

# Subzelluläre Metabolit-Analyse in Säugerzellen

Methodenentwicklung und Anwendung zur Untersuchung des  
Stoffwechsels von CHO-Zellen

## Dissertation

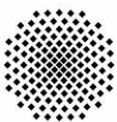
Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart zur Erlan-  
gung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhand-  
lung

vorgelegt von: Jens-Christoph Matuszczyk, geb. in Haltern am See.

Hauptberichter: Prof. Dr.-Ing. Ralf Takors

Mitberichter: Prof. Dr. Steffen Rupp

Tag der mündlichen Prüfung: 08.11.2017



**Universität Stuttgart**

(University of Stuttgart, Germany)

**Institut für Bioverfahrenstechnik**

(Institute of Biochemical Engineering)

**2017**

Versicherung der eigenständigen Anfertigung der Arbeit

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die genannten Referenzen und Literaturbezüge genutzt habe. Diese sind durch entsprechende Nennung der Quellen kenntlich gemacht und im Literaturverzeichnis hinterlegt.

---

Stadt, Datum

---

Jens-Christoph Matuszczyk

## Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr.-Ing. Takors dafür danken, dass ich diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen konnte. Ich danke ihm für die Vergabe des interessanten Themas und die fachliche Unterstützung sowie seine Geduld, die er bei meiner Anfertigung der Arbeit hatte.

Als nächstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rupp dafür bedanken, dass er sich bereit erklärte Zweitberichter für diese Arbeit zu sein, sowie Herrn Prof. Dr. Kontermann für seine Rolle als Vorsitzender der Prüfungskommission. Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Olayioye, Herrn Prof. Dr. Morrison und Herrn PD Dr. Siemann-Herzberg dafür bedanken sich für den Umlauf zur Verfügung zu stellen. Zusätzlich gebührt mein Dank Herrn PD Dr. Siemann-Herzberg für die vielen Gespräche während meiner Tätigkeit am Institut, in denen er mich fachlich unterstützte aber auch stets zu motivieren wusste.

Dr. Oliver Vielhauer danke ich dafür, mir die Möglichkeit gegeben zu haben eigenständig an der GC-MS zu arbeiten und dass er sich hierfür die Zeit für eine gründliche Einarbeitung nahm. Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Atila Teleki für das Vermessen der LC-MS Proben und seine Hilfe bei der Datenauswertung bedanken. Ohne diese Unterstützung wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

All meinen Arbeitskollegen, insbesondere Jeremy, Jenny, Max sowie Andreas und Alex, möchte ich für die schöne Arbeitsatmosphäre danken. Ihr wart jederzeit für fachliche Gespräche und kreativen Input zu haben, aber auch für ein wenig Zerstreuung wann immer es nötig war.

Ganz besonders freue ich mich darüber, dass meine Familie mich über den gesamten Zeitraum der Promotion begleitet und motiviert hat. Auch wenn der Weg lang war, Ihr habt nie aufgehört an mich zu glauben. Das vergess ich Euch nie und bin sehr, sehr dankbar für diese tolle Unterstützung.





## Inhaltsverzeichnis

i.	<u>Abkürzungsverzeichnis</u> .....	i
ii.	<u>Kurzzusammenfassung</u> .....	vi
iii.	<u>Abstract</u> .....	vii
1.	<u>Einleitung</u> .....	1
2.	<u>Zielsetzung</u> .....	3
3.	<u>Stand der Forschung</u> .....	6
3.1	Zellkulturtechnik .....	6
3.1.1	Kompartimentierung von Säugerzellen .....	7
3.1.2	Zentralstoffwechsel in Säugerzellen .....	9
3.2	Systembiologie .....	14
3.3	Metabolomforschung .....	15
3.3.1	Probenahme und Quenching .....	17
3.3.2	Aufarbeitung und Extraktion von Metabolomproben .....	21
3.3.3	Quantifizierung von Metabolomproben .....	23
3.3.4	Auswertung metabolischer Daten .....	27
4.	<u>Material und Methoden</u> .....	29
4.1	Generierung einer Arbeitszellbank und Adaption an ein CD-Medium .....	29
4.2	Erstellen und Auftauen von Kryokulturen .....	29
4.3	Kultivierung im unregelmäßigem System .....	30
4.4	Kultivierung im regulierten System .....	31
4.5	Bestimmung der Kultivierungsparameter .....	31
4.5.1	Lebendzellichte und Viabilität .....	32
4.5.2	Glukose- und Laktat-Bestimmung .....	32
4.5.3	Glutamin-Bestimmung zur Festlegung der Prozessphase .....	32
4.5.4	Bestimmung der Ammoniumkonzentration im Kulturüberstand .....	33
4.5.5	Bestimmung der Osmolalität im Waschpuffer .....	33
4.6	Filtration von Zellen zur Metabolomuntersuchung und Methodenentwicklung .....	33

4.7	Extraktion der zellulären Metabolite aus den eingefrorenen Filtern .....	35
4.8	Färbung der Mitochondrien mit Nonylacridine-Orange (NAO) .....	39
4.9	Quantifizierung der Metabolite in Zell-Extrakte und Übestandsproben .....	40
4.9.1	Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen mittels HPLC.....	40
4.9.2	Bestimmung der Nukleotidkonzentrationen mittels HPLC .....	41
4.9.3	Bestimmung von Stoffwechselintermediaten mittels GC-MS.....	42
4.9.4	Bestimmung von Stoffwechselintermediaten mittels LC-MS.....	44
4.10	Herstellung eines <sup>13</sup> C-Algenextraktes als interne Referenz .....	46
4.11	DoE-Analyse .....	46
<u>5.</u>	<u>Ergebnisse und Diskussion.....</u>	<u>48</u>
5.1	Verarbeitung und Auswertung der Daten aus der zellulären Metabolommessung.....	49
5.2	Überprüfung der Anwendbarkeit der fraktionellen Filtration bei der subzellulären Metabolomanalyse in Säugerzellen .....	57
5.2.1	Voruntersuchungen zur Eignung der Filtermembranen in Bezug auf ihre Stabilität und unspezifischer Metabolitwiederfindung .....	57
5.2.2	Charakterisierung der fraktionellen Filtration als Werkzeug der subzellulären Metabolomanalyse.....	61
5.2.3	Wiederfindung von intrazellulären Metaboliten auf den Filtern .....	64
5.2.4	Extraktstabilität in Abhängigkeit der Lagerdauer .....	69
5.2.5	Beurteilung der Quenching-Effizienz.....	73
5.2.6	Rückhalt intakter Mitochondrien bei der fraktionellen Filtration.....	79
5.2.7	Reduktion des Monocarboxylat-Leakage während der Probenahme.....	81
5.2.8	Abreicherung der zytosolischen Fraktion .....	84
5.3	Anwendung der fraktionellen Filtration bei der subzellulären Metabolomanalyse in Säugerzellen .....	93
5.3.1	Kulturverlauf und extrazelluläre Metabolitkonzentrationen .....	93
5.3.2	Einfluss der Substratverfügbarkeit auf intra- und subzelluläre Metabolitpools .....	101
5.4.	Betrachtung theoretischer Störquellen bei der fraktionellen Filtration.....	115
<u>6.</u>	<u>Zusammenfassung.....</u>	<u>118</u>
<u>7.</u>	<u>Ausblick.....</u>	<u>120</u>

<u>8.</u>	<u>Literatur .....</u>	<u>122</u>
<u>9.</u>	<u>Abbildungsverzeichnis .....</u>	<u>135</u>

## i. Abkürzungsverzeichnis

Tab. i: Verzeichnis der in dieser Arbeit benutzten Abkürzungen.

Abkürzungen	Bedeutung
%	Prozent
*	Annehmen der Nullhypothese
°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
µs	Mikrosekunden
1,3-bPG	1,3-Bisphosphoglycerat
<sup>12</sup> C	Kohlenstoff-Isotop 12
<sup>13</sup> C	Kohlenstoff-Isotop 13
2PG	2-Phosphoglycerat
2-PG	2-Phosphoglycerat
3PG	3-Phosphoglycerat
3-PG	3-Phosphoglycerat
6PG	6-Phosphogluconat
Abb.	Abbildung
AcCoa	Acetyl-CoenzymA
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	Adenlyat-Energieladung
aKG	alpha-Ketoglutarat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Varianzanalyse
APCI	atmospheric pressure coloumb ionisation
ASN	Asparagin
ASP	Aspartat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
AxP	Adenosinphosphat (AMP, ADP, ATP)
BSA	bovines Serumalbumin
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
C3	Kohlenstoffkörper mit 3 C-Atomen
CCD	Zentral-zusammengesetztes Design
CD	chemisch definiert
CE	Kapillarelektrophorese
CE-MS	Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat
CHCL3	Chloroform
CHO	chinese hamster ovary
CI	chemical Impact-Ionisierung
cisAco	cis-Aconitat
Cit	Citrat
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CMF	calcium-magnesium free

CMP	irgendsoein Nukleotid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoA	CoenzymA
COXi	Cytochrom-C-Oxidase Untereinheit I
CTP	Cytidintriphosphat
d	Tag
DAD	Diode-Array-Detektor
DHAP	Dihydroxiacetonphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DO	Gelöstsauerstoff
DOE	Design of Experiments
E	Zehnerpotenz
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	electron impact-Ionisierung
ESI	electro spray-Ionisierung
eV	Elektronenvolt
F6P	Fruktose-6Phosphat
Fa.	Firma
FA	Farraday-Auffänger
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid, reduziert
FbP	Fruktose-1,6-bisPhosphat
FMOC	Fluorenylmethoxycarbonyl
fmol	Femto-Mol
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
Fum	Fumarat
<i>g</i>	Zentrifugalbeschleunigung
G6P	Glukose-6Phosphat
GAP	Glyceraldehyd-3Phosphat
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GDP	Guanosindiphosphat
GLN	Glutamin
GLU	Glutamat
Gluc	Glukose
GLUT	Glukose-Transporter
GMP	Guanosinmonophosphat
GPIIb	Glykoprotein-2b
GPIIIb	Glykoprotein-3b
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Wasserstoffatom
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Phosphorsäure
HCl	Salzsäure
HeLa	Henrietta Lacks Zellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HILIC	hydrophile Interaktionschromatographie
HO	Nullhypothese
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IC50	Inhibierungskonstante mit 50 prozentiger Hemmung
IDMS	Isotopen-Verdünnungsmassenspektrometrie
IgG1	Immunoglobulin G1
Iso-Cit	Iso-Citrat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
K <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Kaliumborat
KDEL	Aminosäure-Zielsequenz
kg	Kilogramm
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
KPO <sub>4</sub>	Kaliumphosphat
L	Liter
Lak	Laktat
LAMP2	Lysosom-assoziiertes Membran-Protein 2
LC	Flüssigchromatographie
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
LP	Lysepuffer
M	Molar [mol.L <sup>-1</sup> ]
m	Masse
m/v	Masse pro Volumen
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
Mal	Malat
mbar	Millibar
MDCK	<i>Madin Darby canine Kidney</i> -Zellen
MEOHN <sub>2</sub> HCl	O-methylhydroxylaminehydrochlorid
MetOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MMP	mitochondriales Membranpotential
mOsmol	Milliosmol
MS	Massenspektrometrie
MTX	Methotrexat
MVDA	Multivariate-Datenanalyse
n	Zahl der Einzelversuche
N	Drehzahl
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	Natrium-Borat

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Dinatriumcarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduziert
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NAO	Nonylacrinidin-Orange
ng	Nanogramm
NH <sub>4</sub>	Ammonium
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NSO	Murine Myelomazelle
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
OxAc	Oxalacetat
P	Proportionalitätsfaktor des PD-Reglers
PBS	phosphate-buffered-saline
PCA	principal component analysis
pCO <sub>2</sub>	Partialdruck CO <sub>2</sub>
PEP	Phosphoenolpyruvat
pH	Stoffmengenkonzentration der Oxoniumionen
PM	Photomultiplier
PTFE	Polytetrafluoroethylen
Pwr.SP	Power Setpoint
Pyr	Pyruvat
R <sup>2</sup> , r <sup>2</sup>	Korrelationskoeffizient
R5P	Ribose-5Phosphat
Rab4	<i>Ras-related in brain</i> -Protein 4
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEV	Sekundär-Elektronen-Verstärker
SIR	single ion recording
sL	Standardliter
Suc	Succinat
SucCoA	Succinyl-CoenzymA
SW480	kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TBAS	Tetrabutylammoniumsulfat
TBDMS	t-Butyldimethylsilyl
TBS	Tris-gepufferte Lösung
TCA	Citrat-Zyklus
Ti	Nachstellzeit des PI-Reglers

TMS	Trimethylsilyl
TOM22	Translokase der äußeren Membran
TrisBase	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
TRP	Tryptophan
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolet
v/v	Volumen pro Volumen
Val	Valin
VIS	visuelles Spektrum
WP	Waschpuffer
x	Ablehnen der Nullhypothese

---



## ii. Kurzzusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit trägt dem immer größer werdenden Interesse an metabolischen Untersuchungen Rechnung. Säugerzellen werden intensiv als Wirtssysteme zur pharmazeutischen Herstellung von Wirkstoffen genutzt. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung die in ihnen ablaufenden Vorgänge genau zu verstehen und gegebenenfalls zu optimieren. Der Stoffwechsel bietet hierzu eine wichtige Stellschraube.

Zu diesem Zweck wurde eine Methode entwickelt, um die kompartmentäre Verteilung von ausgewählten Produkten des primären Kohlenstoffwechsels in CHO-Zellen zu untersuchen. Diese Methode basiert darauf, dass die Plasmamembran der Zellen unter Einsatz von Digitonin gezielt permeabilisiert wird, während die Zellen in einem schnellen Filtrationsschritt gleichzeitig gequenchet und vom Medium gereinigt werden. So bleiben Zellen ohne cytosolischen Inhalt übrig. Von diesen Zellen wurden Zellextrakte erstellt und mit chromatographischen sowie massenspektrometrischen Methoden analysiert. Im Vergleich zu nicht permeabilisierten Zellen konnten so die mitochondrialen Metabolit-Konzentrationen abgeleitet werden. Die Anwendung dieses Verfahrens bei einer batch-Kultivierung der CHO-Zellen zeigte, dass deutliche Unterschiede zwischen den cytosolischen und mitochondrialen Konzentrationen der phosphorylierten Adenylat-Spezies existierten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Adenylat-Pool kompartimentspezifisch variiert wird und dass im Cytosol eine stärkere Abnahme des Adenylat-Pools erfolgte als in der mitochondrialen Fraktion. Es wird vermutet, dass der Grund hierfür in der Aufrechterhaltung der cytosolischen Energieladung durch die AMP-aktivierte Protein-Kinase liegt. Die gemessenen Energieladungen am Ende der Kultivierung betragen 0.89 im Cytosol und 0.62 in den Mitochondrien. Eine Berechnung der Energieladungen über die Differenzmengen zum Anfang der Kultur ergäbe Werte von 0.67 und 0.28 in den jeweiligen Kompartimenten. Derart niedrige Werte sind nicht in Einklang zu bringen mit den ermittelten Viabilitäten. Somit konnte die entwickelte Methode Einblicke in die kompartmentären Abläufe gewähren und verdeutlichen wieso eine rein Gesamtzell-basierte Analyse nicht ausreichend ist.

### iii. Abstract

The presented work takes account of the growing interest in metabolic studies. Mammalian cells are extensively used for the production of biopharmaceutical active agents. Therefore it is of high importance to deeply understand the processes taking place inside the cells and, if necessary, optimize these. Metabolic studies do provide a profound tool to do so.

The presented work contains the development of a novel method to analyse the compartment-specific distribution of selected products of the primary carbon metabolism in CHO cells. This method is based on the selective permeabilisation of the plasma-membrane with the help of digitonin while performing a fast filtration to quench and wash the cells. This leaves cells devoid of cytosolic content. The treated cells were used to prepare cell extracts. Chromatographic and mass-spectrometric methods were used to quantify the metabolite levels. By comparing lysed and non-treated (but quenched) cells compartment-specific metabolic concentrations can be derived. This procedure was applied to a batch-fermentation of CHO cells and showed that there were distinct differences between the cytosolic and mitochondrial concentration of phosphorylated adenylate-species. Furthermore it was shown that the adenylate pool was varied depending on the corresponding compartment. The cytosolic adenylate pool showed a higher decrease of adenylates than the mitochondrial one. It is assumed that the AMP-activated protein kinase is accountable for these dynamics by maintaining the cytosolic energy charge. At the end of cultivation the cytosolic energy charge was at a level of 0.89 whereas the mitochondrial energy charge was at 0.62. By taking into account the differential amount of adenylates compared to the beginning of culture the corresponding values for the energy charge were at 0.67 and 0.28. These values were in sharp contrast with the measured viabilities of the cultures. By illustrating this, the method proved the importance of a compartment specific analysis and provided valuable insight into cellular and subcellular processes.

## 1. Einleitung

Der biopharmazeutischen Herstellung von Medikamenten kommt eine immer größer werdende Bedeutung zu. Im Jahre 2008 betrug der Markt für rekombinant hergestellte Proteine 50 Milliarden US-Dollar (Matasci, Hacker et al. 2008), ausgehend von einer aktuellen Analyse des Gesamtmarktes für Biopharmazeutika der P&S Market Reserach Gruppe betrug die Marktgröße 2014 160.44 Milliarden US-Dollar und soll bis 2020 mit einer kumulierten, jährlichen Wachstumsrate von 9.6 % weiter wachsen (Newswire 2016). Hierbei wird ein geringer Anteil, etwa 20 – 30 %, in prokaryotischen Expressionssystemen hergestellt (Matasci, Hacker et al. 2008; Huang, Lin et al. 2012), der überwiegende Anteil der Produktion erfolgt in Säugerzellen. Prinzipiell existieren verschiedene verfügbare Zellsysteme unterschiedlicher Tierarten, so gibt es murine NS0-Zellen, MDCK-Zellen von Hunden, verschiedene humane Zelllinien, die wie PerC.6-Zellen gezielt immortalisiert wurden oder aus Tumorgewebe stammen (HeLa). Der Fokus der industriellen Produktion liegt jedoch bei CHO-Zelllinien (Kim, Kim et al. 2012; Zhu 2012). Während für CHO-Zellen umfangreiche Erfahrungen zur Prozessführung bestehen und die Produkttiter ergiebig sind, weisen sie den gravierenden Nachteil auf, dass auch nicht-humane Komponenten wie Galactose- $\alpha$ 1,3-Galactose und N-Glycolylneuramin-Säure in das Glykosylierungsmuster eingebaut werden (Dumont, Ewart et al. 2015). Da diese potentiell immunogene Wirkung besitzen können, bleibt es abzuwarten ob und in welchem Mass humane Produktionszellen an industrieller Relevanz zu den etablierten CHO-Zellen aufschließen können.

Aufgrund der hohen Kosten bei der Herstellung von rekombinanten Produkten liegt es im Interesse des Produzenten einen möglichst effizienten Prozess zu nutzen. Grob betrachtet kann man hierbei primär die Bereiche Upstream sowie Downstream voneinander unterscheiden. Beim Downstream-Processing geht es hauptsächlich um die Abtrennung der Biomasse sowie der eigentlichen Aufreinigung des Produktes. Da je nach Art des Produktes und des Prozesses mehrere Aufreinigungsschritte notwendig sind, ist es erstrebenswert in diesen Schritten möglichst geringe Verluste an Produkt zu erzielen sowie dessen Aktivität nicht zu beeinträchtigen. Das Upstream-Processing umfasst die Arbeitsschritte die zur eigentlichen Durchführung eines Bioprozesses gehören. Die Effizienz von Bioprozessen lässt sich im Upstream-Bereich einerseits durch die Wahl des passenden Zellsystems und die Prozessführung beeinflussen. Neben der Art des Prozess (batch, fedbatch, kontinuierlich) lässt sich die Produktivität auch durch eine gezielte Beeinflussung des Temperaturverlaufs (Kaufmann,

Mazur et al. 1999; Al-Fageeh, Marchant et al. 2006; Becerra, Berrios et al. 2012; Vergara, Becerra et al. 2014) oder des pH-Wertes (Oguchi, Saito et al. 2006; Trummer, Fauland et al. 2006) erhöhen.

Darüberhinaus wird intensiv an der Entwicklung besonders auf die zellulären Bedürfnisse abgestimmter Medien und geeigneter Feedstrategien (Zhou, Rehm et al. 1997; Sellick, Croxford et al. 2011) gearbeitet. Säugerzellen stellen aufgrund ihres komplexen Stoffwechsels, der wiederum durch ihre Kompartimentierung bedingt ist, hohe Ansprüche an das genutzte Kulturmedium. Es gibt viele verschiedene Ansätze Medien zu Optimieren, hierzu gehören unter anderem einfache stöchiometrische Ansätze (Xie and Wang 1994; Shakibaie, Tabandeh et al. 2011), ebenso werden aber auch statistische Verfahren (Parampalli, Eskridge et al. 2007; Dong, Mandenius et al. 2008) und Algorithmen (Marteijn, Jurrius et al. 2003; Hutwimmer, Wagner et al. 2008) genutzt, um neue Medien zu entwickeln und bestehende zu verbessern. All diesen Methoden ist gemein, dass sie keine speziellen Erkenntnisse über den Stoffwechsel der Zellen liefern oder erfordern. Dies bedingt aber auch, dass tiefgreifende Erkenntnisse über zelluläre Stoffwechselphänomene mit diesen Methoden nicht zu erwarten sind. Die Methoden der systembiologischen Forschung, insbesondere im Bereich der Metabolomforschung und der Stoffflussanalysen, liefern hier deutlich genauere Aussagen über die Abläufe in den Zellen. Bisher liegt der Fokus der Metabolomanalysen in Säugerzellen auf gesamtzellulären Untersuchungen. Die Analyse von subzellulären Pools ist zwar wünschenswert, ist aber im Gegensatz zu Pflanzenzellen schwierig umzusetzen. Mit einigen speziellen Methoden konnten bisher subzelluläre Pools untersucht werden (Imamura, Nhat et al. 2009), allerdings sind diese für eine Standardanalytik zu aufwendig und für industriell genutzte Zellsysteme ungeeignet. Ein routinemäßiger Zugang zu organellären Pools würde es erlauben ganz neue Verfahren zur Auswahl von Produktionszelllinien zu etablieren, indem zum Beispiel subzelluläre Markermetabolit-Pools als Selektionskriterium genutzt werden. Diese könnten dann mit erwünschten Eigenschaften wie Wachstum und Produktivität oder Produktqualität korreliert werden. Eine Analyse von subzellulären Pools in Abhängigkeit der Nährstoffverfügbarkeit oder der Prozessführung ist hingegen nützlich, wenn tiefergehende Methoden zur Medien- bzw. Prozessführungsoptimierung entwickelt werden sollen. Auch Stoffflussanalysen würden von der Zugänglichkeit organellärer Metabolitproben profitieren.

