikation (IBVT, 2005, Implementierung der Software durch Mauch). Die zeitkritische numerische Integration wurde parallelisiert. Die Optimierung erfolgte von einem Master-Rechner.

LIMEX ermöglicht eine problemangepasste Einstellung der Integrationsparameter absolute Fehlertoleranz, relative Fehlertoleranz und minimale Schrittweite durch den Benutzer. Verwendet wurde die Version LIMEX4-3B (Ehrig *et al.*, 2004). Eine numerisch stabile Integration in dem betrachteten Simulationsbereich bis 600 s bei akzeptablen Rechenzeiten wurde mit den Einstellungen  $aTol = 1.0^{-7}$ ,  $rTol = 1.0^{-6}$  und minimale Schrittweite  $h = 1.0^{-8}$  erzielt. Da die Jakobi-Matrix nur sehr wenige Einträge aufwies, es sich also um eine Sparse-Matrix handelte, wurde die LIMEX-Option dynamic sparsing verwendet und es wurden nur Einträge in der Jakobi-Matrix größer  $10^{-3}$  berücksichtigt. Insbesondere wurden negative Lösungen vorübergehend zugelassen, um im Bereich kleiner Schrittweiten die andernfalls extrem hohe Anzahl an Schrittweitenreduzierungen herabzusetzen. Mit diesen Integrationseinstellungen konnte gegenüber den MATLAB-Integratoren erhöhte numerische Stabilität bei einer um eine Größenordnung niedrigeren Rechenzeit realisiert werden. Ein weiterer Vorteil von LIMEX gegenüber den Integratoren in MATLAB ist, dass definierte Zeitpunkte angegeben werden können, bis zu denen LIMEX integriert, das Ergebnis ausgibt und auf diese Weise den Vergleich zwischen berechneten und simulierten Isotopomerenverteilungen bei Zeitreihenexperimenten ermöglicht. Diese Informationen werden in der Zielfunktion (Kapitel 8.3.3) zur Identifikation der intrazellulären Raten benötigt.

### 8.2.2.2 Numerische Stabilität

Numerisch stabile Lösungen können weder bei der numerischen Integration des Isotopomeren-Bilanzgleichungssystems (Schmidt *et al.*, 1999a; Wittmann *et al.*, 2002b) noch bei der Verwendung von iterativen (Schmidt *et al.*, 1999a; Dauner *et al.*, 2001a) oder explizit analytischen Verfahren (Wiechert *et al.*, 1999; van Winden *et al.*, 2005) für beliebige Parameter bei der numerischen Lösung des algebraischen Gleichungssystems ermittelt werden. Aus diesem Grund werden die Reversibilitäten bei den reversiblen Reaktionen durch Nebenbedingungen (Kapitel 8.3.3, Gleichung 8-2) beschränkt (Wiechert *et al.*, 1997a; Schmidt *et al.*, 1999a; Dauner *et al.*, 2001a; Wittmann *et al.*, 2002b). Die ermittelten oberen Grenzen der Reversibilitätsfaktoren  $\beta_j$  (Kapitel 7.4.2), die mit den optimierten Limex-Integrationseinstellungen (Kapitel 8.2.2.1) noch eine numerisch stabile Integration ermöglichen, sind in Tabelle 8-1 angegeben. Als untere Grenze wurde jeweils 0 (irreversible Reaktion) gewählt. Als freie Flüsse (Wiechert *et al.*, 1997a), entsprechend den beiden Freiheitsgraden des Teilmodells A (Kapitel 7.5.1), wurden die von den Enzymen Phosphoglucose Isomerase ( $r_2$ ) und Phosphoenolpyruvat-Carboxylase/Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase ( $r_{13}$ ) katalysierten Umsetzungen gewählt (Kapitel 7.2.2).

**Tabelle 8-1.** Maximal zulässige Reversibilitätsfaktoren  $\beta_j$  (siehe Reaktionsmodell Abbildung 7-3).

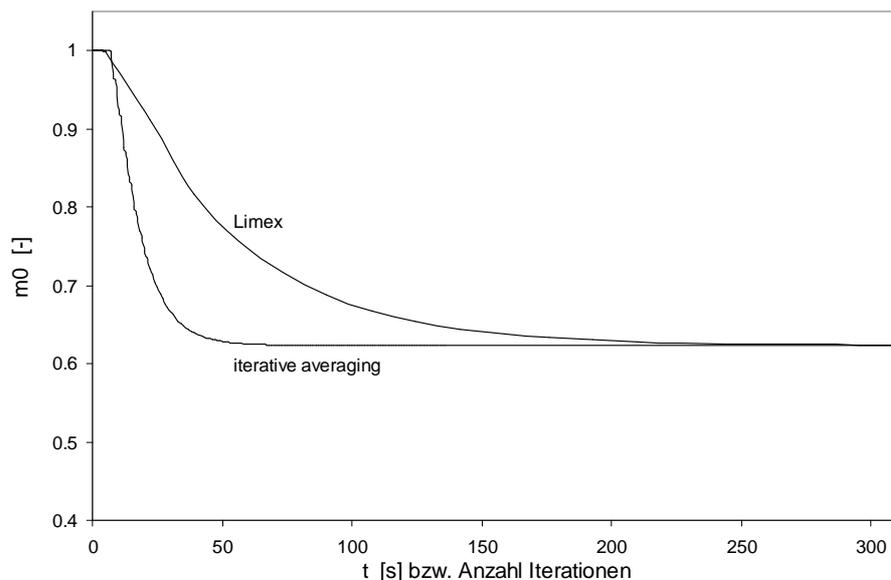
	$r_j$	$\beta_j$
Glykolyse	$r_2$	10
Glykolyse	$r_4$	5
PPP <sup>a)</sup>	$r_7$	5
PPP	$r_8$	5
PPP	$r_9$	5
Glykolyse	$r_{10}$	15
Glykolyse	$r_{11}$	20
anaplerotisch	$r_{13}$	20
TCA <sup>b)</sup>	$r_{16}$	20
TCA	$r_{17}$	20

<sup>a)</sup> Pentosephosphat-Weg

<sup>b)</sup> Tricarbonsäure-Zyklus

### 8.2.3 Iteratives Verfahren

Zur Validierung und Untersuchung von Rechenzeit und Konvergenz der Lösungen wurde neben der numerischen Integration auch das von Schmidt (Schmidt *et al.*, 1999a) vorgeschlagene algebraische iterative-averaging-Verfahren, ein modifiziertes Jakobi-Iterationsverfahren, in MATLAB implementiert. Sowohl für die numerische Integration mit LIMEX als auch für das modifizierte Jakobi-Iterationsverfahren mit Normierung der Isotopomerenanteile auf eins nach jedem Iterationsschritt (Schmidt *et al.*, 1999a) konnte Konvergenz gegen die gleichen isotopisch stationären Werte festgestellt werden. Dies ist in Abbildung 8-4 exemplarisch für das m0 Massenisotopomer von PEP gezeigt.



**Abbildung 8-4.** Bei Lösung des Isotopomeren-Differentialgleichungssystems konvergieren die simulierten Verläufe bei numerischer Integration (LIMEX) und modifiziertem Jakobi-Iterationsverfahren (Schmidt *et al.*, 1999a) gegen den gleichen isotopisch stationären Wert wie das Beispiel des  $m_0$  Massenisotopomers von PEP zeigt. Das Jakobi-Iterationsverfahren erreicht nach ca. 75 Iterationen Stationarität. Es wurde ein Reversibilitätsfaktor aller reversiblen Reaktionen von  $\beta_j = 10$  angenommen.

Hinsichtlich der benötigten Rechenzeit je Iterationszyklus war das Jakobi-Iterationsverfahren der numerischen Integration überlegen. Gegenüber den bisher verwendeten MATLAB-Integratoren (Schmidt *et al.*, 1999a; Wittmann *et al.*, 2002b) ist die numerische Integration mit LIMEX um eine Größenordnung schneller. LIMEX ist eine Größenordnung langsamer als das iterative Lösungsverfahren. Dieser zusätzliche Aufwand lässt sich durch das erweiterte Anwendungsspektrum der isotopisch instationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse (Kapitel 9.1) rechtfertigen.

## 8.3 Flussschätzung

### 8.3.1 Parameteridentifikation in Isotopomeren-Netzwerken

Während die intrazelluläre Ratenverteilung den Markierungszustand des Systems eindeutig bestimmt, gilt die Umkehrung nicht und es können je nach Topologie des Netzwerkes multiple Flusslösungen auftreten (Wiechert *et al.*, 1997a). Beispiele hierfür wurden bereits einleitend genannt (Kapitel 8.1). Im isotopisch stationären Fall ist ein nichtlineares Inversenproblem zu lösen, für das es bei Verwendung des sogenannten Cumomeren-Konzeptes (Wiechert *et al.*, 1999) eine explizite analytische Lösung gibt. Zur Identifikation der Parameter, das sind die gesuchten Raten (Nettoraten bzw. Raten von Hin-/Rückreaktionen),

sind Parameterschätzverfahren zu verwenden, da eine Berechnung von Gröbner-Basen auf sehr kleine Systeme beschränkt ist (Mollney *et al.*, 1999). Ebenfalls bei Verwendung des Cumomeren-Konzeptes kam van Winden (van Winden *et al.*, 2001b) bei der Analyse von Netzwerken realistischer Größe zu der gleichen Aussage. Jedoch ist diese Vorgehensweise bei der numerischen Integration von Isotopomeren-Bilanzgleichungssystemen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, nicht anwendbar. Aufgrund der Komplexität der nichtlinearen Gleichungsstruktur, insbesondere wenn reversible Reaktionen zugelassen werden, und der Abhängigkeit von der Topologie des Netzwerkes ist der Kenntnisstand bei der Identifikation intrazellulärer Raten aus Markierungsexperimenten rudimentär (Wiechert *et al.*, 1997b). Die Frage der strukturellen Identifikation der Parameter, d. h. der stationären Raten, in Isotopomeren-Netzwerken realistischer Größe kann nach Isermann (Isermann *et al.*, 2003) eindeutig nur für den unrealistischen Fall vollständiger Messinformation beantwortet werden, d. h. unter der Voraussetzung, dass sämtliche bilanzierte Isotopomere gemessen werden können. Bei diesen strukturellen Untersuchungen bleiben außerdem Messfehler unberücksichtigt. Wegen dieser Restriktionen sind zur Identifikation intrazellulärer Raten aus  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimenten Parameterschätzverfahren, die auch eine Evaluierung von Daten aus größeren Netzwerken ermöglichen, zu verwenden (Wiechert *et al.*, 1997b; Isermann *et al.*, 2003; van Winden *et al.*, 2005). Eingesetzt hierfür wurden Evolutionäre Algorithmen (Schmidt *et al.*, 1999a; Dauner *et al.*, 2001a), Simulated Annealing (Schmidt *et al.*, 1999a; Dauner *et al.*, 2001a) und in MATLAB implementierte Optimierungsverfahren (Wittmann *et al.*, 2002b; van Winden *et al.*, 2005). Da es sich bei Parameterschätzverfahren um numerische Verfahren handelt, kann weder die Existenz noch die Eindeutigkeit von Lösungen bewiesen werden (Isermann *et al.*, 2003). Um mehrere Lösungen zu verhindern, sollten daher so viele Messinformationen wie möglich für die Flusssschätzung verwendet werden (Wiechert *et al.*, 1997b; Isermann *et al.*, 2003; Wiechert *et al.*, 2005). Zur Vermeidung lokaler Lösungen sind die Startwerte der Parameterschätzverfahren zu variieren und mehrere Optimierungen durchzuführen (Wiechert *et al.*, 1997b; Schmidt *et al.*, 1999a; Isermann *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit wurden LC-MS basierte Massenisotopomerenverteilungen aus der isotopisch instationären Markierungsdynamik als zusätzliche Messinformationen für die Schätzung der gesuchten intrazellulären Raten verwendet. Da zur Parameteridentifikation bei nichtlinearen Problemen wie der isotopomerenbasierten Analyse von biochemischen Reaktionsnetzwerken globale Suchstrategien besonders geeignet sind (Mendes *et al.*, 1998), wurde für die Identifikation der intrazellulären Raten und der Reversibilitätsfaktoren der Evolutionsalgorithmus JavaEVA (Streichert *et al.*, 2005) verwendet.

### 8.3.2 Parameterschätzproblem im untersuchten Modellsystem

#### Parameter

Im untersuchten Teilmodell A (Abbildung 7-3) waren insgesamt 30 Raten zu bestimmen (Kapitel 7.5.2). In jedem Iterationszyklus waren zwei Raten in parallelen Reaktionswegen und 10 Reversibilitätsfaktoren reversibler Reaktionen zu schätzen:

- 2 Flüsse in den parallelen Reaktionswegen:  $\mathbf{r} = (r_2, r_{13})^T$
- 10 Reversibilitätsfaktoren:  $\boldsymbol{\beta} = (\beta_2, \beta_4, \beta_7, \beta_8, \beta_9, \beta_{10}, \beta_{11}, \beta_{13}, \beta_{16}, \beta_{17})^T$

#### Messdaten

Die Identifikation der Parameter erfolgte mit unterschiedlichen Messdatensätzen.

##### 1. <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse mittels 48 isotopisch instationärer und 23 isotopisch stationärer LC-MS Messdaten (Kapitel 9.2)

Es wurden die Massenisotopomere aus dem isotopisch instationären Übergangsverhalten (Zeitpunkte  $t = 91, 22, 346, 589$  s) von DHAP+GAP, 2PG+3PG und PEP verwendet (Kapitel 6.3.2). Bei diesen Metaboliten konnte die Markierungsdynamik der  $n+1$  Massenisotopomere ( $m_0, m+1, m+2, m+3$ ) quantifiziert werden. Damit standen insgesamt 48 Messungen (3 Metabolite  $\times$  4 Massenisotopomere  $\times$  4 Zeitpunkte) zu Verfügung. Als weitere Messung wurde auch die isotopisch stationäre Massenisotopomerenverteilung berücksichtigt (Tabelle 6-1, Kapitel 6.3.1). Dies bedeutete 23 zusätzlich gemessene Massenisotopomere.

##### 2. <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse mittels 23 isotopisch stationärer LC-MS Messdaten (Kapitel 9.3.1)

Es wurden die isotopisch stationären Messungen von 23 Massenisotopomeren verwendet (Tabelle 6-1, Kapitel 6.3.1). Vollständige Messinformation lag für DHAP+GAP, 2PG+3PG und PEP vor (3 Metabolite  $\times$  4 Massenisotopomere). Bei FBP wurden die  $m_0$  bis  $m+3$  Massenisotopomere sowie das  $m+6$  Massenisotopomer, bei P5P wurden die  $m_0$  und  $m+1$  Massenisotopomere, bei 6PG die  $m_0, m+1, m+3$  und  $m+6$  Massenisotopomere verwendet. Nicht verwendet wurden die nur als Pools quantifizierten Massenisotopomere von G6P+F6P und wegen des hohen Variationskoeffizienten von 34.5% das  $m+2$  Massenisotopomer von 6PG (Kapitel 6.3.1).

##### 3. <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse mittels 28 isotopisch stationärer GC-MS Messdaten (Kapitel 9.3.2)

Es wurden die isotopisch stationären Messungen von 28 Massenisotopomeren der proteinogenen Aminosäuren berücksichtigt. Als Messdaten konnten die quantitativ bestimmten Massenisotopomere von 15 proteinogenen Aminosäuren verwendet werden (Kapitel 4.3.1). Von den Aminosäuren-Familien (Aromaten-, Serin-, Pyruvat-, Aspartat-

und Glutamat-Familie) wurden nach den Kriterien Anzahl der C-Atome, d. h. Anzahl der Messinformationen, Intensität der Messsignale und Eindeutigkeit der Zuordnung der Markierungsmuster zu den Precursor-Metaboliten der zentralen Kohlenstoffwechselwege Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus die Aminosäuren Phenylalanin, Serin, Alanin, Aspartat und Glutamat ausgewählt. Außerdem wurden die Massenisotopomere von Histidin für die Flussschätzung benutzt. Bei Phenylalanin wurden die Massenisotopomere  $m_0$  bis  $m+5$ , bei Serin die Massenisotopomere  $m_0$  bis  $m+3$ , bei Alanin die Massenisotopomere  $m_0$  bis  $m+3$ , bei Aspartat die Massenisotopomere  $m_0$  bis  $m+4$ , bei Glutamat die Massenisotopomere  $m_0$  bis  $m+5$  und bei Histidin die Massenisotopomere  $m_0$  bis  $m+2$  für die Flussschätzung verwendet. Wegen redundanter Information und größeren Messfehlern wurden die isotopisch stationären Massenisotopomere der freien Aminosäuren Alanin und Glutamat nicht verwendet (Kapitel 4.3.2.1). Aufgrund der schwer interpretierbaren Zeitkonstanten blieben bei diesen freien Aminosäuren die Messungen aus der Markierungsdynamik ebenfalls für die Identifikation der intrazellulären Raten ungenutzt (Kapitel 4.3.2.2).

#### 4. **<sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse mittels 23 isotopisch stationärer LC-MS und 28 isotopisch stationärer GC-MS Messdaten (Kapitel 9.3.3)**

Es wurden die isotopisch stationären LC-MS Messungen von 23 Massenisotopomeren des zentralen Kohlenstoffwechsels (Tabelle 6-1, Kapitel 6.3.1) und die isotopisch stationären GC-MS Messungen von 28 Massenisotopomeren der proteinogenen Aminosäuren (Kapitel 4.3.1) verwendet.

### 8.3.3 Optimierung unter Nebenbedingungen

Eine in der Parameterschätzung übliche Vorgehensweise bei der Formulierung von Zielfunktionen ist, die Fehlerquadratsumme aus experimentell ermittelten Daten und simulierten Werten zu minimieren. Findet bei der <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse in der Zielfunktion eine Gewichtung von Messungen statt, so erfolgt diese meist auf Basis von Varianzen (Wiechert *et al.*, 1997b; Dauner *et al.*, 2001a; van Winden *et al.*, 2005), von absoluten Messfehlern (Schmidt *et al.*, 1999a) sowie von relativen Messfehlern (Wittmann *et al.*, 2002b).

In dieser Arbeit wurden zur Schätzung der intrazellulären Stoffflussverteilung in *E. coli* sowohl LC-MS basierte Messungen aus der isotopisch instationären Markierungsdynamik, d. h. aus Zeitreihenexperimenten, als auch LC-MS und GC-MS basierte Messungen unter isotopisch stationären Bedingungen verwendet (Kapitel 8.3.2).

Das Optimierungsproblem zur Bestimmung der 30 Raten im zentralen Kohlenstoffwechsel des Teilmodells A (Abbildung 7-3) mittels  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse ist in Tabelle 8-2 zusammengefasst.

**Tabelle 8-2.** Anzahl der gemessenen Massenisotopomere und Anzahl der Freiheitsgrade für die isotopisch instationäre und stationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse im Reaktionsmodell gemäß Abbildung 7-3.

$^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse	Kapitel	Anzahl gemessene Massenisotopomere			Anzahl Freiheitsgrade (Kapitel 7.5.2)
		isotopisch instationär	isotopisch stationär		
			LC-MS	LC-MS	
isotopisch instationär und isotopisch stationär	9.2	48	23	-	12
isotopisch stationär	9.3.1	-	23	-	12
isotopisch stationär	9.3.2	-	-	28	12
isotopisch stationär	9.3.3	-	23	28	12

### Zielfunktion

Die Zielfunktion wurde auf Basis relativer Fehlerquadratsummen formuliert, d. h. je Messpunkt wurde die quadrierte Abweichung zwischen gemessenem und simuliertem Massenisotopomerenanteil mit dem gemessenen Wert gewichtet (Gleichung 8-1). Hierbei waren Nebenbedingungen für die freien Flüsse und die maximal zulässigen Reversibilitätsfaktoren einzuhalten (Gleichung 8-2).

$$\min g(\mathbf{r}, \mathbf{I}_{\text{Glucose}}) = \sum_{i=1}^N \left( \frac{\mathbf{MI}_{i,\text{gem}}|t_i - \mathbf{MI}_{i,\text{sim}}(\mathbf{r}, \mathbf{I}_{\text{Glucose}})|t_i}{\mathbf{MI}_{i,\text{sim}}(\mathbf{r}, \mathbf{I}_{\text{Glucose}})|t_i} \right)^2 \quad (8-1)$$

mit den Nebenbedingungen

$$0 \leq \mathbf{r}_j^{\text{frei}} \leq \mathbf{r}_j^{\text{Grenz}} \quad \text{und} \quad 0 \leq \beta_j \leq \beta_j^{\text{max}} \quad (8-2)$$

In der Zielfunktion  $g$  (Gleichung 8-1) bezeichnet  $\mathbf{r}$  den Ratenvektor und  $\mathbf{I}_{\text{Glucose}}$  den Vektor der molaren Isotopomerenanteile markierter Glucose, die bei einem  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment zugegeben wird.  $\mathbf{MI}_{i,\text{gem}}|t_i$  und  $\mathbf{MI}_{i,\text{sim}}|t_i$  bezeichnen die zum Zeitpunkt  $t$  gemessenen bzw. simulierten Massenisotopomerenverteilungen der  $i = 1, \dots, N$  gemessenen Metabolite. Die Obergrenzen der beiden freien Flüsse  $r_2$  und  $r_{13}$  wurden aus Flussanalysen ermittelt (siehe unten), die maximal zulässigen Reversibilitätsfaktoren wurden in Abhängigkeit der numerischen Stabilität des Systems definiert (Kapitel 8.2.2.2). Alle Messwerte tragen in gleichem Maße zur Zielfunktion bei. Dies ist dann vorteilhaft, wenn die Massenisotopomerenanteile,

wie z. B. unter den gewählten experimentellen Bedingungen die  $m_0$  und  $m+2$  Massenisotopomerenanteile bei den C-3 Molekülen (Kapitel 6.3.1), unterschiedlich große absolute Abweichungen zwischen experimentell ermittelten Messungen und simulierten Werten aufweisen, jedoch mit ähnlichen Messfehlern gemessen werden können. Dies war bei den LC-MS basierten Massenisotopomeren von DHAP+GAP, 2PG+3PG und PEP mit Variationskoeffizienten zwischen 3.7% und 14% (DHAP+GAP), 4.8% und 13.3% (2PG+3PG) bzw. 5.2% und 14.2% (PEP) näherungsweise der Fall (Kapitel 6.3.1).

Relative Fehlerquadratsummen wurden in der Zielfunktion einheitlich für die isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse (LC-MS) und die isotopisch stationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse (LC-MS und GC-MS) verwendet. Ebenfalls untersucht wurde eine Gewichtung der Zielfunktion mit den Varianzen unter Verwendung eines Datensatzes isotopisch stationärer LC-MS Messungen bei der isotopisch stationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse. Es wurde kein Unterschied bei der identifizierten Flussverteilung festgestellt.

Für die Optimierung wurde der Evolutionsalgorithmus JavaEva (Streichert *et al.*, 2005) verwendet. Bei bis zu 55000 Funktionsaufrufen für die Parameteridentifikation wurden für eine Optimierung bis zu 9.5 d benötigt.

Des Weiteren wurde in jedem Optimierungszyklus eine stöchiometrische Flussanalyse durchgeführt (Abbildung 8-1). Da an dieser Stelle bereits eine Ausgleichsrechnung unter Berücksichtigung der gemessenen Raten stattfand, konnte die Identifikation der freien Flüsse und der Reversibilitätsfaktoren von diesem Schritt entkoppelt werden und musste nicht in der Zielfunktion (Gleichung 8-1) berücksichtigt werden (Wiechert *et al.*, 1997b; Schmidt *et al.*, 1999a; Dauner *et al.*, 2001b; Wittmann *et al.*, 2002b).

Aus Gründen der numerischen Stabilität erfolgt die Optimierung unter Nebenbedingungen (Wiechert *et al.*, 1997a; Schmidt *et al.*, 1999a; Dauner *et al.*, 2001a; Wittmann *et al.*, 2002b). Diese sind in Gleichung 8-2 formuliert. Auf die oberen Grenzen der Reversibilitätsfaktoren wurde bereits in Kapitel 8.2.2.2 eingegangen. Als untere Schranke der freien Flüsse  $r_2$  (Phosphoglucose Isomerase) und  $r_{13}$  (Phosphoenolpyruvat-Carboxylase/Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase) wurde 0 gewählt (kein Fluss), als obere Schranke kann die Glucoseaufnahmerate unter Berücksichtigung der Biomasseabflüsse verwendet werden. Die stöchiometrische Flussanalyse erlaubt eine weitere Beschränkung der oberen Grenzen durch die Ermittlung von *Grenzflüssen*, d. h. der maximal möglichen Flüsse in parallelen Wegen. Auf diese Weise kann das Optimierungsproblem vereinfacht werden. Diese Vorgehensweise kann vor allem bei Analyse und Optimierung großskaliger metabolischer Netzwerke zweckmäßig sein.

### 8.3.4 Statistische Bewertung der Ergebnisse

Die statistische Analyse identifizierter Parameter in Isotopomeren-Netzwerken wird durch deren nichtlineare, gekoppelte Struktur erschwert (Wiechert *et al.*, 1997b). Insbesondere sind die Methoden der Linearen Algebra, die zur Analyse linearer (statistischer) Modelle mit normalverteilten Zufallsgrößen eingesetzt werden können und bei der stöchiometrischen Flussanalyse verwendet werden (Wang *et al.*, 1983; van Heijden *et al.*, 1994a; van Heijden *et al.*, 1994b; Vallino *et al.*, 1993), bei der Analyse nichtlinearer Isotopomeren-Netzwerke nicht anwendbar. Nach Wiechert (Wiechert *et al.*, 1997b) ist der Kenntnisstand bei der statistischen Auswertung von  $^{13}\text{C}$ -Markierungssystemen vor allem wegen starker Nichtlinearitäten in Gegenwart großer Austauschflüsse unzureichend und eine nichtlineare Transformation dieser reversiblen Reaktionen erforderlich, um die statistischen Auswerteverfahren der linearen Regressionstheorie zumindest näherungsweise anwenden zu können (Schmidt *et al.*, 1999b; Wiechert *et al.*, 1999; Dauner *et al.*, 2001a; Wittmann *et al.*, 2002b).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen durchgeführt. Auf die problematische Bestimmung statistischer Maße aus Zeitreihenexperimenten wurde bereits in Kapitel 8.3.3 hingewiesen. Wegen der Nichtlinearität des Systems und der Berücksichtigung isotopisch stationärer und instationärer Messdaten wurde insbesondere die Güte der Schätzung der intrazellulären Raten bei dem verwendeten Evolutionsalgorithmus (Kapitel 8.3.3) untersucht. Hierzu wurden für die in parallelen Berechnungszyklen mit unterschiedlichen, zufällig verteilten Startwerten (Kapitel 8.2.2.1) geschätzten Raten Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet, die bei den  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen in Kapitel 9 angegeben sind. Außerdem wurden Messdatensätze von unterschiedlichen Analysetechniken (LC-MS, GC-MS) zur Identifikation der intrazellulären Stoffflussverteilung herangezogen, um mögliche systematische oder durch die Analysemethoden verursachte Fehler zu minimieren. Im einzelnen wurden isotopisch instationäre Messungen (LC-MS) und stationäre Messungen (LC-MS, GC-MS) für die Auswertung benutzt (Kapitel 4.3.1 und 6.3).