## 2. Zielsetzung

Eukaryotische Zellen weisen im Gegensatz zu Bakterien eine Kompartimentierung der Zelle auf. Dies bedeutet, dass die Zelle in mehrere unterschiedliche Reaktionsräume aufgeteilt ist. Durch diese Aufteilung ist eine eukaryotische Zelle in der Lage Stoffwechselfvorgängen räumlich voneinander zu trennen. Diese räumliche Trennung bringt einige Vorteile mit sich. So können in jedem Kompartiment die jeweils optimalen Bedingungen, z.B. des pH-Werts, eingestellt werden und eine Konkurrenzsituation verschiedener Enzyme um die gleichen Substrate wird reduziert. Gleichmaßen bedeutet dies aber auch, dass die Zellen in der Lage sein müssen mittels geeigneter Transportsysteme die für den Stoffwechsel benötigten Metabolite zu den jeweiligen Zielorten verbringen zu können. Dies wird über Shuttle und Transportsysteme realisiert (Passarella and Atlante 2007). Für die experimentelle Untersuchung des zellulären Stoffwechsels bedeutet dies zudem, dass idealerweise jedes Kompartiment für Untersuchungen zugänglich sein sollte. Auf diese Notwendigkeit wird vermehrt in der Literatur hingewiesen (Reaves and Rabinowitz 2010; Hou, Takanaga et al. 2011) auch wenn die bisher verfügbaren experimentellen Methoden den Anforderungen bisher nicht umfassend gerecht werden. Als Konsequenz dessen dominieren bisher Gesamtzellanalysen, die nur einen Querschnitt über alle Kompartimente liefern. Als Folge dessen lassen sich subzelluläre Unterschiede, beispielsweise im ATP-Gehalt der Zellen, nicht auflösen. Eine Ausnahme bilden hier FRET-Analysen, die auch in der Lage sind subzelluläre Metabolit-Pools zu analysieren (Kennedy, Madreiter et al. 2014; Stangherlin, Koschinski et al. 2014). Allerdings bedingt diese Methode eine Modifikation der zu untersuchenden Zellen, so dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass die so gewonnenen Daten unverändert auch für industrielle Produktionszelllinien gültig sind. Eine bisher gängige Praxis bestand darin Transportsysteme bei metabolischen Flussanalysen aus den Modellen herauszuhalten um deren Komplexität nicht übermäßig zu erhöhen (Altamirano, Illanes et al. 2001; Zamorano, Wouwer et al. 2010; Ahn and Antoniewicz 2012).

Bis auf die erwähnten FRET-Analysen gibt es keine verfügbaren Protokolle für die kompartimentspezifische Untersuchung von Metaboliten in Säugerzellen. Aus diesem Grund sollte eine entsprechende Methode entwickelt werden, die es erlaubt Metabolomuntersuchungen in Säugerzellen durchzuführen und dabei die prominentesten Organellen zu unterscheiden, die am Primärstoffwechsel der Zellen beteiligt sind. Unter dieser Vorgabe wurden das Cytoplasma sowie die Mitochondrien als die aufzulösenden Organellen ausgewählt. Tierische Zellkul-

turen können sowohl adhärenz als auch in Suspension kultiviert werden. Da in industriellen Prozessen Suspensionzellen dominieren, wurde die zu entwickelnde Methode an diese Gegebenheiten angepasst. Als Produktionszelllinie wurde ein IgG1-produzierender CHO-Klon (ATCC: 12445) gewählt und in einem Batch-Prozess kultiviert. Wichtig war hierbei eine repräsentative Zelllinie zu nutzen, damit eine Plattformtechnologie entwickelt werden kann, die sich auch auf andere CHO-Klone übertragen lässt. Neben diesen grundlegenden Festlegungen auf das zu untersuchende Zellsystem und die Kulturbedingungen, ist es erforderlich die technischen Anforderungen an eine subzelluläre Probenahme genauer zu betrachten. Aus diesem Grund wird an dieser Stelle eine Beprobung von Zellen grob skizziert um anschließend die Anforderungen an eine Methode zur subzellulären Metabolomanalyse zu definieren, wie sie in dieser Arbeit entwickelt werden soll.

Da es sich um eine Suspensionskultur handelt, ist davon auszugehen, dass die Zellproben von Medienrückständen umgeben sind, diese Rückstände enthalten ebenfalls Stoffwechselprodukte wie sie in den Zellen vorkommen. Zum Zeitpunkt der Probenahme befinden sich die Zellen in einem vitalen Zustand und weisen eine ausgeprägte Stoffwechselaktivität auf. Wie bereits erwähnt finden die Stoffwechselaktivitäten in unterschiedlichen Kompartimenten in der Zelle statt. Hierbei ist es zutreffend, dass derselbe Metabolit in unterschiedlichen Organellen vorkommen kann. Die bei den Probenahmen gewonnenen Zellen stellen ein komplexes Gemisch aus den Zielmetaboliten und unerwünschter Matrixkomponenten, wie beispielsweise zellulärer Membranen oder Enzyme, dar. Um reine Metabolitfraktionen zu erhalten müssen die Proben aufgereinigt werden, so dass zwischen der Probenahme und der finalen Metabolitmessung eine gewisse Zeit vergeht. Aufgrund von Beschränkungen beim Probevolumen kann nur eine gewisse Zahl an Zellen zur Extraktion von Metaboliten und schlussendlich zur Vermessung aufbereitet werden. Im Prozess der Probenahme und der Extraktion der Zellen, kommen die in den Proben befindlichen Metabolite mit unterschiedlichen Materialien und Chemikalien in Kontakt.

Bei der Entwicklung der hier vorgestellten Methode wurde besonderes Augenmerk darauf gelegt, dass eben diese Charakteristika vorliegen können und entsprechend berücksichtigt werden. Da die Methode auf fundamentalen Strukturen im Zellaufbau zurückgreift, wurde der Grundstein dafür gelegt um sie auch in anderen Zellsystemen anwenden zu können. Fasst man all diese Einschränkungen zusammen so lassen sich folgende Anforderungen an eine Methode zur subzellulären Metabolomanalyse in Säugerzellen finden. In den späteren

Kapiteln dieser Arbeit werden die einzelnen Punkte erneut aufgegriffen und Schritt für Schritt betrachtet. Die Methode muss in der Lage sein

- eine ausreichende Anzahl von Zellen zu beproben um auswertbare Signale zu erzeugen.
- extrazelluläre Überstände von den Zellen abzutrennen und somit die intra- und subzellulären Signale nicht zu verfälschen.
- die relevanten Organellen separat zugänglich zu machen und dabei diese möglichst intakt zu lassen, hierbei ist die Identifizierung von Markermetaboliten erstrebenswert.
- den Stoffwechsel der Zellen ausreichend schnell zu stoppen um die originären Zustände zum Zeitpunkt der Probenahme zu erhalten.
- durch die bei der Probenahme eingesetzten Utensilien und Chemikalien die Stabilität der Metabolomproben nicht zu verfälschen.
- aufgereinigte Metabolitextrakte zu erzeugen, die stabil genug sind um für einen angemessenen Zeitraum gelagert zu werden.
- Metabolitproben zu erzeugen, die mit sensitiven massenspektrometrischen Messverfahren kompatibel sind.

### 3. Stand der Forschung

Dieses Kapitel der Arbeit dient dazu die hier entwickelte Methode in den Kontext der bisherigen Techniken und Entwicklungen auf dem Themengebiet der Metabolomanalyse einzuordnen. Zu diesem Zweck wird zunächst rudimentär die Zellkulturtechnik vorgestellt, um dann im weiteren Verlauf die Bereiche zu erörtern, die für das Verständnis des zellulären Stoffwechsels und der notwendigen Techniken um diesen zu untersuchen, notwendig sind.

#### 3.1 Zellkulturtechnik

Die Ursprünge der Zellkultur gehen zurück ins 19. Jahrhundert als es Wilhem Roux gelang embryonale Hühnerzellen für mehrere Tage in einer warmen Salzlösung am Leben zu erhalten. Seit diesen frühen Erfolgen wurden die Kultivierungsmethoden immer weiter verfeinert, so dass mittlerweile auch pharmazeutisch wirksame Produkte und transplantierfähiges Gewebe hergestellt werden können.

Generell ist zu unterscheiden, dass entweder die Zellen selber das Produkt darstellen oder die von diesen hergestellten Produkte, wie Antikörper oder rekombinante Proteine. Darüberhinaus können Zellen ebenfalls eingesetzt werden um Viren zu produzieren. Bei der Kultivierung von eukaryotischen Zellen ist darauf zu achten, dass diese entweder adhärent oder in Suspension wachsen. Da die Verfügbarkeit des Wachstumssubstrats bei adhärennten Kulturen limitierend wirkt, muss die zur Verfügung stehende Oberfläche maximiert werden. Dies kann über Kulturflaschen mit mehreren Zwischenböden oder über Rollflaschen erreicht werden, ebenso können kleine Kügelchen (*Carrier*) angeboten werden um die Wachstumsfläche zu maximieren. Mit Hilfe der *Carrier* ist es möglich adhärennte Zellen im Bioreaktor zu kultivieren. Für Suspensionszellen spielt die Verfügbarkeit der Wachstumsoberfläche keine Rolle, da sie direkt im Kulturvolumen wachsen. Ihre Aufzucht kann in Kulturflaschen, Schüttelkolben und Bioreaktoren erfolgen. Die etabliertesten Prozesse sind batch, fed-batch und kontinuierliche Kultivierungen. Beim batch-Prozess wird einmalig Medium vorgelegt, nach dem Inokulieren erfolgen bis auf die Probennahmen und eventuelle Zugabe von pH-Korrekturmitteln keine weiteren Volumenänderungen. Im fed-batch-Modus werden basierend auf dem batch-Ansatz noch ein oder mehrere Feed-Ströme bolus-artig bzw. permanent hinzugegeben. Somit werden Nährstofflimitierungen vermieden, inhibierende Stoffwechselprodukte können verdünnt und höhere Zellkonzentrationen und Proukttiter erreicht wer-



den. Das Volumen der Kultur nimmt durch die Feedzugabe stetig zu. Beim kontinuierlichen Betrieb wird sowohl Frischmedium zugegeben als auch Medium entfernt, hierbei bleibt das Prozessvolumen konstant und Nährstofflimitierungen werden vermieden. Darüberhinaus ist es möglich störende Stoffwechselprodukte auszuverdünnen sowie instabile Produkte schnell zur weiteren Aufarbeitung zu bringen.

### 3.1.1 Kompartimentierung von Säugerzellen

Säugerzellen weisen einen sehr komplexen und räumlich strukturierten Stoffwechsel auf. Die grundlegenden Stoffwechselvorgänge des Zentralstoffwechsels unterscheiden sich nicht von denen in bakteriellen Systemen. So bilden auch hier die Glykolyse, der Pentose-Phosphat-Weg und der Citrat-Zyklus das Rückgrat der Kohlenstoffverstoffwechslung. Jedoch führt die Kompartimentierung in Säugerzellen dazu, dass die einzelnen Stoffwechselwege in unterschiedlichen Reaktionsräumen der Zellen stattfinden. Im Gegensatz hierzu ist bei prokaryotischen Systemen allenfalls eine räumliche Konzentrierung von frisch synthetisierten Stoffwechsel-assoziierten Enzymen möglich (Martin 2010), basierend auf Diffusionsunterschieden von Enzymen in Wasser und Cytosol (Elowitz, Surette et al. 1999), die der Kompartimentierung in Säugerzellen vergleichbar wäre. So erfolgt der Citrat-Zyklus in Säugerzellen in den Mitochondrien. Der Vorteil der Kompartimentierung besteht unter anderem darin, dass unterschiedliche Enzyme nicht um die gleichen Substrate konkurrieren müssen und sich einzelne Reaktionen somit gegenseitig behindern. Darüber hinaus wird auf diese Weise das Problem umgangen, dass Intermediate oder Produkte eines Stoffwechselweges auf bestimmte Reaktionen eines anderen inhibierend wirken können. Durch eine räumliche Trennung ist es somit möglich unterschiedliche Konzentrationen der gleichen Substanz in einer Zelle zu realisieren und somit für jeden Bereich optimale Konzentrationen zu ermöglichen. Obgleich dieses Konzept enorme Vorteile bietet, erfordert es jedoch ebenso Anpassungen seitens der Zelle. Auch wenn bestimmte Stoffwechselwege räumlich voneinander getrennt werden, so müssen gemeinsame Intermediate dennoch ausgetauscht werden können um einen reibungslosen Ablauf zu gewährleisten. Das gleichzeitige Aufrechterhalten der Konzentrationsgradienten stellt für die Zellen hierbei eine besondere Schwierigkeit dar. Die Lösung hierfür liegt in speziellen Transport- oder auch Shuttle-Systemen. Diese ermöglichen es Stoffwechselinter-

mediate entweder direkt, z.B. in Form von Monocarboxylat- oder Aminosäuretransportern, oder indirekt wie im Falle von NADH über das Malat-Aspartat-Shuttle auszutauschen.

Tab. 1: Überblick der gängigsten Organellen in eukaryotischen Zellen

Organell	Funktion
Nukleus	Transkription von DNA, beherbergt die DNA der Zelle
Cytosol	Translation von DNA, Energiestoffwechsel
Mitochondrium	oxidative Verstoffwechslung von Glukose
endoplasmatisches Retikulum (rauh)	Translation und Faltung von Proteinen
endoplasmatisches Retikulum (glatt)	Synthese von Lipiden und Steroiden, Detoxifizierung
Golgi-Apparat	Sortierung, Prozessierung und Modifizierung von Proteinen
Peroxisom	Abbau von Wasserstoffperoxid
Autophagosom	Degradation von Zellbestandteilen
Lysosom	Abbau von Biomolekülen (Kohlenhydrate, Peptide, ...)
Vesikel	Transport von Substanzen

Tab. 1 gibt einen Überblick der Kompartimente in Säugerzellen und der damit verbundenen Stoffwechselwege. Mit Blick auf den Zentralstoffwechsel und dem Thema dieser Arbeit stehen die Mitochondrien besonders hervor. Als Ort des Citrat-Zyklus und der oxidativen Phosphorylierung sind sie von ausserordentlicher Bedeutung für die Energiegewinnung in den Zellen. Entwicklungsgeschichtlich ist davon auszugehen, dass Mitochondrien, ebenso wie Chloroplasten in Pflanzenzellen, durch die Aufnahme von frühen Proteo- bzw. im Fall der Chloroplasten durch Cyanobakterien entstanden sind (Kleine, Maier et al. 2009; van der Giezen 2009). Diese sogenannte Endosymbiontentheorie erlangte erst 1967 durch die Veröffentlichung von Lynn Sagan größere Bekanntheit (Sagan 1967).

Ogleich der Ursprung von Mitochondrien somit erklärt ist, gib es bezüglich ihrer Zustandsform in den Zellen weiterhin keine allgemeingültige Auffassung. Als Reaktion auf Stressstimuli teilen und verschmelzen Mitochondrien (Okamoto and Shaw 2005; Detmer and Chan 2007). Es gibt sowohl Publikationen die zeigen, dass Mitochondrien als einzelnes, distinktes Organell vorliegen (Lombardi, Damon et al. 2000; Collins, Berridge et al. 2002), aber auch Publikationen die Hinweise geben, dass es verbundene mitochondriale Netzwerke gibt (De Giorgi, Lantigue et al. 2000; Gomes, Benedetto et al. 2011; Rambold, Kostecky et al. 2011). Für Untersuchungen der mitochondrialen Stoffwechselintermediate ist dies von entscheidender Bedeutung. Würden beispielsweise Methoden zur Aufreinigung der Mitochondrien genutzt, die eine starke Scherbelastung der Mitochondrien bewirken, so könnte dies bei ei-

nem mitochondrialen Netzwerk zu strukturellen Schäden und somit unweigerlich zu einem Verlust des Matrixinhaltes führen. Wird im Gegensatz jedoch ein schonendes Verfahren genutzt, das gut für netzwerkartige Strukturen funktioniert, einzelne, kleine Mitochondrien jedoch nicht erfasst, so kommt es ebenfalls zu einem erheblichen Verlustes des zu untersuchenden Matrixinhaltes der Mitochondrien.

Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt der zellulären Kompartimentierung ist der Volumenanteil den die unterschiedlichen Organellen in den Zellen beanspruchen, da die Konzentration von Metaboliten immer abhängig ist von dem Volumen in dem sie vorliegen. Soweit sind keine CHO-spezifischen Volumen-Verteilungen für Organelle in Suspensionszellen bekannt, die Literatur liefert aber exemplarische Daten für Hepatozyten. Diese sind in Tab. 2 aufgetragen und dienen in dieser Arbeit als Berechnungsgrundlage.

Tab. 2: Volumenanteile der verschiedenen Organelltypen für Hepatozyten nach Alberts (Alberts 1989)

Kompartiment	Anteil am Gesamtzellvolumen [%]
Cytosol	54
Mitochondrien	22
raues Endoplasmatisches Retikulum	9
glattes endoplasmatische Retikulum plus Golgi	6
Nucleus	6
Peroxisom	1
Lysosom	1
Endosom	1

### 3.1.2 Zentralstoffwechsel in Säugerzellen

Der Zentralstoffwechsel von Säugerzellen umfasst im Wesentlichen die Aktivitäten in der Glykolyse, dem Pentose-Phosphat-Weg, dem Citrat-Zyklus sowie die oxidative Phosphorylierung. Hierzu wird Glukose über Natrium-Glukose-Cotransporter und über Glukosetransporter (GLUT1-14) aufgenommen (Bell, Kayano et al. 1990). Aufgrund seiner hohen Affinität sorgt der Insulin-unabhängige Glukose-Transporter 1 für eine Basalversorgung der Zellen, insbesondere bei CHO Zellen wurde er als der wichtigste Glukosetransporter beschrieben (Hara, Yonezawa et al. 1994). Sobald die Glukose im Cytosol vorliegt wird sie in Glukose-6-Phosphat umgewandelt. Das Glukose-6-Phosphat kann nun entweder im Pentose-Phosphat-Weg zur Herstellung von NADPH und Precursor für die Nukleotidsynthese genutzt werden oder aber weiter die Glykolyse zur Energiegewinnung durchlaufen. Studien für Hybridoma-

Zellen haben gezeigt, dass zwischen 4 und 20 % der aufgenommenen Glukose in den Pentose-Phosphat-Weg gehen (Sharfstein, Tucker et al. 1994; Bonarius, Ozemre et al. 2001), während Niklas et al für humane Zellen Werte um 2.3 % bestimmten (Niklas, Sandig et al. 2011) und Goudar 41 % für CHO-Zellen (Goudar, Biener et al. 2010). In der Glykolyse, siehe Abb. 1, hingegen erfolgt als nächstes die Umwandlung zu Fruktose-6Phosphat durch das Enzym Glukose-6Phosphat-Isomerase. Die Phosphorylierung von Fruktose-6Phosphat zu Fruktose-1,6-bisPhosphat ist aufgrund seiner thermodynamischen Gleichgewichtslage für die Glykolyse irreversibel und somit deren erster *committed step*. Somit wurden bisher 2 Moleküle ATP pro Molekül Glukose verbraucht. Als nächstes erfolgt eine Aufspaltung in zwei C3-Körper, entweder in Dihydroxyaceton-Phosphat oder direkt in Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat unter Bildung von einem Molekül NADH pro C3-Körper. Als nächstes erfolgt eine Umwandlung in 1,3-bisPhosphoglycerat und schließlich in 3-Phosphoglycerat, wobei wieder ein Molekül ATP pro C3-Körper gewonnen wird. Eine Umlagerung der Phosphatgruppe liefert nun 2-Phosphoglycerat was wiederum zu Phosphoenolpyruvat umgewandelt wird. Als letzter Schritt der Glykolyse wird hieraus anschließend durch Abspaltung von ATP Pyruvat gebildet. Die Verstoffwechslung eines Moleküls Glukose in der Glykolyse liefert also netto 2 Moleküle NADH und 2 Moleküle ATP.

Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse, kann nun entweder unter Verbrauch von NADH zu Laktat umgewandelt oder direkt in den Citrat-Zyklus eingeschleust werden. Säugerzellen sind dafür bekannt, dass sie unter bestimmten Kulturbedingungen ein exzessives Glukose-Wasting betreiben und viel Laktat bilden (Henry, Jolicoeur et al. 2011; Templeton, Dean et al. 2013; Young 2013). Durch die Bildung von Laktat aus Pyruvat wird  $\text{NAD}^+$  gebildet das nun wieder als Edukt für die Glykolyse zur Verfügung steht und diese antreibt. Jones et al führen überdies als Grund an, dass proliferierende Zellen Mitochondrien nicht für die Bereitstellung von Energieäquivalenten einsetzen müssen, sondern vermehrt Intermediate wie Citrat und  $\alpha$ -Ketoglutarat für die Fettsäure- und Aminosäuresynthese bilden (Jones and Thompson 2009). Studien zeigen, dass es übergreifend für verschiedene Zelllinienarten Muster gibt, die mit der erhöhten Glykolyseaktivität einhergehen. Diese Muster betreffen beispielsweise das Expressionlevel von GLUT1 sowie glykolytischer Enzyme wie der Hexokinase 2 (Neermann and Wagner 1996; Dang and Semenza 1999; Mulukutla, Khan et al. 2010). In Abhängigkeit der Zelllinie und den Kulturbedingungen kann der Eintrag des in der Glykolyse gebildeten Pyruvats in den Citrat-Zyklus stark variieren. Niklas et al fanden in humanen Zellen, dass in

den ersten drei Kulturtagen nur 0.7 % des cytosolischen Pyruvats in die Mitochondrien transportiert wurden (Niklas, Sandig et al. 2011). Für CHO-Zellen wurden je nach Zelle und Prozesszeit Werte zwischen 17 und 79 % veröffentlicht (Altamirano, Illanes et al. 2001; Goudar, Biener et al. 2006; Goudar, Biener et al. 2010). Sobald Pyruvat in die Mitochondrien transportiert worden ist, wird unter NADH-Bildung aus Pyruvat Acetyl-CoA gewonnen. Dieses kann nun mittels Oxalat zu Citrat umgewandelt werden. Über die Zwischenschritte Cis-Aconitat und Iso-Citrat wird  $\alpha$ -Ketoglutarat gebildet, welches unter Gewinnung von NADH zu Succinyl-CoA umgewandelt wird. Die weitere Umwandlung des Succinyl-CoA zu Succinat liefert nun GTP. Succinat wird anschließend unter Gewinnung von  $\text{FADH}_2$  zu Fumarat umgewandelt, was wiederum zu Malat verstoffwechselt wird. Unter Gewinnung eines weiteren Moleküls NADH erfolgt nun die Bildung von Oxalacetat und der Zyklus kann erneut beginnen. Aus einem Molekül Pyruvat gewinnt die Zelle im Citrat-Zyklus somit 3 Moleküle NADH sowie je ein Molekül GTP und  $\text{FADH}_2$ , aus einem Molekül Glukose folglich die doppelten Mengen. Wie in Abb. 2 zu sehen ist, ist die Zelle in der Lage mehrere Metabolite in den Zyklus einzuspeisen, hierzu gehören: Pyruvat, Citrat,  $\alpha$ -Ketoglutarat und Malat. Da die mitochondriale Membran für Metabolite nicht permeabel ist, werden hierzu spezielle Transport-Systeme benötigt.

Die Aufgabe des Citrat-Malat Shuttles besteht darin Acetyl-CoA zwischen dem Cytosol und den Mitochondrien auszutauschen. Im Cytosol kann es beispielsweise für die Fettsäuresynthese genutzt werden. Für den Austausch werden Citrat und Malat über einen Citrat-Carrier aus den Mitochondrien in das Cytosol transportiert. Dort wird unter CoA und ATP-Verbrauch Oxalacetat, Acetyl-CoA und ADP gebildet. Während das Acetyl-CoA nun für weitere katabole Reaktionen genutzt werden kann, wird Oxalacetat unter NADH-Verbrauch zu Malat umgewandelt, welches wiederum für den nächsten Citrat-Transport benötigt wird. Alternativ kann auf cytosolischer Seite unter NADPH-Gewinnung Pyruvat gebildet werden. Das Pyruvat kann nun mittels eines Pyruvat- $\text{H}^+$ -Symporters in die mitochondriale Matrix transportiert werden. Damit die auf diese Weise steigende Malat- und Pyruvat-Konzentration in der Matrix weitere Transportschritte nicht negativ beeinflussen, kann Malat unter NADH-Bildung bzw. Pyruvat unter ATP-Verbrauch zu Oxalacetat umgewandelt werden.

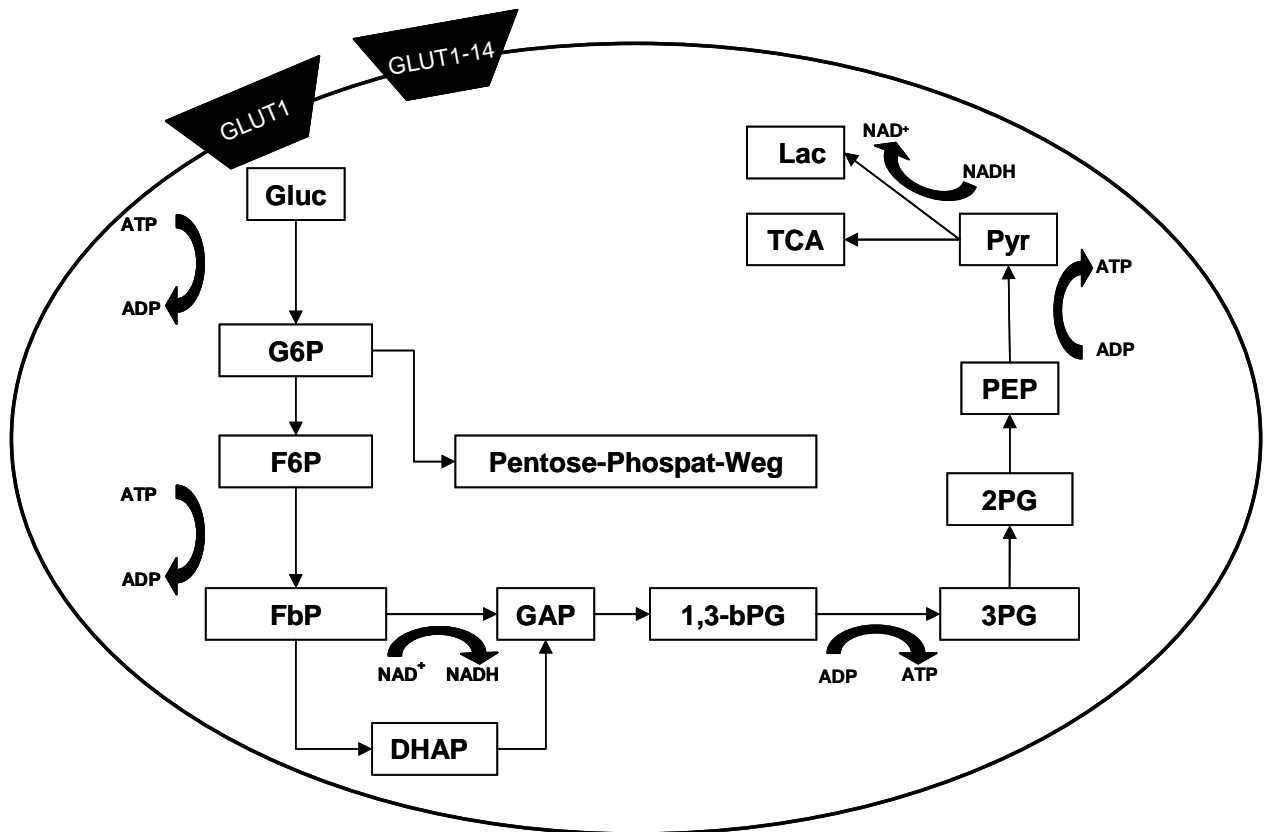


Abb. 1: schematische Darstellung der Glukoseaufnahme in das Cytosol von Säugerzellen über Glukose-Transporter (GLUT) mit anschließender Verstoffwechslung in der Glykolyse bzw. Einspeisen des Glukose-6Phosphats in den Pentose-Phosphat-Weg.

Die Aufgabe des Malat-Aspartat-Shuttles hingegen besteht im Austausch von NADH zwischen dem Cytosol und der mitochondrialen Matrix. Hierzu wird ein Malat aus dem Cytosol per Antiporter im Austausch mit einem  $\alpha$ -Ketoglutarat aus der mitochondrialen Matrix in das Mitochondrium verbracht. Hier kann das Malat entweder direkt in den Citrat-Zyklus gebracht werden oder unter Bildung eines NADH zu Oxalacetat umgewandelt werden. Zusammen mit Glutamat kann aus Oxalacetat  $\alpha$ -Ketoglutarat und Aspartat gebildet werden, wobei das  $\alpha$ -Ketoglutarat wieder für Antiporte mit Malat zur Verfügung steht. Das Aspartat kann im Aspartat-Glutamat-Shuttle im Austausch mit einem cytosolischen Glutamat aus der Matrix heraus transportiert werden. Im Cytosol kann dann erneut aus Aspartat und Glutamat  $\alpha$ -Ketoglutarat und Oxalacetat gebildet werden.

Über die Glutaminolyse kann  $\alpha$ -Ketoglutarat in den Citrat-Zyklus gebracht werden. Hierzu werden Glutamin bzw. Glutamat aus dem Cytosol in die Matrix gebracht. Bei Glutamin erfolgt dann unter Abspaltung von Ammonium die Bildung von Glutamat. Glutamat kann dann unter erneuter Abspaltung von Ammonium in  $\alpha$ -Ketoglutarat umgewandelt und in den Cit-

rat-Zyklus eingebracht werden. In der Literatur sind zahlreiche Beispiele genannt in der die Glutaminverfügbarkeit in den Kulturen mit dem Glukoseverbrauch der Zellen einhergeht (Lee, Yap et al. 2003; Wong, Wong et al. 2005; Sidorenko, Wahl et al. 2008; Wahrheit 2014). Dies zeigt, dass bei metabolischen Untersuchungen die Definition der Probenahmezeitpunkte besonders wichtig ist um repräsentative Stoffwechselphasen zu untersuchen.

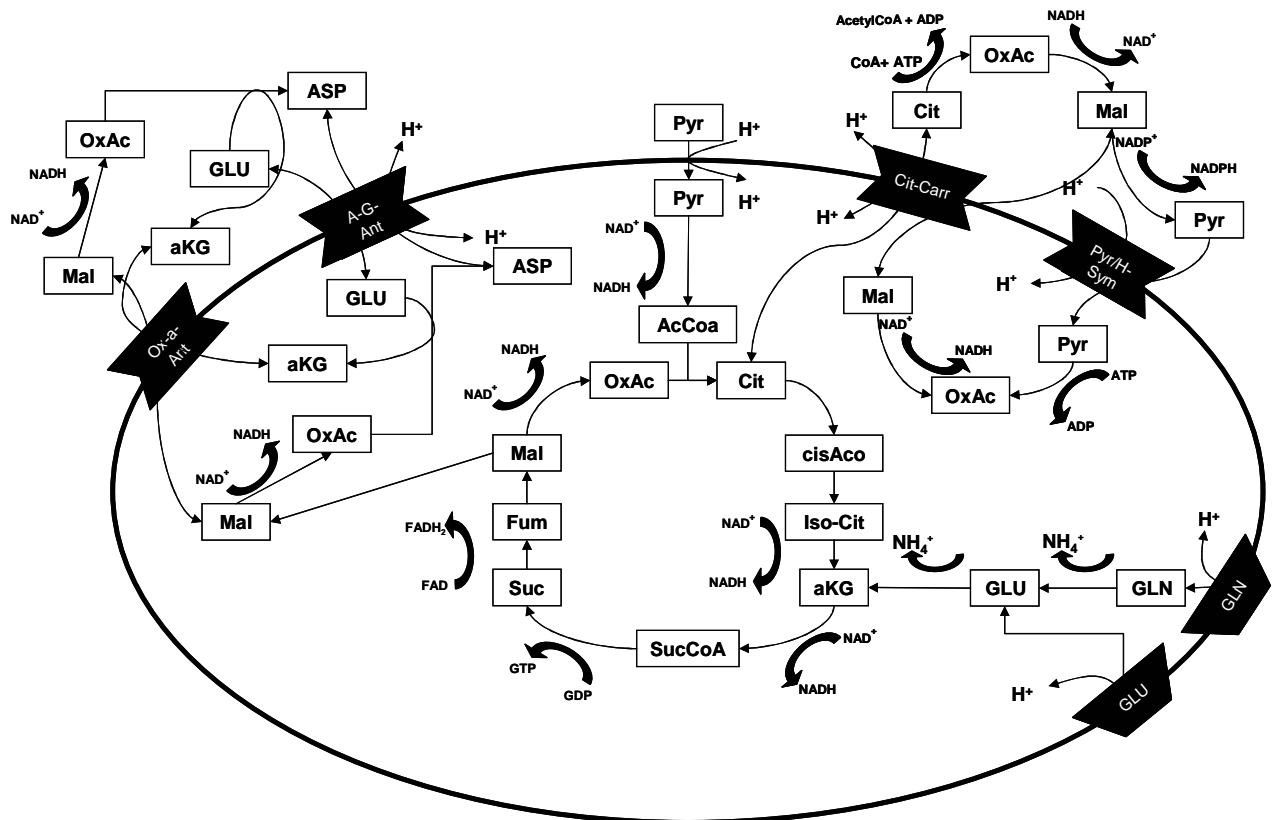


Abb. 2: schematische Darstellung des Stoffaustauschs zwischen dem Cytosol (ausen) und Mitochondrien (Ellipse) in Säugerzellen und den zugehörigen Stoffwechselwegen sowie Transportmechanismen. Dies umfasst den regulären Citrat-Zyklus (mitte) sowie das Malat-Aspartat-Shuttle (links), das Citrat-Malat-Shuttle (rechts oben) und die Glutaminolyse (rechts unten). Der Stoffaustausch erfolgt über die aufgelisteten Transporter. Ox-a-Ant: Malat-a-Ketoglutarat Antiporter; A-G-Ant: Aspartat-Glutamat-Antiporter; Cit-Carr: Citrat-Carrier; Pyr/H-Sym: Pyruvat-H<sup>+</sup>-Symporter; GLU: mitochondriale Glutamat-Transporter; GLN: mitochondriale Glutamin-Transporter.

### 3.2 Systembiologie

Zelluläre System, unabhängig davon ob sie pro- oder eukaryontischen Ursprungs sind, sind hochkomplexe Gebilde, die nicht ausschließlich thermodynamischen Gesetzen gehorchen, sondern ebenfalls komplexe Regulationsmechanismen aufweisen. Aus diesem Grund ist es für ein holistisches Verständnis von Zellen wichtig diese nicht nur isoliert bezüglich ihres Stoffwechsels oder der Genaktivität zu untersuchen, sondern diese Informationen miteinander in Beziehung zu setzen. Auf diese Weise ist es möglich ein biologisches System dahingehend zu untersuchen wie es auf Störungen reagiert und somit mehr Informationen über das System selbst zu erhalten (Ideker, Galiski et al. 2001). Hierzu werden verschiedene Informationen, z.B. Genom-, Transkriptom-, Proteom-, Fluxom- und Metabolom-Daten, zusammengetragen und quantitativ ausgewertet. Bottom-up-Ansätze umfassen beispielsweise die Erstellung von Netzwerken durch mathematische Modelle, die durch Literatur-Daten bestätigt werden, während bei Top-down-Ansätzen die genannten omics-Daten zusammen mit statistischen und mathematischen Auswertungen Verwendung finden (Shahzad and Loor 2012). Die so gewonnenen Erkenntnisse können vielfältig genutzt werden. So haben Schaub et al durch die statistische Auswertung von Prozessdaten und den daraus abgeleiteten Stofffluss- und Expressionsprofilen eine Optimierung eines pharmazeutischen Produktionsprozesses von  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  auf  $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  erreichen können (Schaub, Clemens et al. 2011). Popp et al haben mittels quantitativer Metabolit-Profile nebst multivariater Datenanalyse und einer mechanistischen Modellerstellung metabolische Charakteristika von Hochproduzenten aus mehreren CHO-K1-Klonen identifizieren können (Popp, Müller et al. 2016), während Zalai et al mittels mechanistischen Modellansätzen und Daten-getriebener multivariater Datenanalyse die Dynamik im Laktat-Stoffwechsel in CHO-Zellen untersuchten (Zalai, Koczka et al. 2015). Neben der gezeigten Verwendung bei der Optimierung von pharmazeutischen Prozessen findet sich eine breite Nutzbarkeit für systembiologische Methoden, die von der Suche nach neuen Medikamenten (Butcher, Berg et al. 2004; Kell 2006), der Untersuchung des Darmmikrobioms beim Menschen und dessen Einfluss auf Fettleibigkeit (Greenblum, Turnbaugh et al. 2012) bis hin zur Steigerung der Photosynthese reicht (Nogales, Gudmundsson et al. 2012). Da die Metabolomforschung wichtige Daten für systembiologische Untersuchungen liefert, wird sie im Folgenden genauer betrachtet.



### 3.3 Metabolomforschung

Die Metabolomforschung befasst sich mit dem Metabolom von einzelnen Zellen bzw. ganzen Organismen. Der Begriff des Metaboloms beschreibt die Gesamtheit der zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle vorliegenden kleinen chemischen Moleküle und wurde bereits 1998 von Oliver et al beschrieben (Oliver, Winson et al. 1998). Fiehn hat diese Definition später noch genauer beschrieben (Fiehn 2002). Da das Metabolom die oberste Ebene von Transkriptom, Proteom und Fluxom darstellt, kommt es von den genannten dem Phänotypen der Zellen am nächsten (Dettmer, Aronov et al. 2007). Die Anzahl der Publikationen im Bereich Metabolomics stieg zuletzt von einer niedrigen zwei bis dreistelligen Anzahl im Jahre 2002 auf etwa 6000 im Jahre 2012 (Cromski, Muhamadali et al. 2015). Dies verdeutlicht wie sehr dieses Forschungsgebiet an Attraktivität gewonnen hat.

Zur Untersuchung des Metaboloms gibt es viele verschiedene Ansätze, Krastanov unterscheidet hierbei drei prinzipielle Strategien (Krastanov 2010). Die gezielte Metabolomanalyse befasst sich mit der präzisen Quantifizierung einzelner Metabolite oder kleiner Metabolit-Sets. Beim Metabolit Profiling werden Gruppen von Metaboliten, die mit ausgewählten Stoffwechselwegen assoziiert sind, identifiziert und grob quantifiziert. Als letztes nennt er das Metabolische Fingerprinting, bei dem es um die Untersuchung des gesamten Metaboloms geht ohne die einzelnen Komponenten jedoch zu identifizieren. Anhand von Unterschieden in den Metabolit-Mustern lassen sich hier qualitative Aussagen treffen. In der Literatur finden sich für diese Vorgehensweisen ausreichend Beispiele. So führten Jackson et al gezielte Untersuchungen am Komponenten des Zentralstoffwechsels in *E. coli* durch (Jackson, Werner et al. 2013). Liu et al haben mittels gezielter Nukleotid-Analysen Biomarker identifiziert, die mit Chemotherapeutika assoziiert sind (Liu, Zhang et al. 2014). Ebenso konnten Amantonico et al durch die Analyse ausgewählte Nukleotide zeigen, dass es in homogenen *Closterium acerosum*-Kulturen zu metabolischen Heterogenitäten innerhalb der Kultur kommen kann (Amantonico, Urban et al. 2010). Von Purwaha et al wurden gezielt die Auswirkungen der L-Asparaginase auf die Aminosäuren in adhären Zellen untersucht um weitere Erkenntnisse über den Wirkmechanismus der L-Asparaginase zu erhalten, die mit der lymphoblastischen Leukämie bei Kindern in Verbindung gebracht wird (Purwaha, Lorenzi et al. 2014).

Metabolisches Profiling von Insektenzellen wurde von Monteiro et al dazu genutzt metabolische Muster in ergiebigen Virusproduzenten von *Spodoptera frugiperda* zu erkennen und

Stoffwechselwege zu identifizieren, die für weitere Stammoptimierungen genutzt werden können (Monteiro, Bernal et al. 2014). Bei der Untersuchung ausgewählte Zentralstoffwechselmetabolite in MDCK-Zellen zeigte sich, dass der Einfluss der Wachstumsphase auf die Glykolyse und den Citrat-Zyklus bedeutender ist als das Kulturmedium (Rehberg, Rath et al. 2014). Durch Anwendung von Profiling-Untersuchungen in der Mikroumgebung von Darm- und Magenkrebs konnte gezeigt werden, dass das Tumorgewebe reich an Aminosäuren und Laktat ist aber wenig Glukose aufweist (Hirayama, Kami et al. 2009). Ebenso ist das umliegende Gewebe extrem nährstoffarm.

Wagstaff et al nutzten das metabolische Fingerprinting um die metabolische Reprogrammierung von CHO-Zellen als Folge eines Temperatur-Shiftes zu untersuchen (Wagstaff, Master-ton et al. 2013). Bei diesen Untersuchungen konnten sie zeigen, dass die zelluläre Antwort auf den Temperatur-Stimulus zelllinienspezifisch erfolgt. Neben weiteren Techniken haben auch Ley et al Fingerprinting Analysen in EPO-produzierenden CHO-Zellen angewandt um die zelluläre Anpassung an die heterologe Proteinexpression zu untersuchen (Ley, Seresht et al. 2015). Rödiger et al haben mit einer Glycan-spezifischen Fingerprinting-Analyse den Einfluss der Kulturbedingungen auf die Proteinqualität untersucht (Rödiger, Rapp et al. 2013). Hierbei zeigte sich, dass die Adaption der Zellen an die jeweiligen Medienbedingungen einen größeren Einfluss auf die Glykosylierung besitzt als Änderungen in der Prozessführung. Auch mikrobielle Untersuchungen greifen regelmäßig auf das Fingerprinting zurück, beispielsweise um *E. coli* Stämme zu phänotypisieren (AlRabiah, Correa et al. 2013).

Die verfügbaren Techniken aus dem Metabolombereich haben sich als derart nützlich erwiesen, dass sie mittlerweile auch Anwendung in der Entwicklung von industriellen Zellkulturmedien finden (Liu, Yang et al. 2014). Die Untersuchung des Metaboloms umfasst folgende Arbeitsschritte. Zunächst müssen die zu untersuchenden Zellen daran gehindert werden, während der Untersuchung ihren Stoffwechsel regulär weiterzuführen. Dies würde andernfalls die Ergebnisse verzerren. Als nächstes müssen die in den Zellen befindlichen Metabolite zugänglich gemacht werden und störende Substanzen abgereichert werden. Sobald die Proben aufgearbeitet vorliegen, können sie vermessen werden. Die hierbei gewonnenen Metabolit-Daten müssen als nächstes analysiert und interpretiert werden. Da jeder der hier vorgestellten Schritte ganz individuelle Anforderungen an die Vorgehensweise stellt, werden die entsprechenden Techniken in den Kapiteln 3.3.1 - 3.3.4 separat vorgestellt. Zur Veranschau-

lichung wird in Abb. 3 der typische Arbeitsablauf einer klassischen Metabolom-Studie skizziert.

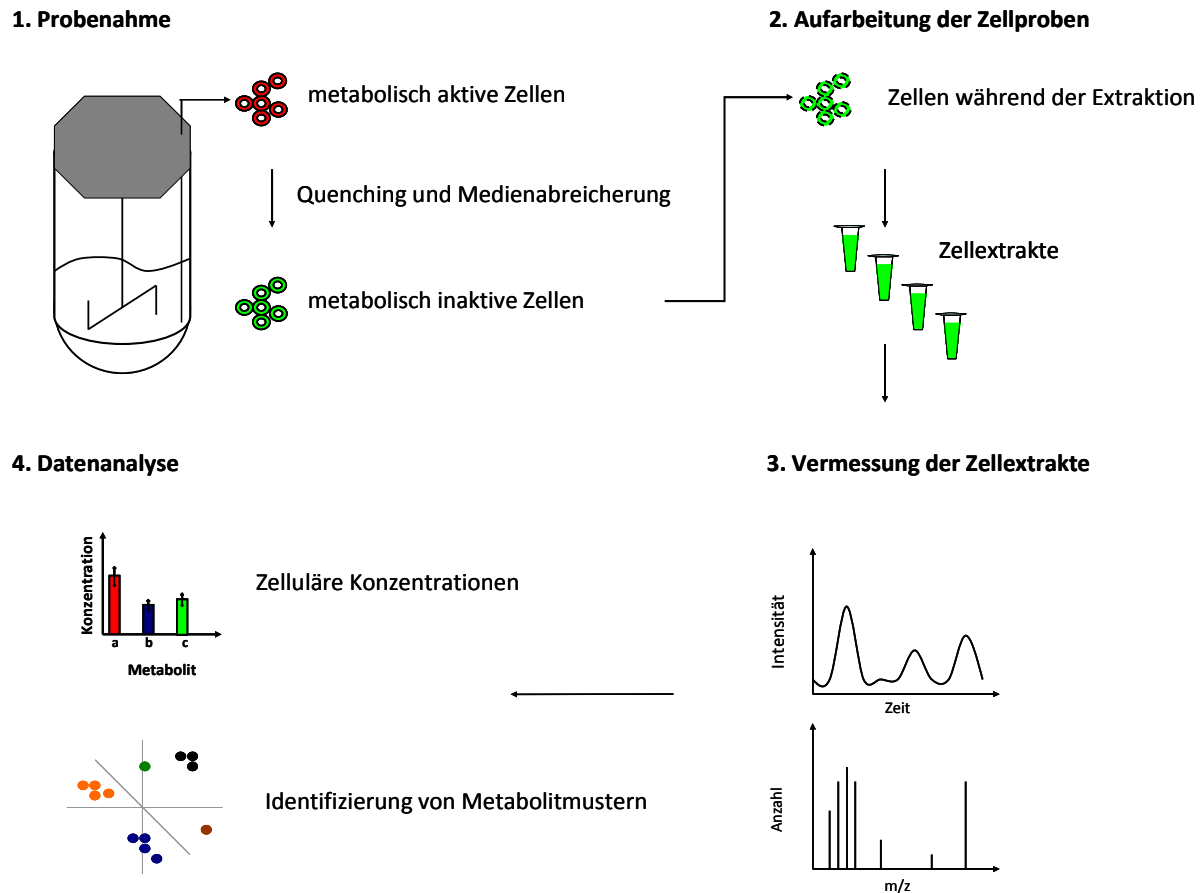


Abb. 3: Skizzierter Ablauf einer klassischen invasiven Metabolomuntersuchung in Zellen. Zunächst werden die Zellen, z.B. in einem Bioreaktor, kultiviert. Anschließend werden Proben genommen und der Stoffwechsel der Zellen gestoppt (Quenching). In den meisten Fällen ist eine Abreicherung des Mediums notwendig. In der folgenden Aufarbeitung der Zellproben werden die Metabolite der Zellen zugänglich gemacht und aufgereinigt. Sie sind nun bereit vermessen zu werden um die relevanten Metabolite zu quantifizieren. Sobald diese Daten vorliegen, können die zellulären Konzentrationen bestimmt werden und diese Daten weiter nach Mustern oder Auffälligkeiten untersucht werden.

### 3.3.1 Probenahme und Quenching

Die Probenahme bei metabolischen Untersuchungen ist von entscheidender Bedeutung. Die Umschlagsdauer von Metabolit-Pools in Zellen ist im Allgemeinen sehr gering, hängt aber auch von den betroffenen Metaboliten selbst ab. Für Bakterien und Hefen finden sich in der Literatur Werte für den Turnover von Glukose, ATP sowie ADP von  $1 \text{ mM} \cdot \text{sec}^{-1}$ ,  $1.5 \text{ mM} \cdot \text{sec}^{-1}$  und  $2 \text{ mM} \cdot \text{sec}^{-1}$  (Dekoning and Vandam 1992; Rizzi, Baltes et al. 1997). Da es bei der Probenahme darauf ankommt ein originalgetreues Abbild des Stoffwechsels zum Zeitpunkt der

Beprobung zu erhalten, muss dafür gesorgt werden, dass die Stoffwechselaktivität der Zellen möglichst rasch eingestellt wird. Die Analyse der Adenylat-Energieladung bietet die Möglichkeit über das Verhältnis von ATP zu seinen dephosphorylierten Spezies ADP und AMP zu ermitteln ob die Zellen in einem physiologisch guten Zustand sind. Dieses Konzept wurde bereits in den sechziger Jahren von Atkinson eingeführt (Atkinson 1968). Für Metabolomuntersuchungen kann das Energieladungssignal genutzt werden um abzuschätzen ob der Stoffwechsel während der Probenahme weiterläuft. Ein weiteres wichtiges Kriterium bei der Beprobung von Zellen ist die hinreichende Abreicherung des extrazellulären Milieus. Säugerzellen haben besonderen Ansprüchen an die Zusammensetzung des eingesetzten Kulturmediums. Aus diesem Grund enthalten Zellkulturmedien wichtige Komponenten wie verschiedene Zucker, Aminosäuren, Vitamine, Spurenelemente oder Wachstumsfaktoren. Da insbesondere Zucker und Aminosäuren in den Medien in millimolaren Konzentrationen vorliegen, ergibt sich das Problem, dass Medienrückstände bei der Beprobung die zellulären Metabolomdaten stark beeinträchtigen und verzerren können (Dietmair, Timmins et al. 2010). Eine gute Probenahme zeichnet sich also dadurch aus, dass sie einerseits hinreichend schnell ist um originalgetreue Messdaten zu erzeugen. Andererseits muss sie aber auch die Zellen vom extrazellulären Milieu abtrennen, so dass keine Störsignale vermessen werden.