Es wurde ein Chi-Quadrat-Test zur Überprüfung der Gültigkeit des Modells bzw. der Daten auf Messfehler durchgeführt (Pazman, 1993; Stephanopoulos, 1998). Der Chi-Quadrat-Test ist bei Nichtlinearität anwendbar, jedoch müssen normalverteilte Messfehler angenommen werden. Van Winden (van Winden *et al.*, 2005) verwendete den Chi-Quadrat-Test zur statistischen Beurteilung einer mit isotopisch stationären LC-MS Daten identifizierten Flussverteilung. Diese Vorgehensweise wurde auch in dieser Arbeit gewählt. Dabei ist die mit den Varianzen ( $\sigma_i$ ) gewichtete Quadratsumme  $k$  der Residuen zwischen gemessenen ( $m_{i,\text{gem}}$ ) und simulierten ( $m_{i,\text{sim}}$ ) Massenisotopomerenanteilen der  $i = 1, \dots, N$  gemessenen Metabolite

$$k = \sum_{i=1}^N \left( \frac{m_{i,\text{gem}} - m_{i,\text{sim}}}{\sigma_i} \right)^2 \quad (8-3)$$

eine  $\chi^2$ -verteilte Variable, die vom Vertrauensintervall (entsprechend der Wahrscheinlichkeit  $1 - \alpha$  bei einem Signifikanzniveau  $\alpha$ ) und der Anzahl der Freiheitsgrade FG mit

$$\text{FG} = \text{Anzahl unabhängiger Messdaten} - \text{Anzahl der Modellparameter} \quad (8-4)$$

abhängt und für die gelten muss

$$k < \chi^2(\text{FG}, 1 - \alpha) \quad (8-5)$$

damit der Chi-Quadrat-Test erfüllt ist (van Winden *et al.*, 2005), d. h. das Modell gültig ist bzw. die Messdaten keine groben Fehler aufweisen.

Für das Isotopomerenmodell (Teilmodul A in Abbildung 7-2) wurde ein 90%-Konfidenzintervall (Wiechert *et al.*, 1997b) zugrunde gelegt. Im nächsten Schritt wurde die Anzahl der Freiheitsgrade gemäß Gleichung 8-4 ermittelt (Wiechert *et al.*, 1997b; van Winden *et al.*, 2005). Es standen 23 LC-MS Messungen isotopisch stationärer Massenisotopomerenanteile (Kapitel 8.3.2), gemessene Raten von Glucoseaufnahme und Acetatbildung sowie 11 Biomasse-syntheseraten (Kapitel 7.2.3), die äußere Freiheitsgrade des Isotopomerenmodells darstellen, zur Verfügung. Es waren 20 Nettoraten zu quantifizieren. Die Anzahl der Freiheitsgrade betrug  $\text{FG} = 23 + 2 + 11 - 20 = 16$ .

Auf Basis der 23 isotopisch stationären LC-MS Messungen betrug  $\chi^2 = 23.5$ , die mit den Varianzen gewichtete Fehlerquadratsumme dagegen  $k = 183$ , so dass der Chi-Quadrat-Test fehlschlug ( $k > \chi^2$ ). Allerdings ist bei der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse ein Scheitern des Chi-Quadrat-Tests nicht unwahrscheinlich (Wiechert *et al.*, 1997b). Aus diesem Grund wurden die Beiträge der einzelnen isotopisch stationären LC-MS Messungen zur gewichteten Fehlerquadratsumme untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass bei Weglassung von 4 Massenisotopomeren der Metabolite FBP ( $k_{\text{FBP},m_0} = 39$ ,  $k_{\text{FBP},m+1} = 24$ ) und DHAP+GAP ( $k_{\text{DHAP+GAP},m_0} = 34$ ,  $k_{\text{DHAP+GAP},m+3} = 20$ ) der insgesamt 23 Messdaten die gewichtete Fehlerquadratsumme nur noch  $k = 66$  betrug. Als Ursache könnten demzufolge Messfehler angeführt werden. Tatsächlich erwies sich die Messung von FBP als nicht unproblematisch wie bei der Markierungs-dynamik bereits diskutiert wurde (Kapitel 6.3.2). Der Grund liegt vor allem darin, dass es sich um ein C-6 Molekül handelt und damit 7 Massenisotopomere zu quantifizieren sind. Für die Berechnung der Standardabweichungen wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Möglicherweise würde eine größere Grundgesamtheit auch zu größeren Standardabweichungen führen. So bedeuteten insbesondere die sehr kleinen Variationskoeffizienten bei dem  $m+1$  Massenisotopomer von FBP (5.5%) und bei dem  $m_0$  Massenisotopomer von

DHAP+GAP (3.7%) einen entsprechend großen Beitrag zur Fehlerquadratsumme. Lässt man dagegen einen Messfehler von 20% zu, wie dies bei der Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen üblich ist (Chassagnole *et al.*, 2002), so betrug die mit den Varianzen gewichtete Fehlerquadratsumme unter Berücksichtigung aller 23 Messdaten  $k = 35$ . Unter Auslassung der Massenisotopomere  $m_0$  von FBP ( $k_{\text{FBP},m_0} = 10$ ) und  $m+3$  von DHAP+GAP ( $k_{\text{DHAP+GAP},m+3} = 5.5$ ) berechnete sich die varianzgewichtete Fehlerquadratsumme auf einen Wert von  $k = 19.5$  und lag damit unterhalb von  $\chi^2 = 23.5$ .

Aus den obigen Ausführungen folgt, dass zur Ermittlung der zugrunde gelegten Messfehler Dreifachbestimmungen aus drei getrennten Analyseläufen aus einem Experiment nicht ausreichend waren. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei einzelnen Massenisotopomeren möglicherweise auch systematische Fehler, z. B. in einer komplexen Probenmatrix durch Peaküberlagerungen im Massenspektrum mit anderen Substanzen, auftreten. Einzelne Messfehler bei der Auswertung von Massenspektren - z. B. infolge starken Rauschens bei Massenisotopomeren, die nur in geringem Umfang entstanden wie das  $m+3$  Massenisotopomer von DHAP+GAP, oder aufgrund einer großen Anzahl von C-Atomen die Quantifizierung von mehreren Massenspuren erfordern wie bei FBP - können mit einem Chi-Quadrat-Test identifiziert werden. Indes befanden sich die mit unterschiedlichen Messdaten identifizierten Flussverteilungen in sehr guter Übereinstimmung (Kapitel 9). Von Fehlern in der Modellstruktur ist dagegen nicht auszugehen, da das betrachtete Reaktionsnetzwerk sehr gut untersucht ist (Fraenkel, 1996; Cronan *et al.*, 1996, Keseler 2005) und in diesem Modellsystem stöchiometrische (Chassagnole *et al.*, 2002) und  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen (Emmerling *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2003; Siddiquee *et al.*, 2004) durchgeführt wurden, deren Resultate mit den Ergebnissen dieser Arbeit (Kapitel 9) weitgehend konsistent sind.

Im stöchiometrischen Ganzzellmodell (Teilmodul B in Abbildung 7-2) wurde ebenfalls ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Den drei Freiheitsgraden ( $\text{FG} = 133 \text{ Raten} - 130 \text{ bilanzierte Metabolite} = 3$ ) standen vier gemessene Austauschflüsse (Glucoseaufnahme, Sauerstoffaufnahme, Kohlendioxidbildungsrate und Acetatbildungsrate), so dass das Ganzzellmodell einfach überbestimmt war (Kapitel 7.5.1). Es wurde eine  $\chi^2$ -Wahrscheinlichkeit von 77% ermittelt (Vertrauensintervall 95%, 10% Messfehler der Eingangsgrößen). Chassagnole (Chassagnole *et al.*, 2002) ermittelte einen Wert von  $\chi^2 = 69.9\%$  und stellte ebenfalls keine Inkonsistenzen fest.

## 9 Isotopisch instationäre und stationäre $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen in *E. coli*

### 9.1 Einleitung

Die Ergebnisse der isotopisch instationären und isotopisch stationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen in *E. coli* sind Gegenstand dieses Kapitels. Für die nachfolgend dargestellten Ergebnisse der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen wurden nachfolgende Datensätze (siehe auch die zusammenfassende Darstellung in Kapitel 8.3.2) herangezogen:

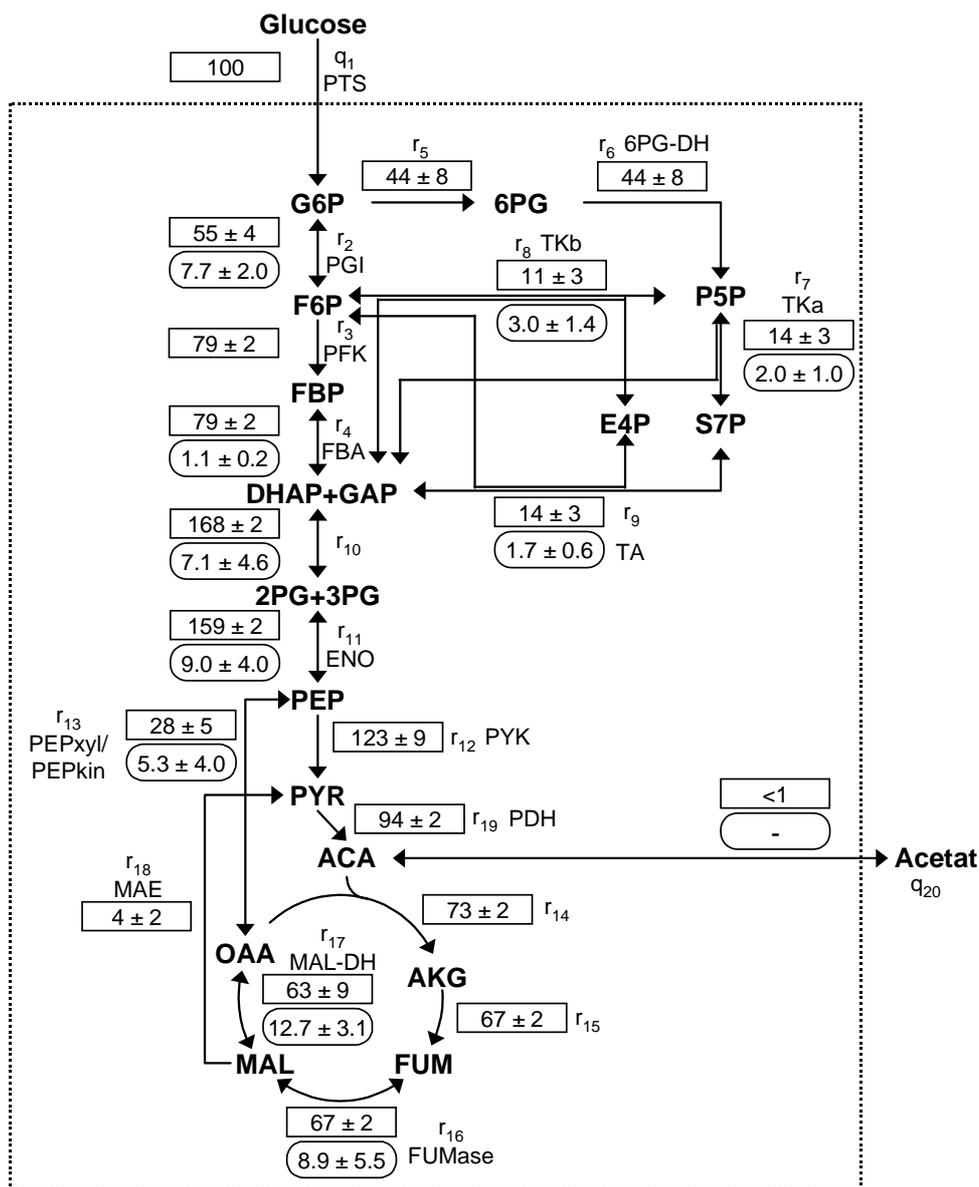
1. Kapitel 9.2: isotopisch instationäre und stationäre Massenisotopomere von Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels, gemessen mit LC-MS
2. Kapitel 9.3.1: isotopisch stationäre Massenisotopomere von Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels, gemessen mit LC-MS
3. Kapitel 9.3.2: isotopisch stationäre Massenisotopomere proteinogener Aminosäuren, gemessen mit GC-MS
4. Kapitel 9.3.3: isotopisch stationäre Massenisotopomere von Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels und proteinogener Aminosäuren

Die Ergebnisse der mit diesen Datensätzen ermittelten Stoffflussverteilungen werden im folgenden dargestellt und miteinander verglichen. Außerdem folgt ein Vergleich mit in der Literatur beschriebenen Stoffflussverteilungen.

### 9.2 $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse auf Basis isotopisch instationärer und isotopisch stationärer LC-MS Messdaten

Die intrazelluläre Stoffflussverteilung in den zentralen Kohlenstoffwechselwegen Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus in *E. coli* W3110 bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  als Ergebnis der isotopisch instationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse zeigt Abbildung 9-1. Unter isotopisch instationärer  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse soll eine  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse verstanden werden, bei der Messinformationen aus der isotopisch instationären Markierungsdynamik explizit zur Identifikation der intrazellulären Ratenverteilung genutzt werden (Kapitel 1.1). Da bei den

experimentellen Bedingungen dieser Arbeit die Zeitkonstanten zur Erreichung eines isotopisch stationären Zustandes in *E. coli* nur zwischen 2 und 5 min betragen (Kapitel 6.3.2), wurde auch der Messvektor des isotopisch stationären Zustandes berücksichtigt, so dass es sich streng genommen um eine isotopisch stationäre und instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse handelt. Es wurden ausschließlich LC-MS Messdaten für die Identifikation der intrazellulären Stoffflussverteilung verwendet (Kapitel 8.3.2).



**Abbildung 9-1.** Isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse in *E. coli* W3110 bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ . Die auf die Glucoseaufnahme rate normierten Nettoraten sind in den Rechtecken angegeben, die Reversibilitätsfaktoren (Faktoren, um welche die Hinreaktionen größer als die zugehörigen Nettoraten sind) in den abgerundeten Rechtecken. Zur Identifikation der intrazellulären Stoffflussverteilung wurden isotopisch instationäre und stationäre LC-MS Messungen verwendet. Die angegebenen Standardabweichungen wurden aus parallelen Optimierungen ermittelt. Der Fluss von PEP zu PYR berücksichtigt das PTS-System in *E. coli*.

Als wesentliche Ergebnisse wurden eine Flussverteilung am G6P-Knoten zwischen Glykolyse und Pentosephosphat-Weg von 55% : 44% (bezogen auf die Glucoseaufnahme) bestimmt sowie mit 4% nur eine geringe Aktivität des Malatenzyms. Die aus 16 parallelen Optimierungen (Kapitel 8.2.2.1) ermittelten und in Abbildung 9-1 angegebenen Standardabweichungen wurden auf die jeweiligen Mittelwerte der identifizierten Nettoraten normiert und die prozentualen, auf den Mittelwert bezogenen Standardabweichungen berechnet. Diese Variationskoeffizienten der geschätzten Nettoraten betragen mit den in Kapitel 7.2.2 eingeführten Bezeichnungen (siehe auch Anhang A1) für  $r_2$  (PGI) 8%,  $r_3$  (PFK) 2%,  $r_4$  (FBA) 2%,  $r_5$  18%,  $r_6$  (6PG-DH) 18%,  $r_7$  (Tka) 18%,  $r_8$  (TKb) 31%,  $r_9$  (TA) 18%,  $r_{10}$  1%,  $r_{11}$  (ENO) 1%,  $r_{12}$  (PYK) 8%,  $r_{13}$  (PEP<sub>xyl</sub>/PEPkin) 16%,  $r_{14}$  2%,  $r_{15}$  2%,  $r_{16}$  (FUMase) 2%,  $r_{17}$  (MAL-DH) 16%,  $r_{18}$  (MAE) 35% und  $r_{19}$  (PDH) 2%. Die Variationskoeffizienten der Reversibilitätsfaktoren  $\beta_j$  (Kapitel 7.4.2), die ausdrücken, um welchen Faktor die Rate der j-ten Hinreaktion größer als die zugehörige Nettorate ist, wurden in gleicher Weise bestimmt. Diese betragen für  $\beta_2$  26%,  $\beta_4$  19%,  $\beta_7$  48%,  $\beta_8$  47%,  $\beta_9$  36%,  $\beta_{10}$  64%,  $\beta_{11}$  44%,  $\beta_{13}$  75%,  $\beta_{16}$  62% und  $\beta_{17}$  25%. Die Nettoraten konnten mit kleineren Variationskoeffizienten geschätzt werden als die Reversibilitätsfaktoren. Die Nettoraten in der Glykolyse konnten mit geringeren Standardabweichungen als im Pentosephosphat-Weg identifiziert werden, wobei in der Glykolyse auch mehr gemessene Massenisotopomerenverteilungen als im Pentosephosphat-Weg zur Parameteridentifikation zur Verfügung standen (Kapitel 6.3). Während die Nettoraten  $r_{14}$ ,  $r_{15}$ ,  $r_{16}$  und  $r_{19}$  im bzw. bei Eintritt in den Tricarbonsäure-Zyklus ebenfalls mit geringen Abweichungen geschätzt werden konnten, waren die Standardabweichungen im Bereich des zur Pyruvat-Kinase ( $r_{12}$ ) parallelen Stoffwechselweges über Oxalacetat und Malat zu Pyruvat ( $r_{13}$ ,  $r_{17}$ ,  $r_{18}$ ) größer. Da die vom Malatenzym katalysierte Umsetzung ( $r_{18}$ ) nur 4% der Glucoseaufnahme betrug und damit sehr klein war, konnte diese nur mit relativ großen Abweichungen geschätzt werden. Bei den Reversibilitätsfaktoren wurden vergleichsweise niedrige prozentuale Abweichungen nur im Bereich der oberen Glykolyse ( $\beta_2$ ,  $\beta_4$ ) ermittelt. Im unteren Teil der Glykolyse, in Pentosephosphat-Weg, Tricarbonsäure-Zyklus und im Bereich der anaplerotischen Reaktionen waren diese deutlich größer (siehe oben).

In *E. coli* wurden sowohl stöchiometrische Flussanalysen (Schmid *et al.*, 2004) als auch  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen durchgeführt (Schmidt *et al.*, 1999a; Dauner, 2000; Emmerling *et al.*, 2002; Siddiquee *et al.*, 2004). Bei stöchiometrischen Flussanalysen wurde am G6P-Knoten eine Flussverteilung zwischen Glykolyse und Pentosephosphat-Weg von 28% : 71% bis zu 72% : 27% abhängig davon ermittelt, ob im Tricarbonsäure-Zyklus die Isocitrat-Dehydrogenase NAD bzw. NADP als Kofaktor verwendet (Chassagnole *et al.*, 2002; Schmid *et al.*, 2004). Dauner (Dauner, 2000) bestimmte in *E. coli* MG1655 bei  $D = 0.22 \text{ h}^{-1}$  und Glucose-limitierung ein Verhältnis zwischen Glykolyse und Pentosephosphat-Weg von 76% : 21%, wobei bei der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse auf die Bilanzierung von Kofaktoren verzichtet werden

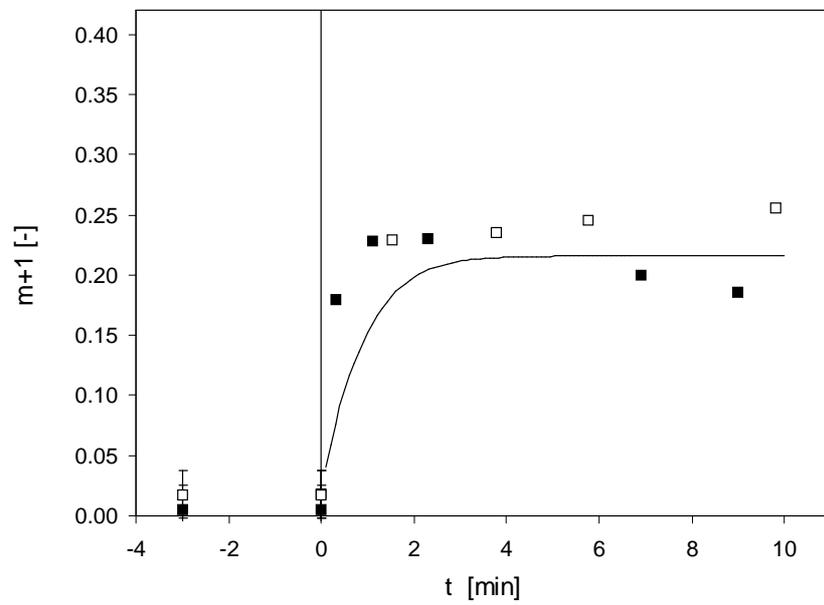
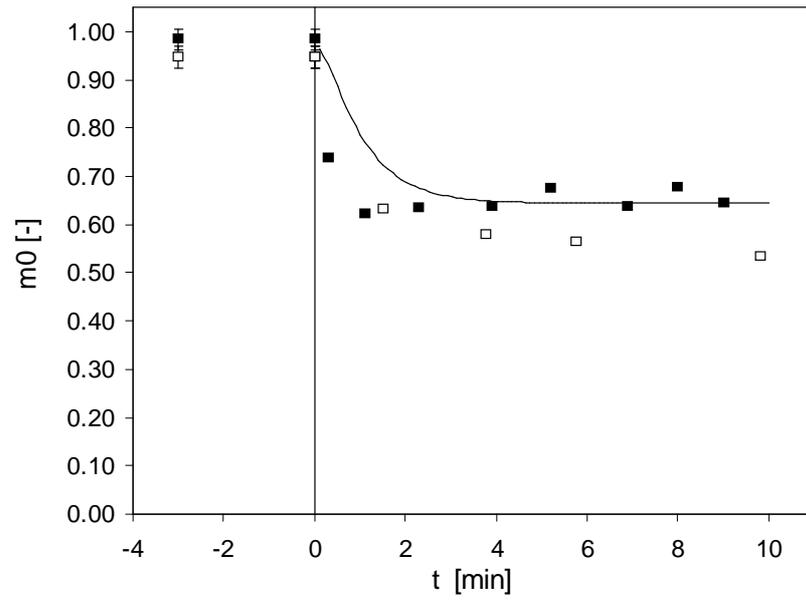
kann (Kapitel 7.4.1). Bei einer Verdünnungsrate von  $D = 0.09 \text{ h}^{-1}$  und Glucoselimitierung ermittelte Emmerling (Emmerling *et al.*, 2002) für den *E. coli* Wildtyp JM101 eine Flussverteilung am G6P-Knoten von 54% : 44%, was dem Ergebnis dieser Arbeit entspricht. Vergleichbare Ergebnisse mit Verhältnissen zwischen Glykolyse und Pentosephosphat-Weg betragen 65% : 34% bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  (Siddiquee *et al.*, 2004) und 53% : 46% (Schmidt *et al.*, 1999a). Die Aktivität des Malatenzyms in *E. coli* bezogen auf die Glucoseaufnahme wurde im Rahmen dieser Arbeit zu 4% bestimmt und ist in guter Übereinstimmung mit ermittelten Werten von 8% (Dauner, 2000), 7% (Emmerling *et al.*, 2002) und 3% (Siddiquee *et al.*, 2004). Eine statistische Bewertung der geschätzten Flüsse in *E. coli* führten Dauner (Dauner, 2000) und Emmerling (Emmerling *et al.*, 2002) durch, wobei für die Linearisierung des nichtlinearen Modells die von Wiechert (Wiechert *et al.*, 1997b) für die isotopisch stationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse vorgeschlagene nichtlineare Kompaktifizierung der reversiblen Reaktionen verwendet wurde. Als Messdaten standen die mit GC-MS und NMR bestimmten Markierungsmuster der proteinogenen Aminosäuren zur Verfügung. Es wurden auch die zentralen Kohlenstoffwechselwege Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus untersucht (Dauner, 2000; Emmerling *et al.*, 2002). Am ungenauesten konnten dabei ebenfalls die Nettoraten im Pentosephosphat-Weg und die Flüsse über die Enzyme Phosphoenolpyruvat-Carboxylase/Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, Malat-Dehydrogenase und Malatenzym identifiziert werden (Dauner, 2000). Hinsichtlich der Austauschflüsse bzw. Reversibilitätsfaktoren waren nur qualitative Aussagen möglich (Emmerling *et al.*, 2002). Als mögliche Ursache hierfür sind insbesondere numerische Probleme bei unbeschränkten Austauschflüssen (Kapitel 8.2.2.2) zu nennen.

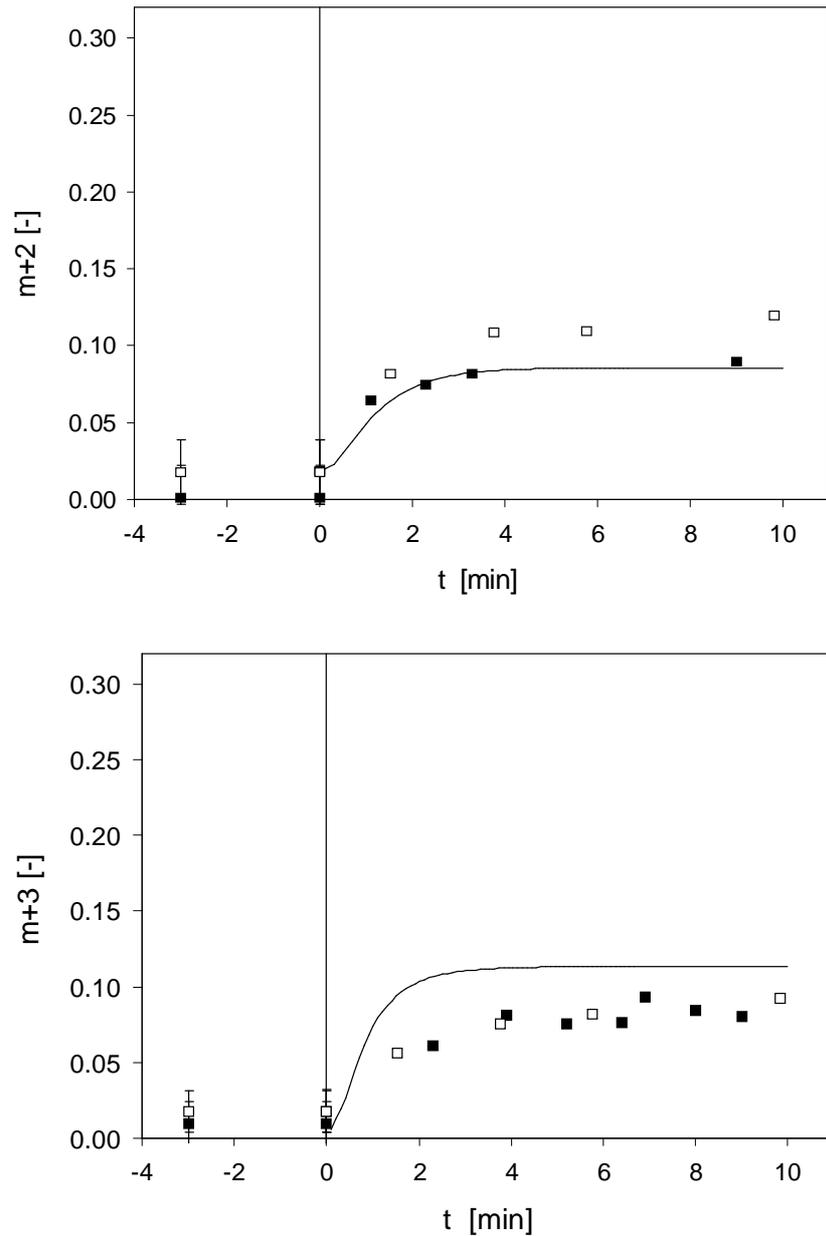
Das in Abbildung 9-1 gezeigte Ergebnis änderte sich nicht, wenn der isotopisch stationäre Messvektor bei der Flusschätzung unberücksichtigt blieb und ausschließlich Daten aus der Markierungsdynamik verwendet wurden.