In der Literatur finden sich viele unterschiedliche Beispiele dafür, wie versucht wird die obigen Ziele zu erreichen. Prinzipiell ist hierbei zu unterscheiden, ob es sich um die Analyse mehrerer Zellen handelt oder um einzelne Zellen. Die Betrachtung mehrerer Zellen hat den Vorteil, dass hierbei größere Stoffmengen an zu analysierenden Metaboliten erzeugt werden und die nachgeschaltete Analytik hierdurch mit Blick auf die Nachweisbarkeit von Metaboliten entlastet wird. In bisher veröffentlichten Arbeiten wird beispielsweise eiskaltes Methanol eingesetzt um Zellen erfolgreich zu quenchen (Sellick, Croxford et al. 2011). Diese Methode wird nicht nur bei Säugerzellen eingesetzt, sondern auch bei Studien mit bakteriellen und Hefesystemen. Allerdings wurde im Zusammenhang mit dieser Methode von Leakage-Phänomenen, also dem unkontrollierten Verlust von zellulären Metaboliten, berichtet (Canelas, Ras et al. 2008). Aus diesem Grund wurden bereits der Einfluss von verschiedenen Komponenten wie HEPES und Ammonium-Bicarbonat und der Osmolarität untersucht (Sellick, Hansen et al. 2009). Alternativ wird auch auf eiskalte Phosphat-gepufferte Salinelösungen zurückgegriffen um Zellen zu quenchen (Wahrheit, Niklas et al. 2011; Kronthaler, Gstraunthaler et al. 2012). Ein anderer Weg um den Stoffwechsel von Zellen abzustoppen

besteht darin mittels Hitze einwirkung jegliche Enzymaktivität zu beenden. Dies kann zum Beispiel über gezielt aufgebrachte heiße Luft erfolgen (Maier, Hofmann et al. 2008) oder über eine Heizwendel durch die die Zellsuspension gepumpt wird (Schaub, Schiesling et al. 2006). Demgegenüber besteht die Möglichkeit die Zellsuspension in einem Wärmetauscher gezielt abzukühlen (Wiendahl, Brandner et al. 2007).

Sofern es sich um adhären wachsende Zellen handelt, ist es ausreichend den Medienüberstand zu verwerfen um die Zellen anschließend mit der Quenching-Lösung zu behandeln (Teng, Huang et al. 2009). Bisweilen wird hierzu auch direkt flüssiger Stickstoff auf die Kulturplatten gegeben (Kennedy, Lorenz et al. 2011). Gegebenenfalls werden die Zellen noch von der Wachstumsfläche entfernt (Dettmer, Nurnberger et al. 2011). Der Aufwand der betrieben werden muss um Suspensionszellen vom umgebenden Medium zu trennen, ist hingegen größer und somit zeitintensiver. Eine einfache Methode besteht darin die gequenchten Zellen abzuzentrifugieren (Pabst, Grass et al. 2010). Ansätze zur schnellen Filtration finden ebenso weite Verbreitung (Bolten and Wittmann 2008; Volmer, Northhoff et al. 2010; Bort, Shanmukam et al. 2014). Da hierbei in einem Schritt gequench und gewaschen werden kann, sparen diese Ansätze Zeit bei der Probenahme. Allerdings kommen hierbei die Filtermembranen mit den zu extrahierenden Metaboliten in Kontakt, so dass es zu unerwünschten Wechselwirkungen kommen kann (Rabinowitz and Kimball 2007). Aus diesem Grund werden vermehrt Borosilicat-Membranen für Filtrationsansätze eingesetzt (Volmer, Northhoff et al. 2010; Bort, Shanmukam et al. 2014).

Ein wichtiger Aspekt bei der Probenahme ist die Integrität der Zellen. Da eukaryotische Zellen wesentlich größer als die meisten prokaryotischen Zellen sind, weisen sie verglichen mit diesen auch ein größeres Volumen-Membranfläche-Verhältnis auf. Dies macht sie gegenüber Schereinflüssen besonders anfällig. Da die Zellen durch die Probenahme auf unterschiedliche Art und Weise beansprucht werden können, muss sichergestellt werden, dass die Zellen hinreichend intakt sind. Für Säugerzellen bedingt dies, dass die Probenahme schonender stattfinden muss als bei Prokaryoten. Um dies zu überprüfen müssen Messsignale vorliegen, die ausschließlich auf intrazellulären Markern beruhen. Ein oft genutzter Ansatz ist die Vermessung der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität (Wiendahl, Brandner et al. 2007; Ivanova and Uhlig 2008; Volmer, Northhoff et al. 2010; Bahnemann 2014). Dieses Enzym kommt ausschließlich im Cytosol vor und ist somit ein Indikator für die strukturelle Unversehrtheit der Zellen. Sofern weitere Organellen untersucht werden sollen, muss eine Betrachtung zusätzlicher Mar-

kerenzyme, wie beispielsweise der Glutamin- oder Malat-Dehydrogenase für Mitochondrien (Rajapakse, Shimizu et al. 2001; Niklas, Melnyk et al. 2011), erfolgen. Bei der Verwendung von Marker-Enzymen zur Beurteilung von Organell-Integritäten ist darauf zu achten, dass die Versuchsbedingungen die Enzymaktivität nicht beeinträchtigen (Kendig and Tarloff 2007).

All die hier dargestellten Methoden der Probenahme für Metabolomuntersuchungen haben gemein, dass sie die Kompartimentierung von Säugerzellen nicht in Betracht ziehen. Während die subzelluläre Metabolomanalyse bei Pflanzenzellen weit verbreitet ist, gilt dies nicht für Säugerzellen. Die bei Untersuchungen von Pflanzenzellen oft genutzte nicht-wässrige Fraktionierung (Winter, Robinson et al. 1994; Farre, Fernie et al. 2008; Nadwodnik and Lohaus 2008; Masakapalli, Le Lay et al. 2010) ist bei Säugerzellen nicht anwendbar. Verfügbare Methoden zur Dichtegradient-basierten Isolierung von Organellen (Madden and Storrie 1987; Rajapakse, Shimizu et al. 2001; Aubry and Klein 2006) erlauben zwar eine Isolierung der gewünschten Kompartimente, sind jedoch zu zeitintensiv um die Probenbehandlung im nicht-gekühlten wässrigen Milieu durchzuführen. Eine Fraktionierung von Zellen ist auch mittels spezieller, lab-on-a-chip Geräten möglich die z.B. die Zellen mittels Elektrolyse aufschließen und die Organellen trennen (Lu, Schmidt et al. 2005), allerdings gelten hier dieselben Einschränkungen. Ebenso wurden mikrofluidische Ansätze veröffentlicht, bei denen Zellen durch Mikromesser gespült wurden um die mitochondriale Fraktion freizulegen (Wurm and Zeng 2012). Einen völlig anderen Weg beschreiten Ansätze die auf dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) beruhen. Hierbei werden die Zellen modifiziert um Markermoleküle zu exprimieren, die bei der hochspezifischen Bindung an ihre Zielmoleküle ein messbares FRET-Signal erzeugen. Über das Einbringen organell-spezifischer trafficking-Signale können die Markermoleküle somit gezielt in die Organellen der Zellen dirigiert werden. Mit dieser ausgefeilten Methodik konnten bereits Einblicke in die Zelle auf subzellulärem Level gewonnen werden (Imamura, Nhat et al. 2009; Bermejo, Haerizadeh et al. 2010; Okumoto 2010; Hou, Takanaga et al. 2011; Kioka, Kato et al. 2014; Stangherlin, Koschinski et al. 2014). Auch wenn diese Methode derzeit am erfolgversprechendsten erscheint, weist sie einen Nachteil auf. Um die Zellen untersuchen zu können, müssen sie zwangsläufig modifiziert werden. Hierbei muss für jeden zu untersuchenden Metaboliten ein eigenes Markermolekül exprimiert werden. In wie fern die Untersuchungsergebnisse dieser artifiziellen Zellen auf die ursprünglichen Zellen übertragbar sind, ist noch unklar.

### 3.3.2 Aufarbeitung und Extraktion von Metabolomproben

Die Aufarbeitung der Metabolomproben hat zum Ziel die in den gequenchten Zellen befindlichen Metabolite zugänglich zu machen. Hierbei ist es essentiell, dass das eingesetzte Extraktionsverfahren keine Beeinflussung der Metabolite in der Probe bewirkt. Wie in 3.3.1 beschrieben kann es zu einer Interaktion der Extraktionsmittel mit den Proben und dem zur Probenahme genutzten Equipment kommen. Darüber hinaus muss sichergestellt werden, dass durch eventuelle enzymatische Restmengen keine Umwandlung von nachzuweisenden Metaboliten erfolgt. Aus diesem Grund werden die Proben während der Extraktion entweder gekühlt und mit organischen Lösungsmitteln extrahiert oder es werden hohe Temperaturen eingesetzt um die Enzyme zu denaturieren. Das zu analysierende Metabolitspektrum variiert je nachdem welcher Stoffwechselweg untersucht wird und kann von polaren Substanzen wie phosphorylierte Zucker oder Nukleotide bis zu unpolaren Fettsäuren reichen. Aus diesem Grund muss das eingesetzte Extraktionsmittel der Polarität der Zielmetabolite angepasst werden (Wurm, Schopke et al. 2010).

Mit der Wahl des geeigneten Extraktionsmittels befassen sich etliche Publikationen. Maßgeblich handelt es sich hierbei um organische Lösungsmittel, allerdings finden sich auch Ansätze mit Perchlorsäure oder heißem Wasser. In Abhängigkeit der zugrunde liegenden Probenmatrix liefern diese Ansätze unterschiedliche Ergebnisse. Lin et al haben gezeigt, dass organische Lösungsmittel wie Acetonitril und Methanol sowie Methanol-Chloroform ähnliche Wiederfindungen für niedermolekulare Metabolite ergeben, Perchlorsäure hingegen jedoch zu starken Varianzen unter den Replikaten führt (Lin, Wu et al. 2007). Für die Extraktion von Aspergillus-Kulturen hingegen erwies sich ein 50 prozentiges Acetonitril-Wasser-Gemisch bei 70 °C als vorteilhaft (Tokuoka, Sawamura et al. 2010). Auch bei der Extraktion von Super-CHO Zellen erwies sich ein, in diesem Fall eiskaltes, 50 prozentiges Acetonitril-Wasser-Gemisch als überlegen gegenüber Extraktionen mit verschiedenen temperierten Methanol- sowie Ethanol-Wasser Gemischen und Perchlorsäuren bzw. KOH-Lösungen (Dietmair, Timmins et al. 2010). Hierbei ist weiterhin zu unterscheiden, dass die Wasser-Gemische bessere Ergebnisse ergeben als die reinen Lösungsmittelansätze. Bei der Untersuchung von adhären-ten SW480-Zellen lieferte die Wahl von Aceton als Extraktionsmittel die geringste Extraktionseffizienz während Methanol, Methanol-Wasser und Methanol-Isopropanol-Wasser-Gemische vergleichbare Ergebnisse lieferten (Dettmer, Nurnberger et al. 2011). Bei der Extraktion von CHO-Zellen haben Sellick et al gezeigt, dass im Vergleich mit kaltem Methanol, heißem Ethanol, Methanol-Chloroform, KOH sowie Perchlorsäure die Extraktion

heißem Ethanol, Methanol-Chloroform, KOH sowie Perchlorsäure die Extraktion mit reinem Methanol gefolgt von einer Wasserextraktion die besten Ergebnisse erzielte (Sellick, Knight et al. 2010). Insbesondere bei den Hitze-basierten Verfahren wurde deutlich, dass die Wiederfindung von Temperatur-sensitiven Metaboliten hierbei negativ beeinflusst wurde und dies für die weitere Datenauswertung zu berücksichtigen ist. Bei der Untersuchung des Extraktionsverfahrens in MDCK- sowie Vero-Zellen wurde von Ritter et al die Eignung von Perchlorsäure, heißen wie kalten Methanol-Wasser-Gemischen, heißem Ethanol, Ameisensäure und Acetonitril überprüft (Ritter, Genzel et al. 2008). Hierbei zeigte sich das Methanol-Wasser-Gemisch überlegen, nach einem zusätzlichen Fällungsschritt mit Chloroform konnten die Wiederfindungen abermals verbessert werden.

Bei Ansätzen, die eine Filtrations-basierte Probenahme in CHO-Zellen nutzen, wurde die Extraktion mit Methanol bzw. Methanol-Chloroform-Gemischen durchgeführt (Volmer, Northoff et al. 2010; Bort, Shanmukam et al. 2014; Pfizenmaier, Matuszczyk et al. 2014). Neben der Wahl des geeigneten Lösungsmittels, ist auch das korrekte Wasser-Lösemittel-Verhältnis ausschlaggebend für die Güte der Extraktion (Kimball and Rabinowitz 2006).

Wie die hier aufgeführten Publikationen zeigen, ist es offensichtlich schwierig ein universell gültiges Extraktionsmittel zu finden, dass für alle Zelltypen und Kultivierungsarten optimale Ergebnisse liefert. Somit ist es unerlässlich die eigene Extraktionsmethode auf ihre Eignung für das gewählte Metabolitspektrum und der zugrunde liegenden Probenmatrix zu untersuchen. Ein geeignetes Mittel hierzu ist die Berechnung der Wiederfindung. Hierzu können drei Sätze von Proben erzeugt werden. Der erste umfasst die regulären Proben. Im zweiten wird dem Probensatz eine definierte Menge eines ausgewählten Metabolitmixes zugegeben. Der dritte Satz von Proben besteht aus reinen Standards des Metabolitmixes. Vergleicht man nun die ermittelten Metabolitmengen aus den Sätzen 1 und 3 und setzt sie zu den Werten des Satzes 2 in Relation, so lässt sich bestimmen welcher Anteil der Metabolite aufgrund der biologischen Matrix verloren ging. Je nach zugrunde liegender Fragestellung gibt es verschiedene Herangehensweisen an die Ermittlung der Wiederfindung (Chambers, Wagrowski-Diehl et al. 2007; Vielhauer 2011). Darüber hinaus bietet die bereits in 3.3.1 erwähnte Adenylat-Energieladung ein gutes Maß um zu überprüfen, ob während der Probenextraktion enzymatische oder thermisch bedingte Umwandlungen von phosphorylierten Nukleotiden erfolgen (Ritter, Genzel et al. 2008). Die Autoren haben darüber hinaus ausgewählte Poolgrößen sowie die Abreicherung von Nukleotid und Proteinen als Bewertungskriterium be-



trachtet. Ausgewählte Poolgrößen sowie die Anzahl der identifizierten Metabolite in Abhängigkeit der Extraktionsmittel wurden auch von Sellick et al als Kriterium genutzt (Sellick, Knight et al. 2010). De Val et al haben hingegen gezielt den Abbau von ausgewählten Metaboliten während der Probenaufarbeitung betrachtet um die Eignung der Extraktionsmethode zu bewerten (de Val, Kyriakopoulos et al. 2013).

### 3.3.3 Quantifizierung von Metabolomproben

Die quantitative Analyse von Metabolomproben erfordert, wie in 3.3.2 dargestellt, hinreichend sorgfältig aufgearbeitete Proben. Hierzu ist es unverzichtbar, dass Komponenten der biologischen Matrix, wie Debris und Enzyme, abgereichert werden, damit die Analyse-Instrumente nicht beeinträchtigt und verschmutzt werden und keine weiteren enzymatischen Umwandlungen in den Proben erfolgen. Während dies bei größeren Membranfragmenten durch Zentrifugation gut zu realisieren ist, erfordert die Enzymabreicherung die bereits erwähnten Fällungsschritte, beispielsweise mit Chloroform. Weite Verbreitung finden (hochleistungs)flüssigkeitschromatographische, gaschromatographische Methoden sowie daran gekoppelte massenspektrometrische Methoden. HPLC-basierte Messverfahren werden beispielsweise genutzt um Nukleotide wie ATP, NAD, FAD, GTP zu analysieren. Diese werden anhand von reverse-Phase Chromatographien aufgetrennt (Bhatt, Chen et al. 2012; Contreras-Sanz, Scott-Ward et al. 2012; Studzinska and Buszewski 2013), die Quantifizierung kann dann mittels UV- Detektoren erfolgen. Aminosäuren können ebenfalls recht einfach mittels reverse-Phase Chromatographien quantifiziert werden (Bartolomeo and Maisano 2006; Buha, Panchal et al. 2011), allerdings erfordert die Detektion mit einem UV- bzw. Fluoreszenz-Detektor eine vorangegangene Derivatisierung mit ortho-Phtaldialdehyd und 9-Fluoronylmethyl-Chloroformat. Auch organische Säuren sind über HPLC-Analysen zugänglich und können beispielsweise per Brechungsindex vermessen werden (Ehrlich, Goerlitz et al. 1981; Ross Fischer and Chapital 1987). Sobald größere Metabolitspektren analytisch abgedeckt werden müssen und die zu erwartenden Analytkonzentrationen abnehmen, kommen rein chromatographisch basierte Analysemethoden an ihre Grenze. In diesem Fall kann auf massenspektrometrische Analysen zurückgegriffen werden.

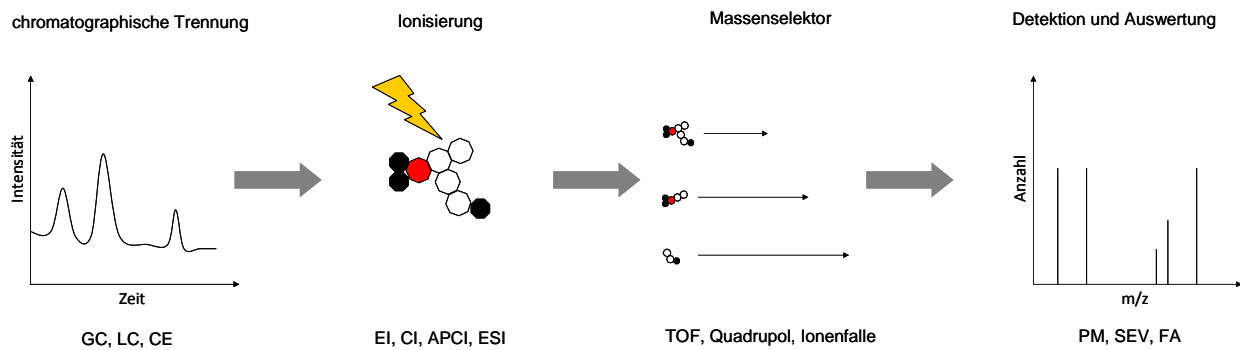


Abb. 4: schematische Darstellung der Funktionsweise einer chromatographisch gekoppelten Massenspektrometrie-Analyse. Zunächst erfolgt eine chromatographische Trennung des Analytgemisches. Anschließend werden die Einzelsubstanzen ionisiert und im Massenselektor aufgetrennt. Im Detektor werden die Ionen detektiert und die Ursprungsanalyte anhand der charakteristischen Masse-Ladungsverhältnisse identifiziert.

Wichtig für massenspektrometrische Analysen von Metabolomproben sind zuverlässige Abtrennungen von Salzresten aus der Probe, da diese die Ionisierung negativ beeinflussen können und die Quelle langfristig verschmutzen was die Geräteperformance mindert (Dettmer, Aronov et al. 2007; Wurm, Schopke et al. 2010).

Gaschromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie-Techniken (GC-MS) sind bereits seit einigen Jahrzehnten bekannte und genutzte Methoden zur Vermessung von Proben (Gohlke 1959; Gohlke 1962). Sie setzen jedoch voraus, dass die Proben in die Gasphase gebracht werden. Aus diesem Grund müssen die Proben entsprechend vorbehandelt werden, nicht-polare Metabolite erfordern daher mindestens einen Derivatisierungsschritt (Robards, Haddad et al. 1997) während polare Metabolite zweimal derivatisiert werden müssen (Fiehn, Kopka et al. 2000; O'Hagan, Dunn et al. 2005). Problematisch kann die notwendige Derivatisierung werden, wenn diese aufgrund sterischer Beeinträchtigung in sehr großen Molekülen nicht vollständig erfolgt (Buscher, Czernik et al. 2009). Anwendbar sind GC-MS Analysen beispielsweise bei der Untersuchung von Fettsäuren (Zelles and Bai 1993; Escobar-Morreale, Samino et al. 2012; Lv and Yang 2012), sowie bei der Analyse von organischen Säuren (Jensen, Joseph et al. 2006; Hofmann, Maier et al. 2008) und Aminosäuren (Dauner and Sauer 2000; Nasution, van Gulik et al. 2008).

Kapillar-Elektrophorese-gekoppelte Massenspektrometrie-Techniken (CE-MS) eignen sich für die Analyse von geladenen und polaren Analyten und bieten eine sehr hohe Auflösung (Barbas, Morares et al. 2011). Hierbei werden die Analyte beim Durchwandern einer geladenen Kapillare aufgrund des elektroosmotischen Flusses getrennt. Mit dieser Technik können

Aminosäuren, organische Säuren und Zucker sowie Nukleotide aber auch Vitamine gemessen werden (Soga, Ohashi et al. 2003; Zhang, Sun et al. 2012)

Die Kopplung der Massenspektrometrie an die Flüssigchromatographie wird ebenfalls intensiv genutzt für die Analyse von Metabolomproben. Hierbei können sowohl Normalphase- als auch reverse-Phase und HILIC-Säulen eingesetzt werden. Während Normalphase-Säulen beispielsweise bei der Untersuchung von Sekundärmetaboliten von Pflanzen eine Rolle spielen (Lei, Huhman et al. 2011), sind insbesondere HILIC-Anwendungen bei der Analyse von Metabolom-Proben in Bakterien und tierischen Zellen weit verbreitet (Bi, Krausz et al. 2013; Guerasio, Haberhauer-Troyer et al. 2014; Teleki, A. et al. 2014).

Bezüglich der zu bevorzugenden Messplattform wurden intensive Untersuchungen durchgeführt. Büscher et al haben die Eignung verschiedener Plattformen für 91 Metabolite, die den gesamten Zentralstoffwechsel von Glykolyse über Pentose-Phosphat-Weg, Citrat-Zyklus, Redox-Stoffwechsel bis hin zu Aminosäuren und Nukleotide abdecken, untersucht (Buscher, Czernik et al. 2009). Sie kamen zu der Erkenntnis, dass für die Untersuchung des Zentralstoffwechsels Flüssigchromatographie-gekoppelte massenspektrometrische Untersuchungen aufgrund ihrer Robustheit und der Abdeckung des Metabolitspektrums geeignet sind. Idealerweise werden diese Messungen durch Gaschromatographie-gekoppelte massenspektrometrische Messungen ergänzt. Kapillar-elektrophoretische Untersuchungen bieten im Vergleich zu den genannten Ansätzen weniger Vorteile, da sie diese im Auftrennungsvermögen und der Sensitivität nicht übertreffen dafür aber weniger robust sind. Die Autoren empfehlen für die Analytik großer, polarer Substanzen flüssigkeitsbasierte Chromatographiemethoden während kleinere, stabile Moleküle wie Aminosäuren, organische Säuren und Fettsäuren idealerweise mit gaschromatographischen Ansätze untersucht werden.

Unabhängig davon welche MS-Plattform für die Analyse der Proben gewählt wird, ist es notwendig Matrixeffekte in den Proben zu kompensieren. Diesen kann man mit der Isotopen-Verdünnungsmassenspektrometrie (IDMS) begegnen. Diese Technik zielt darauf ab den Proben eine definierte Menge  $^{13}\text{C}$ -markierter Substanzen beizumengen. Da potentielle Degradationseffekte in den Proben sowohl die  $^{12}\text{C}$ - als auch die  $^{13}\text{C}$ -Analyte betreffen und davon ausgegangen werden kann, dass dieser Effekt für beide Spezies gleich ausgeprägt ist, kann über eine Auswertung des Quotienten der Messsignale von  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Analyte der Einfluss von Matrixeffekten egalisiert werden. Trägt man das Verhältnis von  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Signal gegen die Analytkonzentration des  $^{12}\text{C}$ -Standards auf, so kann anhand der resultierenden Kalibrierkur-

ve die Analytkonzentrationen in jeder Probe berechnet werden, der bei der Probenvorbereitung  $^{13}\text{C}$ -Standard zugegeben wurde. Abb. 5 zeigt exemplarisch wie das  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Signal für die Auswertung genutzt werden kann. In der Praxis finden  $^{13}\text{C}$ -gelabelte Zell- und Algenextrakte Verwendung (Wu, Mashego et al. 2004; Cipollina, ten Pierick et al. 2009; Vielhauer 2011). Diese haben den Vorteil, dass nicht für jeden Analyten ein eigener Standard erworben werden muss.

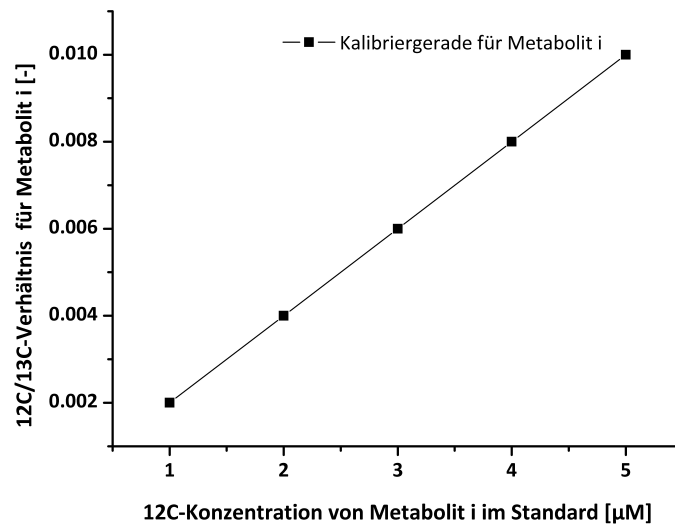


Abb. 5: exemplarische Darstellung der Auswertung von  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Signalen bei der IDMS-Analytik. Hierzu wird der Quotient aus dem  $^{12}\text{C}$ - und dem  $^{13}\text{C}$ -Signal gebildet und gegen die bekannten  $^{12}\text{C}$ -Konzentrationen im Kalibrierstandard aufgetragen. Die resultierende Kalibriergerade ermöglicht eine Quantifizierung des Zielanalyten in den unbekanntenen Proben.

Da die Analyse und Identifizierung im Massenspektrometer auf den resultierenden Masse-Ladungsverhältnissen beruht und diese abhängig sind von der Art der Ionisierung ist es notwendig entsprechende Datenbanken zur Verfügung zu haben um unbekannte Analyte zu identifizieren. Neben den proprietären Software-Paketen, die mit den Anlagen zur Verfügung gestellt werden, gibt es weitere Datenbanken. Diese sind zum Teil Plattform-spezifisch (Kopka, Schauer et al. 2005; Tautenhahn, Cho et al. 2012), differenzieren allerdings auch nach Organismen (Wishart, Jewison et al. 2012; Guo, Jewison et al. 2013).

### 3.3.4 Auswertung metabolischer Daten

Nach erfolgreicher Vermessung der Metabolitproben und der Quantifizierung der darin befindlichen Stoffwechselprodukte erfolgt die Auswertung der erhaltenen Daten. Zunächst einmal ist es erforderlich die Komplexität der Probenaufarbeitung zu berücksichtigen. Mit jedem eingebrachten Wasch-, Fällungs- sowie Einengungsschritt werden die Konzentrationen in den Proben verändert. Um die analytisch bestimmten Stoffmengen korrekt rückrechnen zu können, müssen sämtliche Volumenänderungen während der Extraktion und der Probenvorbereitung für die Analytik festgehalten werden. Dieses um die Probenvorbereitung bereinigte Datenset kann nun mit verschiedenen mathematischen Verfahren ausgewertet werden. Methoden wie *principal component analysis* (PCA) und multivariate Datenanalyse (MVDA) eignen sich dazu um in den erhobenen Metabolom-Daten Muster aufzudecken. Schaub et al nutzten diese Methode um eine Prozessintensivierung basierend auf Metabolom-, Fluxom- und Flussdaten durchzuführen (Schaub, Clemens et al. 2011). Für die metabolische Charakterisierung des Zustandes der Überproduktion in NS0-Zellen nutzen Khoo et al ebenfalls PCA-Auswertungen von intrazellulären Metabolit-Daten (Khoo and Al-Rubeai 2009). In MDCK Zellen haben Cao et al ebenfalls mittels PCA intrazelluläre Metabolit-Daten analysiert um metabolische Markersubstanze zu identifizieren (Cao, Wang et al. 2011). Sofern die Metabolit-Level bestimmten Organellen zugeordnet werden sollen, stellt sich das Problem welche organellären Marker bei den Analysen benutzt werden können. Unabhängig davon wie die eigentliche Probenahme beschaffen ist um Zugang zu den Zellorganellen zu erhalten, muss für die gewählten Markersubstanzen folgendes gelten

- sie dürfen im Aufarbeitungsprozess nicht beschädigt werden,
- sie müssen in den Organellen in ausreichender Form vorliegen,
- sie müssen mit den zur Verfügung stehenden Methoden gemessen werden können.

Für Organellaufreinigungen wird in der Literatur auf enzymatische und proteinogene Markersubstanzen zurückgegriffen. So nutzten Hornig-Do et al verschiedene Proteine um zwischen dem Zytoskellet ( $\beta$ -Actin), dem Cytosol (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), den Golgi-Apparat (Golgin-97), dem Endosom (Rab4), den Mitochondrien (TOM22, COXi) und dem endoplasmatischen Retikulum (KDEL) sowie dem Nukleus (Lamine) (Hornig-Do, Gunther et al. 2009) zu unterscheiden. Zur gezielten Aufreinigung von Granula und Plasmamembra-

nen haben Nießen et al Magnetkugel-gekoppelte Antikörper gegen LAMP2 bzw. GPIIb/GPIIIb genutzt (Niessen, Jedlitschky et al. 2007). Michelsen et al schlagen für die Zuordnung der Organellen folgende Marker vor: Nukleus (DNA, RNA), Mitochondrien (CytochromC Oxidase, Succinat Dehydrogenase), Lysosom ( $\beta$ -Galaktosidase), Endosom (Peroxidase), Golgi-Apparat (Galactosyl-Transferase), Zytosol (Laktatdehydrogenase) (Michelsen and von Hagen 2009). Niklas et al analysierten die Enzymaktivitäten von Laktatdehydrogenase, Glutamatdehydrogenase, Malat-Dehydrogenase sowie von Iso-Citrat-Dehydrogenase, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Fruktose-1,6-bisPhosphatase um den Aufschluss von Zellen und die Integrität von Mitochondrien quantitativ bewerten zu können (Niklas, Melnyk et al. 2011). Die hier dargestellten Markerenzyme bzw. -proteine sind zwar organellspezifisch, dennoch eignen sie sich nur bedingt dazu organellspezifische Metabolomuntersuchungen zu unterstützen, indem sie zur Integritätsbestimmung der Zielorganellen eingesetzt werden. Wie in 3.3.1 und 3.3.2 dargestellt, basiert ein Großteil der Probenahme- und Extraktionstechniken darauf organische Lösemittel einzusetzen. Dies führt dazu, dass die organellspezifischen Signale nach erfolgter Probenaufbereitung nicht mehr ausgewertet werden können. Somit werden Marker benötigt, die diese Aufarbeitungsschritte überstehen. Idealerweise handelt es sich dann dabei selbst um Metabolite. Bisher dominieren in der Literatur jedoch Studien, die auf Enzyme als Marker zurückgreifen. Dies liegt sicherlich auch daran, dass die in 3.1.1 beschriebene Kompartimentierung ursächlich dafür ist, dass nur sehr wenige Metabolite Organellspezifisch vorkommen und deren Quantifizierung hohe Anforderungen an die Sensitivität der Messung stellt. Dennoch wurde aus den genannten Vorteilen metabolischer Marker in der vorliegenden Arbeit auf ebendiese zurückgegriffen und die Kompartiment-spezifische Analyse durchgeführt.

#### 4. Material und Methoden

##### 4.1 Generierung einer Arbeitszellbank und Adaption an ein CD-Medium

In dieser Arbeit wurde eine CHO-DP12 Zelllinie verwendet (CRL-12445, Fa. ATCC). Bei Auslieferung wächst die Zelle adhärent in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (30-2002, Fa. ATCC) supplementiert mit 200 nM Methotrexat (454125, Fa. Calbiochem), 0.002 mg·mL<sup>-1</sup> rekombinantem Insulin, 10 % fötalem Kälberserum (S0615, Fa. Biochrome) sowie jeweils 0.1 % Trace A und Trace B (Fa. Cellgro).

Das Kryo-Vial wurde aufgetaut und in eine 25 cm<sup>2</sup>-T-Flasche (Fa. Corning) mit 10 mL vorgelegtem Medium gegeben. Die Zellen wuchsen über Nacht im CO<sub>2</sub>-Inkubator (Fa. Thermo Fisher) an, am Folgetag wurden das Medium verworfen die Zellen zweimal mit 37 °C warmen 5 mL CMF-PBS gewaschen und mit 1 mL 0.25 % EDTA/Trypsin-Lösung (59428C, Fa. Sigma-Aldrich) von der Oberfläche gelöst. Der Ablösevorgang wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und durch die Zugabe von 2.7 mL Medium abgestoppt. Die Zellen wurden anschließend auf 75 cm<sup>2</sup>-T-Flaschen (Fa. Corning) mit einer Animpfzelldichte von 0.5·10<sup>5</sup> Zellen·mL<sup>-1</sup> expandiert. Die Adaption erfolgte indem ein Aliquot der Zellsuspension nach dem Trypsinieren entnommen und 5 min bei 300g abzentrifugiert (Megafuge 1.0, Eppendorf) wurde. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 5 mL 37 °C warmen CMF-PBS gewaschen und in einen 125 mL Schüttelkolben (Fa. Corning) überführt. Das Arbeitsvolumen betrug 50 mL, als CD-Medium wurde TC-42 (Fa. Teutocell) mit 4 mM Glutamin (G8540, Fa. Sigma Aldrich) und 200 nM Methotrexat eingesetzt. Die Adaption wurde über 31 Passagen durchgeführt und erst beendet als die Kulturen Lebendzellichten von mindestens 10<sup>7</sup> Zellen·mL<sup>-1</sup> erreichten bei einer Viabilität von 99 %. Diese Zellen wurde als Arbeitszellbank nach 4.2 eingefroren und für die späteren Experimente genutzt.

##### 4.2 Erstellen und Auftauen von Kryokulturen

Die Kryovials wurden der Arbeitszellbank entnommen und aufgetaut. Der Inhalt eines Vials wurde in 9 mL 37 °C warmen TC-42-Medium, supplementiert mit 200 mM Glutamin und 200 nM Methotrexat, aufgenommen und für 5 min bei 300g zentrifugiert. Das Animpfen erfolgte in 125 mL Schüttelkolben (Fa. Corning) mit einem Arbeitsvolumen von 25 mL voll supplementiertem TC-42-Medium. Ausgehend hiervon wurden die Vorkulturen weiterpassagiert.

Zum Einfrieren von Zellen wurde Zellsuspension für 5 min bei 300g zentrifugiert und das Pellet in einem entsprechenden Volumen 4 °C kaltem und DMSO-haltigem (D2650, Fa. Sigma Aldrich) Kryomedium aufgenommen. Die Zusammensetzung des Kryomediums ist in Tab. 3 angegeben. Pro Kryovial wurden  $10^7$  Zellen in 1 mL Kryomedium eingefroren. Die Kryovials wurden in einem auf 4 °C kaltem Einfriercontainer (Fa. Nalgene) mit einem Temperaturgradienten von  $1\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$  über Nacht bei -70 °C eingefroren. Im Anschluss erfolgte ein Transfer in die Gasphase des Stickstoffturms, in dem die Kulturen bis zum Gebrauch lagerten.

Tab. 3: Zusammensetzung des Kryomediums

Komponente	Konzentration
TC-42	-
Glutamin	4 mM
Methotrexat	200 nM
DMSO	10 % (v/v)

#### 4.3 Kultivierung im unregelmäßigem System

Die in 4.1 aufgetauten Zellen wurden im Rahmen des Vorkulturhandlings in einem 2-2-3-Tagesrythmus auf jeweils  $4\cdot 10^5$  Zellen $\cdot\text{mL}^{-1}$  ausverdünnt. Kultiviert wurde in 125 bzw. 250 mL Schüttelkolben (Fa. Corning) mit einem Arbeitsvolumen von 50 bzw. 100 mL vollsupplementiertem TC-42. In Tab. 4 sind die Kultivierungsparameter des Minitron-Schüttelinkubators (Fa. Infor HAT) angegeben. Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Schüttelkulturen als Vorstufen der Bioreaktorkultivierungen und zur Erzeugung von Arbeitszellbanken genutzt.

Tab. 4: Kultivierungsparameter des Schüttelinkubators

Parameter	Wert	Einheit
Temperatur	37	°C
Drehzahl	150	rpm
Auslenkung	5	cm
pCO <sub>2</sub>	5	%



#### 4.4 Kultivierung im geregelten System

Die Bioreaktorkultivierungen erfolgten in einem parallelen DASGIP-Bioreaktorsystem. Dieses bestand aus den in Tab. 5 genannten Modulen. Die Anlage wurde je nach Bedarf im Einfach- oder Parallelbetrieb genutzt. Das Arbeitsvolumen betrug in der Regel 1 L. Die Reglereinstellungen sind in Tab. 6 aufgetragen. Darüber hinaus sind die Sollwerte angegeben. Die Reaktoren wurden mit exponentiell wachsenden Vorkulturen angeimpft. Die Inokulationsdichte betrug  $4 \cdot 10^5$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ . Wie bei den Vorkulturen wurde mit 200 nM Metothrexat und 200 mM Glutamin kultiviert. Das Animpfen erfolgte mittels einer mit einer Olive versehenen 1 L-Schottflasche, die unter der Sterilbank mit Medium und Vorkultur befüllt wurde und über einen Schlauch steril mit dem Reaktor verbunden war.

Tab. 5: Module und Komponenten des DASGIP-Bioreaktorsystems

Komponente	Typ
T	DASGIP Bioblock, TC4SC4
Agitation	TC4SC4
pH	PH4PO4, MX4/4
DO	PH4PO4, MX4/4
Pumpen	MP4
Reaktor	DS1500DSS

Tab. 6: Reglereinstellungen des DASGIP-Bioreaktorsystems

Regler	Reglereinstellung	Sollwert
pH	P=25, Ti=3600 sec, PresetOverlay=True, AutoResetY=False	7.1
DO	P=0.1, Ti=300 s	40 %
Begasung	min= 3 sL, max 5 sL, Kaskade	variabel
N	Pwr.SP=75 %	150 rpm
T	P=15, Ti=1800 sec	37 °C

#### 4.5 Bestimmung der Kultivierungsparameter

Zur Probennahme wurden über den Probennahmeport des Bioreaktors mit 5 – 20 mL LuerLock®-Spritzen (Fa. Braun) 3 mL Vorlauf steril entnommen. Dieser wurde verworfen und ein für die jeweiligen Zwecke geeignetes Volumen Zellsuspension entnommen. Für Filtrationen lag dieses zwischen 2 und 12 mL, wurden nur die extrazellulären Metabolite gemessen

reichten 5 mL aus. Eine Abtrennung der Zellen im Überstand erfolgte mittels Zentrifugation für 5 min bei 400g. Die Überstände wurden bei -70 °C bis zur weiteren Messung gelagert.

#### 4.5.1 Lebendzelldichte und Viabilität

Zur Bestimmung der Lebendzelldichte im Cedex XS (Fa. Roche) wurden 50 µL der entnommenen Probe mit 50 µL Trypan-Blau Lösung (T8150, Fa. Sigma Aldrich) gefärbt. Anschließend wurden 10 µL der gefärbten Zellen in eine Kammer der Cedex Slides (Fa. Roche) gegeben und vermessen, für die Kultivierungen wurden immer Triplikate vermessen. Wenn Zelldichten größer  $10^7$  Zellen·mL<sup>-1</sup> auftraten, wurden die Proben entsprechend mit CMF-PBS verdünnt.

#### 4.5.2 Glukose- und Laktat-Bestimmung

Die Bestimmung der Glukose- und Laktatkonzentrationen im zellfreien Kulturüberstand erfolgte mit Hilfe eines LaboTrace® (Fa. TRACE Analytics). Hierzu wurde eine entsprechende Verdünnung in destilliertem Wasser hergestellt und 20 µL davon in die mit Puffer gefüllten Probengefäße gegeben. Die Messung erfolgte durch ein amperometrisches Verfahren basierend auf membrangebundenen Glukose- sowie Laktatperoxidasen. Die zulässigen Messbereiche lagen für Glukose bei 0.11 – 9.1 g·L<sup>-1</sup>, für Laktat bei 0.045 – 2.7 g·L<sup>-1</sup>.

#### 4.5.3 Glutamin-Bestimmung zur Festlegung der Prozessphase

Die Festlegung der Prozessphasen anhand der im Medium verfügbaren Menge an Glutamin wurde mittels eines YSI2700 (Fa. Yellow Springs Instruments) durchgeführt. Die Messung erfolgt durch Membran-gebundene Enzyme anhand eines amperometrischen Verfahrens. Zellfreier Kulturüberstand wurde gemäß dem zulässigen Messbereiches des Gerätes mit destilliertem Wasser verdünnt und in 1.5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen vermessen.

#### 4.5.4 Bestimmung der Ammoniumkonzentration im Kulturüberstand

Zellfreier Kulturüberstand wurde mit dem Ammonium-Kit (CLK 302, Fa. Hach-Lange) auf die Konzentration von Ammonium untersucht. Gemäß dem Protokoll wurde zunächst das Pulverreagenz in das Messröhrchen gegeben und anschließend 200 µL des Überstandes hinzupipetiert. Nach 15 minütiger Inkubation wurden die Proben im VIS-Spektralphotometer (Fa. Hach-Lange) vermessen und die Konzentration bestimmt. Die Verdünnung der Proben betrug 1:2 bzw. 1:4, je nach vorliegender Ammoniumkonzentration.

#### 4.5.5 Bestimmung der Osmolalität im Waschpuffer

Die Messung der Osmolalität erfolgte im Osmomat 030 (Fa. Gonotech). Das Gerät wurde zunächst mit 50 µL destilliertem Wasser und 50 µL 300 mOsmol·kg<sup>-1</sup> Standard (Fa. Gonotech) kalibriert. Anschließend konnten die Waschpufferproben anhand des Gefrierpunktverfahrens auf ihre Osmolalität untersucht werden.

#### 4.6 Filtration von Zellen zur Metabolomuntersuchung und Methodenentwicklung

Für die Filtration wurden exponentiell wachsende Zellen aus geregelten Bioreaktorkultivierungen genutzt. Der Zeitpunkt orientierte sich an der Lebendzell-dichte der Kultur, in der Regel wurden die Proben am vierten Kultivierungstag genommen, wenn die Lebendzell-dichte zwischen 25 – 40·10<sup>5</sup> Zellen·mL<sup>-1</sup> betrug. Am Vortag der Filtration wurden die benötigte Menge an Wasch- und Lysepuffer hergestellt. Für den Waschpuffer wurde Nanopure-Wasser aus einer Nanopure II Anlage (Fa. Sybron/Barnstead) mit 10 mM KPO<sub>4</sub> (P5655, Fa. Sigma-Aldrich) auf einen pH-Wert von 7.1 eingestellt und die Osmolalität mit NaCl (S5886, Fa. Sigma-Aldrich) auf 290 mOsmol·kg<sup>-1</sup> korrigiert. Die Lysepuffer wurden durch Zugabe der jeweiligen Detergenzien (Digitonin: A1905.0001, Fa. Applichem; Natriumdodecylsulfat: L3771, Fa. Sigma Aldrich) oder Lösemittel zu dem Waschpuffer hergestellt. Wasch- und Lysepuffer wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung bei 4 – 8 °C gekühlt gelagert. Zusätzlich wurde für die Gesamtzellanalyse ein Pall Tiefenfilter Typ A/D (Fa. Pall) in 120 mL-Rotilaboschraubdeckeldosen (CEP0.1, Fa. Karl Roth) pro Messung eingewogen. Für die fraktionelle Filtration wurden ein Typ A/D und ein Pall Membranfilter Metrigard (Fa. Pall) in den Schraubdeckeldosen eingewogen. Hierbei war die Anordnung der Filter derart, dass der Tie-

fenfilter zuerst mit der Zellsuspension in Kontakt kam und nachgeschaltet der Membranfilter. Am Tag der Filtration wurde als erstes die Lebendzellichte als Dreifachbestimmung im Reaktor bestimmt. Basierend hierauf wurde das notwendige Volumen an Zellsuspension für  $2 \cdot 10^7$  Zellen berechnet. Bevor die Zellsuspension zur Filtration aus dem Reaktor gezogen wurde, wurden der Tiefenfilter bzw. die Tiefenfilter/Membranfilter-Kombination mit 10 mL eiskaltem Waschpuffer gespült. Die Filter lagen hierbei auf einer runden Metallgitteraufnahme, die sowohl für Stabilität als auch für ein schnelles Abfließen des Permeates sorgte. In der Zeit in der sich der Druck einregelte (Gesamtzellfiltration 30 mbar, fraktionelle Filtration 90 mbar) wurden 3 mL Vorlauf aus dem Probenahmeport entnommen und verworfen. Anschließend wurde das benötigte Zellvolumen in eine sterile LuerLock-Spritze (Omnifix Solo, Fa. Braun) gezogen. Die Zellsuspension wurde in ein 50 mL Greiner-Röhrchen überführt und dort mit einer passenden Eppendorf Pipette aufgenommen und auf den Filter verbracht. Sobald die Flüssigkeit abfiltriert war, wurde bei der Gesamtzellfiltration mit 35 mL eiskaltem Waschpuffer gewaschen und der trockene Filter in die zugehörige Rotilabo-Schraubdeckelose gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bei fraktionellen Filtrationen wurde zunächst das entsprechende Volumen Lysepuffer auf den Filter gegeben und anschließend mit Waschpuffer gewaschen. Das weitere Einfrieren erfolgte analog. Die Filter verblieben bis zur Extraktion in einer  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  Gefriertruhe. Nach jeder Filtration wurde die Filteraufnahme mit 30 mL Nanopure-Wasser gespült. Abb. 6 zeigt einen schematischen Aufbau der Filtrationsanlage, bestehend aus einer Vakuumpumpe (MZ 2C, Fa. Vacuubrand), einer Kontrolleinheit (Dicon 400, Fa. Jumo), einem Proportionalventil (2824, Fa. Bürkert) und einem Druckmessumformer (MIDAS SI 401006, Fa. Jumo).