### **Vergleich von Experiment und Simulation**

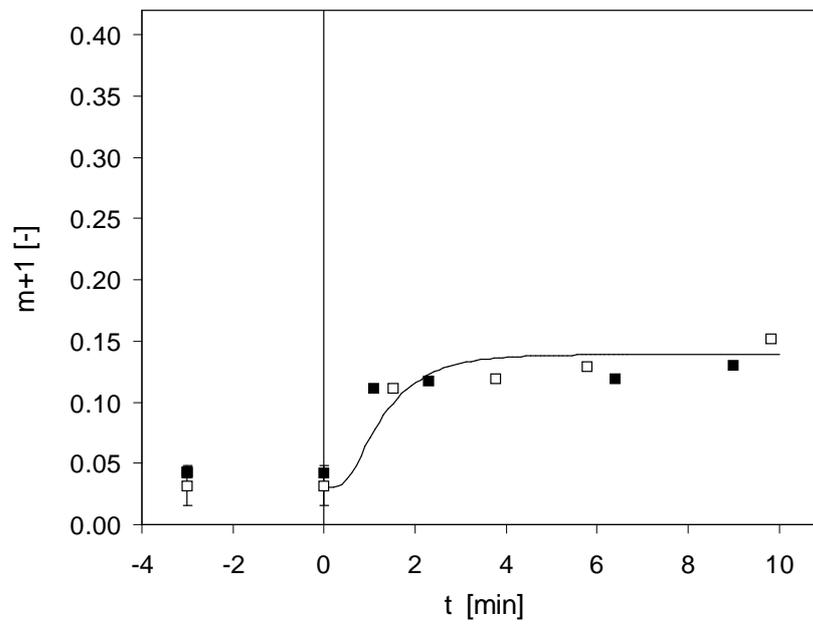
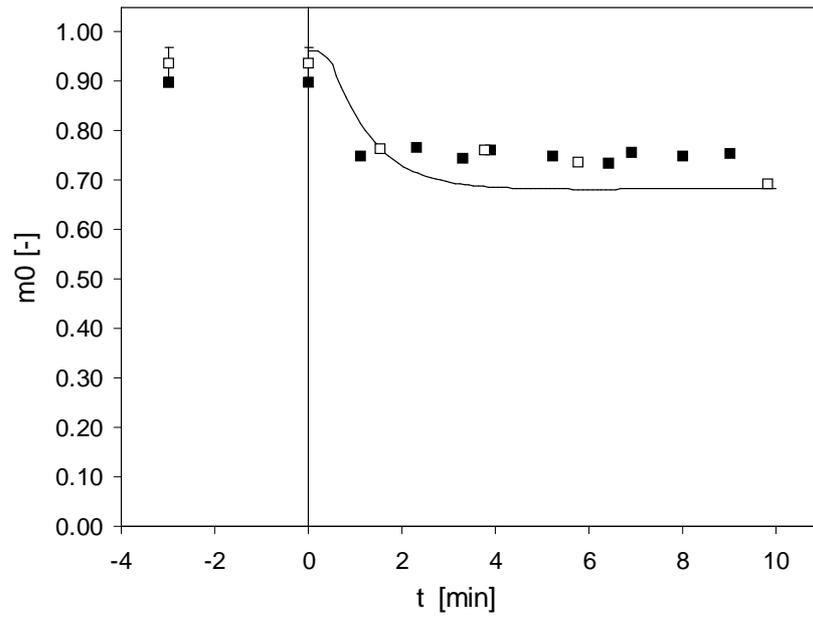
Bei der isotopisch instationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse in *E. coli* W3110 bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  (Abbildung 9-1) wurden Messungen aus der isotopisch instationären Markierungsdynamik (Kapitel 6.3.2) zur Identifikation der intrazellulären Flussverteilung verwendet. In Abbildung 9-2 bis Abbildung 9-4 sind gemessene und simulierte Massenisotopomer-Zeitverläufe von DHAP+GAP, 2PG+3PG und PEP dargestellt. Die Markierungsdynamik dieser Metabolite wurde für die Schätzung der Flussverteilung verwendet. Die experimentellen Daten wurden bereits ausführlich in Kapitel 6.3.2 beschrieben und diskutiert. Bei DHAP+GAP wurde für die identifizierte Flussverteilung (Abbildung 9-1) bei den Massenisotopomeren  $m_0$ ,  $m_{+1}$  und  $m_{+2}$  eine gute Übereinstimmung zwischen Experiment und Simulation festgestellt (Abbildung

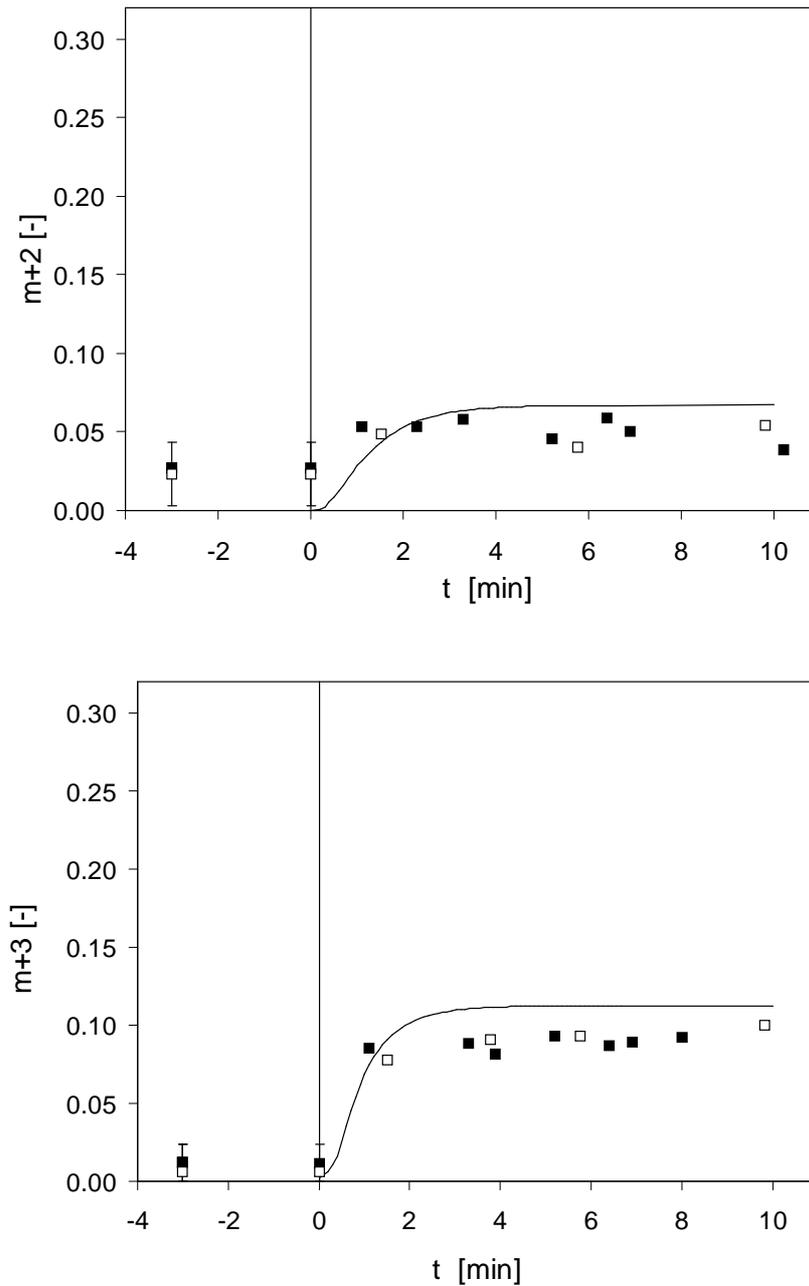
9-2). Abweichungen ergaben sich für das  $m+3$  Massenisotopomer, bei dem jedoch die relative, auf den Mittelwert bezogene Standardabweichung von 11% bereits im isotopisch stationären Fall vergleichsweise hoch war. Bei 2PG+3PG wurde für alle Massenisotopomere gute Korrespondenz von Experiment und Simulation festgestellt (Abbildung 9-3). Bei PEP war die Übereinstimmung der Massenisotopomere  $m_0$ ,  $m+1$  und  $m+2$  sehr gut (Abbildung 9-4). Bei dem  $m+3$  Massenisotopomer war die Anpassung weniger gut, wobei der Variationskoeffizient dieses Massenisotopomers mit 11.1% relativ hoch war. Die gezeigten Massenisotopomer-Zeitverläufe sind repräsentativ. Da bei den Metaboliten FBP, P5P und 6PG aufgrund der kleinen Zeitkonstanten keine ausreichende Anzahl von Messungen im interessanten Zeitbereich kleiner 5 min vorlagen, wurde auf deren Darstellung verzichtet. Die experimentell ermittelten und simulierten Massenisotopomer-Zeitverläufe nach erfolgter Optimierung sind vor dem Hintergrund zu sehen, dass bei der Optimierung ein nichtlineares, gekoppeltes und steifes Isotopomeren-Differentialgleichungssystem von 550 bilanzierten Isotopomeren zu lösen war. Messtechnisch ist die Quantifizierung von Massenisotopomeren im Bereich der Markierungsdynamik besonders anspruchsvoll, da die Anteile der natürlichen Massenisotopomere mit Ausnahme des  $m_0$  Massenisotopomers sehr klein sind. Die in Kapitel 6.3.1 angegebenen Fehler beziehen sich dabei ausschließlich auf den isotopisch stationären Zustand. Eine mögliche Restriktion bei Simulation und Optimierung könnte darin zu sehen sein, dass die Reversibilitätsfaktoren aus numerischen Gründen zu beschränken waren (Kapitel 8.2.2.2). Von grundsätzlichen Fehlern in der Modellstruktur war nicht auszugehen (Kapitel 8.3.4).



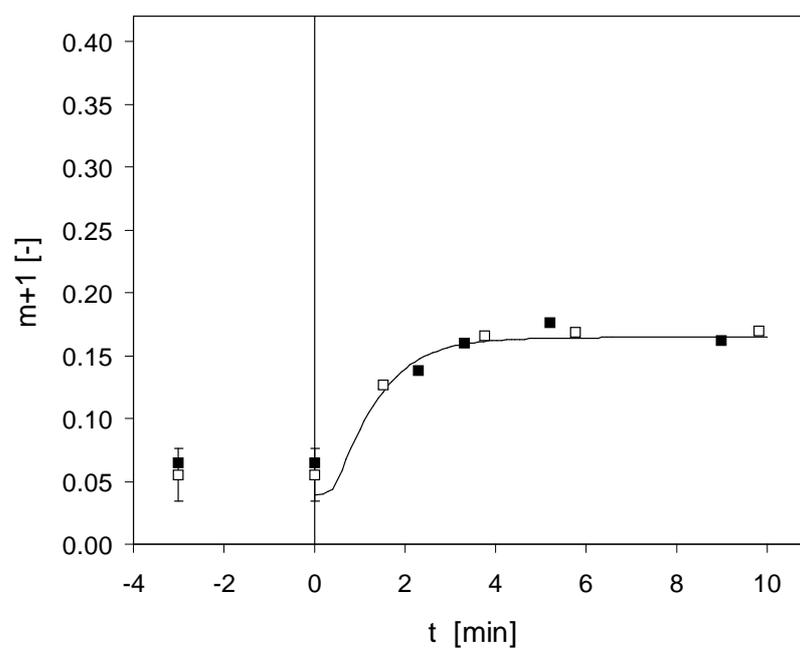
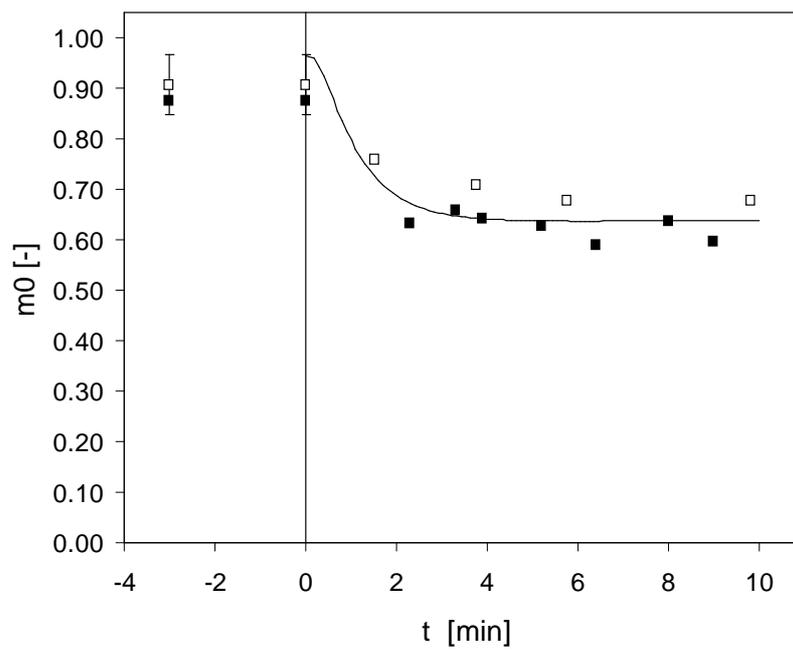


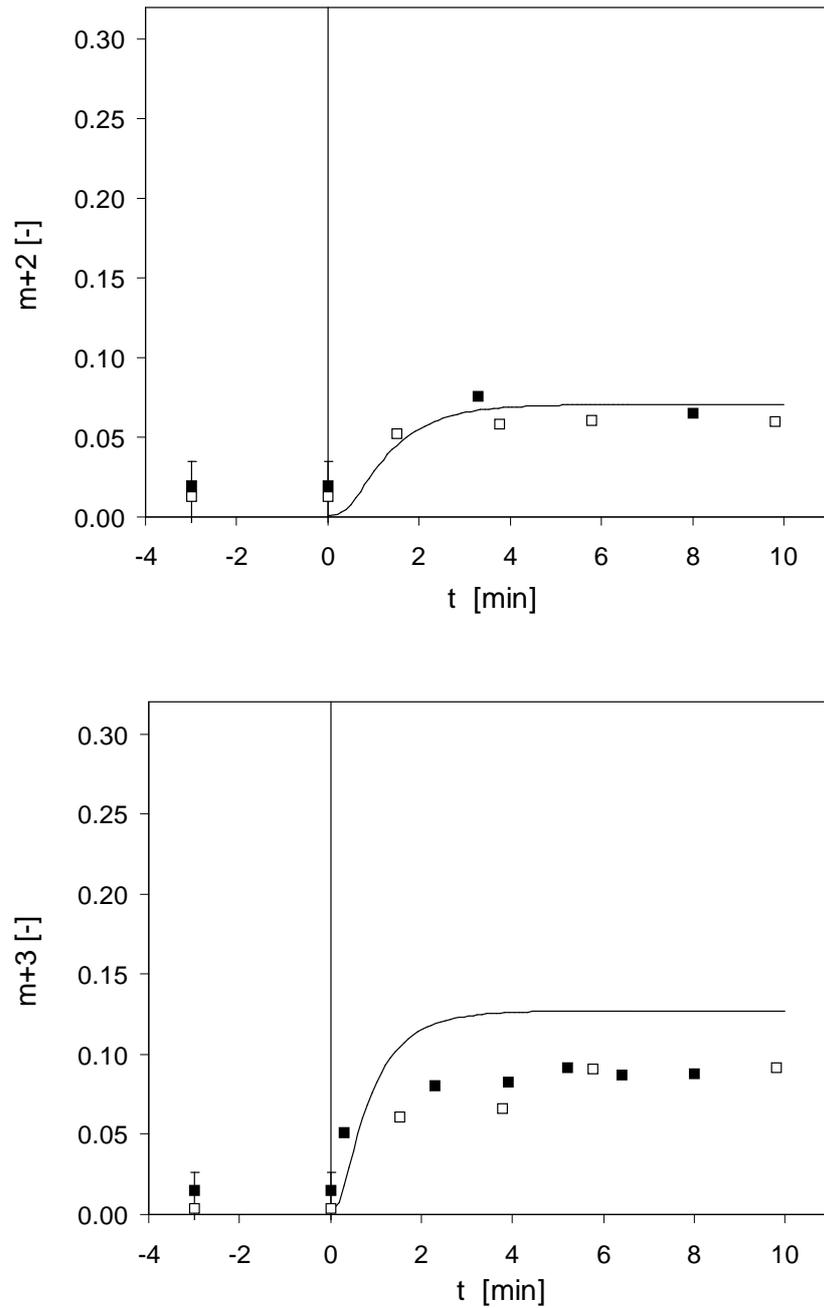
**Abbildung 9-2.** LC-MS basierte Messung und Simulation der Massenisotopomer-Zeitverläufe der  $m_0$ ,  $m+1$ ,  $m+2$  und  $m+3$  Massenisotopomere von DHAP+GAP in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  bei einem  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment. Es wurden zwei unabhängige  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente (□ Markierungsexperiment M2 bzw. ■ Markierungsexperiment M3) durchgeführt.





**Abbildung 9-3.** LC-MS basierte Messung und Simulation der Massenisotopomer-Zeitverläufe der  $m_0$ ,  $m+1$ ,  $m+2$  und  $m+3$  Massenisotopomere von 2PG+3PG in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  bei einem  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment. Es wurden zwei unabhängige  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente ( $\square$  Markierungsexperiment M2 bzw.  $\blacksquare$  Markierungsexperiment M3) durchgeführt.





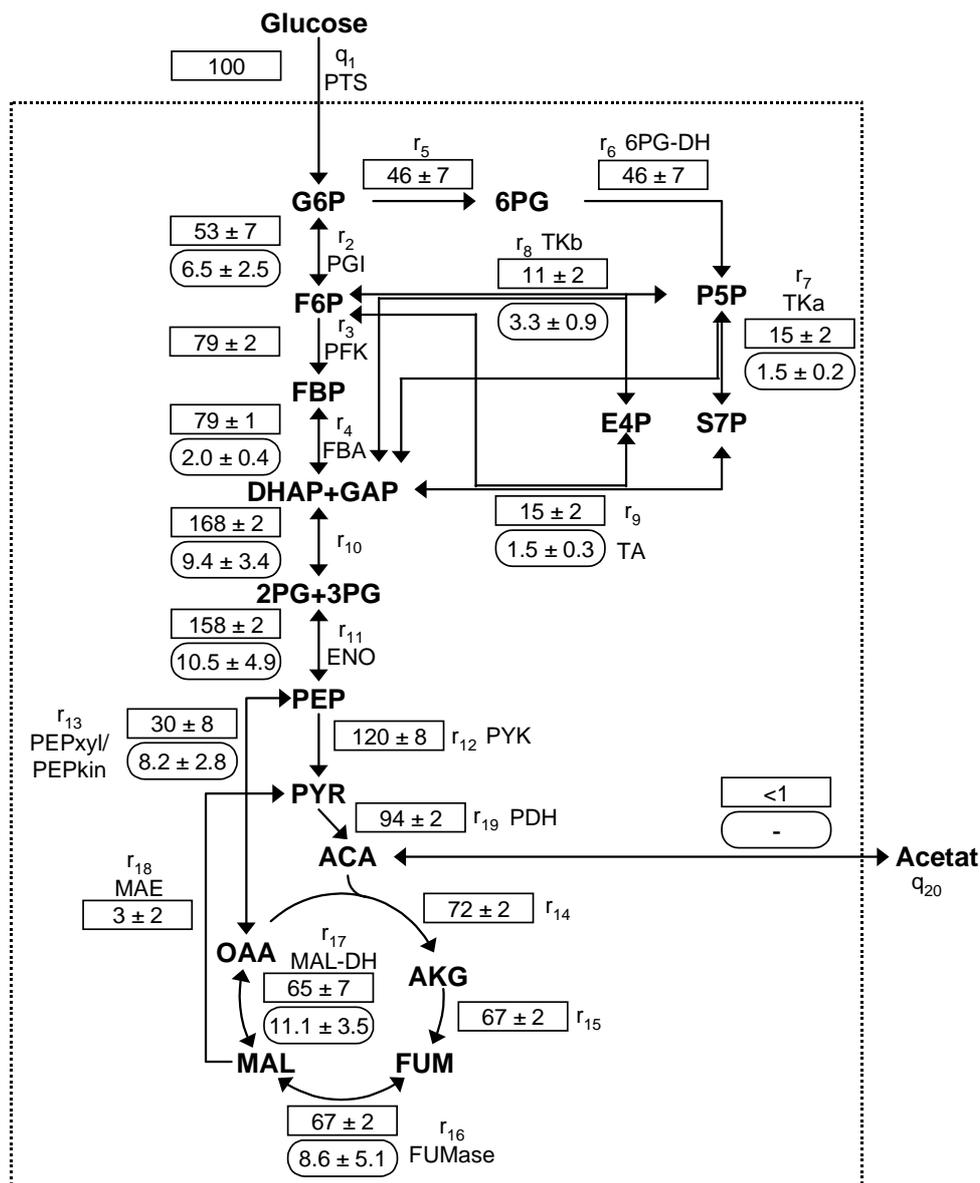
**Abbildung 9-4.** LC-MS basierte Messung und Simulation der Massenisotopomer-Zeitverläufe der  $m_0$ ,  $m_{+1}$ ,  $m_{+2}$  und  $m_{+3}$  Massenisotopomere von PEP in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  bei einem  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment. Es wurden zwei unabhängige  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente ( $\square$  Markierungsexperiment M2 bzw.  $\blacksquare$  Markierungsexperiment M3) durchgeführt.

### 9.3 <sup>13</sup>C-Stoffflussanalysen auf Basis isotopisch stationärer Messdaten

Zur Identifikation der intrazellulären Stoffflussverteilung aus isotopisch stationären Datensätzen (LC-MS, GC-MS) wurde weiterhin auf die Integration des instationären Differentialgleichungssystems zurückgegriffen. Für die Ermittlung der Fehlerquadratsumme wurden nur die isotopisch stationären Werte herangezogen. Die metabolisch stationären Absolutkonzentrationen, die die Zeitkonstanten in der Markierungsdynamik der Massenisotopomere bestimmen, spielen im isotopisch stationären Fall für die Schätzung der intrazellulären Flüsse keine Rolle.

#### 9.3.1 LC-MS

Die intrazelluläre Stoffflussverteilung in den zentralen Kohlenstoffwechselwegen Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus in *E. coli* W3110 bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  zeigt Abbildung 9-5. Zur Identifikation der intrazellulären Stoffflussverteilung wurden isotopisch stationäre Massenisotopomere aus LC-MS Messungen verwendet (Kapitel 8.3.2).



**Abbildung 9-5.** Isotopisch stationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse in *E. coli* W3110 bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ . Die auf die Glucoseaufnahme rate normierten Nettoraten sind in den Rechtecken angegeben, die Reversibilitätsfaktoren (Faktoren, um welche die Hinreaktionen größer als die zugehörigen Nettoraten sind) in den abgerundeten Rechtecken. Zur Identifikation der intrazellulären Stoffflussverteilung wurden isotopisch stationäre LC-MS Messungen verwendet. Die angegebenen Standardabweichungen wurden aus parallelen Optimierungen ermittelt. Der Fluss von PEP zu PYR berücksichtigt das PTS-System in *E. coli*.

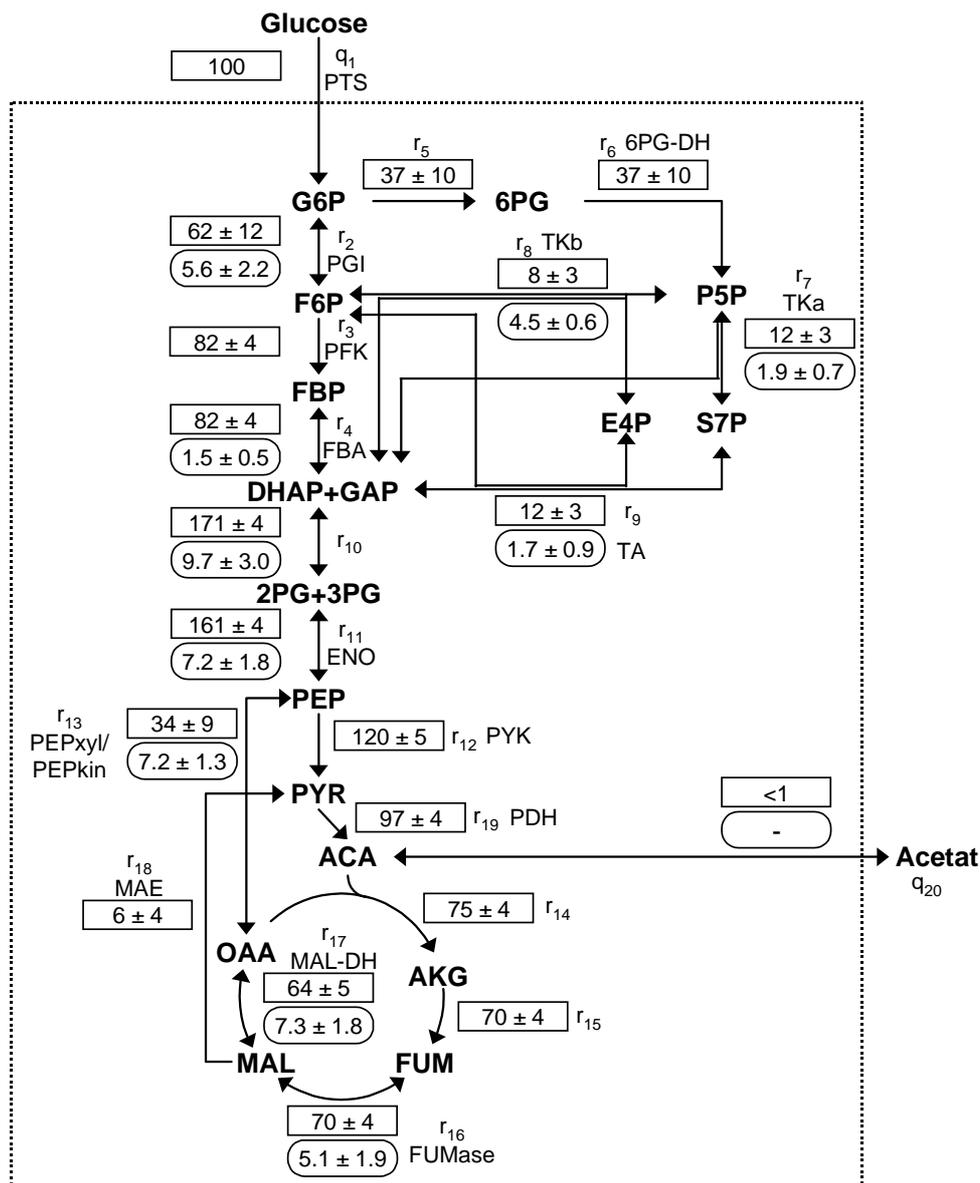
Es wurden eine Flussverteilung am G6P-Knoten zwischen Glykolyse und Pentosephosphat-Weg von 53% : 46% (bezogen auf die Glucoseaufnahme rate) bestimmt sowie mit 3% nur eine geringe Aktivität des Malatenzyms. Aus 16 parallelen Optimierungen wurden Standardabweichungen (Abbildung 9-5) und Variationskoeffizienten der identifizierten Nettoraten und Reversibilitätsfaktoren ermittelt. Diese betragen mit den in Kapitel 7.2.2 eingeführten Bezeichnungen (siehe auch Anhang A1) für  $r_2$  (PGI) 13%,  $r_3$  (PFK) 3%,  $r_4$  (FBA) 1%,  $r_5$  15%,  $r_6$  (6PG-DH) 15%,  $r_7$  (TKa) 15%,  $r_8$  (TKb) 20%,  $r_9$  (TA) 15%,  $r_{10}$  1%,  $r_{11}$  (ENO) 1%,  $r_{12}$  (PYK) 6%,

$r_{13}$  (PEP<sub>xyl</sub>/PEP<sub>kin</sub>) 26%,  $r_{14}$  3%,  $r_{15}$  3%,  $r_{16}$  (FUMase) 3%,  $r_{17}$  (MAL-DH) 11%,  $r_{18}$  (MAE) 58% und  $r_{19}$  (PDH) 2%. Die Variationskoeffizienten der Reversibilitätsfaktoren  $\beta_j$  (Kapitel 7.4.2), die ausdrücken, um welchen Faktor die Rate der  $j$ -ten Hinreaktion größer als die zugehörige Nettorate ist, wurden in gleicher Weise bestimmt. Diese betragen für  $\beta_2$  38%,  $\beta_4$  20%,  $\beta_7$  14%,  $\beta_8$  25%,  $\beta_9$  26%,  $\beta_{10}$  37%,  $\beta_{11}$  45%,  $\beta_{13}$  27%,  $\beta_{16}$  51% und  $\beta_{17}$  30%.