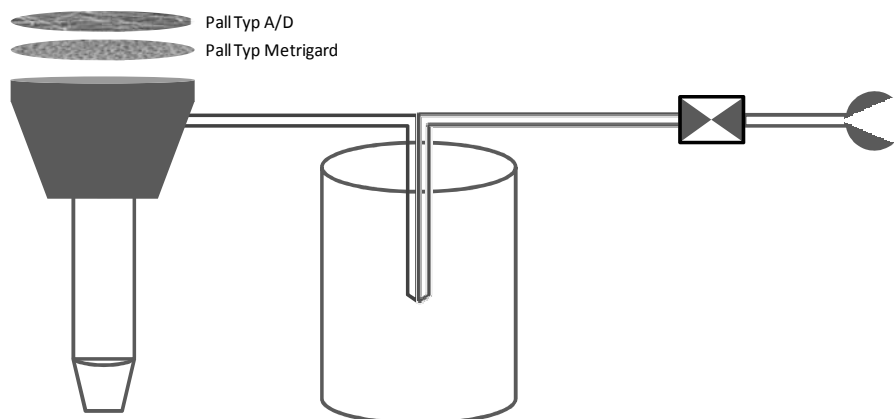


Abb. 6: schematischer Aufbau der Filtrationsanlage. Dargestellt sind die Anordnung der Filtertypen, sowie ihre Orientierung zur Zellsuspension. Des Weiteren ersichtlich sind eine Waschflasche und das Druckregelventil vor der Unterdruckpumpe.

#### 4.7 Extraktion der zellulären Metabolite aus den eingefrorenen Filtern

Die in 4.6 erzeugten Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Am Tag der Extraktion wurden immer drei Filter pro Ansatz und drei Ansätze pro Tag extrahiert. Die Extraktion verlief nach einem am Institut im Rahmen einer Diplomarbeit zur Analyse von Metabolom-Proben in Säugerzellen entwickelten Protokoll (Illner 2012). Als erstes wurden die Massen der Rotilabo-Schraubdeckeldosen samt der Filter bestimmt. Dann wurden jeweils 5 mL eiskalte 70%ger MetOH-Lösung zugegeben, erneut die Masse bestimmt und die Schraubdeckeldosen bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Kryostaten (RK 20, Fa. Lauda) für 90 min inkubiert. Dann wurden die Filter einzeln aus den Schraubdeckeldosen entnommen, auf die Filtrationsanlage aus 4.6 gebracht und in ein 50 mL Greiner-Röhrchen trockenfiltriert. Das in der Schraubdeckeldose verbleibende Restvolumen wurde während der Filtration auf den Filter, der mit der Zellseite in Richtung Greiner-Röhrchen orientiert wurde, pipettiert. Anschließend wurde die Schraubdeckeldose mit 2 mL 50%ger MetOH-Lösung ausgespült und dieses Volumen ebenfalls auf den Filter gegeben. Die abfiltrierte Extraktionslösung im Greiner-Röhrchen wurde mit 0.5 mL eiskaltem  $\text{CHCl}_3$  versetzt und für 20 sec gevortext. Das Zweiphasen-System wurde durch 10 minütige Zentrifugation in einer Megafuge 1.0 (Fa. Heraeus) bei  $3219g$  wieder getrennt. Die Methanol-Phase wurde daraufhin abgesaugt und als 1 mL Aliquots auf vorgewogene 1.5 mL Eppendorfreaktionsgefäße verteilt und gewogen. Diese wurden anschließend im RVC 2-33 IR (Fa. Christ) evaporiert. Das hierzu genutzte Evaporationsprogramm ist in Tab. 7 aufgeführt. Die reduzierten Proben wurden direkt nach der Evaporation erneut gewogen und bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  weggefroren.

Tab. 7: Evaporationsprogramm zur Einengung der Zellextrakte. Die letzte Spalte gibt die exemplarisch gemessenen Temperaturen in den Proben zum jeweiligen Programmabschnitt an. Die Gesamtdauer des Programms betrug 110 min. Am Ende der Evaporation wurden die 1 mL Extrakt auf etwa 100  $\mu\text{L}$  reduziert.

Zeit [min]	Solldruck [mbar]	Sollwert am Ende des Abschnitts [mbar]	Probentemperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]
10	20	15	10.3
15	15	10	8
25	10	8	6.2
30	8	6	6.5
35	6	4	7.6
110	4	-	23.1

Die real pipettierten Volumina wurden anhand der notierten Massen berechnet. Anhand von Gleichung 1 kann so die Stoffmenge pro Zelle bestimmt werden. Die Variablen sind in Tab. 8 erläutert.

$$\text{Stoffmenge pro Zelle} = \frac{\text{Konzentration} \times \text{Verdünnung durch Probenaufarbeitung}}{\text{Zellzahl}}$$

$$= N(a, b, c, d, e, f, z) = \frac{z}{2E7 \text{ Zellen}} \times \frac{\frac{a-b}{\rho_{\text{H}_2\text{O}}}}{\rho_{\text{MetOH}}} \times \left( d - e + \frac{f-d}{\rho_{\text{MetOH}}} + 2 \right)$$

(Gleichung 1)

Tab. 8: Erklärung der Variablen zur Stoffmengenberechnung pro Zelle

Variable	Bedeutung
V	aufgetragenes Volumen Zellsuspension
$c_x$	Lebendzelldichte
a	Gewicht der Reaktionsgefäße nach Evaporation
b	Gewicht der Reaktionsgefäße ohne Extraktionslösung
c	Gewicht der Reaktionsgefäße mit Extraktionslösung
d	Masse der Schraubdeckeldose mit Filter und Zellen ohne Extraktionsmittel
e	Masse der Schraubdeckeldose mit Filter ohne Zellen ohne Extraktionsmittel
f	Masse der Schraubdeckeldose mit Filter mit Zellen und Extraktionsmittel
i	Volumen des Extraktionsmittels im zweiten Extraktionsschritt
z	Konzentration des Metaboliten
ry	relativer Fehler zur Variablen y

Außer bei den Wirkungsflächenexperimenten wurden alle Faktorvariationen als Triplikate durchgeführt. Somit können die Stoffmengen als Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit der Standardabweichung als Fehler dargestellt werden. Ein Nachteil dieser Vorgehensweise liegt aber darin, dass die Fehler-behafteten Größen nicht vollständig erfasst werden. So wird vernachlässigt, dass das aufgetragene Probenvolumen ebenso wie das Volumen der 50%igen MetOH-Lösung im zweiten Extraktionsschritt variieren kann. Aus diesem Grund wurde die Methode erweitert indem eine Fehlerfortpflanzung etabliert wurde, die eben dies berücksichtigt (Gleichung 2). Die zugehörigen partiellen Ableitungen sind nachfolgend wiedergegeben. Die notwendigen Fehler wurden bestimmt indem für die Variablen  $c_x$ , a, b, c, d, e, f und z die Standardabweichungen der drei Replikate durch die zugehörigen Mittelwerte geteilt wurden. Die Variablen V und i wurden experimentell bestimmt (n=20). Die relativen Fehler wurden analog zu den anderen Variablen berechnet. Für die Fehlerfortpflanzung nach Gauß wurde die Wurzel aus der Summe der quadrierten Produkte der partiellen Ableitungen mit

den zugehörigen relativen Fehlern bestimmt (Gleichung 3). Die partiellen Ableitungen sind nachfolgend aufgelistet (Gleichungen 4 – 11).

$$\text{Stoffmenge pro Zelle} = \frac{z}{V \times c_x} \times \frac{\frac{a-b}{\rho_{\text{H}_2\text{O}}}}{\frac{c-b}{\rho_{\text{MetOH}}}} \times \left( d - e + \frac{f-d}{\rho_{\text{MetOH}}} + i \right)$$

(Gleichung 2)

$$\text{Fehler nach Gauß} = \sqrt{\left( \left( \frac{dN}{da} \times ra \right)^2 + \left( \frac{dN}{db} \times rb \right)^2 + \left( \frac{dN}{dc} \times rc \right)^2 + \left( \frac{dN}{dd} \times rd \right)^2 + \left( \frac{dN}{de} \times re \right)^2 + \left( \frac{dN}{df} \times rf \right)^2 + \left( \frac{dN}{di} \times ri \right)^2 + \left( \frac{dN}{dz} \times rz \right)^2 \right)}$$

(Gleichung 3)

$$\frac{dN}{da} = \frac{-0.149zd - 0.865ze + 1.014zf + 0.865zi}{V_{c_xc} - V_{c_xb}}$$

$$\frac{dN}{db} = \frac{(0.149zd + 0.865ze - 1.014zf - 0.865zi) \times (V_{c_xc} - V_{c_xb}) \times (-0.149zad - 0.865zae + 1.014zaf + 0.865zai + 0.149zbd + 0.865zbe - 1.014zbf - 0.865zbi) \times V_{c_x}}{(V_{c_xc} - V_{c_xb})^2}$$

$$\frac{dN}{dc} = \frac{-(-0.149zad - 0.865zae + 1.014zaf + 0.865zai + 0.149zbd + 0.865zbe - 1.014zbf - 0.865zbi) \times V_{c_x}}{(V_{c_xc} - V_{c_xb})^2}$$

$$\frac{dN}{dc_x} = \frac{-(-0.149zad - 0.865zae + 1.014zaf + 0.865zai + 0.149zbd + 0.865zbe - 1.014zbf - 0.865zbi) \times (V_c - V_b)}{(V_{c_xc} - V_{c_xb})^2}$$

$$\frac{dN}{dd} = \frac{-0.149a + 0.149zb}{V_{c_xc} - V_{c_xb}}$$

$$\frac{dN}{de} = \frac{-0.865za + 0.865zb}{V_{c_xc} - V_{c_xb}}$$

$$\frac{dN}{df} = \frac{1.014za - 1.014zb}{V_{c_xc} - V_{c_xb}}$$

$$\frac{dN}{di} = \frac{0.865za - 0.865zb}{V_{c_xc} - V_{c_xb}}$$

$$\frac{dN}{dV} = \frac{-(-0.149zad - 0.865zae + 1.014zaf + 0.865zai + 0.149zbd + 0.865zbe - 1.014zbf - 0.865zbi) \times (c_xc - c_xb)}{(V_{c_xc} - V_{c_xb})^2}$$

$$\frac{dN}{dz} = \frac{-0.149ad - 0.865ae + 1.014af + 0.865ai + 0.149bd + 0.865be - 1.014bf - 0.865bi}{V_{c_xc} - V_{c_xb}}$$

(Gleichungen 4 – 11)



#### 4.8 Färbung der Mitochondrien mit Nonylacrinidine-Orange (NAO)

Die Färbung der Mitochondrien wurde mit NAO (A7847, Fa. Sigma-Adrich) durchgeführt, NAO reagiert wenig sensible auf Schwankungen im mitochondrialen Membranpotential. Hierzu wurde eine PBS-gepufferten Färbelösung mit  $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  NAO angesetzt. Die Messung der gefärbten Zellen erfolgte in einem infinite 200 MTP-Fluoreszenzreader (Fa. Tecan), die genauen Messparameter sind in Tab. 9 aufgelistet.

Tab. 9: Messeinstellungen am infinite 200 MTP-Fluoreszenzreader

Parameter	Wert
Modus	Fluoreszenz Messung von oben
Exzitationswellenlänge [nm]	495
Emissionswellenlänge [nm]	525
Exzitationsbandbreite [nm]	9
Emissionsbandbreite [nm]	20
Verstärkung	90
Anzahl der Blitze	25
Integrationszeit [ $\mu\text{s}$ ]	20
Verzögerungszeit [ $\mu\text{s}$ ]	0
Ruhezeit [ms]	0

Zur Überprüfung ob es einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der gefärbten Zellen und der Signalintensität gibt, wurden  $13.22\text{E}7$  Zellen für 5 min bei  $400g$  abzentrifugiert und anschließend mit 10 mL CMF-PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei  $400g$  wurde das Pellet mit 6 mL NAO-Lösung für 15 min im Dunkeln inkubiert. Ab diesem Schritt wurden die Proben im Dunkeln prozessiert. Das Pellet wurde zweimal mit 10 mL CMF-PBS gewaschen und zentrifugiert (5 min,  $400g$ ) und schließlich in 2 mL CMF-PBS aufgenommen. In einer schwarzen 96-well Mikrotiterplatte (flacher, klarer Boden, Polysteren, Fa. Greiner) wurden dann jeweils drei Tüpfel mit  $300 \mu\text{L}$  Zellsuspension und  $2\text{E}7$ ,  $1\text{E}7$ ,  $0.5\text{E}7$ ,  $0.2\text{E}7$  und  $0.02\text{E}7$  Zellen aufgetragen, sofern nötig wurde die Zelllösung mit CMF-PBS verdünnt. Diese Zellzahlen entsprachen 100, 50, 25, 10 und 1 Prozent der zu erwartenden Signalintensität.

Für den Filtrationsversuch aufgeschlossener Zellen mit gefärbten Mitochondrien wurden  $18\text{E}7$  Zellen für 5 min bei  $400g$  abzentrifugiert und mit 10 mL CMF-PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 1 mL CMF-PBS aufgenommen und für 10 sec bei 40 %iger Leistung für einen Zyklus mit einem Ultraschallgerät (Sonopuls 2200 MS73, Fa. Bandelin) aufgeschlossen. An-

schließlich wurde eine Ultrazentrifugation bei 15.000g für 5 min durchgeführt und der Überstand verworfen. Die Färbung erfolgte mit 18 mL Färbelösung für 15 min in Dunkelheit. Anschließend wurde das Zelllysate für 5 min bei 15.000g abzentrifugiert und zweimal mit 10 mL CMF-PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 2.7 mL CMF-PBS aufgenommen und analog zu den obigen Versuchen eine Verdünnungsreihe in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Zusätzlich wurden 2E7 Zellen auf eine A/D-Metrigard Filterkombination aufgetragen, bei 90 mbar filtriert und mit 35 mL Waschpuffer nachgespült. Das Permeat wurde restlos aufgefangen und für 5 min bei 15.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das mutmaßliche Pellet in 300 µL CMF-PBS aufgenommen und ebenfalls auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Sowohl die Verdünnungsreihe als auch der Filtrationsansatz wurden als Triplikate durchgeführt.

#### 4.9 Quantifizierung der Metabolite in Zell-Extrakte und Überstandsproben

Im Folgenden wird beschrieben wie die Metabolite in Zell-Extrakten und Kulturüberständen bestimmt wurden. Hierzu wurden UV-basierte HPLC-Methoden sowie massenspektrometrische Analyse-Methoden eingesetzt.

##### 4.9.1 Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen mittels HPLC

Zur Ermittlung der Aminosäurekonzentration im Kulturüberstand sowie in Zellextrakten wurden die Proben mittels HPLC vermessen. Hierzu wurden die zellfreien Kulturüberstände aufgetaut und erneut bei maximaler Geschwindigkeit für 5 min abzentrifugiert. Die so vorbehandelten Überstandsproben wurden 1:30 in destilliertem Wasser verdünnt, Zellextrakte wurden nicht verdünnt. Anschließend wurden hiervon 980 µL zusammen mit 20 µL eines 2 mM Norvalin-Standards (N7627, Fa. Sigma Aldrich) in braune HPLC-Vials (Fa. Roth) pipettiert, bei Zellextrakten die entsprechenden Volumina in 100 µL-Borosilicat-Inserts (Fa. Roth). Tab. 10 listet die Informationen zur Instrumentierung und Vorbereitung der Laufmittel auf. Tab. 11 zeigt den Gradienten des Laufmittels B im Laufe der Messung. Das Messprinzip basiert auf einer Derivatisierung der primären Amine durch OPA und der Derivatisierung von Hydroxyprolin und Prolin durch FMOC. Die Derivate wurden anschließend per DAD oder UV-Detektor vermessen. Die Auswertung erfolgte über die jeweiligen Quotienten der Analyt-

Flächen bezogen auf den Norvalin-Standard unter Verwendung einer externen Kalibrierkurve.

Tab. 10: Instrumente und Chemikalien für die Aminosäureanalyse mittels HPLC

Parameter	Wert
Instrument	Agilent
Säule	Zorbax Eclipse Plus C18 / 4.6x250 mm
Detektion	UV : 338 nm ; FLD : 230 nm (Anregung), 450 nm (Emission)
Laufmittel A	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (71633, Fa. Fluka), 10 mM Na <sub>2</sub> BO <sub>4</sub> O <sub>7</sub> (S9640, Fa. Sigma), 0.5 mM NaN <sub>3</sub> (74415, Fa. Fluka), pH 8.2
Laufmittel B	45 % Methanol (T909.1, Fa. Roth), 45 % Acetonitril (HN44.2, Fa. Roth), 10 % H <sub>2</sub> O (A511.3, Fa. Roth)
Derivatisierungsreagenzien	1: 0.4 M K <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (1.00165, Fa. Merck) 2: 10 mg·mL <sup>-1</sup> OPA (79760, Fa. Fluka) in Borat-Puffer + 8.2 µL 3-Mercaptopropionsäure (63768, Fa. Fluka) 3: 2.5 mg·mL <sup>-1</sup> FMOc (23186, Fa. Sigma) in 1 mL Acetonitril 4: 100 mL Laufmittel A + 0.25 mL konz. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (79606, Fa. Fluka)
Kalibrierstandards	1.25 – 400 µM-Verdünnungen des AS-Standardmixes (AAS18, Fa. Sigma) mit ASN, GLN und TRP gespikt
Messmethode	AGILENT_5990-4547_01.M
Fluss	1.5 mL·min <sup>-1</sup>

Tab. 11: Elutionsgradient zur Aminosäurebestimmung mittels HPLC

Zeit	Laufmittel B [%]
0.00	2.00
0.84	2.00
33.40	57.00
33.50	100.00
39.30	100.00
39.40	2.00
40.00	2.00

#### 4.9.2 Bestimmung der Nukleotidkonzentrationen mittels HPLC

Intrazelluläre Konzentrationen phosphorylierter Nukleotide wurden per HPLC bestimmt. Hierzu wurden Zellextrakte aufgetaut und für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Extrakte wurden anschließend je nach Bedarf und erwarteter Analytkonzentration bis zu zehnfach verdünnt und in 100 µL-Borosilicat-Inserts (Fa. Roth) in braune HPLC-Vials (Fa. Roth) pipettiert. Tab. 12 zeigt die Details zur genutzten HPLC-Methode. Die Quantifizierung erfolgte anhand der Peakflächen bezogen auf eine externe Kalibrierkurve. In Tab. 13 ist der genutzte Gradient abgebildet.

Tab. 12: Instrumente und Chemikalien für die Nukleotidanalyse mittels HPLC

Parameter	Wert
Instrument	Agilent
Säule	Supelcosil LC-18-T, 150x 4.6 mm
Detektion	UV1 : 260 nm ; UV2 : 360.6 nm
Laufmittel A	100 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (60347 , Fa. Fluka; 60221, Fa. Fluka), 4 mM TBAS (86868 , Fa. Sigma), pH 8.2
Laufmittel B	100 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (60347 , Fa. Fluka; 60221, Fa. Fluka), 4 mM TBAS (86868 , Fa. Sigma), 30 % (v/v) MetOH (T909.1, Fa. Roth), pH 7.2
Kalibrierstandards	2.5 – 100 µM-Verdünnungen des Nukleotidmixes
Messmethode	NADPH_67min_Lara_30C.M
Fluss	1.0 mL·min <sup>-1</sup>

Tab. 13: Elutionsgradient zur Nukleotidbestimmung mittels HPLC

Zeit	Laufmittel B [%]
0.00	0.00
3.50	0.00
20.00	30.00
22.00	35.00
40.00	60.00
48.00	100.00
55.00	100.00
60.00	0.00
67.00	0.00

#### 4.9.3 Bestimmung von Stoffwechselintermediaten mittels GC-MS

Für die Untersuchung der Lagerstabilität von Zellextrakten, den Wiederfindungsexperimenten und der versuchten Beeinflussung der Monocarboxylattransporter wurden ausgewählte Stoffwechselintermediate der Glykolyse und des Citrat-Zyklus per GC-MS vermessen, ebenfalls wurden Kulturüberstandsproben auf ihre Pyruvatkonzentration überprüft. Hierbei wurde für Pyruvat die TBDMS-Methode genutzt, alle anderen Metabolite wurden mittels TMS-Derivatisierung vermessen. Die fertigen Proben wurden in braunen, spitz-zulaufenden GC-Fläschchen (Fa. Wagner Munz) in den Autosampler gestellt und von dort vermessen. Zellextrakte wurden unverdünnt derivatisiert, Überstandsproben wurden vor der Derivatisierung 1:50 verdünnt. Die Angaben zu den Einstellungen der GC-MS sind in Tab. 14 aufgelistet.

Tab. 14: Instrument und Einstellungen zur GC-MS Messung von Stoffwechselintermediaten

Parameter	Wert
GC-Instrument	Perkin-Elmer Autosystem XL GC
MS-Instrument	Perkin-Elmer TurboMass Mass Spectrometer, Quadrupol
Software	Turbomass
Trägergas	Helium, 1 mL·min <sup>-1</sup>
Säule	Zebron ZB-5ms (30 m x 250 µm x 0.25 µm, 5 % Phenyl), Fa. Phenomenex
Temperatur-Programm TMS	Start: 70 °C; Gradient 6 °C·min <sup>-1</sup> , Ende: 320 °C
Temperatur-Programm TBDMS	Start: 100 °C; Gradient 10 °C·min <sup>-1</sup> bis 145 °C, dann 30 °C·min <sup>-1</sup> bis 300 °C, Ende: 300 °C
Injektor-Temperatur	230 °C
Ionisierung	Elektronenstoss-Ionisierung, 70 eV, 180 °C
Messmodus	qualitativ: Fullscan; quantitativ: SIR
Messmethode: TMS	GC: 230-n-pp, MS: Metabol-SL-hot-13C
Messmethode: TBMS	GC: TBDMS-Metabol, MS: TBMS-Met-SIR-13C

Vor der eigentlichen Derivatisierung wurden 50 µL des Zellextraktes bzw. der anzusetzenden Metabolitstandards mit 50 µL <sup>13</sup>C-vollgelabelten Algenextrakt (487945-1G, Fa. Sigma Aldrich) vermischt und in einem 1.5 mL Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf) im Evaporator unter Verwendung des eingespeicherten Programms „H2O-100µL“ getrocknet. Bei der TMS-Derivatisierung wurden 60 µL einer MeOHN<sub>2</sub>HCl-Lösung (226904, Fa. Sigma) mit 20 mg pro mL Pyridin (9729, Fa. Roth) zu der getrockneten Probe gegeben und für 90 min bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 40 µL der Lösung in ein braunes GC-Vial gegeben und 64 µL fertige BSTFA-Lösung (33148, Fa. Supelco) hinzugegeben. Die Probe wurde erneut für 60 min bei 50 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend konnte sie in den Autosampler gestellt und vermessen werden. Für TBDMS-Messungen wurden ebenfalls 60 µL der MeOHN<sub>2</sub>HCl Lösung zur getrockneten Probe gegeben. Die erste Inkubation erfolgte schüttelnd bei 60 °C für 30 min. Anschließend wurden 40 µL in ein braunes GC-Vial überführt und 80 µL einer fertigen MTBSTFA –Lösung (00942, Fa. Sigma) zugegeben. Die zweite Derivatisierung erfolgte erneut bei 60 °C und dauerte 60 min. Danach waren die Proben bereit für die Vermessung. In Tab. 15 sind die für die jeweiligen Messmethoden Metabolit-spezifischen Messzeitfenster sowie die Masse-Ladungsverhältnisse der <sup>12</sup>C und <sup>13</sup>C-Analyten aufgelistet. Durch die Zugabe des <sup>13</sup>C-Algenstandards existierte für jeden der zu messenden Metabolite ein interner Standard. Basierend auf den <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C-Verhältnissen der jeweiligen Peakflächen konnte mit einer externen Kalibrierkurve eine genaue Quantifizierung der Analyten durchgeführt werden. Durch die Verwendung der <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C-Verhältnisse konnte ausgeschlossen werden, dass die Messung durch eine potentielle Degradation der Proben beeinträchtigt wird.

Tab. 15: Metabolit-spezifische Messzeitfenster und Masse-Ladungsverhältnisse der für die GC-MS Messungen genutzten Methoden. Die Auflösung betrug 0.5 Da, der Delay zwischen den beiden Messkanälen 20 msec.

Methode	Analyt	Start-Zeit [min]	End-Zeit [min]	m/z- <sup>12</sup> C	m/z- <sup>13</sup> C
TBMS-Met-SIR-13C	Pyr	5.5	5.9	174	177
	Glu	11.2	11.65	432	437
	Lak	8.14	8.40	219	222
	Val	10.40	10.75	144	148
	Mal	10.87	11.20	245	249
Metabol-SL-hot-13C	Mal	18.7	19.2	245	249
	aKG	20.4	20.9	304	309
	Cit	25.03	25.4	273	278
	R5P	29.1	30.4	217	220
	G6P	32.2	33.2	471	475

#### 4.9.4 Bestimmung von Stoffwechselintermediaten mittels LC-MS

Die Bestimmung der intra- und subzellulären Metabolit-Level während der Batch-Kultivierung im Bioreaktor erfolgte mit einer am Institut entwickelten LC-MS Analytik (Teleki, A. et al. 2014). Diese machte noch mehr Analyte apparativ zugänglich als die oben beschriebene GC-MS Methode (z.B. cis-Aconitat), konnte jedoch bestimmte Substanzen wie Pyruvat nicht erschließen. Zusätzlich wies sie eine z.T. erhöhte Sensitivität auf.

Tab. 16: Probenvorbereitungsschema zur LC-MS Analytik.

Volumina [ $\mu$ L]	Wert
Probe bzw. Standard	9.5
<sup>13</sup> C-Algenextrakt	9.5
NH <sub>4</sub> -Acetat, 200 mM, pH 9.2	1
Acetonitril	30

Ausgangspunkt der Probenvorbereitung waren wieder die gefrorenen Zellextrakte. Diese wurden aufgetaut und für 15 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in einem 1.5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß gemäß den Angaben in Tab. 16 vorbereitet. Diese Proben wurden in 100  $\mu$ L-Inserts in braunen HPLC-Vials überführt und in den Probensteller der LC-MS Anlage gestellt. Da es in dem zur Probenmessung gewählten Milieu Metabolit-spezifisch zu Degradationseffekten kam, wurde immer nur ein kleiner Satz Proben frisch vorbereitet und in den Autosampler gestellt. In Kombination mit dem in-

ternen Algenstandard konnte so sichergestellt werden, dass die Signale der Proben stets auswertbar waren. Die Tabellen Tab. 16, Tab. 17 und Tab. 18 zeigen die Einstellungen und die Instrumentierung zu den LC-MS-Analysen.

Tab. 17: Instrument und Einstellungen zur LC-MS Messung von Stoffwechselintermediaten

Parameter	Wert
LC-Instrument	Agilent 1200 HPLC mit Agilent 1260 Autosampler (Setpoint: 5 °C)
MS-Instrument	Agilent 6410B Triple Quad
Software	MassHunter B.04.00
Laufmittel A	90 % (v/v) Acetonitril, 10 % (v/v) 10 mM Ammonium-Acetat, pH 9.2 bzw. 5.6 (negativ bzw. positiv-Modus)
Laufmittel B	90 % (v/v) Wasser, 10 % (v/v) Acetonitril, pH 9.2 bzw. 5.6 (negativ bzw. positiv-Modus)
Säule	Hauptsäule: Sequant ZIC-pHILIC (150 x 2.1 mm, 5 µm), Fa. Merck Vorsäule: Sequant ZIC-pHILIC (20 x 2.1 mm, 5 µm), Fa. Merck
Säulentemperatur	40 °C
Flussrate	0.2 mL·min <sup>-1</sup>
Elutions-Gradient	Beginn: 0 % Laufmittel B; Minute 1 – 30: linearer Gradient von 0 – 75 % Laufmittel B; Minute 30 – 34: linearer Gradient von 75 – 100 % Laufmittel B; Minute 34 – 39: Halten bei 100 % Laufmittel B; Minute 39 – 49: linearer Gradient von 100 – 0 % B; Minute 49 – 54: 0 % Laufmittel B
Ionisierung	Elektronenspray-Ionisierung, Stickstoff-Fluss 10 L·min <sup>-1</sup> , 350 °C, 30 psi, 4000 V
Messmodus	Multiple Reaktionsübergangsüberwachung

Tab. 18: Metabolit-spezifische Messzeitfenster und Masse-Ladungsverhältnisse für die LC-MS Messungen. Der Delay zwischen den Reaktionsübergängen betrug 100 ms. Die Aminosäuren wurden positiv ionisiert, während die anderen Metabolite im negativen Modus ionisiert wurden.

Analyt	m/z- <sup>12</sup> C Precursor-Ion	m/z- <sup>13</sup> C Tochter-Ion	m/z- <sup>13</sup> C Precursor-Ion	m/z- <sup>13</sup> C Tochter-Ion
Suc	117	73	121	76
R5P	229	97	234	97
Ru5P	229	97	234	97
aKG	145	101	150	105
F6P	259	97	265	97
Mal	133	115	137	119
Fum	115	71	119	74
G6P	259	97	265	97
2PG	185	79	188	79
3PG	185	97	188	97
Cis-Aco	173	85	179	89
PEP	167	79	170	79
6PG	275	97	281	97
Cit	191	111	197	116
FbP	339	97	345	97
GLN	147	84	152	88
GLU	148	84	153	88
ALA	90	44	93	46

#### 4.10 Herstellung eines $^{13}\text{C}$ -Algenextraktes als interne Referenz

Zur Herstellung des für die MS-Analysen benötigten  $^{13}\text{C}$ -Algenextraktes wurden 15 mg des  $^{13}\text{C}$ -Algenextraktes (487945-1G, Fa. Sigma Aldrich) pro mL Reinstwasser für 3 min bei 95 °C gekocht. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis runtergekühlt und in 1 mL Portionen aliquotiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Aliquots bei – 70 °C tiefgefroren.

#### 4.11 DoE-Analyse

Die Bestimmung der optimierten Wasch- und Lysebedingungen wurde mit Hilfe eines DoE – Ansatzes durchgeführt. Hierfür wurde die Software JMP 7 (Fa. SAS Institute GmbH) genutzt. Das experimentelle Design wurde basierend auf den Angaben in Tab. 19 erstellt. Als Zielgrößen wurden hierbei die prozentualen Rest-Mengen von Glukose-6Phosphat und cis-Aconitat in den filtrierten Zellen gewählt. Die Berechnung der Restmenge erfolgte in Bezug auf eine zeitgleiche Gesamtzellfiltration derselben Kultur. Das Design umfasste 6 Zentrumsunkte und 14 Faktorkombinationen. In Tab. 20 ist die Zuordnung der Faktorlevel zu den jeweiligen Einflussgrößen aufgetragen, Tab. 21 zeigt den experimentellen Versuchsplan des DOE-Experimentes. Basierend auf diesen Angaben wurden die Versuche durchgeführt.

Tab. 19: Darstellung der Parameter zur Erzeugung des DoE-Versuchsplans mit JMP7.

Parameter	Wert
Typ	Zentral zusammengesetztes Design (CCD)
Design Typ	CCD uniforme Precision
Zielgröße 1	Residuale G6P Menge [%]; minimieren
Zielgröße 2	Residuale cisAco Menge [%]; maximieren
Einflussgröße 1	Volumen Waschpuffer
Einflussgröße 2	Volumen Lysepuffer
Einflussgröße 3	Konzentration des Detergenz im Lysepuffer
Anzahl an Test	20, davon 6 Zentrumsunkte
Faktorstufen	2
Axialer Wert	1.682
Run Order	randomisiert



Tab. 20: Zuordnung der einzelnen Faktorlevel zu den gewählten Einflussgrößen im experimentellen Design.

Einflussgröße	Faktorlevel				
	-1.682	-1	0	1	1.682
Lysepuffer-Volumen [mL]	1.59	5	10	15	18.4
Waschpuffer-Volumen [mL]	23.18	30	40	50	56.817
Detergenz im Lysepuffer, Digitonin [%]	0.000	0.040	0.100	0.160	0.200
Detergenz im Lysepuffer, SDS [%]	0.000	0.003	0.007	0.010	0.013

Tab. 21: Experimenteller Versuchsplan anhand des in Tab. 19 definierten zentral zusammengesetzten Designs zur Optimierung der Wasch- und Lysebedingungen zur subzellulären Metabolomanalyse in Säugerzellen.

Faktorkombination	Waschpuffer-Volumen	Lysepuffer-Volumen	Detergenz im Lysepuffer
0A0	0	1.682	0
0	0	0	0
+++	1	-1	1
--	-1	1	-1
0	0	0	0
0	0	0	0
---	-1	1	1
0	0	0	0
--+	-1	-1	1
0	0	0	0
+++	1	1	1
a00	-1.682	0	0
++-	1	1	-1
0	0	0	0
---	-1	-1	-1
00a	0	0	-1.682
A00	1.682	0	0
0a0	0	-1.682	0
00A	0	0	1.682
+--	1	-1	-1

## 5. Ergebnisse und Diskussion

In diesem Abschnitt werden die experimentellen Ergebnisse der Arbeit dargestellt und entsprechend diskutiert. Zunächst wird erörtert wie die erhaltenen Messdaten weiterverarbeitet und zu intrazellulären Stoffmengen bzw. -konzentrationen verrechnet werden. Anschließend wird die experimentelle Methodenentwicklung dargestellt. Im Fokus stehen hierbei

- die Eignung der gewählten Membranfilter mit Blick auf die Integrität und den Rückhalt von Mitochondrien,
- die Abtrennung des umgebenden Mediums,
- der hierfür notwendige Zeitbedarf und dessen Einfluss auf den Metabolit-Gehalt der Zellen,
- die Wiederfindung der untersuchten Metabolite,
- die Stabilität der Zellextrakte,
- die Optimierung der Lyse- und Waschbedingungen.

Abschließend wird die entwickelte Methode zur subzellulären Metabolom-Analyse bei einer Batch-Kultivierung von CHO-DP12 in geregelten Systemen eingesetzt. Die gewonnenen Daten aus den extrazellulären, wie auch den intra- und subzellulären Metabolit-Pools werden genutzt, um den Stoffwechsel der Zellen mit Blick auf die jeweiligen Prozessphasen zu analysieren.

### 5.1 Verarbeitung und Auswertung der Daten aus der zellulären Metabolommessung

Daten und insbesondere hieraus abgeleitete Raten, die im Rahmen systembiologischer Untersuchungen erhoben werden, sind immer zu einem gewissen Teil fehlerbehaftet. Der Grund hierfür liegt in der Fehleranfälligkeit der jeweiligen Einzelschritte der Probenaufbereitung, beispielsweise können Pipettierfehler oder Fehler bei der Chromatogramm-Integration auftreten. Im ungünstigsten Fall kommt es dann zu einer Potenzierung der Fehler, was die Auswertung der Daten erschwert oder gänzlich verhindert. Für die Auswertung der Daten aus zellulären und subzellulären Metabolommessungen ist eine hinreichende Genauigkeit somit unabdingbar. Die Genauigkeit der Daten wiederum ist eine Folge der Richtigkeit und der Präzision der Datenerhebung, wobei die Richtigkeit die Abweichung vom wahren Wert beschreibt und die Präzision ein Maß für die Reproduzierbarkeit der Daten darstellt (Tillack 2012). Letztere, also die Streuung der Daten, kann durch eine Optimierung der zugrundeliegenden Protokolle verbessert werden. Die Richtigkeit der Daten zu erhöhen ist hingegen schwieriger. Im Rahmen einer systembiologischen Arbeit mit Fokus auf Stoffwechseluntersuchungen ist die Verwendung geeigneter Analysemethoden, genauer Metabolitstandards sowie eine regelmäßige Kalibrierung und Qualitätskontrolle der Messinstrumente eine denkbare Möglichkeit.

Aufgrund der obigen Problematik bestand ein Ziel dieser Arbeit darin die Genauigkeit der Metabolitmessungen präzise beschreiben zu können. Ausgangspunkt war hierbei die in 4. beschriebene Gleichung 1. Diese erlaubte eine Berücksichtigung potentieller Pipettiergenauigkeiten der 5 mL-Extraktionslösung sowie die variierenden Massen von Filtrerrückständen und Schraubdeckeldosen. Die Bestimmung der intrazellulären Poolgrößen erfolgte über die Bildung eines Mittelwertes aus drei Replikaten mit der Standardabweichung als Fehler. Allerdings wurden Fehler bei der Zelldichtebestimmung und dem Auftragen der Zellsuspension sowie der 2 mL-Extraktionslösung auf den Filter nicht berücksichtigt. Aus diesem Grund wurde eine Erweiterung der Gleichung 1 um die genannten Größen durchgeführt und eine Fehlerfortpflanzung nach Gauss vorgenommen. Voraussetzung hierfür sind eine Normalverteilung der Daten, nicht-abhängige Variablen und eine Linearität der Funktionen (Moseley 2013). Für einen direkten Vergleich wurden Metabolitdaten für die HPLC/LC-MS Datenauswertung sowie der GC-MS-Datenauswertung erhoben und jeweils über die beiden Vorgehensweisen ausgewertet. Die Daten für die HPLC/LC-MS-Messungen stammten aus Extrakten, die im Rahmen der Experimente zur SDS-bedingten Zellyse gewonnen wurden und im negativ-Modus der LC-MS vermessen wurden. Die GC-MS-Daten basieren auf

negativ-Modus der LC-MS vermessen wurden. Die GC-MS-Daten basieren auf Extrakten, die für die Metabolit-Wiederfindung auf den Filtermembranen eingesetzt wurden. Die unterschiedliche Herkunft der Ausgangsproben ist somit auch der Grund warum sich die in Abb. 7 dargestellten Stoffmengen für Citrat, Fumarat und Malat bei den beiden Messplattformen GC-MS und LC-MS voneinander unterscheiden.

Im Folgenden wurde untersucht in welchem Maße die über die verschiedenen Ansätze berechneten Stoffmengen pro Zelle und die zugehörigen Fehler voneinander abweichen. Darüber hinaus wurde über einen Vergleich der einzelnen Fehlerquadrate abgeschätzt wie groß die jeweiligen Teilbeiträge der einzelnen Fehler waren. Abb. 7 zeigt die Gegenüberstellung der anhand der beiden Berechnungsmethoden bestimmten Stoffmengen für die untersuchten Metabolite. Hierbei fällt auf, dass die Stoffmengen der per GC-MS vermessenen Metabolite (Pyruvat, Malat, Citrat, Fumarat, Glutamat, Valin) unter Anwendung von Gleichung 2 tendenziell höher liegen als bei der Ausgangsgleichung 1. Für die per LC-MS gemessenen Metabolite lässt sich diese Beobachtung nicht generell treffen. Die nach Gleichung 2 mit der Fehlerfortpflanzung nach Gauss bestimmten Fehler sind tendenziell größer, auch wenn bei einigen Metaboliten wie etwa Succinat oder  $\alpha$ -Ketoglutarat dies nicht zutrifft. Um die durch die Berechnungsarten hervorgerufenen Stoffmengen und Fehler genauer darstellen zu können, wurden diese gegeneinander aufgetragen.

In Abb. 8 sind die Stoffmengen pro Zelle für die per LC-MS gemessenen Metabolite GDP, 6-Phosphogluconat, cis-Aconitat, GTP, 2-Phosphoglycerat/3-Phosphoglycerat, GMP, iso-Citrat, Fumarat, Fruktose-1,6-bisPhosphat, Phosphoenolpyruvat, Fruktose-6Phosphat, AMP, Glukose-6Phosphat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, ADP, ATP, Citrat, Malat und Succinat gegeneinander aufgetragen. Hierbei sind die Werte die über Gleichung 1 berechnet wurden auf der Ordinate dargestellt, die Werte aus der erweiterten Gleichung 2 auf der Abszisse. Es ist zu sehen, dass die Mittelwerte beinahe vollständig korrelieren, die Steigung von 1.019 zeigt, dass die Stoffmengen nicht nur tendenziell sondern auch größentechnisch übereinstimmen, zumal der Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der Y-Achse mit  $-0.006$  nah am Koordinatenursprung lag. Analog hierzu sind in Abb. 9 die jeweiligen Stoffmengen pro Zelle der per GC-MS gemessenen Metabolite (Glutamat, Citrat, Pyruvat, Valin, Fumarat, Malat) dargestellt. Auch hier besteht eine sehr gute Korrelation ( $R^2 = 0.999$ ) zwischen den beiden Berechnungsarten, anhand der Steigung der Ausgleichsgeraden von 0.784 wird hier aber der in Abb. 7 beobachtete Unterschied zwischen den Berechnungsarten deutlich. Die Berechnung über

Gleichung 2 lieferte also tendenziell höhere intrazelluläre Stoffmengen. Die Größe der Fehler in Abhängigkeit der Berechnungsart ist in Abb. 10 und Abb. 11 dargestellt. Abb. 10 zeigt, dass die über Gleichung 2 bestimmten Fehler größer waren als die Berechnung über Gleichung 1. Die Steigung der Ausgleichsgeraden beträgt zwar 0.984, jedoch liegt der Interzept bei -0.04.

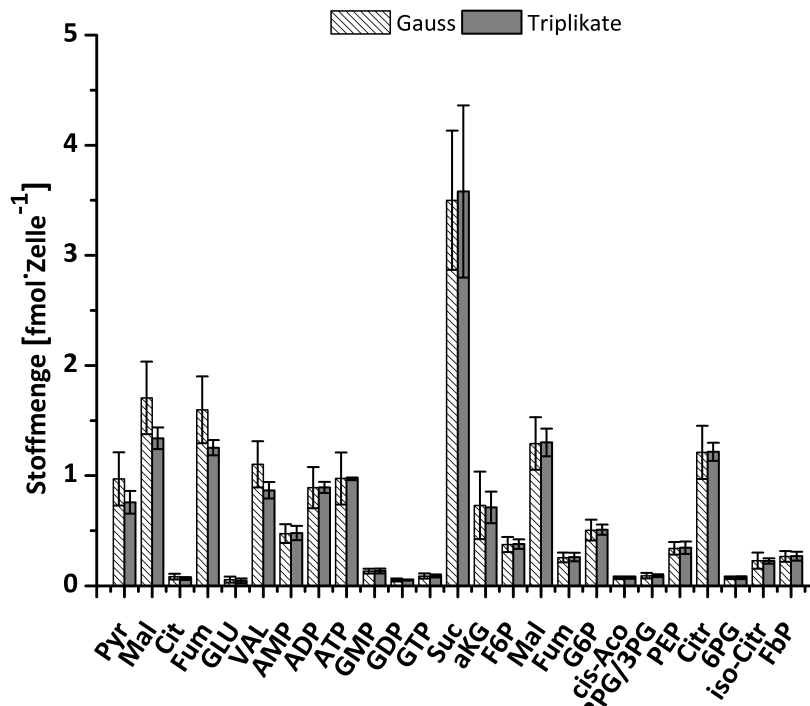


Abb. 7: Darstellung der intrazellulären Stoffmengen der untersuchten Metabolite in  $\text{fmol}\cdot\text{Zelle}^{-1}$  für die jeweiligen Berechnungsmethoden (Gauss und Triplikate). Die Daten wurden ausgehend von drei Replikaten bestimmt.

Anhand des Bestimmtheitsmaßes von 0.753 konnten 75.3 % der Werte erklärt werden. In Abb. 11 ist ein ähnliches Verhalten zu erkennen ( $R^2=0.768$ ). Die Steigung der Ausgleichsgeraden beträgt 0.256, diesmal liegt jedoch der Interzept bei 0.014. Dies zeigt, dass auch in diesem Fall die Anwendung der Gleichung 2 zu höheren Fehlern führte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Berechnungsarten Stoffmengen liefern, die in der Tendenz qualitativ übereinstimmen. Für die Metabolite die per LC-MS gemessen wurden, stimmen die Stoffmengen der beiden Berechnungsansätze auch quantitativ überein. Bei Metaboliten die per GC-MS vermessen wurden lieferte Gleichung 2 hingegen höhere Stoffmengen. Die bestimmten Fehler divergierten unabhängig von der Messplattform zwischen den Gleichungen 1 und 2, wobei Gleichung 2 sowohl bei der LC-MS- als auch bei der GC-MS-Messung größere Fehler erzeugte. Die Anwendung einer Fehlerfortpflanzung ermöglicht es, die jeweiligen Beiträge der Einzelfehler zum Gesamtfehler zu quantifizieren. Hierüber können dann die Fehler iden-

tifiziert werden, die maßgeblich am Gesamt-Fehler beteiligt sind. In Tab. 22 sind für GC- und LC-MS-Messungen je ein Beispielmetabolit (Malat und Glukose-6Phosphat) aufgelistet. Es ist deutlich zu sehen, dass die Variablen a und z den größten Beitrag zum Fehler lieferten. Diese stehen für die Masse des Reaktionsgefäßes mit evaporierter Probe (a) und der bestimmten Metabolitkonzentration in der aufgereinigten Probe (z). Der anteilige Fehler der eingeengten Probe trug bei Malat 25.02 und bei Glukose-6Phosphat 72.92 Prozent zum Gesamtfehler bei, die Metabolitquantifizierung 43.55 bzw. 19.18 Prozent. Somit konnten die Schritte der Probeneinengung durch Evaporation und der Quantifizierung eindeutig als größte Fehlerquellen identifiziert werden. Mit dem Ziel den Gesamt-Fehler der Metabolitquantifizierung zu minimieren bietet sich hier somit der erfolversprechendste Ansatz. Denkbar wäre ein optimiertes Evaporationsprotokoll zu nutzen, das, anstatt festdefinierter Druckstufen abzufahren, den Druck im Evaporator basierend auf der Temperatur in den Proben regelt. Dies führt zu einer gleichmäßigeren Verdampfung der Proben und würde die Reproduzierbarkeit erhöhen. Die Optimierung der Metabolitquantifizierung ist um einiges komplexer. Bei den genutzten massenspektrometrischen Analyseverfahren gibt es sowohl eine chromatographische Ebene als auch die der Ionisierung und Massentrennung. Über eine Anpassung der Temperaturgradienten in der GC und analog einer Optimierung der Laufmittelzusammensetzung sowie der Laufmittelgradienten in der HPLC/LC kann eine Verbesserung der chromatographischen Trennung erfolgen. Die Wahl einer geeigneten Säule ist hierbei essentiell. Für die massenspektrometrische Trennung ist es erforderlich die Salzfracht in den Proben minimal zu halten, die Ionisierungsenergie anzupassen und SIR-Funktionen bzw. Ionenübergänge geeignet zu wählen. Allgemein ist aber festzuhalten, dass die hier eingesetzten Methoden bereits intensiv mit Blick auf die chromatographische Trennung optimiert wurden. Daher ist es ebenfalls denkbar, dass die Varianz in der Metabolitquantifizierung auf Interaktionen mit der biologischen Matrix in der Probe zurückzuführen ist. In diesem Fall ist eine Optimierung der Probenaufarbeitung anzustreben. So könnte beispielsweise eine mehrphasige Chloroform-Fällung durchgeführt werden oder ein größeres Volumen hierfür genutzt werden. Darüber hinaus ist zu überlegen, ob die Bedingungen während der Extraktion z.B. mit Blick auf den pH-Wert optimiert werden können. Die übrigen Variablen tragen jeweils zu weniger als 10 Prozent zum Gesamtfehler bei. Bei den präsentierten Beispiel-Metaboliten war die per optischer Zellzahlbestimmung ermittelte Lebendzelldichte (cx) zu 5.67 bzw. 4.82 Prozent am Gesamtfehler beteiligt. Die Suche nach einer idealen Verdünnungsstufe könnte diesen Fehler

weiter reduzieren, da die eigentliche Meßmethode jedoch unverändert bleibt, ist fraglich ob hiermit lohnenswerte Verbesserungen erreicht werden können.