Das Ergebnis der isotopisch instationären Stoffflussverteilung (Abbildung 9-1) wurde mit den isotopisch stationären LC-MS Messdaten sehr gut reproduziert. Grundsätzliche Unterschiede bei den identifizierten Raten wurden nicht festgestellt. Während die Nettoraten bei der isotopisch instationären Stoffflussverteilung (Kapitel 9.2) gegenüber der isotopisch stationären LC-MS basierten Stoffflussverteilung insgesamt mit geringfügig kleineren Standardabweichungen ermittelt werden konnten, war dies bei den Reversibilitätsfaktoren nicht der Fall. Im isotopisch stationären Fall konnten die Raten im Pentosephosphat-Weg ( $r_5$  bis  $r_9$ ) mit geringfügig kleineren Standardabweichungen bestimmt werden, wohingegen bei dem isotopisch instationären Ansatz die Abweichungen am G6P-Knoten ( $r_2$ ), bei den anaplerotischen Reaktionen ( $r_{13}$ ) und beim Malatenzym ( $r_{18}$ ) geringer waren. Obwohl bei der isotopisch stationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse deutlich weniger Messdaten zur Parameteridentifikation zur Verfügung standen als im isotopisch instationären Fall (Kapitel 8.3.2), war die Qualität der Parameterschätzung vergleichbar. Dies liegt vermutlich daran, dass im isotopisch instationären Fall durch die metabolisch stationären Absolutkonzentrationen zusätzliche (fehlerbehaftete) Messungen zu berücksichtigen waren. In dem betrachteten Reaktionsnetzwerk war die Anzahl isotopisch stationärer LC-MS Messinformationen für die Identifikation der intrazellulären Flussverteilung ausreichend.

### 9.3.2 GC-MS

Die intrazelluläre Stoffflussverteilung in den zentralen Kohlenstoffwechselwegen Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus in *E. coli* W3110 bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  zeigt Abbildung 9-6. Zur Identifikation der intrazellulären Stoffflussverteilung wurden isotopisch stationäre Massenisotopomere proteinogener Aminosäuren aus GC-MS Messungen verwendet (Kapitel 8.3.2).



**Abbildung 9-6.** Isotopisch stationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse in *E. coli* W3110 bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ . Die auf die Glucoseaufnahme rate normierten Nettoraten sind in den Rechtecken angegeben, die Reversibilitätsfaktoren (Faktoren, um welche die Hinreaktionen größer als die zugehörigen Nettoraten sind) in den abgerundeten Rechtecken. Zur Identifikation der intrazellulären Stoffflussverteilung wurden isotopisch stationäre GC-MS Messungen proteinogener Aminosäuren verwendet. Die angegebenen Standardabweichungen wurden aus parallelen Optimierungen ermittelt. Der Fluss von PEP zu PYR berücksichtigt das PTS-System in *E. coli*.

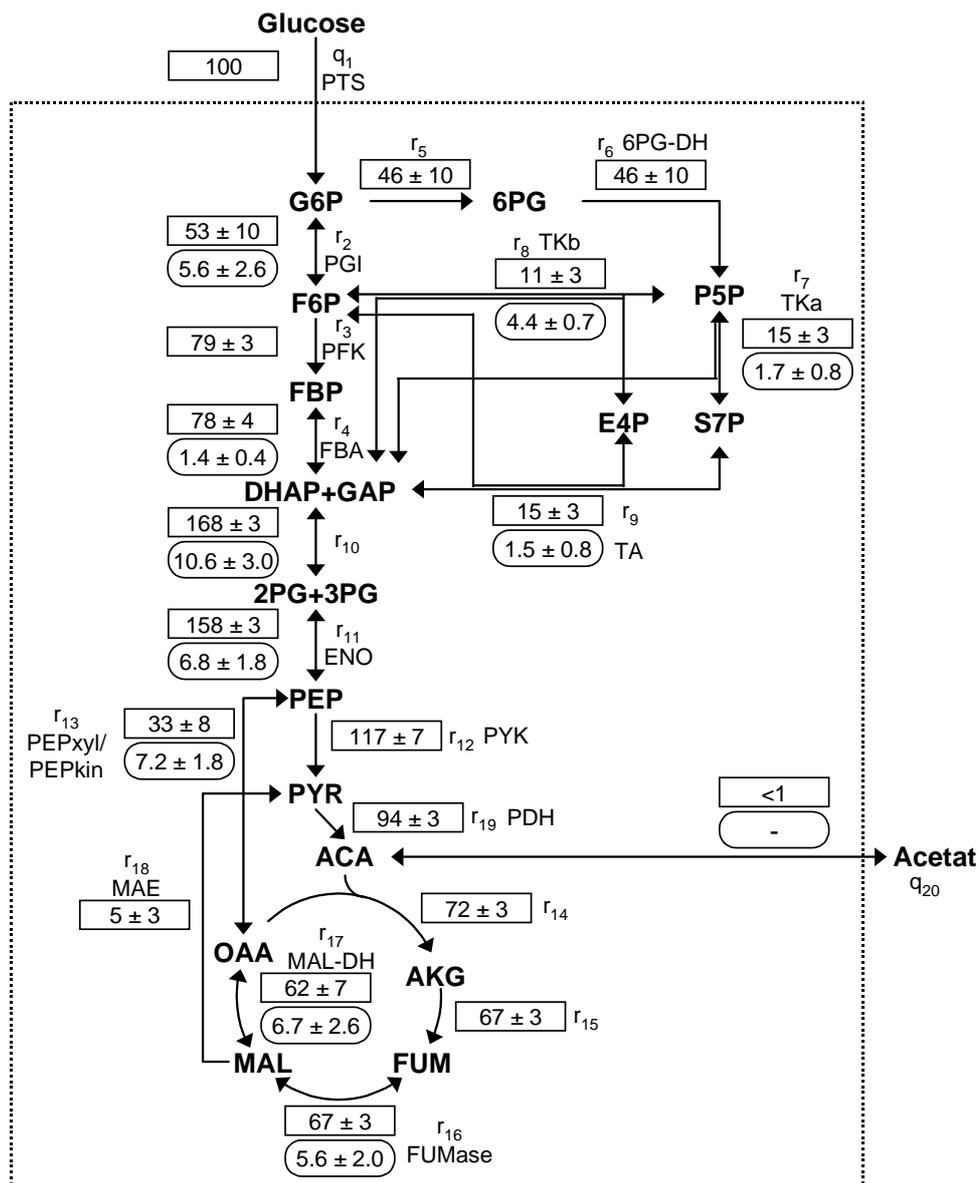
Es wurden eine Flussverteilung am G6P-Knoten zwischen Glykolyse und Pentosephosphat-Weg von 62% : 37% (bezogen auf die Glucoseaufnahme rate) bestimmt sowie mit 6% nur eine geringe Aktivität des Malatenzyms. Aus 16 parallelen Optimierungen wurden Standardabweichungen (Abbildung 9-6) und Variationskoeffizienten der identifizierten Nettoraten und Reversibilitätsfaktoren ermittelt. Diese betragen mit den in Kapitel 7.2.2 eingeführten Bezeichnungen (siehe auch Anhang A1) für  $r_2$  (PGI) 19%,  $r_3$  (PFK) 5%,  $r_4$  (FBA) 5%,  $r_5$  27%,  $r_6$  (6PG-DH) 27%,  $r_7$  (TKa) 28%,  $r_8$  (TKb) 39%,  $r_9$  (TA) 28%,  $r_{10}$  2%,  $r_{11}$  (ENO) 2%,  $r_{12}$  (PYK) 4%,

$r_{13}$  (PEP<sub>xyl</sub>/PEP<sub>kin</sub>) 27%,  $r_{14}$  5%,  $r_{15}$  5%,  $r_{16}$  (FUMase) 5%,  $r_{17}$  (MAL-DH) 8%,  $r_{18}$  (MAE) 70% und  $r_{19}$  (PDH) 4%. Die Variationskoeffizienten der Reversibilitätsfaktoren  $\beta_j$  (Kapitel 7.4.2), die ausdrücken, um welchen Faktor die Rate der  $j$ -ten Hinreaktion größer als die zugehörige Nettorate ist, wurden in gleicher Weise bestimmt. Diese betragen für  $\beta_2$  33%,  $\beta_4$  24%,  $\beta_7$  39%,  $\beta_8$  13%,  $\beta_9$  50%,  $\beta_{10}$  29%,  $\beta_{11}$  25%,  $\beta_{13}$  17%,  $\beta_{16}$  31% und  $\beta_{17}$  29%.

Das Ergebnis der isotopisch instationären Stoffflussverteilung (Abbildung 9-1) konnte auch mit den isotopisch stationären GC-MS Messdaten der proteinogenen Aminosäuren reproduziert werden. Gegenüber der isotopisch instationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse wurden die Netto-raten bei der GC-MS basierten isotopisch stationären Stoffflussverteilung insgesamt mit größeren Standardabweichungen ermittelt, die Reversibilitätsfaktoren dagegen mit geringeren Standardabweichungen. Im isotopisch stationären Fall konnten die Flussverteilung am G6P-Knoten ( $r_2$ ,  $r_5$ ), die Raten im Pentosephosphat-Weg ( $r_5$  bis  $r_9$ ), bei den anaplerotischen Reaktionen ( $r_{13}$ ) und beim Malatenzym ( $r_{18}$ ) nur mit größeren Standardabweichungen bestimmt werden. Bei der Analyse von Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus in *E. coli* konnte Dauner (Dauner, 2000), der umfangreiche GC-MS Datensätze zur Identifikation der intrazellulären Flussverteilung einsetzte, diese Raten ebenfalls nur mit vergleichsweise großen Standardabweichungen schätzen. Geringere Standardabweichungen als im isotopisch instationären Fall ergaben sich im Tricarbonsäure-Zyklus ( $r_{17}$ ). Die größeren Standardabweichungen im Pentosephosphat-Weg können darauf zurückgeführt werden, dass über die Markierungsmuster der proteinogenen Aminosäuren Histidin (P5P) und Phenylalanin (E4P, PEP) zwar ebenfalls zwei Metabolite aus diesem Stoffwechselweg gemessen werden konnten, jedoch weniger Messinformationen aus der Glykolyse vorlagen.

### 9.3.3 LC-MS und GC-MS

Die intrazelluläre Stoffflussverteilung in den zentralen Kohlenstoffwechselwegen Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Tricarbonsäure-Zyklus in *E. coli* W3110 bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  zeigt Abbildung 9-7. Zur Identifikation der intrazellulären Stoffflussverteilung wurden isotopisch stationäre Massenisotopomere von Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels aus LC-MS Messungen und von proteinogenen Aminosäuren aus GC-MS Messungen verwendet (Kapitel 8.3.2).



**Abbildung 9-7.** Isotopisch stationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse in *E. coli* W3110 bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ . Die auf die Glucoseaufnahme rate normierten Nettoraten sind in den Rechtecken angegeben, die Reversibilitätsfaktoren (Faktoren, um welche die Hinreaktionen größer als die zugehörigen Nettoraten sind) in den abgerundeten Rechtecken. Zur Identifikation der intrazellulären Stoffflussverteilung wurden isotopisch stationäre LC-MS Messungen intrazellulärer Metabolite und GC-MS Messungen proteinogener Aminosäuren verwendet. Die angegebenen Standardabweichungen wurden aus parallelen Optimierungen ermittelt. Der Fluss von PEP zu PYR berücksichtigt das PTS-System in *E. coli*.

Es wurden eine Flussverteilung am G6P-Knoten zwischen Glykolyse und Pentosephosphat-Weg von 53% : 46% (bezogen auf die Glucoseaufnahme rate) bestimmt sowie mit 5% nur eine geringe Aktivität des Malatenzyms. Aus 16 parallelen Optimierungen wurden Standardabweichungen (Abbildung 9-7) und Variationskoeffizienten der identifizierten Nettoraten und Reversibilitätsfaktoren ermittelt.

Diese betragen mit den in Kapitel 7.2.2 eingeführten Bezeichnungen (siehe auch Anhang A1) für  $r_2$  (PGI) 19%,  $r_3$  (PFK) 4%,  $r_4$  (FBA) 5%,  $r_5$  22%,  $r_6$  (6PG-DH) 22%,  $r_7$  (Tka) 23%,  $r_8$  (TKb) 31%,  $r_9$  (TA) 23%,  $r_{10}$  2%,  $r_{11}$  (ENO) 2%,  $r_{12}$  (PYK) 6%,  $r_{13}$  (PEP<sub>xyl</sub>/PEPkin) 24%,  $r_{14}$  5%,  $r_{15}$  5%,  $r_{16}$  (FUMase) 5%,  $r_{17}$  (MAL-DH) 11%,  $r_{18}$  (MAE) 65% und  $r_{19}$  (PDH) 4%. Die Variationskoeffizienten der Reversibilitätsfaktoren  $\beta_j$  (Kapitel 7.4.2), die ausdrücken, um welchen Faktor die Rate der  $j$ -ten Hinreaktion größer als die zugehörige Nettorate ist, wurden in gleicher Weise bestimmt. Diese betragen für  $\beta_2$  46%,  $\beta_4$  31%,  $\beta_7$  48%,  $\beta_8$  15%,  $\beta_9$  52%,  $\beta_{10}$  28%,  $\beta_{11}$  27%,  $\beta_{13}$  25%,  $\beta_{16}$  36% und  $\beta_{17}$  39%.

Es konnten die Ergebnisse der isotopisch instationären Stoffflussverteilung (Abbildung 9-1) und der isotopisch stationären Stoffflussverteilungen mit LC-MS (Abbildung 9-5) und GC-MS (Abbildung 9-6) reproduziert werden. Gegenüber der isotopisch instationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse wurden die Nettoraten auf Basis isotopisch stationärer LC-MS und GC-MS Datensätze insgesamt mit geringfügig größeren Standardabweichungen ermittelt, die Reversibilitätsfaktoren dagegen mit geringeren Standardabweichungen wie dies bereits bei den isotopisch stationären LC-MS bzw. GC-MS Messdaten der Fall war (Kapitel 9.3.1 und 9.3.2). Größere Standardabweichungen wurden bei der Flussverteilung am G6P-Knoten ( $r_2$ ,  $r_5$ ), bei den Raten im Pentosephosphat-Weg ( $r_5$  bis  $r_9$ ), bei den anaplerotischen Reaktionen ( $r_{13}$ ) und beim Malatenzym ( $r_{18}$ ) bestimmt. Geringere Standardabweichungen als im isotopisch instationären Fall ergaben sich im Tricarbonsäure-Zyklus ( $r_{17}$ ). Die Flussverteilung aus den kombinierten LC-MS (23 Messdaten) und GC-MS (28 Messdaten) Messungen entsprach am G6P-Knoten dem Ergebnis basierend auf LC-MS Daten (Abbildung 9-5). Für die Fluss-schätzung an diesem Knoten waren vor allem die LC-MS Messungen (Metabolite aus der oberen Glykolyse, 6PG und P5P) ausschlaggebend. Der identifizierte Fluss über das Malatenzym von 5% lag bei kombinierten LC-MS und GC-MS Messungen zwischen den Ergebnissen mit LC-MS (3%) bzw. GC-MS (6%), wobei die Standardabweichungen sehr groß waren.

## 9.4 Zusammenfassung und Diskussion

Dieses Kapitel hatte die Durchführung isotopisch instationärer und isotopisch stationärer  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen in *E. coli* bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  zum Gegenstand. Hierfür wurde das Isotopmeren-Bilanzgleichungssystem numerisch integriert (Kapitel 8.2.2). Auf diese Weise konnten neben isotopisch stationären Messdaten erstmals isotopisch instationäre Messungen aus der Markierungsdynamik für die Fluss-schätzung verwendet werden. Für die Parameteridentifikation wurde ein Evolutionsalgorithmus (Kapitel 8.3.3) eingesetzt. Es wurden unterschiedliche Messdatensätze zur Schätzung der intrazellulären Flussverteilung verwendet (Kapitel 8.3.2).

Im einzelnen waren dies (i) isotopisch instationäre und stationäre LC-MS Messungen, (ii) isotopisch stationäre LC-MS Messungen, (iii) isotopisch stationäre GC-MS Messungen und (iv) isotopisch stationäre LC-MS und GC-MS Messungen. Wesentliche Ergebnisse sind in Tabelle 9-1 zusammengefasst.

**Tabelle 9-1.** Stoffflussverteilung am G6P-Knoten und Aktivität des Malatenzyms in *E. coli* W3110 bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ . Zur Identifikation der intrazellulären Stoffflussverteilung wurden isotopisch instationäre (LC-MS) und stationäre (LC-MS, GC-MS) Messdaten verwendet. Nettoraten und Standardabweichungen sind auf die Glucoseaufnahmerate normiert.

	LC-MS isotopisch stationär und instationär	LC-MS isotopisch stationär	GC-MS isotopisch stationär	LC-MS + GC-MS isotopisch stationär
Glykolyse : PPP <sup>a)</sup>	55 ± 4 : 44 ± 8	53 ± 7 : 46 ± 7	62 ± 12 : 37 ± 10	53 ± 10 : 46 ± 10
Malatenzym	4 ± 2	3 ± 2	6 ± 4	5 ± 3

<sup>a)</sup> Pentosephosphat-Weg

Das Ergebnis der isotopisch instationären <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse unter Verwendung isotopisch instationärer und stationärer LC-MS Messungen konnte durch isotopisch stationäre <sup>13</sup>C-Stoffflussanalysen reproduziert werden (Tabelle 9-1). Eine Validierung erfolgte dadurch, dass mit LC-MS und GC-MS unterschiedliche Messdatensätze verwendet worden sind. Während bei den isotopisch stationären LC-MS Messungen das in Kapitel 3 beschriebene integrierte Probenahmeverfahren und ein neu etabliertes LC-MS Analyseverfahren (Kapitel 5 und 6) eingesetzt wurden, erfolgte die Analyse der proteinogenen Aminosäuren aus konventionell geernteter Biomasse mit einem etablierten GC-MS Analyseverfahren (Dauner *et al.*, 2000). Die Anwendung dieser LC-MS und GC-MS Methoden führte zu konsistenten Messergebnissen (Kapitel 6.5) und Stoffflussverteilungen (Tabelle 9-1). Auf Basis der verfügbaren LC-MS und GC-MS Messdaten (Kapitel 8.3.2) konnten mit LC-MS gegenüber GC-MS insbesondere die Flussverteilung am G6P-Knoten ( $r_2$ ,  $r_5$ ), die Raten im Pentosephosphat-Weg ( $r_5$  bis  $r_9$ ) und beim Malatenzym ( $r_{18}$ ) mit kleineren Standardabweichungen identifiziert werden.

Dagegen konnten in dem untersuchten Modellsystem die nur sehr ungenau bestimmbaren Reversibilitätsfaktoren (Emmerling *et al.*, 2002) mit dem GC-MS Datensatz am besten identifiziert werden. Keine signifikanten Unterschiede wurden bei den LC-MS basierten isotopisch instationären bzw. isotopisch stationären Stoffflussverteilungen festgestellt. Dem zusätzlichen Informationsgewinn aus der Markierungsdynamik standen zusätzliche (fehlerbehaftete) Messungen der Absolutkonzentrationen gegenüber. In dem untersuchten Modellsystem erwies sich die Anzahl isotopisch stationärer LC-MS bzw. GC-MS Messinformationen für die Identifikation der intrazellulären Flussverteilung als ausreichend.

Das Ergebnis der LC-MS basierten isotopisch instationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse wird nachfolgend mit Literaturdaten aus isotopisch stationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen (Tabelle 9-2) und stöchiometrischen Flussanalysen (Tabelle 9-3) verglichen.

**Tabelle 9-2.** Vergleich der Stoffflussverteilung am G6P-Knoten und der Aktivität des Malatenzyms in *E. coli* mit Literaturdaten isotopisch stationärer  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen. Nettoraten und Standardabweichungen sind auf die Glucoseaufnahme rate normiert.

		Schmidt <i>et al.</i> (1999a)	Emmerling <i>et al.</i> (2002)	Shimizu <i>et al.</i> (2004)	Siddiquee <i>et al.</i> (2004)
Flussanalyse	$^{13}\text{C}$ -MFA	$^{13}\text{C}$ -MFA			
Messdaten	LC-MS isotopisch stationär und instationär	NMR	NMR	NMR und GC-MS	NMR und GC-MS
D [ $\text{h}^{-1}$ ]	0.1	k. A.	0.09	0.11	0.1
Glykolyse : PPP <sup>a)</sup>	55 ± 4 : 44 ± 8	53 : 46	54 : 44	70 : 28.3	65 : 34
Malatenzym	4 ± 2	-	7	-	3

<sup>a)</sup> Pentosephosphat-Weg

Die identifizierte Flussverteilung am G6P-Knoten und der Fluss über das Malatenzym waren in sehr guter Übereinstimmung mit Literaturdaten (Emmerling *et al.*, 2002; Siddiquee *et al.*, 2004). Shimizu (Shimizu, 2004) ermittelte einen größeren Fluss durch die Glykolyse, wobei in diesem Modell das Malatenzym nicht berücksichtigt wurde. Schmidt (Schmidt *et al.*, 1999a) hat in *E. coli* ebenfalls eine mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbare Flussverteilung am G6P-Knoten ermittelt, jedoch wurde die Verdünnungsrate, die die Flussverteilung am G6P-Knoten maßgeblich beeinflusst (Shimizu, 2004; Kayser *et al.*, 2005), nicht angegeben. Der Vergleich mit publizierten Flussverteilungen wurde dadurch erschwert, dass diese ohne Standardabweichungen angegeben sind (Schmidt *et al.*, 1999a; Emmerling *et al.*, 2002; Shimizu, 2004; Siddiquee *et al.*, 2004).

Da die Güte der Schätzung intrazellulärer Stoffflüsse von der Anzahl nicht redundanter Messdaten abhängt (Wiechert *et al.*, 1997b; Isermann *et al.*, 2003), wurden in jüngeren Arbeiten verschiedene Messtechniken - wie NMR und GC-MS (Shimizu, 2004; Siddiquee *et al.*, 2004) - kombiniert. In dieser Arbeit wurden sowohl LC-MS als auch GC-MS Analysemethoden eingesetzt.

**Tabelle 9-3.** Vergleich der Stoffflussverteilung am G6P-Knoten und der Aktivität des Malatenzyms in *E. coli* mit Literaturdaten stöchiometrischer Flussanalysen. Nettoraten und Standardabweichungen sind auf die Glucoseaufnahme rate normiert.

Autor		Chassagnole <i>et al.</i> (2002)	Schmid <i>et al.</i> (2004)	Kayser <i>et al.</i> (2005)
Flussanalyse	<sup>13</sup> C-MFA	stöchiometrische MFA		
D [h <sup>-1</sup> ]	0.1	0.1	0.1	0.1
Glykolyse : PPP <sup>a)</sup>	55 ± 4 : 44 ± 8	29 : 70 <sup>b)</sup>	72 : 27 <sup>c)</sup>	56 : 43 <sup>c)</sup>
Malatenzym	4 ± 2	-	-	-

<sup>a)</sup> Pentosephosphat-Weg

<sup>b)</sup> Isocitrat-Dehydrogenase ist NAD-abhängig

<sup>c)</sup> Isocitrat-Dehydrogenase ist NADP-abhängig

Die Ergebnisse der stöchiometrischen Flussverteilungen am G6P-Knoten hängen von der Bilanzierung der Kofaktoren ab (Tabelle 9-3). Dies stellt einen Nachteil der stöchiometrischen Flussanalyse gegenüber der <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse dar (Marx *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1998; Sauer *et al.*, 1999; Christensen *et al.*, 2000; Wiechert, 2001). Schmid (Schmid *et al.*, 2004) ermittelte am G6P-Knoten eine Flussverteilung zwischen Glykolyse und Pentosephosphat-Weg von 28% : 71% für den Fall, dass die Isocitrat-Dehydrogenase NAD als Kofaktor verwendet bzw. von 72% : 27% bei NADP als Kofaktor (Tabelle 9-3). Kayser (Kayser *et al.*, 2005) stellte in *E. coli* bei D = 0.1 h<sup>-1</sup> eine Flussverteilung am G6P-Knoten von 56% : 43% fest, wobei die Isocitrat-Dehydrogenase NADP-abhängig modelliert wurde. Die von Kayser (Kayser *et al.*, 2005) ermittelte Flussverteilung am G6P-Knoten ist in guter Übereinstimmung mit dem Ergebnis dieser Arbeit.

Es wurden isotopisch instationäre <sup>13</sup>C-Stoffflussanalysen in *E. coli* unter Verwendung isotopisch instationärer (LC-MS) und isotopisch stationärer (LC-MS, GC-MS) Datensätze durchgeführt. Die mit isotopisch instationären LC-MS Daten ermittelte intrazelluläre Stoffflussverteilung konnte mit isotopisch stationären Datensätzen (LC-MS, GC-MS, LC-MS+GC-MS) bestätigt werden.

Ein Vorteil der <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse gegenüber der stöchiometrischen Stoffflussanalyse ist, dass auf eine Bilanzierung von Kofaktoren verzichtet werden kann. Je nach Modellierung der Kofaktorabhängigkeit einzelner Reaktionen ergeben sich bei der stöchiometrischen Stoffflussanalyse unterschiedliche Stoffflussverteilungen wie Tabelle 9-3 für die Flussverteilung am G6P-Knoten zeigt. Jedoch erfordern <sup>13</sup>C-Stoffflussanalysen einen höheren experimentellen, analytischen und rechentechnischen Aufwand. Vor allem wegen der beschränkten Verfügbarkeit benötigter C-Atom Transitionen, mangelnder messtechnischer Zugänglichkeit von Stoffwechselwegen und des rechentechnischen Aufwandes wird die <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse, im Gegensatz zur stöchiometrischen metabolischen Flussanalyse, zur Analyse großskaliger metabolischer Reaktionsnetzwerke bisher nicht eingesetzt.

## 10 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden experimentelle und rechnergestützte Verfahren für die LC-MS basierte isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse entwickelt und zur Analyse der intrazellulären Stoffflussverteilung in *E. coli* W3110 bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  eingesetzt. Die  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse ist zwar mit einem höheren experimentellen, analytischen und rechentechnischen Aufwand verbunden, sollte aber für die metabolische Flussanalyse bevorzugt eingesetzt werden, da auf kritische Annahmen, wie sie bei der stöchiometrischen Flussanalyse verwendet werden, verzichtet werden kann. Insbesondere können mit diesem Ansatz parallele Stoffwechselwege und metabolische Zyklen identifiziert werden.

Mit Blick auf die Anwendung ist der Einsatz der Methoden der isotopisch instationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse zur Analyse und Auslegung der industriell relevanten Prozessführungen Batch und Fed Batch anzustreben. Im Gegensatz zu einer GC-MS basierten Analyse proteinogener Aminosäuren kann durch eine LC-MS basierte Vorgehensweise die Markierungsdauer eines  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimentes signifikant reduziert werden und es können ausreichend kleine Zeitkonstanten realisiert werden, um bei Batch und Fed Batch Prozessen Quasi-Stationarität anzunehmen. Dies ermöglicht die Ermittlung intrazellulärer Stoffflussverteilungen zu verschiedenen Prozesszeiten und macht die LC-MS basierte Vorgehensweise für diese Anwendungen besonders geeignet. Die isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse berücksichtigt Messdaten der isotopisch instationären Markierdynamik. Dies bedeutet eine prinzipiell breitere Datenbasis für die Identifikation von intrazellulären Stoffflussverteilungen. Im vorliegenden Fall ergaben die zusätzlichen Messungen für die Schätzung der intrazellulären Flussverteilung keine signifikanten Vorteile. Jedoch ermöglicht der isotopisch instationäre Ansatz eine integrierte Analyse von Markierungsdaten und metabolisch stationären Metabolitkonzentrationen und stellt damit insbesondere ein Potential für eine weitere Verkürzung der Markierungsdauer bei  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimenten dar.

Während bei Fed Batch Prozessen unter Glucoselimitierung die Zugabe markierten Substrates analog der hier für die kontinuierliche Prozessführung beschriebenen Vorgehensweise durch einen Medienwechsel erfolgen kann, sollte bei Untersuchungen im Batch Betrieb auf eine Miniaturisierung der Experimente hingearbeitet werden, da bei solchen Experimenten Glucose in hohen Konzentrationen vorliegt. Triebkraft zur Miniaturisierung sind in diesem Zusammenhang nicht nur die hohen Kosten solcher Untersuchungen, sondern vor allem auch der anzustrebende Einsatz im Hochdurchsatzscreening. Die  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussana-

lyse ist in besonderer Weise zur Miniaturisierung von Experimenten geeignet, da auf eine im kleinen Maßstab messtechnisch schwer zu realisierende Bestimmung von Sauerstoffaufnahme- und Kohlendioxidbildungsraten verzichtet werden kann. Automatisiert wurden das integrierte Probenahmeverfahren durch Prozessintegration und mittels einer Pulsaufgabereinheit die Durchführung von stimulus-response Experimenten. Durch Miniaturisierung sollten in Zukunft weitere Automatisierungspotentiale erschlossen werden, z. B. durch eine parallele Durchführung von  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimenten im Mikrotiterplattenformat.

Durch das in dieser Arbeit eingesetzte integrierte Probenahmeverfahren konnte nicht nur die Reproduzierbarkeit von Experimenten verbessert werden, sondern auch der experimentelle Zeitbedarf zur Durchführung aller benötigten Grundoperationen (Probenahme, Quenching, Extraktion und Probenaufarbeitung) von mehreren Stunden auf 30 s verringert werden. Dies ist ein Schritt in Richtung zeitlich prozessnahe Analyse (at-line) intrazellulärer Metabolite bzw. Markierungsmuster. Eine on-line-Analyse intrazellulärer Metabolite wird noch durch den Umstand erschwert, dass die Retentionszeiten der untersuchten Metabolite bei der etablierten LC-MS Analysemethode zwischen 20 und 30 min lagen. Allerdings lassen die Entwicklungen im Bereich LC-MS Analytik, z. B. die Einführung von LC-MS<sup>n</sup>-Technologien, weitere Fortschritte in Qualität der Messungen und Quantität der messbaren Metabolite erwarten.

Für die Bioprozessentwicklung interessant ist die isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse neben ihrem Einsatz zum Vergleich von unterschiedlichen Prozessbedingungen (z. B. bei Batch und Fed Batch Prozessen) auch bei Untersuchungen von Mutanten und für ein rationales metabolisches Design. Es können Mutanten verglichen, Auswirkungen genetischer Modifikationen untersucht bzw. neue Targets für genetische Modifikationen identifiziert werden. Außerdem stellen stationäre Flussverteilungen einen wichtigen Ausgangspunkt für dynamische Modelle und ein metabolisches Design *in silico* dar. Zielsetzungen sind dabei unter anderem die Erhöhung von Produktivität und Ausbeute, die Erweiterung des Substratspektrums und die Herstellung neuer Produkte. Ein isotopisch instationäres Metabolic Profiling intrazellulärer Metabolitkonzentrationen und Massenisotopomerenverteilungen sowie  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen wurden im Rahmen dieser Arbeit nur in dem Wildtyp *E. coli* W3110 bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  durchgeführt.

Wissenschaftlich interessant ist dieser Ansatz weiterhin auch für die Untersuchung systembiologischer Fragestellungen, insbesondere bei tierischen Zellkulturen, wie sie derzeit z. B. am Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart im Rahmen des BMBF-Projektes 'Systeme des Lebens - Systembiologie' bei Hepatozyten bearbeitet werden. Aussichtsreich sind LC-MS basierte isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen bei diesen Systemen vor allem deshalb, weil sie sich den hohen Turnover von Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels zunutze machen. Wegen zu geringer Proteinbiosyntheseraten bei der Kultivierung (unter Umständen lässt sich hierbei keine signifikante Proteinbiosynthese mehr

beobachten) ist eine  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse auf Basis proteinogener Aminosäuren bei diesen Systemen oft nicht möglich.

Zur Analyse großskaliger metabolischer Reaktionsnetzwerke, wie sie mit der stöchiometrischen Flussanalyse bereits möglich ist, werden neben sensitiveren analytischen Methoden eine umfangreichere Kenntnis von C-Atom Transitionen in metabolischen Reaktionsnetzwerken benötigt, außerdem ein Zugang zu diesen Informationen (diese essentiellen Informationen sollten über Datenbanken verfügbar sein, um die automatisierte Aufstellung der Isotopomerenbilanzen eines metabolischen Reaktionsmodells zu erleichtern).

Weiterzuentwickeln sind auch die rechnergestützten Methoden zur Modellerstellung (z. B. bei mehrmolekularen Reaktionen), Simulation und Optimierung. Vor allem zur effizienten Untersuchung von Modellvarianten (Mutanten) ist eine grafische Modellerstellung und Auswertung wünschenswert, wie sie für stöchiometrische Modelle (z. B. mit der Software INSILICO discovery) bereits möglich ist, da bei einem typischen Isotopomerenmodell mehrere hundert bis tausend Gleichungen aufzustellen und zu lösen sind.

Der vorgestellte Ansatz der isotopisch instationären  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse ermöglicht die integrierte Analyse isotopisch stationärer und isotopisch instationärer Messdaten unterschiedlicher Analysetechniken. Damit ist es außerdem erstmals möglich, durch Kombination von relativen Messinformationen und metabolisch stationären Absolutkonzentrationen Konsistenzprüfungen durchzuführen, da die Markierungs-dynamiken von Massenisotopomeren im Reaktionsnetzwerk von den Poolkonzentrationen abhängen. Auf diese Weise könnten nicht messbare Poolkonzentrationen (z. B. E4P und S7P im Pentose-Phosphat-Weg bei *E. coli*) aus den Markierungs-dynamiken der quantifizierbaren Stoffwechselprodukte identifiziert werden.

Für die Bioprozessentwicklung und eine rationale Stammentwicklung sind die hier entwickelten Methoden zur Untersuchung von Metabolom (integriertes Probenahmeverfahren und LC-MS Analytik) und Fluxom (isotopisch instationäre  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse) neben den Methoden zur Analyse von Genom, Transkriptom und Proteom einzusetzen.

# Anhang

## A1 Bezeichnung von Metaboliten, Nettoreaten und Enzymen

### Metabolite

ACA	Acetyl-Coenzym A
AKG	$\alpha$ -Ketoglutarat
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
E4P	Erythrose-4-phosphat
FBP	Fructose-1,6-bisphosphat
FUM	Fumarat
F6P	Fructose-6-phosphat
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
G6P	Glucose-6-phosphat
MAL	L-Malat
OAA	Oxalacetat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PYR	Pyruvat
P5P	Pentosephosphat Pool (Ribulose-5-phosphat, Xylulose-5-phosphat, Ribose-5-phosphat)
R5P	Ribose-5-phosphat
S7P	Sedoheptulose-7-phosphat
2PG	2-Phosphoglycerat
3PG	3-Phosphoglycerat
6PG	6-Phospho-gluconat

## Nettoraten und Enzymen

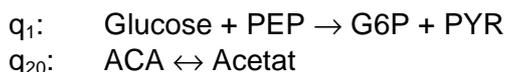
Raten über die Systemgrenze sind mit  $q_i$  bezeichnet, intrazelluläre Raten mit  $r_i$ . Zu den Raten  $r_i$  ist jeweils eine Kurzbezeichnung und der vollständige Name des Enzyms bzw. des Transportsystems angegeben. Da bei den Raten  $r_5$ ,  $r_{10}$ ,  $r_{14}$ ,  $r_{15}$  und  $q_{20}$  jeweils lineare Reaktionssequenzen zusammengefasst wurden, werden bei diesen keine weiteren Bezeichnungen verwendet.

$q_1$	PTS	Phosphotransferase-System
$r_2$	PGI	Glucose-6-phosphat-Isomerase
$r_3$	PFK	6-Phosphofruktokinase
$r_4$	FBA	Fructosebisphosphat-Aldolase
$r_6$	6PG-DH	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
$r_7$	TKa	Transketolase Reaktion a
$r_8$	TKb	Transketolase Reaktion b
$r_9$	TA	Transaldolase
$r_{11}$	ENO	Enolase
$r_{12}$	PYK	Pyruvat-Kinase
$r_{13}$	PEP <sub>xyl</sub> /PEPkin	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase/Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
$r_{16}$	FUMase	Fumarase
$r_{17}$	MAL-DH	Malat-Dehydrogenase
$r_{18}$	MAE	Malatenzym
$r_{19}$	PDH	Pyruvat-Dehydrogenase

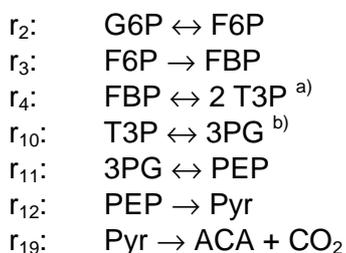
## A2 Stöchiometrisches Modell (Teilmodul A in Abbildung 7-2)

Bei der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse kann auf die Bilanzierung von Kofaktoren und Nukleotiden verzichtet werden. Im stöchiometrischen Modell angegeben sind daher nur Reaktanden, bei denen C-Atom Transitionen (Anhang A3) stattfinden.

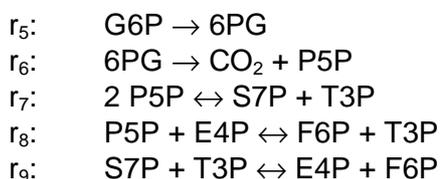
### Phosphotransferase-System, Acetatbildung



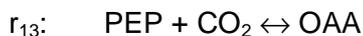
### Glykolyse



### Pentosephosphat-Weg



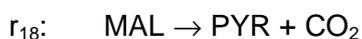
### Phosphoenolpyruvat-Carboxylase/Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase



### Tricarbonsäure-Zyklus



### Malatenzym



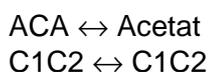
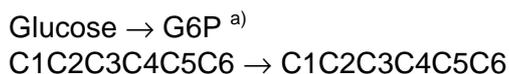
<sup>a)</sup> T3P Triosephosphat. DHAP und GAP wurden als Pool modelliert und quantifiziert

<sup>b)</sup> 2PG und 3PG wurden als Pool modelliert und quantifiziert

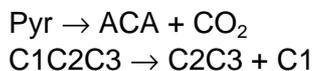
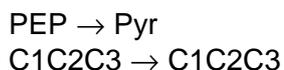
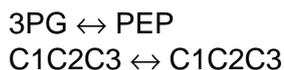
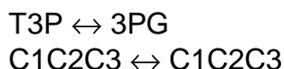
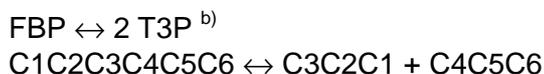
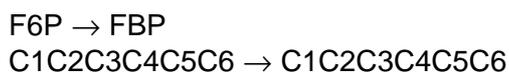
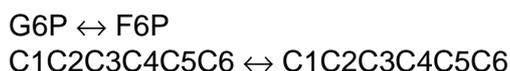
### A3 C-Atom Transitionen im Isotopomerenmodell und Scrambling-Reaktionen

Die C-Atom Transitionen werden in C-Atom-Zuordnungsmatrizen (Zupke *et al.*, 1994) abgelegt, die für die Berechnung der Isotopomeren-Zuordnungsmatrizen (Schmidt *et al.*, 1997) und zur Generierung des Isotopomerenmodells (Anhang A4) benötigt werden.

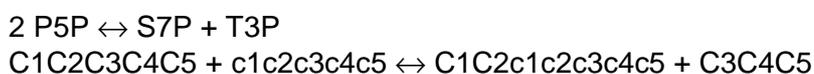
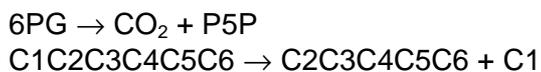
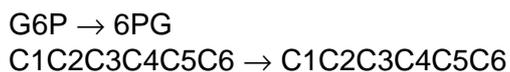
#### Phosphotransferase-System, Acetatbildung

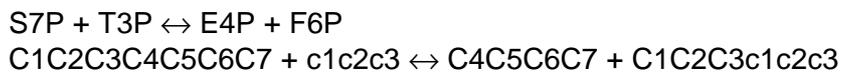
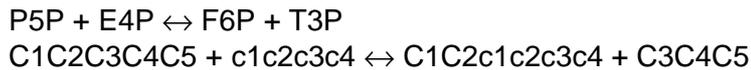


#### Glykolyse

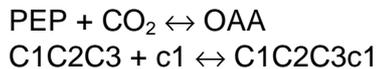


#### Pentosephosphat-Weg

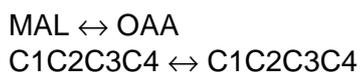
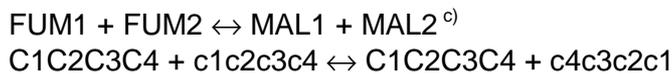
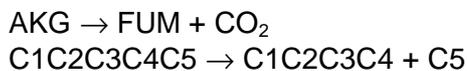
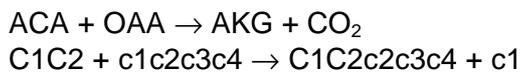




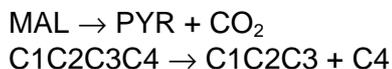
### Phosphoenolpyruvat-Carboxylase/Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase



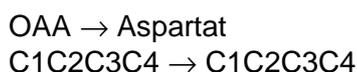
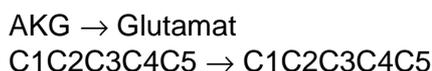
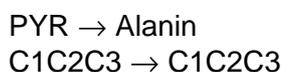
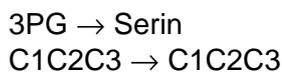
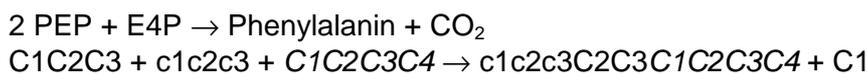
### Tricarbonsäure-Zyklus



### Malatenzym



### Aminosäuren



a) beim PTS-System erfolgt eine Übertragung von Phosphat, kein C-Atom Übergang

b) T3P Triosephosphat. DHAP+GAP wurden als 2 Moleküle Triosephosphat modelliert

c) Fumarat ist ein rotationssymmetrisches Molekül. Die Wahrscheinlichkeit für ein Markierungs-Scrambling beträgt 50% (Kapitel 7.4.3)

## A4 Isotopomerenmodell

Basierend auf dem stöchiometrischen Modell (Anhang A2) und den zugehörigen C-Atom Transitionen (Anhang A3) wurde das Isotopomerenmodell dieses Reaktionsnetzwerkes mit dem Algorithmus von Schmidt (Schmidt *et al.*, 1997) in Maple generiert. Die Bilanzgleichungen des Isotopomerenmodells sind nachfolgend aufgeführt. Darin sind alle Raten mit  $v_i$  bezeichnet (Hinreaktionen  $v_{i_f}$  bzw. Rückreaktionen  $v_{i_b}$ ). Angegeben sind auch die numerischen Werte der Flüsse in die Biomassesynthese. Die Bezeichnung der Isotopomere  $I_i$  folgt der von Schmidt (Schmidt *et al.*, 1997) eingeführten Nomenklatur.

### Glykolyse

#### G6P

$$v1 * IGlc[1] + v2\_b * IF6P[1] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[1]$$

$$v1 * IGlc[2] + v2\_b * IF6P[2] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[2]$$

$$v1 * IGlc[3] + v2\_b * IF6P[3] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[3]$$

$$v1 * IGlc[4] + v2\_b * IF6P[4] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[4]$$

$$v1 * IGlc[5] + v2\_b * IF6P[5] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[5]$$

$$v1 * IGlc[6] + v2\_b * IF6P[6] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[6]$$

$$v1 * IGlc[7] + v2\_b * IF6P[7] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[7]$$

$$v1 * IGlc[8] + v2\_b * IF6P[8] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[8]$$

$$v1 * IGlc[9] + v2\_b * IF6P[9] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[9]$$

$$v1 * IGlc[10] + v2\_b * IF6P[10] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[10]$$

$$v1 * IGlc[11] + v2\_b * IF6P[11] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[11]$$

$$v1 * IGlc[12] + v2\_b * IF6P[12] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[12]$$

$$v1 * IGlc[13] + v2\_b * IF6P[13] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[13]$$

$$v1 * IGlc[14] + v2\_b * IF6P[14] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[14]$$

$$v1 * IGlc[15] + v2\_b * IF6P[15] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[15]$$

$$v1 * IGlc[16] + v2\_b * IF6P[16] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[16]$$

$$v1 * IGlc[17] + v2\_b * IF6P[17] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[17]$$

$$v1 * IGlc[18] + v2\_b * IF6P[18] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[18]$$

$$v1 * IGlc[19] + v2\_b * IF6P[19] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[19]$$

$$v1 * IGlc[20] + v2\_b * IF6P[20] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[20]$$

$$v1 * IGlc[21] + v2\_b * IF6P[21] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[21]$$

$$v1 * IGlc[22] + v2\_b * IF6P[22] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[22]$$

$$v1 * IGlc[23] + v2\_b * IF6P[23] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[23]$$

$$v1 * IGlc[24] + v2\_b * IF6P[24] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[24]$$

$$v1 * IGlc[25] + v2\_b * IF6P[25] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[25]$$

$$v1 * IGlc[26] + v2\_b * IF6P[26] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[26]$$

$$v1 * IGlc[27] + v2\_b * IF6P[27] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[27]$$

$$v1 * IGlc[28] + v2\_b * IF6P[28] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[28]$$

$$v1 * IGlc[29] + v2\_b * IF6P[29] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[29]$$

$$v1 * IGlc[30] + v2\_b * IF6P[30] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[30]$$

$$v1 * IGlc[31] + v2\_b * IF6P[31] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[31]$$

$$v1 * IGlc[32] + v2\_b * IF6P[32] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[32]$$

$$v1 * IGlc[33] + v2\_b * IF6P[33] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[33]$$

$$v1 * IGlc[34] + v2\_b * IF6P[34] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[34]$$

$$v1 * IGlc[35] + v2\_b * IF6P[35] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[35]$$

$$v1 * IGlc[36] + v2\_b * IF6P[36] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[36]$$

$$v1 * IGlc[37] + v2\_b * IF6P[37] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[37]$$

$$v1 * IGlc[38] + v2\_b * IF6P[38] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[38]$$

$$v1 * IGlc[39] + v2\_b * IF6P[39] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[39]$$

$$v1 * IGlc[40] + v2\_b * IF6P[40] = (v2\_f + v6 + .20940957140558e-2) * IG6P[40]$$

$v1*IGlc[41]+v2\_b*IF6P[41] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[41]$   
 $v1*IGlc[42]+v2\_b*IF6P[42] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[42]$   
 $v1*IGlc[43]+v2\_b*IF6P[43] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[43]$   
 $v1*IGlc[44]+v2\_b*IF6P[44] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[44]$   
 $v1*IGlc[45]+v2\_b*IF6P[45] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[45]$   
 $v1*IGlc[46]+v2\_b*IF6P[46] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[46]$   
 $v1*IGlc[47]+v2\_b*IF6P[47] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[47]$   
 $v1*IGlc[48]+v2\_b*IF6P[48] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[48]$   
 $v1*IGlc[49]+v2\_b*IF6P[49] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[49]$   
 $v1*IGlc[50]+v2\_b*IF6P[50] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[50]$   
 $v1*IGlc[51]+v2\_b*IF6P[51] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[51]$   
 $v1*IGlc[52]+v2\_b*IF6P[52] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[52]$   
 $v1*IGlc[53]+v2\_b*IF6P[53] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[53]$   
 $v1*IGlc[54]+v2\_b*IF6P[54] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[54]$   
 $v1*IGlc[55]+v2\_b*IF6P[55] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[55]$   
 $v1*IGlc[56]+v2\_b*IF6P[56] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[56]$   
 $v1*IGlc[57]+v2\_b*IF6P[57] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[57]$   
 $v1*IGlc[58]+v2\_b*IF6P[58] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[58]$   
 $v1*IGlc[59]+v2\_b*IF6P[59] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[59]$   
 $v1*IGlc[60]+v2\_b*IF6P[60] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[60]$   
 $v1*IGlc[61]+v2\_b*IF6P[61] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[61]$   
 $v1*IGlc[62]+v2\_b*IF6P[62] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[62]$   
 $v1*IGlc[63]+v2\_b*IF6P[63] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[63]$   
 $v1*IGlc[64]+v2\_b*IF6P[64] = (v2\_f+v6+.20940957140558e-2)*IG6P[64]$

## F6P

$v2\_f*IG6P[1]+v8\_f*(IP5P[5]+IP5P[2]+IP5P[3]+IP5P[1]+IP5P[6]+IP5P[4]+IP5P[7]+IP5P[8])*IE4P[1]+v9\_f*(IS7P[3]+IS7P[4]+IS7P[5]+IS7P[6]+IS7P[7]+IS7P[8]+IS7P[9]+IS7P[10]+IS7P[11]+IS7P[12]+IS7P[13]+IS7P[14]+IS7P[15]+IS7P[16]+IS7P[1]+IS7P[2])*IT3P[1] = (v2\_b+v8\_b+v9\_b+v3+.790648704229291e-3)*IF6P[1]$   
 $v2\_f*IG6P[2]+v8\_f*(IP5P[5]+IP5P[2]+IP5P[3]+IP5P[1]+IP5P[6]+IP5P[4]+IP5P[7]+IP5P[8])*IE4P[2]+v9\_f*(IS7P[3]+IS7P[4]+IS7P[5]+IS7P[6]+IS7P[7]+IS7P[8]+IS7P[9]+IS7P[10]+IS7P[11]+IS7P[12]+IS7P[13]+IS7P[14]+IS7P[15]+IS7P[16]+IS7P[1]+IS7P[2])*IT3P[2] = (v2\_b+v8\_b+v9\_b+v3+.790648704229291e-3)*IF6P[2]$   
 $v2\_f*IG6P[3]+v8\_f*(IP5P[5]+IP5P[2]+IP5P[3]+IP5P[1]+IP5P[6]+IP5P[4]+IP5P[7]+IP5P[8])*IE4P[3]+v9\_f*(IS7P[3]+IS7P[4]+IS7P[5]+IS7P[6]+IS7P[7]+IS7P[8]+IS7P[9]+IS7P[10]+IS7P[11]+IS7P[12]+IS7P[13]+IS7P[14]+IS7P[15]+IS7P[16]+IS7P[1]+IS7P[2])*IT3P[3] = (v2\_b+v8\_b+v9\_b+v3+.790648704229291e-3)*IF6P[3]$   
 $v2\_f*IG6P[4]+v8\_f*(IP5P[5]+IP5P[2]+IP5P[3]+IP5P[1]+IP5P[6]+IP5P[4]+IP5P[7]+IP5P[8])*IE4P[4]+v9\_f*(IS7P[3]+IS7P[4]+IS7P[5]+IS7P[6]+IS7P[7]+IS7P[8]+IS7P[9]+IS7P[10]+IS7P[11]+IS7P[12]+IS7P[13]+IS7P[14]+IS7P[15]+IS7P[16]+IS7P[1]+IS7P[2])*IT3P[4] = (v2\_b+v8\_b+v9\_b+v3+.790648704229291e-3)*IF6P[4]$   
 $v2\_f*IG6P[5]+v8\_f*(IP5P[5]+IP5P[2]+IP5P[3]+IP5P[1]+IP5P[6]+IP5P[4]+IP5P[7]+IP5P[8])*IE4P[5]+v9\_f*(IS7P[3]+IS7P[4]+IS7P[5]+IS7P[6]+IS7P[7]+IS7P[8]+IS7P[9]+IS7P[10]+IS7P[11]+IS7P[12]+IS7P[13]+IS7P[14]+IS7P[15]+IS7P[16]+IS7P[1]+IS7P[2])*IT3P[5] = (v2\_b+v8\_b+v9\_b+v3+.790648704229291e-3)*IF6P[5]$   
 $v2\_f*IG6P[6]+v8\_f*(IP5P[5]+IP5P[2]+IP5P[3]+IP5P[1]+IP5P[6]+IP5P[4]+IP5P[7]+IP5P[8])*IE4P[6]+v9\_f*(IS7P[3]+IS7P[4]+IS7P[5]+IS7P[6]+IS7P[7]+IS7P[8]+IS7P[9]+IS7P[10]+IS7P[11]+IS7P[12]+IS7P[13]+IS7P[14]+IS7P[15]+IS7P[16]+IS7P[1]+IS7P[2])*IT3P[6] = (v2\_b+v8\_b+v9\_b+v3+.790648704229291e-3)*IF6P[6]$   
 $v2\_f*IG6P[7]+v8\_f*(IP5P[5]+IP5P[2]+IP5P[3]+IP5P[1]+IP5P[6]+IP5P[4]+IP5P[7]+IP5P[8])*IE4P[7]+v9\_f*(IS7P[3]+IS7P[4]+IS7P[5]+IS7P[6]+IS7P[7]+IS7P[8]+IS7P[9]+IS7P[10]+IS7P[11]+IS7P[12]+IS7P[13]+IS7P[14]+IS7P[15]+IS7P[16]+IS7P[1]+IS7P[2])*IT3P[7] = (v2\_b+v8\_b+v9\_b+v3+.790648704229291e-3)*IF6P[7]$   
 $v2\_f*IG6P[8]+v8\_f*(IP5P[5]+IP5P[2]+IP5P[3]+IP5P[1]+IP5P[6]+IP5P[4]+IP5P[7]+IP5P[8])*IE4P[8]+v9\_f*(IS7P[3]+IS7P[4]+IS7P[5]+IS7P[6]+IS7P[7]+IS7P[8]+IS7P[9]+IS7P[10]+IS7P[11]+IS7P[12]+IS7P[13]+IS7P[14]+IS7P[15]+IS7P[16]+IS7P[1]+IS7P[2])*IT3P[8] = (v2\_b+v8\_b+v9\_b+v3+.790648704229291e-3)*IF6P[8]$   
 $v2\_f*IG6P[9]+v8\_f*(IP5P[5]+IP5P[2]+IP5P[3]+IP5P[1]+IP5P[6]+IP5P[4]+IP5P[7]+IP5P[8])*IE4P[9]+v9\_f*(IS7P[17]+IS7P[18]+IS7P[19]+IS7P[20]+IS7P[21]+IS7P[22]+IS7P[23]+IS7P[24]+IS7P[25]+IS7P[26])$







$$\begin{aligned}
&v2\_f*IG6P[55]+v8\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*I \\
&E4P[7]+v9\_f*(IS7P[97]+IS7P[98]+IS7P[99]+IS7P[100]+IS7P[101]+IS7P[102]+IS7P[103]+IS7P[104]+IS \\
&7P[105]+IS7P[106]+IS7P[107]+IS7P[108]+IS7P[109]+IS7P[110]+IS7P[111]+IS7P[112])*IT3P[7] = \\
&(v2\_b+v8\_b+v9\_b+v3+.790648704229291e-3)*IF6P[55] \\
&v2\_f*IG6P[56]+v8\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*I \\
&E4P[8]+v9\_f*(IS7P[97]+IS7P[98]+IS7P[99]+IS7P[100]+IS7P[101]+IS7P[102]+IS7P[103]+IS7P[104]+IS \\
&7P[105]+IS7P[106]+IS7P[107]+IS7P[108]+IS7P[109]+IS7P[110]+IS7P[111]+IS7P[112])*IT3P[8] = \\
&(v2\_b+v8\_b+v9\_b+v3+.790648704229291e-3)*IF6P[56] \\
&v2\_f*IG6P[57]+v8\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*I \\
&E4P[9]+v9\_f*(IS7P[119]+IS7P[113]+IS7P[114]+IS7P[115]+IS7P[116]+IS7P[117]+IS7P[118]+IS7P[120 \\
&]+IS7P[121]+IS7P[122]+IS7P[123]+IS7P[124]+IS7P[125]+IS7P[126]+IS7P[127]+IS7P[128])*IT3P[1] = \\
&(v2\_b+v8\_b+v9\_b+v3+.790648704229291e-3)*IF6P[57] \\
&v2\_f*IG6P[58]+v8\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*I \\
&E4P[10]+v9\_f*(IS7P[119]+IS7P[113]+IS7P[114]+IS7P[115]+IS7P[116]+IS7P[117]+IS7P[118]+IS7P[12 \\
&0]+IS7P[121]+IS7P[122]+IS7P[123]+IS7P[124]+IS7P[125]+IS7P[126]+IS7P[127]+IS7P[128])*IT3P[2] \\
&= (v2\_b+v8\_b+v9\_b+v3+.790648704229291e-3)*IF6P[58] \\
&v2\_f*IG6P[59]+v8\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*I \\
&E4P[11]+v9\_f*(IS7P[119]+IS7P[113]+IS7P[114]+IS7P[115]+IS7P[116]+IS7P[117]+IS7P[118]+IS7P[12 \\
&0]+IS7P[121]+IS7P[122]+IS7P[123]+IS7P[124]+IS7P[125]+IS7P[126]+IS7P[127]+IS7P[128])*IT3P[3] \\
&= (v2\_b+v8\_b+v9\_b+v3+.790648704229291e-3)*IF6P[59] \\
&v2\_f*IG6P[60]+v8\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*I \\
&E4P[12]+v9\_f*(IS7P[119]+IS7P[113]+IS7P[114]+IS7P[115]+IS7P[116]+IS7P[117]+IS7P[118]+IS7P[12 \\
&0]+IS7P[121]+IS7P[122]+IS7P[123]+IS7P[124]+IS7P[125]+IS7P[126]+IS7P[127]+IS7P[128])*IT3P[4] \\
&= (v2\_b+v8\_b+v9\_b+v3+.790648704229291e-3)*IF6P[60] \\
&v2\_f*IG6P[61]+v8\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*I \\
&E4P[13]+v9\_f*(IS7P[119]+IS7P[113]+IS7P[114]+IS7P[115]+IS7P[116]+IS7P[117]+IS7P[118]+IS7P[12 \\
&0]+IS7P[121]+IS7P[122]+IS7P[123]+IS7P[124]+IS7P[125]+IS7P[126]+IS7P[127]+IS7P[128])*IT3P[5] \\
&= (v2\_b+v8\_b+v9\_b+v3+.790648704229291e-3)*IF6P[61] \\
&v2\_f*IG6P[62]+v8\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*I \\
&E4P[14]+v9\_f*(IS7P[119]+IS7P[113]+IS7P[114]+IS7P[115]+IS7P[116]+IS7P[117]+IS7P[118]+IS7P[12 \\
&0]+IS7P[121]+IS7P[122]+IS7P[123]+IS7P[124]+IS7P[125]+IS7P[126]+IS7P[127]+IS7P[128])*IT3P[6] \\
&= (v2\_b+v8\_b+v9\_b+v3+.790648704229291e-3)*IF6P[62] \\
&v2\_f*IG6P[63]+v8\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*I \\
&E4P[15]+v9\_f*(IS7P[119]+IS7P[113]+IS7P[114]+IS7P[115]+IS7P[116]+IS7P[117]+IS7P[118]+IS7P[12 \\
&0]+IS7P[121]+IS7P[122]+IS7P[123]+IS7P[124]+IS7P[125]+IS7P[126]+IS7P[127]+IS7P[128])*IT3P[7] \\
&= (v2\_b+v8\_b+v9\_b+v3+.790648704229291e-3)*IF6P[63] \\
&v2\_f*IG6P[64]+v8\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*I \\
&E4P[16]+v9\_f*(IS7P[119]+IS7P[113]+IS7P[114]+IS7P[115]+IS7P[116]+IS7P[117]+IS7P[118]+IS7P[12 \\
&0]+IS7P[121]+IS7P[122]+IS7P[123]+IS7P[124]+IS7P[125]+IS7P[126]+IS7P[127]+IS7P[128])*IT3P[8] \\
&= (v2\_b+v8\_b+v9\_b+v3+.790648704229291e-3)*IF6P[64]
\end{aligned}$$

## FBP

$$\begin{aligned}
&v3*IF6P[1]+v4\_b*IT3P[1]^2 = v4\_f*IFBP[1] \\
&v3*IF6P[2]+v4\_b*IT3P[1]*IT3P[2] = v4\_f*IFBP[2] \\
&v3*IF6P[3]+v4\_b*IT3P[1]*IT3P[3] = v4\_f*IFBP[3] \\
&v3*IF6P[4]+v4\_b*IT3P[1]*IT3P[4] = v4\_f*IFBP[4] \\
&v3*IF6P[5]+v4\_b*IT3P[1]*IT3P[5] = v4\_f*IFBP[5] \\
&v3*IF6P[6]+v4\_b*IT3P[1]*IT3P[6] = v4\_f*IFBP[6] \\
&v3*IF6P[7]+v4\_b*IT3P[1]*IT3P[7] = v4\_f*IFBP[7] \\
&v3*IF6P[8]+v4\_b*IT3P[1]*IT3P[8] = v4\_f*IFBP[8] \\
&v3*IF6P[9]+v4\_b*IT3P[1]*IT3P[5] = v4\_f*IFBP[9] \\
&v3*IF6P[10]+v4\_b*IT3P[5]*IT3P[2] = v4\_f*IFBP[10] \\
&v3*IF6P[11]+v4\_b*IT3P[5]*IT3P[3] = v4\_f*IFBP[11] \\
&v3*IF6P[12]+v4\_b*IT3P[5]*IT3P[4] = v4\_f*IFBP[12] \\
&v3*IF6P[13]+v4\_b*IT3P[5]^2 = v4\_f*IFBP[13] \\
&v3*IF6P[14]+v4\_b*IT3P[5]*IT3P[6] = v4\_f*IFBP[14] \\
&v3*IF6P[15]+v4\_b*IT3P[5]*IT3P[7] = v4\_f*IFBP[15] \\
&v3*IF6P[16]+v4\_b*IT3P[5]*IT3P[8] = v4\_f*IFBP[16] \\
&v3*IF6P[17]+v4\_b*IT3P[1]*IT3P[3] = v4\_f*IFBP[17] \\
&v3*IF6P[18]+v4\_b*IT3P[3]*IT3P[2] = v4\_f*IFBP[18]
\end{aligned}$$

$v3*IF6P[19]+v4\_b*IT3P[3]^2 = v4\_f*IFBP[19]$   
 $v3*IF6P[20]+v4\_b*IT3P[3]*IT3P[4] = v4\_f*IFBP[20]$   
 $v3*IF6P[21]+v4\_b*IT3P[5]*IT3P[3] = v4\_f*IFBP[21]$   
 $v3*IF6P[22]+v4\_b*IT3P[3]*IT3P[6] = v4\_f*IFBP[22]$   
 $v3*IF6P[23]+v4\_b*IT3P[3]*IT3P[7] = v4\_f*IFBP[23]$   
 $v3*IF6P[24]+v4\_b*IT3P[3]*IT3P[8] = v4\_f*IFBP[24]$   
 $v3*IF6P[25]+v4\_b*IT3P[1]*IT3P[7] = v4\_f*IFBP[25]$   
 $v3*IF6P[26]+v4\_b*IT3P[7]*IT3P[2] = v4\_f*IFBP[26]$   
 $v3*IF6P[27]+v4\_b*IT3P[3]*IT3P[7] = v4\_f*IFBP[27]$   
 $v3*IF6P[28]+v4\_b*IT3P[7]*IT3P[4] = v4\_f*IFBP[28]$   
 $v3*IF6P[29]+v4\_b*IT3P[5]*IT3P[7] = v4\_f*IFBP[29]$   
 $v3*IF6P[30]+v4\_b*IT3P[7]*IT3P[6] = v4\_f*IFBP[30]$   
 $v3*IF6P[31]+v4\_b*IT3P[7]^2 = v4\_f*IFBP[31]$   
 $v3*IF6P[32]+v4\_b*IT3P[7]*IT3P[8] = v4\_f*IFBP[32]$   
 $v3*IF6P[33]+v4\_b*IT3P[1]*IT3P[2] = v4\_f*IFBP[33]$   
 $v3*IF6P[34]+v4\_b*IT3P[2]^2 = v4\_f*IFBP[34]$   
 $v3*IF6P[35]+v4\_b*IT3P[3]*IT3P[2] = v4\_f*IFBP[35]$   
 $v3*IF6P[36]+v4\_b*IT3P[2]*IT3P[4] = v4\_f*IFBP[36]$   
 $v3*IF6P[37]+v4\_b*IT3P[5]*IT3P[2] = v4\_f*IFBP[37]$   
 $v3*IF6P[38]+v4\_b*IT3P[2]*IT3P[6] = v4\_f*IFBP[38]$   
 $v3*IF6P[39]+v4\_b*IT3P[7]*IT3P[2] = v4\_f*IFBP[39]$   
 $v3*IF6P[40]+v4\_b*IT3P[2]*IT3P[8] = v4\_f*IFBP[40]$   
 $v3*IF6P[41]+v4\_b*IT3P[1]*IT3P[6] = v4\_f*IFBP[41]$   
 $v3*IF6P[42]+v4\_b*IT3P[2]*IT3P[6] = v4\_f*IFBP[42]$   
 $v3*IF6P[43]+v4\_b*IT3P[3]*IT3P[6] = v4\_f*IFBP[43]$   
 $v3*IF6P[44]+v4\_b*IT3P[6]*IT3P[4] = v4\_f*IFBP[44]$   
 $v3*IF6P[45]+v4\_b*IT3P[5]*IT3P[6] = v4\_f*IFBP[45]$   
 $v3*IF6P[46]+v4\_b*IT3P[6]^2 = v4\_f*IFBP[46]$   
 $v3*IF6P[47]+v4\_b*IT3P[7]*IT3P[6] = v4\_f*IFBP[47]$   
 $v3*IF6P[48]+v4\_b*IT3P[6]*IT3P[8] = v4\_f*IFBP[48]$   
 $v3*IF6P[49]+v4\_b*IT3P[1]*IT3P[4] = v4\_f*IFBP[49]$   
 $v3*IF6P[50]+v4\_b*IT3P[2]*IT3P[4] = v4\_f*IFBP[50]$   
 $v3*IF6P[51]+v4\_b*IT3P[3]*IT3P[4] = v4\_f*IFBP[51]$   
 $v3*IF6P[52]+v4\_b*IT3P[4]^2 = v4\_f*IFBP[52]$   
 $v3*IF6P[53]+v4\_b*IT3P[5]*IT3P[4] = v4\_f*IFBP[53]$   
 $v3*IF6P[54]+v4\_b*IT3P[6]*IT3P[4] = v4\_f*IFBP[54]$   
 $v3*IF6P[55]+v4\_b*IT3P[7]*IT3P[4] = v4\_f*IFBP[55]$   
 $v3*IF6P[56]+v4\_b*IT3P[4]*IT3P[8] = v4\_f*IFBP[56]$   
 $v3*IF6P[57]+v4\_b*IT3P[1]*IT3P[8] = v4\_f*IFBP[57]$   
 $v3*IF6P[58]+v4\_b*IT3P[2]*IT3P[8] = v4\_f*IFBP[58]$   
 $v3*IF6P[59]+v4\_b*IT3P[3]*IT3P[8] = v4\_f*IFBP[59]$   
 $v3*IF6P[60]+v4\_b*IT3P[4]*IT3P[8] = v4\_f*IFBP[60]$   
 $v3*IF6P[61]+v4\_b*IT3P[5]*IT3P[8] = v4\_f*IFBP[61]$   
 $v3*IF6P[62]+v4\_b*IT3P[6]*IT3P[8] = v4\_f*IFBP[62]$   
 $v3*IF6P[63]+v4\_b*IT3P[7]*IT3P[8] = v4\_f*IFBP[63]$   
 $v3*IF6P[64]+v4\_b*IT3P[8]^2 = v4\_f*IFBP[64]$

### T3P

$v7\_f*(IP5P[1]+IP5P[9]+IP5P[17]+IP5P[25])+v8\_f*(IP5P[1]+IP5P[9]+IP5P[17]+IP5P[25])+v9\_b*(IF6P[49]+IF6P[57]+IF6P[1]+IF6P[9]+IF6P[17]+IF6P[25]+IF6P[33]+IF6P[41])+v10\_b*I3PG[1]+v4\_f*(IFBP[5]+IFBP[6]+IFBP[7]+IFBP[8]+IFBP[1]+IFBP[2]+IFBP[3]+IFBP[4])+v4\_f*(IFBP[33]+IFBP[17]+IFBP[25]+IFBP[9]+IFBP[1]+IFBP[57]+IFBP[41]+IFBP[49]) = (v7\_b+v8\_b+v9\_f+v10\_f+2*v4\_b+.876494312136489e-3)*IT3P[1]$   
 $v7\_f*(IP5P[10]+IP5P[2]+IP5P[26]+IP5P[18])+v8\_f*(IP5P[10]+IP5P[2]+IP5P[26]+IP5P[18])+v9\_b*(IF6P[50]+IF6P[58]+IF6P[2]+IF6P[10]+IF6P[18]+IF6P[26]+IF6P[34]+IF6P[42])+v10\_b*I3PG[2]+v4\_f*(IFBP[33]+IFBP[34]+IFBP[35]+IFBP[36]+IFBP[37]+IFBP[38]+IFBP[39]+IFBP[40])+v4\_f*(IFBP[34]+IFBP[18]+IFBP[26]+IFBP[10]+IFBP[2]+IFBP[58]+IFBP[42]+IFBP[50]) = (v7\_b+v8\_b+v9\_f+v10\_f+2*v4\_b+.876494312136489e-3)*IT3P[2]$   
 $v7\_f*(IP5P[19]+IP5P[27]+IP5P[3]+IP5P[11])+v8\_f*(IP5P[19]+IP5P[27]+IP5P[3]+IP5P[11])+v9\_b*(IF6P[43]+IF6P[51]+IF6P[59]+IF6P[3]+IF6P[11]+IF6P[19]+IF6P[27]+IF6P[35])+v10\_b*I3PG[3]+v4\_f*(IFBP[1$

$$\begin{aligned}
&7]+IFBP[18]+IFBP[19]+IFBP[20]+IFBP[21]+IFBP[22]+IFBP[23]+IFBP[24]+v4\_f*(IFBP[27]+IFBP[35]+IFBP[11]+IFBP[19]+IFBP[3]+IFBP[51]+IFBP[59]+IFBP[43]) = \\
&(v7\_b+v8\_b+v9\_f+v10\_f+2*v4\_b+.876494312136489e-3)*IT3P[3] \\
&v7\_f*(IP5P[28]+IP5P[4]+IP5P[20]+IP5P[12])+v8\_f*(IP5P[28]+IP5P[4]+IP5P[20]+IP5P[12])+v9\_b*(IF6P[44]+IF6P[52]+IF6P[60]+IF6P[4]+IF6P[12]+IF6P[20]+IF6P[28]+IF6P[36])+v10\_b*I3PG[4]+v4\_f*(IFBP[51]+IFBP[52]+IFBP[53]+IFBP[54]+IFBP[55]+IFBP[56]+IFBP[49]+IFBP[50])+v4\_f*(IFBP[28]+IFBP[36]+IFBP[12]+IFBP[20]+IFBP[4]+IFBP[52]+IFBP[60]+IFBP[44]) = \\
&(v7\_b+v8\_b+v9\_f+v10\_f+2*v4\_b+.876494312136489e-3)*IT3P[4] \\
&v7\_f*(IP5P[5]+IP5P[29]+IP5P[21]+IP5P[13])+v8\_f*(IP5P[5]+IP5P[29]+IP5P[21]+IP5P[13])+v9\_b*(IF6P[45]+IF6P[53]+IF6P[61]+IF6P[5]+IF6P[13]+IF6P[21]+IF6P[29]+IF6P[37])+v10\_b*I3PG[5]+v4\_f*(IFBP[11]+IFBP[12]+IFBP[13]+IFBP[14]+IFBP[15]+IFBP[16]+IFBP[9]+IFBP[10])+v4\_f*(IFBP[29]+IFBP[37]+IFBP[13]+IFBP[21]+IFBP[5]+IFBP[53]+IFBP[61]+IFBP[45]) = \\
&(v7\_b+v8\_b+v9\_f+v10\_f+2*v4\_b+.876494312136489e-3)*IT3P[5] \\
&v7\_f*(IP5P[14]+IP5P[30]+IP5P[6]+IP5P[22])+v8\_f*(IP5P[14]+IP5P[30]+IP5P[6]+IP5P[22])+v9\_b*(IF6P[46]+IF6P[54]+IF6P[62]+IF6P[6]+IF6P[14]+IF6P[22]+IF6P[30]+IF6P[38])+v10\_b*I3PG[6]+v4\_f*(IFBP[41]+IFBP[42]+IFBP[43]+IFBP[44]+IFBP[45]+IFBP[46]+IFBP[47]+IFBP[48])+v4\_f*(IFBP[30]+IFBP[38]+IFBP[14]+IFBP[22]+IFBP[6]+IFBP[54]+IFBP[62]+IFBP[46]) = \\
&(v7\_b+v8\_b+v9\_f+v10\_f+2*v4\_b+.876494312136489e-3)*IT3P[6] \\
&v7\_f*(IP5P[15]+IP5P[23]+IP5P[31]+IP5P[7])+v8\_f*(IP5P[15]+IP5P[23]+IP5P[31]+IP5P[7])+v9\_b*(IF6P[23]+IF6P[47]+IF6P[55]+IF6P[63]+IF6P[7]+IF6P[15]+IF6P[31]+IF6P[39])+v10\_b*I3PG[7]+v4\_f*(IFBP[27]+IFBP[28]+IFBP[29]+IFBP[30]+IFBP[31]+IFBP[32]+IFBP[25]+IFBP[26])+v4\_f*(IFBP[31]+IFBP[39]+IFBP[15]+IFBP[23]+IFBP[7]+IFBP[55]+IFBP[63]+IFBP[47]) = \\
&(v7\_b+v8\_b+v9\_f+v10\_f+2*v4\_b+.876494312136489e-3)*IT3P[7] \\
&v7\_f*(IP5P[16]+IP5P[32]+IP5P[24]+IP5P[8])+v8\_f*(IP5P[16]+IP5P[32]+IP5P[24]+IP5P[8])+v9\_b*(IF6P[48]+IF6P[56]+IF6P[64]+IF6P[8]+IF6P[16]+IF6P[24]+IF6P[32]+IF6P[40])+v10\_b*I3PG[8]+v4\_f*(IFBP[64]+IFBP[57]+IFBP[58]+IFBP[59]+IFBP[60]+IFBP[61]+IFBP[62]+IFBP[63])+v4\_f*(IFBP[32]+IFBP[16]+IFBP[24]+IFBP[8]+IFBP[64]+IFBP[56]+IFBP[40]+IFBP[48]) = \\
&(v7\_b+v8\_b+v9\_f+v10\_f+2*v4\_b+.876494312136489e-3)*IT3P[8]
\end{aligned}$$

### 3PG

$$\begin{aligned}
v10\_f*IT3P[1]+v11\_b*IPEP[1] &= (v10\_b+v11\_f+.16964700644637e-1)*I3PG[1] \\
v10\_f*IT3P[2]+v11\_b*IPEP[2] &= (v10\_b+v11\_f+.16964700644637e-1)*I3PG[2] \\
v10\_f*IT3P[3]+v11\_b*IPEP[3] &= (v10\_b+v11\_f+.16964700644637e-1)*I3PG[3] \\
v10\_f*IT3P[4]+v11\_b*IPEP[4] &= (v10\_b+v11\_f+.16964700644637e-1)*I3PG[4] \\
v10\_f*IT3P[5]+v11\_b*IPEP[5] &= (v10\_b+v11\_f+.16964700644637e-1)*I3PG[5] \\
v10\_f*IT3P[6]+v11\_b*IPEP[6] &= (v10\_b+v11\_f+.16964700644637e-1)*I3PG[6] \\
v10\_f*IT3P[7]+v11\_b*IPEP[7] &= (v10\_b+v11\_f+.16964700644637e-1)*I3PG[7] \\
v10\_f*IT3P[8]+v11\_b*IPEP[8] &= (v10\_b+v11\_f+.16964700644637e-1)*I3PG[8]
\end{aligned}$$

### PEP

$$\begin{aligned}
v11\_f*I3PG[1]+v13\_b*(IOAA[1]+IOAA[2]) &= (v11\_b+v13\_f+v12+v1+.142098388914668e-1)*IPEP[1] \\
v11\_f*I3PG[2]+v13\_b*(IOAA[3]+IOAA[4]) &= (v11\_b+v13\_f+v12+v1+.142098388914668e-1)*IPEP[2] \\
v11\_f*I3PG[3]+v13\_b*(IOAA[5]+IOAA[6]) &= (v11\_b+v13\_f+v12+v1+.142098388914668e-1)*IPEP[3] \\
v11\_f*I3PG[4]+v13\_b*(IOAA[7]+IOAA[8]) &= (v11\_b+v13\_f+v12+v1+.142098388914668e-1)*IPEP[4] \\
v11\_f*I3PG[5]+v13\_b*(IOAA[9]+IOAA[10]) &= (v11\_b+v13\_f+v12+v1+.142098388914668e-1)*IPEP[5] \\
v11\_f*I3PG[6]+v13\_b*(IOAA[11]+IOAA[12]) &= (v11\_b+v13\_f+v12+v1+.142098388914668e-1)*IPEP[6] \\
v11\_f*I3PG[7]+v13\_b*(IOAA[13]+IOAA[14]) &= (v11\_b+v13\_f+v12+v1+.142098388914668e-1)*IPEP[7] \\
v11\_f*I3PG[8]+v13\_b*(IOAA[15]+IOAA[16]) &= (v11\_b+v13\_f+v12+v1+.142098388914668e-1)*IPEP[8]
\end{aligned}$$

### PYR

$$\begin{aligned}
(v12+v1)*IPEP[1]+v18*(IMal[1]+IMal[2]) &= (v19+.502850468884723e-1)*IPyr[1] \\
(v12+v1)*IPEP[2]+v18*(IMal[3]+IMal[4]) &= (v19+.502850468884723e-1)*IPyr[2] \\
(v12+v1)*IPEP[3]+v18*(IMal[5]+IMal[6]) &= (v19+.502850468884723e-1)*IPyr[3] \\
(v12+v1)*IPEP[4]+v18*(IMal[7]+IMal[8]) &= (v19+.502850468884723e-1)*IPyr[4] \\
(v12+v1)*IPEP[5]+v18*(IMal[9]+IMal[10]) &= (v19+.502850468884723e-1)*IPyr[5] \\
(v12+v1)*IPEP[6]+v18*(IMal[11]+IMal[12]) &= (v19+.502850468884723e-1)*IPyr[6] \\
(v12+v1)*IPEP[7]+v18*(IMal[13]+IMal[14]) &= (v19+.502850468884723e-1)*IPyr[7]
\end{aligned}$$

$$(v12+v1)*IPEP[8]+v18*(IMal[15]+IMal[16]) = (v19+.502850468884723e-1)*IPyr[8]$$

## ACA

$$v19*(IPyr[1]+IPyr[5])+v20\_b*IAcet[1] = (v20\_f+v14+.380033146007629e-1)*IACA[1]$$

$$v19*(IPyr[2]+IPyr[6])+v20\_b*IAcet[2] = (v20\_f+v14+.380033146007629e-1)*IACA[2]$$

$$v19*(IPyr[3]+IPyr[7])+v20\_b*IAcet[3] = (v20\_f+v14+.380033146007629e-1)*IACA[3]$$

$$v19*(IPyr[4]+IPyr[8])+v20\_b*IAcet[4] = (v20\_f+v14+.380033146007629e-1)*IACA[4]$$

## Pentosephosphat-Weg

### 6PG

$$v5*IG6P[1] = v6*I6PG[1]$$

$$v5*IG6P[2] = v6*I6PG[2]$$

$$v5*IG6P[3] = v6*I6PG[3]$$

$$v5*IG6P[4] = v6*I6PG[4]$$

$$v5*IG6P[5] = v6*I6PG[5]$$

$$v5*IG6P[6] = v6*I6PG[6]$$

$$v5*IG6P[7] = v6*I6PG[7]$$

$$v5*IG6P[8] = v6*I6PG[8]$$

$$v5*IG6P[9] = v6*I6PG[9]$$

$$v5*IG6P[10] = v6*I6PG[10]$$

$$v5*IG6P[11] = v6*I6PG[11]$$

$$v5*IG6P[12] = v6*I6PG[12]$$

$$v5*IG6P[13] = v6*I6PG[13]$$

$$v5*IG6P[14] = v6*I6PG[14]$$

$$v5*IG6P[15] = v6*I6PG[15]$$

$$v5*IG6P[16] = v6*I6PG[16]$$

$$v5*IG6P[17] = v6*I6PG[17]$$

$$v5*IG6P[18] = v6*I6PG[18]$$

$$v5*IG6P[19] = v6*I6PG[19]$$

$$v5*IG6P[20] = v6*I6PG[20]$$

$$v5*IG6P[21] = v6*I6PG[21]$$

$$v5*IG6P[22] = v6*I6PG[22]$$

$$v5*IG6P[23] = v6*I6PG[23]$$

$$v5*IG6P[24] = v6*I6PG[24]$$

$$v5*IG6P[25] = v6*I6PG[25]$$

$$v5*IG6P[26] = v6*I6PG[26]$$

$$v5*IG6P[27] = v6*I6PG[27]$$

$$v5*IG6P[28] = v6*I6PG[28]$$

$$v5*IG6P[29] = v6*I6PG[29]$$

$$v5*IG6P[30] = v6*I6PG[30]$$

$$v5*IG6P[31] = v6*I6PG[31]$$

$$v5*IG6P[32] = v6*I6PG[32]$$

$$v5*IG6P[33] = v6*I6PG[33]$$

$$v5*IG6P[34] = v6*I6PG[34]$$

$$v5*IG6P[35] = v6*I6PG[35]$$

$$v5*IG6P[36] = v6*I6PG[36]$$

$$v5*IG6P[37] = v6*I6PG[37]$$

$$v5*IG6P[38] = v6*I6PG[38]$$

$$v5*IG6P[39] = v6*I6PG[39]$$

$$v5*IG6P[40] = v6*I6PG[40]$$

$$v5*IG6P[41] = v6*I6PG[41]$$

$$v5*IG6P[42] = v6*I6PG[42]$$

$$v5*IG6P[43] = v6*I6PG[43]$$

$$v5*IG6P[44] = v6*I6PG[44]$$

$$v5*IG6P[45] = v6*I6PG[45]$$

$$v5*IG6P[46] = v6*I6PG[46]$$

$$v5*IG6P[47] = v6*I6PG[47]$$

$$v5*IG6P[48] = v6*I6PG[48]$$



















$$\begin{aligned}
&v7\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*IP5P[18]+v9\_b* \\
&IE4P[2]*(IF6P[57]+IF6P[58]+IF6P[59]+IF6P[60]+IF6P[61]+IF6P[62]+IF6P[63]+IF6P[64]) = \\
&(v7\_b+v9\_f)*IS7P[114] \\
&v7\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*IP5P[19]+v9\_b* \\
&IE4P[3]*(IF6P[57]+IF6P[58]+IF6P[59]+IF6P[60]+IF6P[61]+IF6P[62]+IF6P[63]+IF6P[64]) = \\
&(v7\_b+v9\_f)*IS7P[115] \\
&v7\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*IP5P[20]+v9\_b* \\
&IE4P[4]*(IF6P[57]+IF6P[58]+IF6P[59]+IF6P[60]+IF6P[61]+IF6P[62]+IF6P[63]+IF6P[64]) = \\
&(v7\_b+v9\_f)*IS7P[116] \\
&v7\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*IP5P[21]+v9\_b* \\
&IE4P[5]*(IF6P[57]+IF6P[58]+IF6P[59]+IF6P[60]+IF6P[61]+IF6P[62]+IF6P[63]+IF6P[64]) = \\
&(v7\_b+v9\_f)*IS7P[117] \\
&v7\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*IP5P[22]+v9\_b* \\
&IE4P[6]*(IF6P[57]+IF6P[58]+IF6P[59]+IF6P[60]+IF6P[61]+IF6P[62]+IF6P[63]+IF6P[64]) = \\
&(v7\_b+v9\_f)*IS7P[118] \\
&v7\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*IP5P[23]+v9\_b* \\
&IE4P[7]*(IF6P[57]+IF6P[58]+IF6P[59]+IF6P[60]+IF6P[61]+IF6P[62]+IF6P[63]+IF6P[64]) = \\
&(v7\_b+v9\_f)*IS7P[119] \\
&v7\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*IP5P[24]+v9\_b* \\
&IE4P[8]*(IF6P[57]+IF6P[58]+IF6P[59]+IF6P[60]+IF6P[61]+IF6P[62]+IF6P[63]+IF6P[64]) = \\
&(v7\_b+v9\_f)*IS7P[120] \\
&v7\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*IP5P[25]+v9\_b* \\
&IE4P[9]*(IF6P[57]+IF6P[58]+IF6P[59]+IF6P[60]+IF6P[61]+IF6P[62]+IF6P[63]+IF6P[64]) = \\
&(v7\_b+v9\_f)*IS7P[121] \\
&v7\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*IP5P[26]+v9\_b* \\
&IE4P[10]*(IF6P[57]+IF6P[58]+IF6P[59]+IF6P[60]+IF6P[61]+IF6P[62]+IF6P[63]+IF6P[64]) = \\
&(v7\_b+v9\_f)*IS7P[122] \\
&v7\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*IP5P[27]+v9\_b* \\
&IE4P[11]*(IF6P[57]+IF6P[58]+IF6P[59]+IF6P[60]+IF6P[61]+IF6P[62]+IF6P[63]+IF6P[64]) = \\
&(v7\_b+v9\_f)*IS7P[123] \\
&v7\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*IP5P[28]+v9\_b* \\
&IE4P[12]*(IF6P[57]+IF6P[58]+IF6P[59]+IF6P[60]+IF6P[61]+IF6P[62]+IF6P[63]+IF6P[64]) = \\
&(v7\_b+v9\_f)*IS7P[124] \\
&v7\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*IP5P[29]+v9\_b* \\
&IE4P[13]*(IF6P[57]+IF6P[58]+IF6P[59]+IF6P[60]+IF6P[61]+IF6P[62]+IF6P[63]+IF6P[64]) = \\
&(v7\_b+v9\_f)*IS7P[125] \\
&v7\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*IP5P[30]+v9\_b* \\
&IE4P[14]*(IF6P[57]+IF6P[58]+IF6P[59]+IF6P[60]+IF6P[61]+IF6P[62]+IF6P[63]+IF6P[64]) = \\
&(v7\_b+v9\_f)*IS7P[126] \\
&v7\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*IP5P[31]+v9\_b* \\
&IE4P[15]*(IF6P[57]+IF6P[58]+IF6P[59]+IF6P[60]+IF6P[61]+IF6P[62]+IF6P[63]+IF6P[64]) = \\
&(v7\_b+v9\_f)*IS7P[127] \\
&v7\_f*(IP5P[28]+IP5P[29]+IP5P[30]+IP5P[27]+IP5P[32]+IP5P[26]+IP5P[25]+IP5P[31])*IP5P[32]+v9\_b* \\
&IE4P[16]*(IF6P[57]+IF6P[58]+IF6P[59]+IF6P[60]+IF6P[61]+IF6P[62]+IF6P[63]+IF6P[64]) = \\
&(v7\_b+v9\_f)*IS7P[128]
\end{aligned}$$

## E4P

$$\begin{aligned}
&v8\_b*(IF6P[49]+IF6P[1]+IF6P[17]+IF6P[33])+v9\_f*(IS7P[17]+IS7P[33]+IS7P[49]+IS7P[1]+IS7P[65]+IS \\
&7P[81]+IS7P[97]+IS7P[113]) = (v8\_f+v9\_b+.69072572696761e-2)*IE4P[1] \\
&v8\_b*(IF6P[50]+IF6P[2]+IF6P[18]+IF6P[34])+v9\_f*(IS7P[18]+IS7P[34]+IS7P[50]+IS7P[2]+IS7P[66]+IS \\
&7P[82]+IS7P[98]+IS7P[114]) = (v8\_f+v9\_b+.69072572696761e-2)*IE4P[2] \\
&v8\_b*(IF6P[51]+IF6P[3]+IF6P[19]+IF6P[35])+v9\_f*(IS7P[3]+IS7P[19]+IS7P[35]+IS7P[51]+IS7P[67]+IS \\
&7P[83]+IS7P[99]+IS7P[115]) = (v8\_f+v9\_b+.69072572696761e-2)*IE4P[3] \\
&v8\_b*(IF6P[52]+IF6P[4]+IF6P[20]+IF6P[36])+v9\_f*(IS7P[84]+IS7P[4]+IS7P[20]+IS7P[36]+IS7P[52]+IS \\
&7P[68]+IS7P[100]+IS7P[116]) = (v8\_f+v9\_b+.69072572696761e-2)*IE4P[4] \\
&v8\_b*(IF6P[53]+IF6P[5]+IF6P[21]+IF6P[37])+v9\_f*(IS7P[85]+IS7P[5]+IS7P[21]+IS7P[37]+IS7P[53]+IS \\
&7P[69]+IS7P[101]+IS7P[117]) = (v8\_f+v9\_b+.69072572696761e-2)*IE4P[5] \\
&v8\_b*(IF6P[54]+IF6P[6]+IF6P[22]+IF6P[38])+v9\_f*(IS7P[6]+IS7P[22]+IS7P[38]+IS7P[54]+IS7P[70]+IS \\
&7P[86]+IS7P[102]+IS7P[118]) = (v8\_f+v9\_b+.69072572696761e-2)*IE4P[6]
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
&v8\_b*(IF6P[23]+IF6P[55]+IF6P[7]+IF6P[39])+v9\_f*(IS7P[119]+IS7P[7]+IS7P[23]+IS7P[39]+IS7P[55]+IS7P[71]+IS7P[87]+IS7P[103]) = (v8\_f+v9\_b+.69072572696761e-2)*IE4P[7] \\
&v8\_b*(IF6P[56]+IF6P[8]+IF6P[24]+IF6P[40])+v9\_f*(IS7P[8]+IS7P[24]+IS7P[40]+IS7P[56]+IS7P[72]+IS7P[88]+IS7P[104]+IS7P[120]) = (v8\_f+v9\_b+.69072572696761e-2)*IE4P[8] \\
&v8\_b*(IF6P[57]+IF6P[9]+IF6P[25]+IF6P[41])+v9\_f*(IS7P[9]+IS7P[25]+IS7P[41]+IS7P[57]+IS7P[73]+IS7P[89]+IS7P[105]+IS7P[121]) = (v8\_f+v9\_b+.69072572696761e-2)*IE4P[9] \\
&v8\_b*(IF6P[58]+IF6P[10]+IF6P[26]+IF6P[42])+v9\_f*(IS7P[10]+IS7P[26]+IS7P[42]+IS7P[58]+IS7P[74]+IS7P[90]+IS7P[106]+IS7P[122]) = (v8\_f+v9\_b+.69072572696761e-2)*IE4P[10] \\
&v8\_b*(IF6P[43]+IF6P[59]+IF6P[11]+IF6P[27])+v9\_f*(IS7P[11]+IS7P[27]+IS7P[43]+IS7P[59]+IS7P[75]+IS7P[91]+IS7P[107]+IS7P[123]) = (v8\_f+v9\_b+.69072572696761e-2)*IE4P[11] \\
&v8\_b*(IF6P[44]+IF6P[60]+IF6P[12]+IF6P[28])+v9\_f*(IS7P[12]+IS7P[28]+IS7P[44]+IS7P[60]+IS7P[76]+IS7P[92]+IS7P[108]+IS7P[124]) = (v8\_f+v9\_b+.69072572696761e-2)*IE4P[12] \\
&v8\_b*(IF6P[45]+IF6P[61]+IF6P[13]+IF6P[29])+v9\_f*(IS7P[13]+IS7P[29]+IS7P[45]+IS7P[61]+IS7P[77]+IS7P[93]+IS7P[109]+IS7P[125]) = (v8\_f+v9\_b+.69072572696761e-2)*IE4P[13] \\
&v8\_b*(IF6P[46]+IF6P[62]+IF6P[14]+IF6P[30])+v9\_f*(IS7P[14]+IS7P[30]+IS7P[46]+IS7P[62]+IS7P[78]+IS7P[94]+IS7P[110]+IS7P[126]) = (v8\_f+v9\_b+.69072572696761e-2)*IE4P[14] \\
&v8\_b*(IF6P[47]+IF6P[63]+IF6P[15]+IF6P[31])+v9\_f*(IS7P[15]+IS7P[31]+IS7P[47]+IS7P[63]+IS7P[79]+IS7P[95]+IS7P[111]+IS7P[127]) = (v8\_f+v9\_b+.69072572696761e-2)*IE4P[15] \\
&v8\_b*(IF6P[48]+IF6P[64]+IF6P[16]+IF6P[32])+v9\_f*(IS7P[16]+IS7P[32]+IS7P[48]+IS7P[64]+IS7P[80]+IS7P[96]+IS7P[112]+IS7P[128]) = (v8\_f+v9\_b+.69072572696761e-2)*IE4P[16]
\end{aligned}$$

## Tricarbonsäure-Zyklus

### AKG

$$\begin{aligned}
&v14*IACA[1]*(IOAA[1]+IOAA[9]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[1] \\
&v14*IACA[1]*(IOAA[2]+IOAA[10]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[2] \\
&v14*IACA[1]*(IOAA[3]+IOAA[11]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[3] \\
&v14*IACA[1]*(IOAA[4]+IOAA[12]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[4] \\
&v14*IACA[1]*(IOAA[5]+IOAA[13]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[5] \\
&v14*IACA[1]*(IOAA[6]+IOAA[14]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[6] \\
&v14*IACA[1]*(IOAA[7]+IOAA[15]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[7] \\
&v14*IACA[1]*(IOAA[8]+IOAA[16]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[8] \\
&v14*IACA[2]*(IOAA[1]+IOAA[9]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[9] \\
&v14*IACA[2]*(IOAA[2]+IOAA[10]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[10] \\
&v14*IACA[2]*(IOAA[3]+IOAA[11]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[11] \\
&v14*IACA[2]*(IOAA[4]+IOAA[12]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[12] \\
&v14*IACA[2]*(IOAA[5]+IOAA[13]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[13] \\
&v14*IACA[2]*(IOAA[6]+IOAA[14]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[14] \\
&v14*IACA[2]*(IOAA[7]+IOAA[15]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[15] \\
&v14*IACA[2]*(IOAA[8]+IOAA[16]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[16] \\
&v14*IACA[3]*(IOAA[1]+IOAA[9]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[17] \\
&v14*IACA[3]*(IOAA[2]+IOAA[10]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[18] \\
&v14*IACA[3]*(IOAA[3]+IOAA[11]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[19] \\
&v14*IACA[3]*(IOAA[4]+IOAA[12]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[20] \\
&v14*IACA[3]*(IOAA[5]+IOAA[13]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[21] \\
&v14*IACA[3]*(IOAA[6]+IOAA[14]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[22] \\
&v14*IACA[3]*(IOAA[7]+IOAA[15]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[23] \\
&v14*IACA[3]*(IOAA[8]+IOAA[16]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[24] \\
&v14*IACA[4]*(IOAA[1]+IOAA[9]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[25] \\
&v14*IACA[4]*(IOAA[2]+IOAA[10]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[26] \\
&v14*IACA[4]*(IOAA[3]+IOAA[11]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[27] \\
&v14*IACA[4]*(IOAA[4]+IOAA[12]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[28] \\
&v14*IACA[4]*(IOAA[5]+IOAA[13]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[29] \\
&v14*IACA[4]*(IOAA[6]+IOAA[14]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[30] \\
&v14*IACA[4]*(IOAA[7]+IOAA[15]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[31] \\
&v14*IACA[4]*(IOAA[8]+IOAA[16]) = (v15+.9231314783813e-2)*IAKG[32]
\end{aligned}$$

### FUM

$$v15*(IOGA[2]+IOGA[1])+1.0*v16\_b*IMal[1] = v16\_f*IFum[1]$$

$$\begin{aligned}
&v15*(IOGA[3]+IOGA[4]).5*v16\_b*IMal[2]+.5*v16\_b*IMal[9] = v16\_f*IFum[2] \\
&v15*(IOGA[5]+IOGA[6]).5*v16\_b*IMal[3]+.5*v16\_b*IMal[5] = v16\_f*IFum[3] \\
&v15*(IOGA[7]+IOGA[8]).5*v16\_b*IMal[4]+.5*v16\_b*IMal[13] = v16\_f*IFum[4] \\
&v15*(IOGA[10]+IOGA[9]).5*v16\_b*IMal[5]+.5*v16\_b*IMal[3] = v16\_f*IFum[5] \\
&v15*(IOGA[11]+IOGA[12]).5*v16\_b*IMal[6]+.5*v16\_b*IMal[11] = v16\_f*IFum[6] \\
&v15*(IOGA[14]+IOGA[13])+1.0*v16\_b*IMal[7] = v16\_f*IFum[7] \\
&v15*(IOGA[16]+IOGA[15]).5*v16\_b*IMal[8]+.5*v16\_b*IMal[15] = v16\_f*IFum[8] \\
&v15*(IOGA[18]+IOGA[17]).5*v16\_b*IMal[9]+.5*v16\_b*IMal[2] = v16\_f*IFum[9] \\
&v15*(IOGA[19]+IOGA[20])+1.0*v16\_b*IMal[10] = v16\_f*IFum[10] \\
&v15*(IOGA[22]+IOGA[21]).5*v16\_b*IMal[11]+.5*v16\_b*IMal[6] = v16\_f*IFum[11] \\
&v15*(IOGA[23]+IOGA[24]).5*v16\_b*IMal[12]+.5*v16\_b*IMal[14] = v16\_f*IFum[12] \\
&v15*(IOGA[26]+IOGA[25]).5*v16\_b*IMal[13]+.5*v16\_b*IMal[4] = v16\_f*IFum[13] \\
&v15*(IOGA[28]+IOGA[27]).5*v16\_b*IMal[14]+.5*v16\_b*IMal[12] = v16\_f*IFum[14] \\
&v15*(IOGA[29]+IOGA[30]).5*v16\_b*IMal[15]+.5*v16\_b*IMal[8] = v16\_f*IFum[15] \\
&v15*(IOGA[32]+IOGA[31])+1.0*v16\_b*IMal[16] = v16\_f*IFum[16]
\end{aligned}$$

## MAL

$$\begin{aligned}
&1.0*v16\_f*IFum[1]+v17\_b*IOAA[1] = (v16\_b+v17\_f+v18)*IMal[1] \\
&.5*v16\_f*IFum[2]+.5*v16\_f*IFum[9]+v17\_b*IOAA[2] = (v16\_b+v17\_f+v18)*IMal[2] \\
&.5*v16\_f*IFum[3]+.5*v16\_f*IFum[5]+v17\_b*IOAA[3] = (v16\_b+v17\_f+v18)*IMal[3] \\
&.5*v16\_f*IFum[4]+.5*v16\_f*IFum[13]+v17\_b*IOAA[4] = (v16\_b+v17\_f+v18)*IMal[4] \\
&.5*v16\_f*IFum[3]+.5*v16\_f*IFum[5]+v17\_b*IOAA[5] = (v16\_b+v17\_f+v18)*IMal[5] \\
&.5*v16\_f*IFum[6]+.5*v16\_f*IFum[11]+v17\_b*IOAA[6] = (v16\_b+v17\_f+v18)*IMal[6] \\
&1.0*v16\_f*IFum[7]+v17\_b*IOAA[7] = (v16\_b+v17\_f+v18)*IMal[7] \\
&.5*v16\_f*IFum[8]+.5*v16\_f*IFum[15]+v17\_b*IOAA[8] = (v16\_b+v17\_f+v18)*IMal[8] \\
&.5*v16\_f*IFum[2]+.5*v16\_f*IFum[9]+v17\_b*IOAA[9] = (v16\_b+v17\_f+v18)*IMal[9] \\
&1.0*v16\_f*IFum[10]+v17\_b*IOAA[10] = (v16\_b+v17\_f+v18)*IMal[10] \\
&.5*v16\_f*IFum[6]+.5*v16\_f*IFum[11]+v17\_b*IOAA[11] = (v16\_b+v17\_f+v18)*IMal[11] \\
&.5*v16\_f*IFum[12]+.5*v16\_f*IFum[14]+v17\_b*IOAA[12] = (v16\_b+v17\_f+v18)*IMal[12] \\
&.5*v16\_f*IFum[4]+.5*v16\_f*IFum[13]+v17\_b*IOAA[13] = (v16\_b+v17\_f+v18)*IMal[13] \\
&.5*v16\_f*IFum[12]+.5*v16\_f*IFum[14]+v17\_b*IOAA[14] = (v16\_b+v17\_f+v18)*IMal[14] \\
&.5*v16\_f*IFum[8]+.5*v16\_f*IFum[15]+v17\_b*IOAA[15] = (v16\_b+v17\_f+v18)*IMal[15] \\
&1.0*v16\_f*IFum[16]+v17\_b*IOAA[16] = (v16\_b+v17\_f+v18)*IMal[16]
\end{aligned}$$

## OAA

$$\begin{aligned}
&v17\_f*IMal[1]+v13\_f*IPEP[1]*ICO2[1] = (v13\_b+v17\_b+v14+.397106833608019e-1)*IOAA[1] \\
&v17\_f*IMal[2]+v13\_f*IPEP[1]*ICO2[2] = (v13\_b+v17\_b+v14+.397106833608019e-1)*IOAA[2] \\
&v17\_f*IMal[3]+v13\_f*IPEP[2]*ICO2[1] = (v13\_b+v17\_b+v14+.397106833608019e-1)*IOAA[3] \\
&v17\_f*IMal[4]+v13\_f*IPEP[2]*ICO2[2] = (v13\_b+v17\_b+v14+.397106833608019e-1)*IOAA[4] \\
&v17\_f*IMal[5]+v13\_f*IPEP[3]*ICO2[1] = (v13\_b+v17\_b+v14+.397106833608019e-1)*IOAA[5] \\
&v17\_f*IMal[6]+v13\_f*IPEP[3]*ICO2[2] = (v13\_b+v17\_b+v14+.397106833608019e-1)*IOAA[6] \\
&v17\_f*IMal[7]+v13\_f*IPEP[4]*ICO2[1] = (v13\_b+v17\_b+v14+.397106833608019e-1)*IOAA[7] \\
&v17\_f*IMal[8]+v13\_f*IPEP[4]*ICO2[2] = (v13\_b+v17\_b+v14+.397106833608019e-1)*IOAA[8] \\
&v17\_f*IMal[9]+v13\_f*IPEP[5]*ICO2[1] = (v13\_b+v17\_b+v14+.397106833608019e-1)*IOAA[9] \\
&v17\_f*IMal[10]+v13\_f*IPEP[5]*ICO2[2] = (v13\_b+v17\_b+v14+.397106833608019e-1)*IOAA[10] \\
&v17\_f*IMal[11]+v13\_f*IPEP[6]*ICO2[1] = (v13\_b+v17\_b+v14+.397106833608019e-1)*IOAA[11] \\
&v17\_f*IMal[12]+v13\_f*IPEP[6]*ICO2[2] = (v13\_b+v17\_b+v14+.397106833608019e-1)*IOAA[12] \\
&v17\_f*IMal[13]+v13\_f*IPEP[7]*ICO2[1] = (v13\_b+v17\_b+v14+.397106833608019e-1)*IOAA[13] \\
&v17\_f*IMal[14]+v13\_f*IPEP[7]*ICO2[2] = (v13\_b+v17\_b+v14+.397106833608019e-1)*IOAA[14] \\
&v17\_f*IMal[15]+v13\_f*IPEP[8]*ICO2[1] = (v13\_b+v17\_b+v14+.397106833608019e-1)*IOAA[15] \\
&v17\_f*IMal[16]+v13\_f*IPEP[8]*ICO2[2] = (v13\_b+v17\_b+v14+.397106833608019e-1)*IOAA[16]
\end{aligned}$$

## CO<sub>2</sub>

$$\begin{aligned}
&v6*(I6PG[1]+I6PG[2]+I6PG[3]+I6PG[4]+I6PG[5]+I6PG[6]+I6PG[7]+I6PG[8]+I6PG[9]+I6PG[10]+I6PG[11]+I6PG[12]+I6PG[13]+I6PG[14]+I6PG[15]+I6PG[16]+I6PG[17]+I6PG[18]+I6PG[19]+I6PG[20]+I6PG[21]+I6PG[22]+I6PG[23]+I6PG[24]+I6PG[25]+I6PG[26]+I6PG[27]+I6PG[28]+I6PG[29]+I6PG[30]+I6PG[31]+I6PG[32])+v19*(IPyr[1]+IPyr[2]+IPyr[3]+IPyr[4])+v14*(IOAA[1]+IOAA[2]+IOAA[3]+IOAA[4]+IOAA[5]
\end{aligned}$$

---

$$\begin{aligned} &+IOAA[6]+IOAA[7]+IOAA[8]+v15*(IAKG[1]+IAKG[3]+IAKG[5]+IAKG[7]+IAKG[9]+IAKG[11]+IAKG[13]+ \\ &IAKG[15]+IAKG[17]+IAKG[19]+IAKG[21]+IAKG[23]+IAKG[25]+IAKG[27]+IAKG[29]+IAKG[31])+v18*(I \\ &Mal[1]+IMal[3]+IMal[5]+IMal[7]+IMal[9]+IMal[11]+IMal[13]+IMal[15])+v13\_b*(IOAA[1]+IOAA[3]+IOAA[5] \\ &]+IOAA[7]+IOAA[9]+IOAA[11]+IOAA[13]+IOAA[15]) = (v6+v19+v14+v15+v18+v13\_b)*ICO2[1] \\ &v6*(I6PG[33]+I6PG[34]+I6PG[35]+I6PG[36]+I6PG[37]+I6PG[38]+I6PG[39]+I6PG[40]+I6PG[41]+I6PG[ \\ &42]+I6PG[43]+I6PG[44]+I6PG[45]+I6PG[46]+I6PG[47]+I6PG[48]+I6PG[49]+I6PG[50]+I6PG[51]+I6PG[ \\ &52]+I6PG[53]+I6PG[54]+I6PG[55]+I6PG[56]+I6PG[57]+I6PG[58]+I6PG[59]+I6PG[60]+I6PG[61]+I6PG[ \\ &62]+I6PG[63]+I6PG[64])+v19*(IPyr[5]+IPyr[6]+IPyr[7]+IPyr[8])+v14*(IOAA[9]+IOAA[10]+IOAA[11]+IOA \\ &A[12]+IOAA[13]+IOAA[14]+IOAA[15]+IOAA[16])+v15*(IAKG[2]+IAKG[4]+IAKG[6]+IAKG[8]+IAKG[10]+ \\ &IAKG[12]+IAKG[14]+IAKG[16]+IAKG[18]+IAKG[20]+IAKG[22]+IAKG[24]+IAKG[26]+IAKG[28]+IAKG[3 \\ &0]+IAKG[32])+v18*(IMal[2]+IMal[4]+IMal[6]+IMal[8]+IMal[10]+IMal[12]+IMal[14]+IMal[16])+v13\_b*(IOA \\ &A[2]+IOAA[4]+IOAA[6]+IOAA[8]+IOAA[10]+IOAA[12]+IOAA[14]+IOAA[16]) = \\ &(v6+v19+v14+v15+v18+v13\_b)*ICO2[2] \end{aligned}$$

## Literatur

Ahern, T. J. and Klibanov, A. M. (1985). The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100°C. *Science* 228: 1280-1284.

Altaras, N. E. and Cameron, D. C. (1999). Metabolic engineering of a 1,2-propanediol pathway in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 65(3): 1180-5.

Aguilera-Vazquez, L. (2005). Modellgestützte Analyse der Dynamik des Speicherstoffwechsels in *S. cerevisiae*. Dissertation am Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart.

Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 10(5): 411-21.

Bergmeyer, H. U. and Bergmeyer, J. (1998a). *Metabolites 1: Carbohydrates*. Weinheim, Wiley-VCH.

Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J. and Bral, M. (1998b). *Metabolites 2: Tri- und Dicarboxylic Acids, Purines, Pyrimidines and Derivatives, Coenzymes, Inorganic Compounds*. Weinheim, Wiley-VCH.

Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J. and Bral, M. (1998c). *Metabolites 3: Lipids, Amino Acids and Related Compounds*. Weinheim, Wiley-VCH.

Bhattacharya, M., Fuhrman, L., Ingram, A., Nickerson, K. W. 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(1): 98-106.

Bonarius, H. P. J., Schmid, G. and Tramper, J. (1997). Flux analysis of underdetermined metabolic networks: The quest for the missing constraints. *Trends in Biotechnology* 15: 308-314.

Borodina, I. and Nielsen, J. (2005). From genomes to in silico cells via metabolic networks. *Curr Opin Biotechnol* 16(3): 350-5.

Bremer, H. and Dennis, P. P. (1996). Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. In: Neidhardt, F. C., Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., Umberger, H. E. (Ed.): *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, American Society for Microbiology, Washington D. C.: 1553-69.

Bro, C. and Nielsen, J. (2004). Impact of 'ome' analyses on inverse metabolic engineering. *Metab Eng* 6(3): 204-11.

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

- Buchholz, A., Takors, R. and Wandrey, C. (2001). Quantification of intracellular metabolites in *Escherichia coli* K12 using liquid chromatographic-electrospray ionization tandem mass spectrometric techniques. *Anal Biochem* 295(2): 129-37.
- Buziol, S., Bashir, I., Baumeister, A., Claassen, W., Noisommit-Rizzi, N., Mailinger, W. and Reuss, M. (2002). New bioreactor-coupled rapid stopped-flow sampling technique for measurements of metabolite dynamics on a subsecond time scale. *Biotechnol Bioeng* 80(6): 632-6.
- Cameron, D. C., Altaras, N. E., Hoffman, M. L. and Shaw, A. J. (1998). Metabolic engineering of propanediol pathways. *Biotechnol Prog* 14(1): 116-25.
- Castrillo, J. I., Hayes, A., Mohammed, S., Gaskell, S. J. and Oliver, S. G. (2003). An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry. *Phytochemistry* 62(6): 929-937.
- Chance, D. L., Gerhardt, K. O. and Mawhinney, T. P. (1998). Gas-liquid chromatography-mass spectrometry of hydroxy fatty acids as their methyl esters tert.-butyldimethylsilyl ethers. *J Chromatogr A* 793(1): 91-8.
- Chassagnole, C., Noisommit-Rizzi, N., Schmid, J. W., Mauch, K. and Reuss, M. (2002). Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 79(1): 53-73.
- Chaves Das Neves, H. J. and Vasconcelos, A. M. P. (1987). Capillary gas chromatography of amino acids, including asparagine and glutamine: Sensitive gas chromatographic-mass spectrometric and selected ion monitoring gas chromatographic-mass spectrometric detection of the N,O(S)-tert.-butyldimethylsilyl derivatives. *Journal of Chromatography* 392: 249-258.
- Chen, S. C., Brown, P. R. and Rosie, D. M. (1977). Extraction procedures for use prior to HPLC nucleotide analysis using microparticle chemically bonded packings. *J. Chromatogr. Sci.* 15: 218-221.
- Chen, Z., Landman, P., Colmer, T. D. and Adams, M. A. (1998). Simultaneous analysis of amino and organic acids in extracts of plant leaves as tert-butyldimethylsilyl derivatives by capillary gas chromatography. *Anal Biochem* 259(2): 203-11.
- Chisti, Y. (2001). Hydrodynamic damage to animal cells. *Crit. Rev. Biotechnol.* 21(2): 67-110.
- Chotani, G., Dodge, T., Hsu, A., Kumar, M., LaDuca, R., Trimbur, D., Weyler, W. and Sanford, K. (2000). The commercial production of chemicals using pathway engineering. *Biochim Biophys Acta* 1543(2): 434-455.
- Christensen, B., Gombert, A. K. and Nielsen, J. (2002). Analysis of flux estimates based on (13)C-labelling experiments. *Eur J Biochem* 269(11): 2795-800.
- Christensen, B. and Nielsen, J. (1999). Isotopomer analysis using GC-MS. *Metab Eng* 1(4): 282-90.
- Christensen, B. and Nielsen, J. (2000). Metabolic network analysis. A powerful tool in metabolic engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 66: 209-31.

- Cronan, J. E. and Laporte, D. (1996). Tricarboxylic acid cycle and Glyoxylate bypass. In: Neidhardt, F. C., Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., Umberger, H. E. (Ed.): *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, American Society for Microbiology, Washington D. C.: 206-11.
- Dauner, M. (2000). Intracellular carbon flux analysis by <sup>13</sup>C-tracer experiments. Dissertation Eth Zürich.
- Dauner, M., Bailey, J. E. and Sauer, U. (2001a). Metabolic flux analysis with a comprehensive isotopomer model in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng* 76(2): 144-56.
- Dauner, M. and Sauer, U. (2000). GC-MS analysis of amino acids rapidly provides rich information for isotopomer balancing. *Biotechnol Prog* 16(4): 642-9.
- Dauner, M. and Sauer, U. (2001b). Stoichiometric growth model for riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng* 76(2): 132-43.
- de Graaf, A. A., Wittig, R. M., Probst, U., Strophaecker, J., Schoberth, S. M. and Sahm, H. (1992). Continuous-flow NMR bioreactor for in vivo studies of microbial cell suspensions with low biomass concentrations. *J. Magn. Resonance*. 98(3): 654-59.
- 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(1): 118-23.
- Deuffhard, P., Hairer, E. and Zugck, J. (1987). One step and extrapolation methods for differential-algebraic systems. *Num. Math.* 51: 501-16.
- Drysch, A., El Massaoudi, M., Wiechert, W., de Graaf, A. A. and Takors, R. (2004). Serial flux mapping of *Corynebacterium glutamicum* during fed-batch L-lysine production using the sensor reactor approach. *Biotechnol Bioeng* 85(5): 497-505.
- Ederle, S. (2000). Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der intrazellulären phosphorylierten Metabolite mittels Ionenchromatographie. Diplomarbeit am Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart.
- Edwards, J. S., Ramakrishna, R., Schilling, C. H. and Palsson, B. O. (1999). Metabolic Flux Balance Analysis. In: *Metabolic Engineering* (Lee, S. Y., Papoutsakis, E. T., Eds.), Marcel Dekker: 13-57.
- Ehrig, R., Nowak, U., Oeverdieck, L. and Deuffhard, P. (1999). Advanced extrapolation methods for large scale differential algebraic problems. In: *High Performance Scientific and Engineering Computing* (Bungartz, H. J., Durst, F., Zenger, C., Eds.), *Lecture Notes in Computational Science and Engineering*, Springer 8: 233-44.
- Eijsink, V. G. H., Bjork, A., Gaseidnes, S., Sirevag, R., Synstad, B., van den Burg, B. and Vriend, G. (2004). Rational engineering of enzyme stability. *Journal of Biotechnology* 113: 105-120.
- Emmerling, M., Dauner, M., Ponti, A., Fiaux, J., Hochuli, M., Szyperski, T., Wuthrich, K., Bailey, J. E. and Sauer, U. (2002). Metabolic flux responses to pyruvate kinase knockout in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184(1): 152-64.
- Evershed, R. P. (1993). Advances in silylation. In: Blau, K. and Halket, J. McK. (Eds.): *Handbook of Derivatives for Chromatography*, Wiley and Sons Ltd.: 52-107.

- Fell, D. A. (1996). *Understanding the Control of Metabolism*. London, Portland Press.
- Fiehn, O., Kopka, J., Dormann, P., Altmann, T., Trethewey, R. N. and Willmitzer, L. (2000). Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol* 18(11): 1157-61.
- Fischer, E. and Sauer, U. (2003). Metabolic flux profiling of *Escherichia coli* mutants in central carbon metabolism using GC-MS. *Eur J Biochem* 270(5): 880-91.
- Fischer, E., Zamboni, N. and Sauer, U. (2004). High-throughput metabolic flux analysis based on gas chromatography-mass spectrometry derived <sup>13</sup>C constraints. *Anal Biochem* 325(2): 308-16.
- Fraenkel, D. G. (1996). Glycolysis. In: Neidhardt, F. C., Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., Umberger, H. E. (Ed.): *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, American Society for Microbiology, Washington D. C.: 189-94.
- Gaskell, S. J. (1997). Electrospray: principles and practice. *Journal of Mass Spectrometry* 32: 677-688.
- Georgi, T., Rittmann, D. and Wendisch, V. F. (2005). Lysine and glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* on glucose, fructose and sucrose: roles of malic enzyme and fructose-1,6-bisphosphatase. *Metab Eng* 7(4): 291-301.
- Gnielinski, V. (1975). *Heat. Forsch. im Ing.-Wes* 41(1): 8-16.
- Gnielinski, V. (1986). *Proc. 8 th Int. Heat Trans. Conf., San Francisco, Hemisphere, Washington.*
- Gonzalez, B., Francois, J. and Renaud, M. (1997). A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast* 13(14): 1347-55.
- Grivet, J.-P., Delort, A.-M. and Portais, J.-C. (2003). NMR and microbiology: from physiology to metabolomics. *Biochimie* 85: 823-840.
- Grotkjaer, T., Akesson, M., Christensen, B., Gombert, A. K. and Nielsen, J. (2004). Impact of transamination reactions and protein turnover on labeling dynamics in (<sup>13</sup>)C-labeling experiments. *Biotechnol Bioeng* 86(2): 209-16.
- Gullberg, J., Jonsson, P., Nordstrom, A., Sjostrom, M. and Moritz, T. (2004). Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 331(2): 283-295.
- Hans, M. A., Heinzle, E. and Wittmann, C. (2001). Quantification of intracellular amino acids in batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 56(5-6): 776-9.
- Hatzimanikatis, V., Emmerling, M., Sauer, U. and Bailey, J. E. (1998). Application of mathematical tools for metabolic design of microbial ethanol production. *Biotechnol Bioeng* 58(2-3): 154-61.
- Hellerstein, M. K. and Neese, R. A. (1999). Mass isotopomer distribution analysis at eight years: theoretical, analytic, and experimental considerations. *Am J Physiol* 276(6 Pt 1): E1146-70.

- Ingraham, J. L. (1983). Biosynthesis and Fueling. In: Growth of the Bacterial Cell, Sunderland, Massachusetts: 133-71.
- Isermann, N. and Wiechert, W. (2003). Metabolic isotopomer labeling systems. Part II: structural flux identifiability analysis. *Math Biosci* 183(2): 175-214.
- Kayser, A., Weber, J., Hecht, V. and Rinas, U. (2005). Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. I. Growth-rate-dependent metabolic efficiency at steady state. *Microbiology* 151(Pt 3): 693-706.
- Keseler, I. M., Collado-Vides, J., Gama-Castro, S., Ingraham, J., Paley, S., Paulsen, I. T., Peralta-Gil, M. and Karp, P. D. (2005). EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 33(Database issue): D334-7.
- Koffas, M. and Stephanopoulos, G. (2005). Strain improvement by metabolic engineering: lysine production as a case study for systems biology. *Curr Opin Biotechnol* 16(3): 361-6.
- Krishnan, P., Kruger, N. J. and Ratcliffe, R. G. (2005). Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *J Exp Bot* 56(410): 255-65.
- Kromer, J. O., Fritz, M., Heinzle, E. and Wittmann, C. (2005). In vivo quantification of intracellular amino acids and intermediates of the methionine pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Anal Biochem* 340(1): 171-3.
- Kromer, J. O., Sorgenfrei, O., Klopprogge, K., Heinzle, E. and Wittmann, C. (2004). In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome, and fluxome. *J Bacteriol* 186(6): 1769-84.
- Lange, H. C., Eman, M., van Zuijlen, G., Visser, D., van Dam, J. C., Frank, J., de Mattos, M. J. and Heijnen, J. J. (2001). Improved rapid sampling for in vivo kinetics of intracellular metabolites in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 75(4): 406-15.
- Lee, W. N., Bergner, E. A. and Guo, Z. K. (1992). Mass isotopomer pattern and precursor-product relationship. *Biol Mass Spectrom* 21(2): 114-22.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2000). Principles of Biochemistry. 3. Aufl., New York.
- Lengeler, J. W. (Hrsg.) (1999). Biology of the prokaryotes. Thieme, Stuttgart.
- Lottspeich, F. (Hrsg.) (1998). Bioanalytik. Spektrum Akad. Verlag, Berlin.
- Maier, K., Hofmann, U., Niebel, A., Reuss, M., Mauch, K. (2006). Metabolite and Flux Analysis in Human Hepatocytes, Posterbeitrag, Metabolic Engineering VI, Noordwijkerhout, NL
- Malloy, C. R., Sherry, A. D. and Jeffrey, F. M. (1988). Evaluation of carbon flux and substrate selection through alternate pathways involving the citric acid cycle of the heart by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *J Biol Chem* 263(15): 6964-71.
- Marx, A., de Graaf, A. A., 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(2): 111-129.

- Mashego, M. R., Jansen, M. L., Vinke, J. L., van Gulik, W. M. and Heijnen, J. J. (2005). Changes in the metabolome of *Saccharomyces cerevisiae* associated with evolution in aerobic glucose-limited chemostats. *FEMS Yeast Res* 5(4-5): 419-30.
- Mashego, M. R., Wu, L., Van Dam, J. C., Ras, C., Vinke, J. L., Van Winden, W. A., Van Gulik, W. M. and Heijnen, J. J. (2004). MIRACLE: mass isotopomer ratio analysis of U-13C-labeled extracts. A new method for accurate quantification of changes in concentrations of intracellular metabolites. *Biotechnol Bioeng* 85(6): 620-8.
- Mauch, K., Vaseghi, S., Reuss, M. (2000). Quantitative Analysis of Metabolic and Signaling Pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. Schügerl, K. and Bellgardt, K. H. (Hrsg.). *Bioreaction engineering: Modeling and control*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 435-477.
- Mendes, P. and Kell, D. (1998). Non-linear optimization of biochemical pathways: applications to metabolic engineering and parameter estimation. *Bioinformatics* 14(10): 869-83.
- Mollney, M., Wiechert, W., Kownatzki, D. and de Graaf, A. A. (1999). Bidirectional reaction steps in metabolic networks: IV. Optimal design of isotopomer labeling experiments. *Biotechnol Bioeng* 66(2): 86-103.
- Moran, L. A. and Scrimgeour, K. G. (Eds.) (1994). *Biochemistry*. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Neidhardt, F. C. and Umbarger, H. E. (1996). Chemical composition of *Escherichia coli*. In: Neidhardt, F. C., Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., Umbarger, H. E. (Ed.): *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, American Society for Microbiology, Washington D. C.: 13-16.
- Nielsen, J. (2001). Metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 55(3): 263-83.
- Nielsen, J. (2003). It is all about metabolic fluxes. *J Bacteriol* 185(24): 7031-5.
- Nielsen, J. and Villadsen, J. (1994). *Bioreaction engineering principles*. London, Plenum Press.
- Niessen, W. M. A., Ed. (1999). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. New York, Marcel Dekker, Inc.
- Park, S. J., Lee, S. Y., Cho, J., Kim, T. Y., Lee, J. W., Park, J. H. and Han, M. J. (2005). Global physiological understanding and metabolic engineering of microorganisms based on omics studies. *Appl Microbiol Biotechnol* 68(5): 567-79.
- Park, S. M., Shaw-Reid, C. and Sinskey, A. J. (1997). Elucidation of anaplerotic pathways in *Corynebacterium glutamicum* via <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy and GC-MS. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 47-52.
- Pazman, A. (1993). *Nonlinear statistical models*. Kluwer Academic Publishing, New York.
- Petersen, S., de Graaf, A. A., Eggeling, L., Mollney, M., Wiechert, W. and Sahm, H. (2000). In vivo quantification of parallel and bidirectional fluxes in the anaplerosis of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* 275(46): 35932-41.

- Poole, C. F., Sye, W. F. and Singhawangcha, S. (1980). New electron-capturing pentafluorophenyldialkylchlorosilanes as versatile derivatizing reagents for gas chromatography. *Journal of Chromatography* 199: 123-142.
- Pramanik, J. and Keasling, J. D. (1997). Stoichiometric Model of *Escherichia coli* Metabolism: Incorporation of Growth-Rate Dependent Biomass Composition and Mechanistic Energy Requirements. *Biotechnol. Bioeng.* 56(4): 398-421.
- Raab, R. M., Tyo, K. and Stephanopoulos, G. (2005). Metabolic engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 100: 1-17.
- Rajasethupathy, P., Vayttaden, S. J. and Bhalla, U. S. (2005). Systems modeling: a pathway to drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* 9(4): 400-6.
- Ratcliffe, R. G. and Shachar-Hill, Y. (2005). Revealing metabolic phenotypes in plants: inputs from NMR analysis. *Biol Rev Camb Philos Soc* 80(1): 27-43.
- Reed, J. L. and Palsson, B. O. (2003). Thirteen years of building constraint-based in silico models of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185(9): 2692-9.
- Roels, J. A. (1980). Application of macroscopic principles to microbial metabolism. *Biotechnol Bioeng* 22: 2457-2514.
- Roels, J. A. (1983). *Energetics and kinetics in biotechnology*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Rühl, M. (2004). GC-MS basierte Isotopomerenanalyse von Aminosäuren und Metaboliten. Studienarbeit am Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart.
- Sato, S., Soga, T., Nishioka, T. and Tomita, M. (2004). Simultaneous determination of the main metabolites in rice leaves using capillary electrophoresis mass spectrometry and capillary electrophoresis diode array detection. *Plant J* 40(1): 151-163.
- Sauer, U. and Bailey, J. E. (1999). Estimation of P-to-O ratio in *Bacillus subtilis* and its influence on maximum riboflavin yield. *Biotechnol Bioeng* 64(6): 750-4.
- Sauter, T. (1997). Reaktionskinetische Untersuchungen zum Glucosetransport in *E. coli*. Diplomarbeit am Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart.
- Schaefer, U., Boos, W., Takors, R. and Weuster-Botz, D. (1999). Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamics. *Anal Biochem* 270(1): 88-96.
- Schaub, J., Schiesling, C., Reuss, M. and Dauner, M. (2006). Integrated Sampling Procedure for Metabolome Analysis. *Biotechnol Prog* 22(5): 1434-42.
- Schiesling, C. (2002). Etablierung eines integrierten Probenahme- und Probeaufbereitungsverfahrens zur Analyse intrazellulärer Metabolitkonzentrationen in *Escherichia coli*. Studienarbeit am Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart.
- Schilling, C. H., Edwards, J. S., Letscher, D. and Palsson, B. O. (2000). Combining pathway analysis with flux balance analysis for the comprehensive study of metabolic systems. *Biotechnol Bioeng* 71(4): 286-306.
- Schmid, J. W., Mauch, K., Reuss, M., Gilles, E. D. and Kremling, A. (2004). Metabolic design based on a coupled gene expression-metabolic network model of tryptophan production in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 6(4): 364-77.

- Schmidt, K., Carlsen, M., Nielsen, J. and Villadsen, J. (1997). Modeling isotopomer distributions in biochemical networks using isotopomer mapping matrices. *Biotechnol Bioeng* 55:831–40.
- Schmidt, K., Marx, A., de Graaf, A. A., Wiechert, W., Sahm, H., Nielsen, J. and Villadsen, J. (1998).  $^{13}\text{C}$  tracer experiments and metabolite balancing for metabolic flux analysis: comparing two approaches. *Biotechnol Bioeng* 58(2-3): 254-7.
- Schmidt, K., Nielsen, J. and Villadsen, J. (1999a). Quantitative analysis of metabolic fluxes in *Escherichia coli*, using two-dimensional NMR spectroscopy and complete isotopomer models. *J Biotechnol* 71(1-3): 175-89.
- Schmidt, K., Norregaard, L. C., Pedersen, B., Meissner, A., Duus, J. O., Nielsen, J. O. and Villadsen, J. (1999b). Quantification of intracellular metabolic fluxes from fractional enrichment and  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  coupling constraints on the isotopomer distribution in labeled biomass components. *Metab Eng* 1(2): 166-79.
- Shampine, L. F. and Hosea, M. E. (1996). Analysis and Implementation of TR-BDF2. *Applied Numerical Mathematics* 20.
- Shampine, L. F. and Reichelt, M. W. (1997). The MATLAB ODE Suite. *SIAM Journal on Scientific Computing* 18: 1-22.
- Shampine, L. F., Reichelt, M. W. and Kierzenka, J. A. (1999). Solving Index-1 DAEs in MATLAB and Simulink. *SIAM Review*, 41: 538-52.
- Shimizu, K. (2004). Metabolic flux analysis based on  $^{13}\text{C}$ -labeling experiments and integration of the information with gene and protein expression patterns. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 91: 1-49.
- Shyrock, J. C., Rubio, R. and Berne, R. M. (1986). Extraction of adenine-nucleotides from cultured Endothelial-cells. *Anal. Biochem.* 159: 73-81.
- Siddiquee, K. A., Arauzo-Bravo, M. J. and Shimizu, K. (2004). Effect of a pyruvate kinase (pykF-gene) knockout mutation on the control of gene expression and metabolic fluxes in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 235(1): 25-33.
- Skoog, D. A. (1996). *Instrumentelle Analytik: Grundlagen, Geräte, Anwendungen*. Springer Verlag, Berlin.
- Smedsgaard, J. and Nielsen, J. (2005). Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. *J Exp Bot* 56(410): 273-86.
- Soo, E. C., Aubry, A. J., Logan, S. M., Guerry, P., Kelly, J. F., Young, N. M. and Thibault, P. (2004). Selective detection and identification of sugar nucleotides by CE-Electrospray-MS and its application to bacterial metabolomics. *Anal. Chem.* 76: 619-626.
- Spielmann, H., Jacob-Muller, U. and Schulz, P. (1981). Simple assay of 0.1-1.0 pmol of ATP, ADP, and AMP in single somatic cells using purified luciferin luciferase. *Anal Biochem* 113(1): 172-8.
- Stafford, D. E. and Stephanopoulos, G. (2001). Metabolic engineering as an integrating platform for strain development. *Curr Opin Microbiol* 4(3): 336-40.

- Stahmann, K. P., Revuelta, J. L. and Seulberger, H. (2000). Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Appl Microbiol Biotechnol* 53(5): 509-16.
- Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A. and Nielsen, J. (1998). *Metabolic Engineering*. San Diego, Academic Press.
- Sterner, J. L., Johnston, M. V., Nicol, R. and Ridge, D. P. (2000). Signal suppression in electrospray ionization Fourier transform mass spectrometry of multi-component samples.
- Streichert, F., Ulmer, H., Zell, A. (2005). JavaEvA: A Java based framework for Evolutionary Algorithms, [www-ra.informatik.uni-tuebingen.de/software/javaeva](http://www-ra.informatik.uni-tuebingen.de/software/javaeva).
- Stryer, L. (1996). *Biochemie*. Spektrum Akad. Verl., 4. Aufl., Heidelberg.
- Szyperski, T. (1995). Biosynthetically directed fractional <sup>13</sup>C-labeling of proteinogenic amino acids. An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. *Eur J Biochem* 232(2): 433-48.
- Taubert, K. and Wiedl, W. (2005). *Differentialgleichungen mit Matlab*, Fachbereich Mathematik, Schwerpunkt Differentialgleichungen und Dynamische Systeme, [www.rrz.uni-hamburg.de](http://www.rrz.uni-hamburg.de).
- Theobald, U., Mailinger, W., Baltus, M., Rizzi, M. and Reuss, M. (1997). In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: I. Experimental observations. *Biotechnology and Bioengineering* 55(2): 305-316.
- 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(1): 31-7.
- Vallino, J. J. and Stephanopoulos, G. (1993). Metabolic flux distribution in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnol Bioeng* 41: 633-46.
- van Heijden, R. T. J. M., Heijnen, J. J., Hellinga, C., Romein, B. and Luyben, K. C. A. M. (1994a). Linear constraint relations in biochemical reaction systems: I. Classification of the calculability and the balanceability of conversion rates. *Biotechnol Bioeng* 43: 3-10.
- van Heijden, R. T. J. M., Romein, B., Heijnen, J. J., Hellinga, C. and Luyben, K. C. A. M. (1994b). Linear constraint relations in biochemical reaction systems: II. Diagnosis and estimation of gross errors. *Biotechnol Bioeng* 43:11-20.
- van Winden, W., Verheijen, P. and Heijnen, S. (2001a). Possible pitfalls of flux calculations based on (<sup>13</sup>C)-labeling. *Metab Eng* 3(2): 151-62.
- van Winden, W. A., Heijnen, J. J., Verheijen, P. J. and Grievink, J. (2001b). A priori analysis of metabolic flux identifiability from (<sup>13</sup>C)-labeling data. *Biotechnol Bioeng* 74(6): 505-16.
- van Winden, W. (2002). <sup>13</sup>C-Labeling Technique for Metabolic Network and Flux Analysis. Dissertation, TU Delft.
- van Winden, W. A., van Dam, J. C., Ras, C., Kleijn, R. J., Vinke, J. L., van Gulik, W. M. and Heijnen, J. J. (2005). Metabolic-flux analysis of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D based on mass isotopomer measurements of (<sup>13</sup>C)-labeled primary metabolites. *FEMS Yeast Res* 5(6-7): 559-68.

Varma, A. and Palsson, B. O. (1994). Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. *Bio/Technol.* 12: 994–98.

Vaseghi, S., Baumeister, A., Rizzi, M. and Reuss, M. (1999). In vivo dynamics of the pentose phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng* 1(2): 128-40.

Visser, D. and Heijnen, J. J. (2003). Dynamic simulation and metabolic re-design of a branched pathway using linlog kinetics. *Metab Eng* 5(3): 164-76.

Visser, D., van Zuylen, G. A., van Dam, J. C., Oudshoorn, A., Eman, M. R., Ras, C., van Gulik, W. M., Frank, J., van Dedem, G. W. K. and Heijnen, J. J. (2002). Rapid sampling for analysis of in vivo kinetics using the BioScope: a system for continuous-pulse experiments. *Biotechnol. Bioeng.* 79(6): 674-681.

Wahl, S. A., Dauner, M. and Wiechert, W. (2004). New tools for mass isotopomer data evaluation in  $(^{13}\text{C})$  flux analysis: mass isotope correction, data consistency checking, and precursor relationships. *Biotechnol Bioeng* 85(3): 259-68.

Wang, N. S. and Stephanopoulos, G. (1983). Application of macroscopic balances to the identification of gross measurement errors. *Biotechnol Bioeng* 25: 2177-2208.

Wiechert, W. (1995). *Metabolische Kohlenstoff-Markierungssysteme - Modellierung, Simulation, Datenanalyse, Auswertung.* Habilitationsschrift, Fachbereich Theoretische Biologie, Universität Bonn.

Wiechert, W. (2001).  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis. *Metab Eng* 3(3): 195-206.

Wiechert, W. and de Graaf, A. A. (1996). In vivo stationary flux analysis by  $^{13}\text{C}$  labeling experiments. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 54: 109-54.

Wiechert, W. and de Graaf, A. A. (1997a). Bidirectional Reaction Steps in Metabolic Networks Part I: Modeling and Simulation of Carbon Isotope Labeling Experiments. *Biotechnol Bioeng* 55(1): 101-117.

Wiechert, W., Mollney, M., Isermann, N., Wurzel, M. and de Graaf, A. A. (1999). Bidirectional reaction steps in metabolic networks: III. Explicit solution and analysis of isotopomer labeling systems. *Biotechnol Bioeng* 66(2): 69-85.

Wiechert, W., Mollney, M., Petersen, S. and de Graaf, A. A. (2001). A universal framework for  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis. *Metab Eng* 3(3): 265-83.

Wiechert, W. and Noh, K. (2005). From stationary to instationary metabolic flux analysis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 92: 145-72.

Wiechert, W., Siefke, C., de Graaf, A. A. and Marx, A. (1997b). Bidirectional Reaction Steps in Metabolic Networks Part II: Flux Estimation and Statistical Analysis. *Biotech Bioeng* 55(1): 118-135.

Wittmann, C., Hans, M. and Heinzle, E. (2002a). In vivo analysis of intracellular amino acid labelings by GC/MS. *Anal Biochem* 307(2): 379-82.

Wittmann, C., Hans, M., van Winden, W. A., Ras, C. and Heijnen, J. J. (2005). Dynamics of intracellular metabolites of glycolysis and TCA cycle during cell-cycle-related oscillation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 89(7): 839-47.

- 
- Wittmann, C. and Heinzle, E. (1999). Mass spectrometry for metabolic flux analysis. *Biotechnol Bioeng* 62(6): 739-750.
- Wittmann, C. and Heinzle, E. (2001a). Application of MALDI-TOF MS to lysine-producing *Corynebacterium glutamicum*: a novel approach for metabolic flux analysis. *Eur J Biochem* 268(8): 2441-55.
- Wittmann, C. and Heinzle, E. (2001b). MALDI-TOF MS for quantification of substrates and products in cultivations of *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Bioeng* 72(6): 642-7.
- Wittmann, C. and Heinzle, E. (2002b). Genealogy profiling through strain improvement by using metabolic network analysis: metabolic flux genealogy of several generations of lysine-producing corynebacteria. *Appl Environ Microbiol* 68(12): 5843-59.
- Wittmann, C., Kim, H. M. and Heinzle, E. (2004a). Metabolic network analysis of lysine producing *Corynebacterium glutamicum* at a miniaturized scale. *Biotechnol Bioeng* 87(1): 1-6.
- Wittmann, C., Krömer, J. O., Kiefer, P., Binz, T. and Heinzle, E. (2004b). Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria. *Analytical Biochemistry* 327: 135-139.
- Wood, T. (1985). The pentose phosphate pathway. Academic Press, Orlando.
- Yang, T. H., Heinzle, E. and Wittmann, C. (2005). Theoretical aspects of <sup>13</sup>C metabolic flux analysis with sole quantification of carbon dioxide labeling. *Comput Biol Chem* 29(2): 121-33.
- Zupke, C. and Stephanopoulos, G. (1994). Modeling of isotope distributions and intracellular fluxes in metabolic networks using atom mapping matrices. *Biotechnol Prog* 10: 489-98.

---

## Danksagung

Bei Prof. Dr.-Ing. Dr. h.c. Matthias Reuss möchte ich mich für das interessante Thema, die wissenschaftliche Betreuung und die fortwährende Unterstützung während des gesamten Promotionsprojektes bedanken.

Bei Prof. Dipl. Ing. Dr. techn. Elmar Heinzle möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Kollegen, Mitarbeitern und Studenten des Instituts für Bioverfahrenstechnik für die gute Zusammenarbeit, Unterstützung und schöne Zeit am IBVT, namentlich bei Sabine Arnold, Knut Behrendt, Wouter Berendsen, Joachim Bucher, Stefan Buziol, Andreas Freund, Christina Fritz, Timo Hardimann, Achim Hauck, Alexej Lapin, Klaus Maier, Dirk Müller, Prem Kumar Murugan, Ulrich Peckmann, Martin Rühl, Markus Samorski, Carola Schiesling, Petra Schlack, Joachim Schmid, Andrea Seipel, Martin Siemann-Herzberg und Oliver Vielhauer. Ein besonderer Dank gilt weiterhin Frau Moser.

Besonders bedanken möchte ich mich bei den Kollegen der INSILICO biotechnology GmbH, allen voran bei Klaus Mauch für die äußerst wertvollen Beiträge bei Modellierung und Simulation, außerdem bei Michael Dauner für die Unterstützung bei experimentellen und analytischen Fragestellungen sowie bei Peter Steiner.

## **Erklärung**

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

Stuttgart, im Dezember 2005

Jochen Schaub