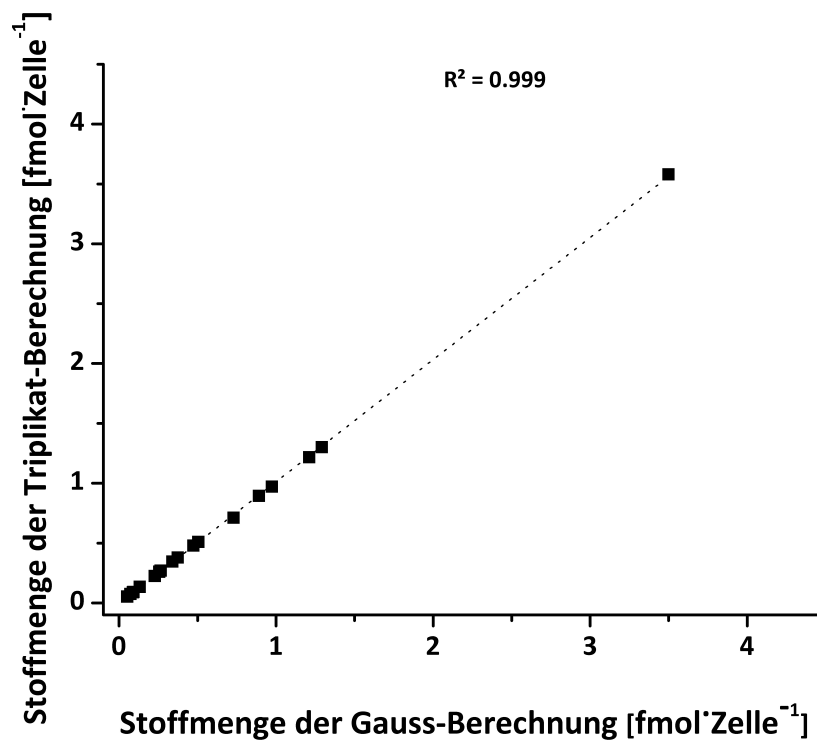


Abb. 8: Auftragung der jeweiligen Stoffmengen pro Zellen in fmol der per LC-MS gemessenen Metabolite. Die Stoffmengen sind in aufsteigender Reihenfolge sortiert (GDP, 6PG, cis-Aco, GTP, 2PG/3PG, GMP, iso-Cit, Fum, FbP, PEP, F6P, AMP, G6P, aKG, ADP, ATP, Citr, Mal, Suc). Die Daten wurden ausgehend von drei Replikaten bestimmt.

Tab. 22: Identifizierung bedeutender Einzelfehlergrößen. Dargestellt sind die Beiträge je eines Metaboliten pro Quantifizierungsplattform zur Fehlerquadratsumme. Dargestellt sind die Daten ausgehend von drei Replikaten.

Variable	Beitrag zur Fehlerquadratsumme [%]	
	Mal	G6P
$m_{\text{Reaktionsgefäß}}$ nach Evaporation	25.02	72.98
$m_{\text{Reaktionsgefäß}}$ ohne Probe	7.15	0.19
$m_{\text{Reaktionsgefäß}}$ mit Probe	0.3	1.93
Zelldichte	5.67	4.82
$m_{\text{Becher}}$ mit Probe ohne LSM	8.99	0.56
$m_{\text{Becher}}$ ohne Probe ohne LSM	3.74	0.14
$m_{\text{Becher}}$ mit Probe mit LSM	5.54	0.21
Volumen 2 mL MetOH	0.01	0.01
Volumen Zellsuspension	0.03	0.03
Konzentration nach GC/LC-MS	43.55	19.19

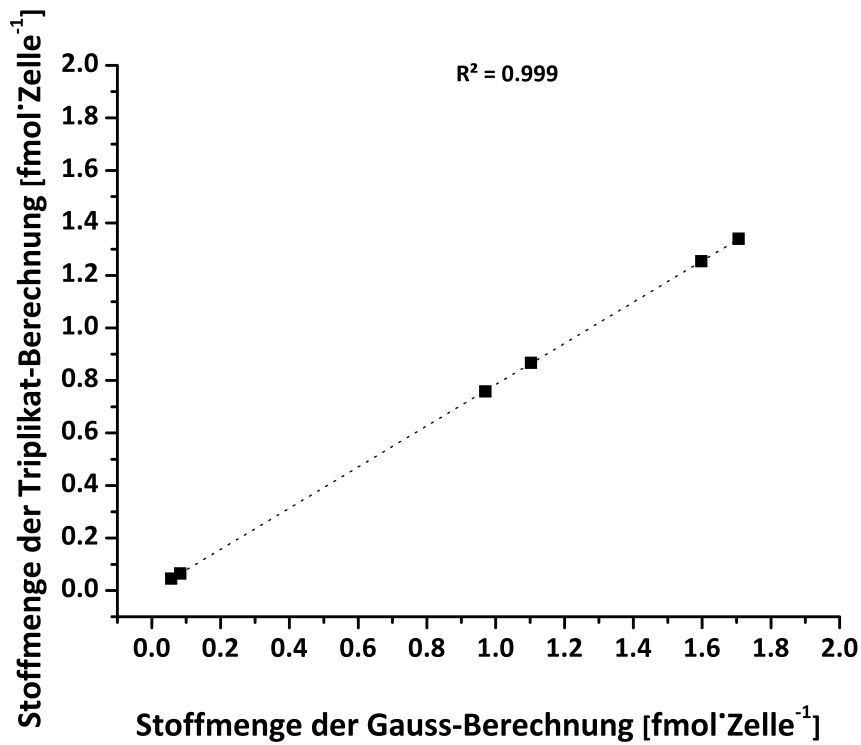


Abb. 9: Auftragung der jeweiligen Stoffmengen pro Zellen in fmol der per GC-MS gemessenen Metabolite. Die Stoffmengen sind in aufsteigender Reihenfolge sortiert (Pyr, Mal, Cit, Fum, GLU, VAL). Die Daten wurden ausgehend von drei Replikaten bestimmt.

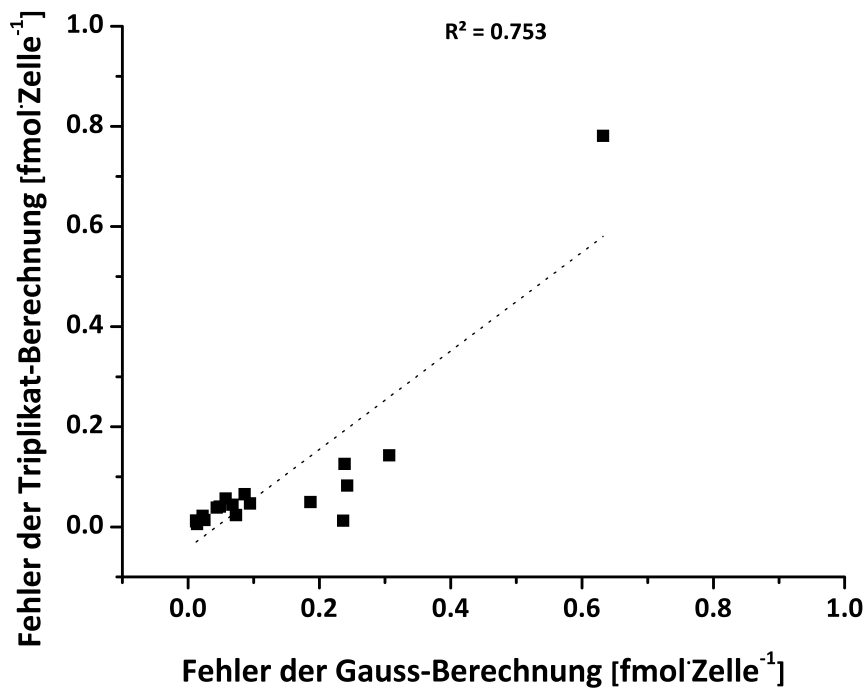


Abb. 10: Auftragung der jeweiligen Fehler in fmol·Zelle<sup>-1</sup> der per LC-MS gemessenen Metabolite. Die Fehler sind in aufsteigender Reihenfolge sortiert (cis-Aco, 6PG, GDP, GMP, GTP, 2PG/3PG, Fum, FbP, PEP, F6P, iso-Cit, AMP, G6P, ADP, ATP, Mal, Cit, aKG, Suc). Die Daten wurden ausgehend von drei Replikaten bestimmt.



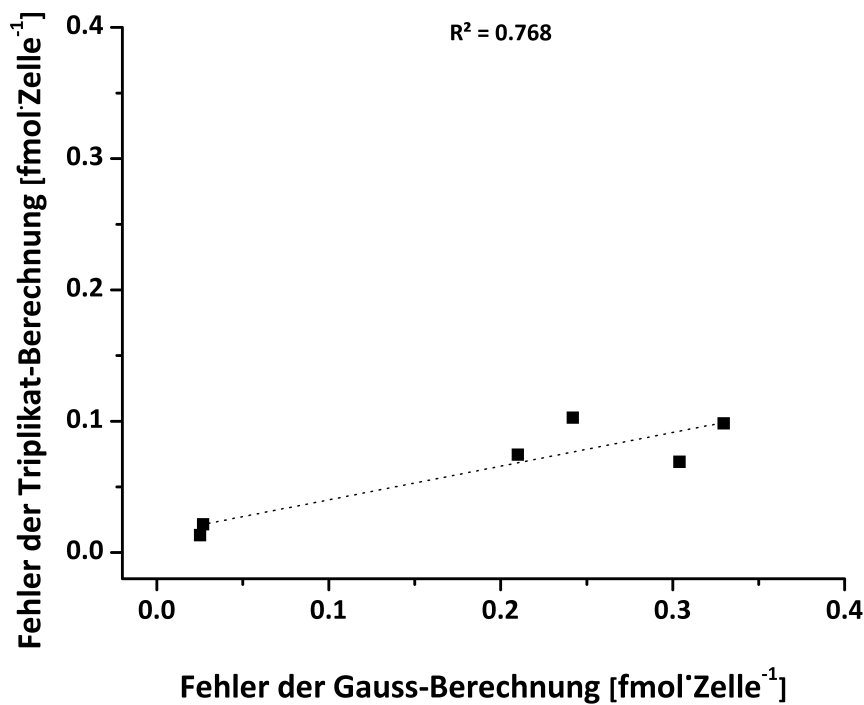


Abb. 11: Auftragung der jeweiligen Fehler pro Zellen in fmol der per GC-MS gemessenen Metabolite. Die Stoffmengen sind in aufsteigender Reihenfolge sortiert (Cit, GLU, VAL, Pyr, Fum, Mal). Die Daten wurden ausgehend von drei Replikaten bestimmt.

Wie in Abb. 7 gezeigt, resultierten die beiden Quantifizierungsmethoden je nach untersuchtem Metabolit in unterschiedlichen zellulären Stoffmengen. Die hierbei ermittelten Abweichungen waren aber gering und lagen jeweils im Fehlerbereich der zu vergleichenden Methode. Des Weiteren ist die Berechnung nach Gleichung 1 besser in der Lage die Variationen aus dem Evaporationsschritt zu kompensieren. Für den weiteren Verlauf der Arbeit wurde aus diesem Grund auf die Berechnung nach Gleichung 1 zurückgegriffen und die Berechnung nach Gleichung 2 dafür genutzt potentielle Fehlerquellen der Methode zu identifizieren.

Bei der Betrachtung der relevanten Fehlergrößen bei der Probenahme und –aufarbeitung fällt auf, dass der Aspekt des Leakage im Vergleich zu Tillack *et al* nicht berücksichtigt wurde. Die Leakageproblematik wurde bewusst vernachlässigt, da dies eine konstante Leakageneigung über den gesamten Kulturverlauf für jeden einzelnen Metaboliten voraussetzt. Von dieser kann aber nicht ausgegangen werden, da hierfür ausgeschlossen werden muss, dass es im Laufe der Kultivierung und den damit veränderlichen Substratverfügbarkeiten im Medium zu Variationen der Phospholipid-Membranzusammensetzung kommt. Eine Variation im Aufbau der Zellmembran könnte zu einer veränderten Scherr- und Druckstabilität der Zellen führen und somit das Leakage durch Zelldisintegration erhöhen. Es ist bekannt, dass die Zu-

sammensetzung des Phospholipid-Bilayers stark vom Zelltyp abhängt (Andoh 2013), so dass zu vermuten ist, dass jeder Zelltyp ein charakteristisches Leakageverhalten zeigt. Darüber hinaus ist zu überlegen, ob dieses Verhalten über den Kulturverlauf konstant ist. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Medienzusammensetzung die Plasmamembranz-Zusammensetzung beeinflussen kann (Berlin 1996; Savelkoul 2012), sind in diesem Zusammenhang die wechselnden Verfügbarkeiten von Substraten im Medium relevant. Ein weiterer Aspekt ist das Transporter-vermittelte Leakage. Hierbei kommt es durch Konzentrationsunterschiede des intrazellulären Milieus und des umgebenden Medium zu einem Transport aus der Zelle hinaus oder in diese hinein. Für den Wasch- und Quenchingvorgang wäre der Efflux aus der Zelle hinaus zu betrachten. Eine im Laufe der Kultivierung variierende Substratverfügbarkeit im Medium könnte die zellulären Poolgrößen beeinflussen und somit über den Konzentrationsgradienten Einfluss auf den Verlust von Metaboliten ausüben. Entsprechende Beobachtungen, die den Einfluss der Kultivierungsdauer oder der Substratverfügbarkeit auf die intrazellulären Konzentrationen belegen, wurden bereits für diverse Zellsysteme gemacht (Baydoun, Emery et al. 1990), (Dietmair, Hodson et al. 2012), (Sellick, Croxford et al. 2011). Aufgrund dieser Überlegungen wurde darauf verzichtet das Leakageverhalten der Zellen zu berücksichtigen.

## 5.2 Überprüfung der Anwendbarkeit der fraktionellen Filtration bei der subzellulären Metabolomanalyse in Säugerzellen

Die in dieser Arbeit angestrebte subzelluläre Metabolomanalyse soll mit Hilfe einer fraktionellen Filtration realisiert werden. Hierbei wird eine Differenzmessung zwischen intakten Zellen und zytosolisch abgereicherten Zellen durchgeführt. Um verlässliche Daten für die Berechnungen der mitochondrialen Fraktion zu erhalten ist es notwendig, dass das experimentelle Setup die Probenerzeugung nicht beeinflusst. Die zu Beginn dieses Kapitels aufgeführten Probleme werden nun im Einzelnen überprüft und diskutiert.

### 5.2.1 Voruntersuchungen zur Eignung der Filtermembranen in Bezug auf ihre Stabilität und unspezifischer Metabolitwiederfindung

Für die Filtration von Zellsuspensionen und anschließender Extraktion der Zellen im Filter ist es notwendig, dass die Membranen sich während der Prozessierung inert verhalten. Hierzu wurde das Extraktionsverhalten des Tiefen- und des Oberflächenfilters sowie einer Kombination aus beiden überprüft. Bei den Leerextraktionen wurden die Filter mit Wasser konditioniert, dann mit Waschpuffer gewaschen und anschließend gemäß dem regulären Protokoll extrahiert. Bei einer anschließenden Vermessung im Fullscan-Modus per GC-MS wurde mit Hilfe der TMS-Derivatisierung nach störenden Substanzen gesucht, die eine Quantifizierung von Zentralstoffwechselmetaboliten erschweren würden.

Abb. 12 zeigt die Chromatogramme der entsprechenden Filterproben. Zum direkten Vergleich wurde eine Leerderivatisierung ohne Filter gemessen um den Hintergrund der Proben beurteilen zu können. In allen Proben wurde 2-methyl-dodecyl-ester-2-Propensäure, 2TMS-Oxalat, Diphenyl-(trimethylsilyl)-phosphin, 2TMS-Lactat und 1,2,3-trimethyl-Benzol gefunden. Somit lässt sich davon ausgehen, dass es sich hierbei um Artefakte aus dem Gaschromatographen oder dem Massenspektrometer bzw. dem Derivatisierungsprozess handelt. Die Filterproben wiesen allesamt einen ausgeprägten 3TMS-Phosphat-Peak auf, dies ist auf Rückstände des KPO<sub>4</sub>-gepufferten Waschpuffers zurückzuführen. Bei den kleineren Phosphatmengen in der Leerprobe könnte es sich um Verschleppungen aus den vorangegangenen Proben handeln. Hohe Salzfrachten bei massenspektrometrischen Messungen sind kritisch zu beurteilen, da sie die Messung beeinflussen können (Dietmair, Timmins et al. 2010). Durch das Salz kann es zu einer Verschmutzung der Quelle und zu einer Überladung mit ioni-

sierten Molekülen kommen. Für die späteren quantitativen Analysen von Metabolitproben wurde dieses Problem reduziert, indem keine Fullscan-Messungen durchgeführt wurden, sondern single ion recording-(SIR)-Funktionen. SIR-Funktionen besitzen den Vorteil, dass Ionen der Zielmoleküle im Quadrupol selektiert werden. Dies führt dazu, dass mehr Messungen pro Zeiteinheit für die definierten  $m/z$  durchgeführt werden können und somit die Sensitivität des Gerätes erhöht wird. Gleichermaßen können Salzionen in diesen SIR-Funktionen ausgeschlossen und die Salzfracht im Detektor des Massenspektrometers verringert werden. Bei den Filterproben wurden Tris-(trimethylsilyl)-borat-Peaks gemessen. Die Typ A/D Filter bestehen aus Borosilikatglas während die Metrigard-Filter aus Glasfaser-verstärktem Kunststoff mit Acryl-Binder hergestellt werden. Vermutlich beinhalten beide Filter eine Borat-Komponente. Die Peakfläche der ADM-Kombination ist größer als die jeweiligen Einzel-Peaks von Typ AD und M und der Leerextraktion, dies spricht dafür dass es sich nicht um Rückstände aus der GC-MS oder der Filterauflage handelt. Allerdings nehmen die Peakflächen von Tris-(trimethylsilyl)-borat im Laufe der Messungen insgesamt ab, so dass diese Möglichkeit nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Extraktion der Filtermembranen nicht dazu führt, dass Substanzen freigesetzt werden, die eine weitere Metabolit-Analytik verhindern. Für intrazelluläre Laktat- und Oxalat-Messungen sind hingegen andere Messplattformen der GC-MS-Analyse vorzuziehen. Der Problematik der Salzfracht kann durch entsprechende Maßnahmen bei der Vermessung begegnet werden.

Damit die Filtermembranen für eine Filtration eingesetzt werden können ist es zusätzlich notwendig, dass keine Metabolite unspezifisch an sie binden. Deswegen wurde überprüft ob in Abwesenheit von Zellen Metabolite bei der Filtration adsorbieren. Hierzu wurden 150  $\mu\text{L}$  eines 10 mM Metabolitmixes auf eine mit 10 mL Waschpuffer vorkonditionierte Filterkombination von Typ A/D und Metrigard gegeben und gemäß der Methode für den Gesamtzell-aufschluss mit 35 mL Waschpuffer gewaschen. Als Referenzwert für die Wiederfindung im Permeat wurde eine äquivalente Verdünnung des Metabolitmixes in Verdünnungspuffer angefertigt. Untersucht wurden Pyruvat, Citrat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, Malat, Ribose-5P, Glukose-6Phosphat, cisAconitat, AMP, ADP, ATP, Glutamat, Histidin, Glycin, und Tryptophan. Hiermit wurden Intermediate der wichtigsten Stoffwechselwege wie der Glykolyse, des

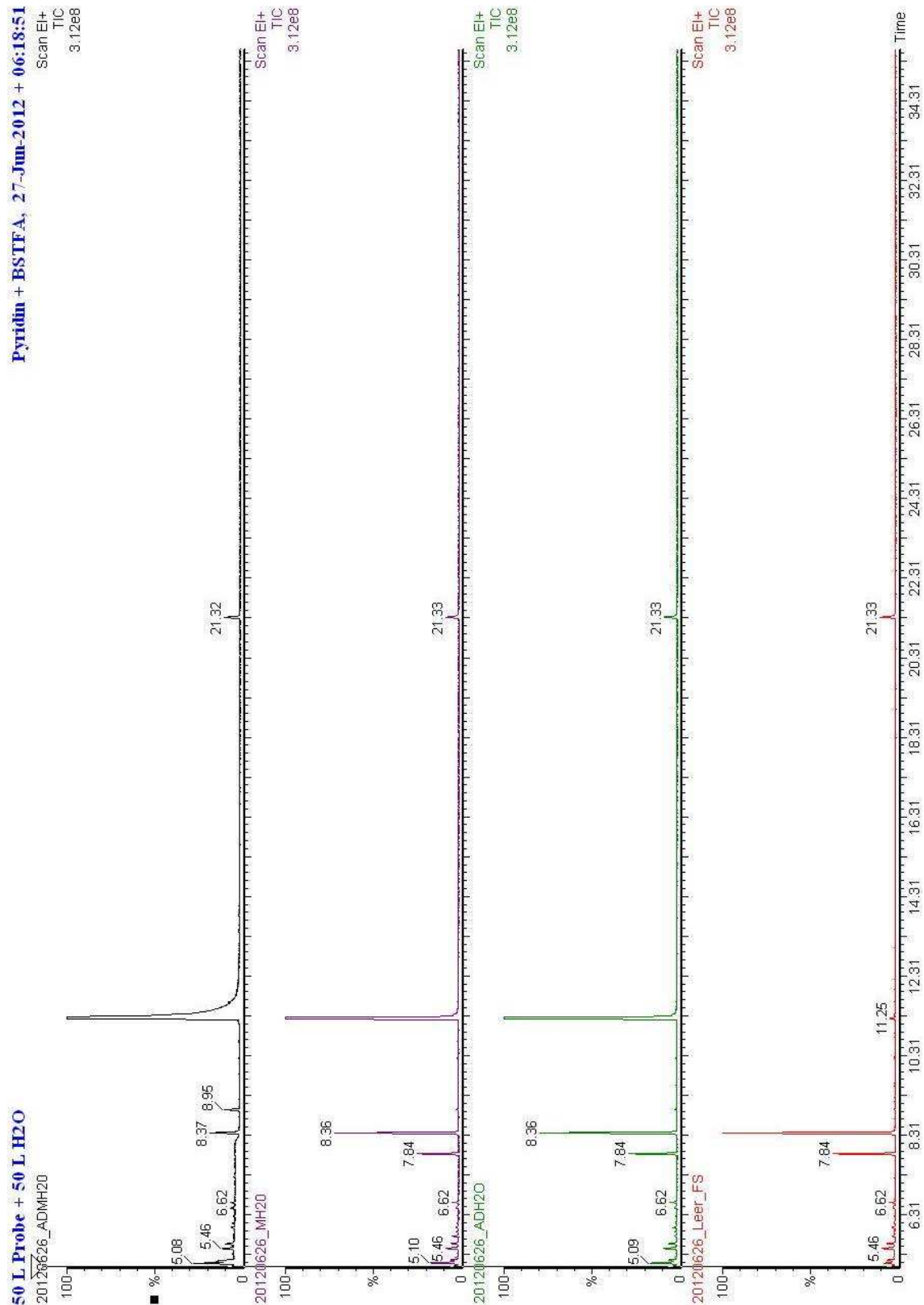


Abb. 12: GC-MS Chromatogramme der Leerextraktionen von mit Wasser konditionierten und mit Waschpuffer filtrierten Tiefenfilter (AD), Membranfilter (M) und einer Kombination von beiden (ADM). Die Proben wurden mit der TMS-Methode derivatisiert und dann im Fullscan-Modus vermessen. Zur Beurteilung des Hintergrundes ist eine Leerderivatisierung (Leer) mit gemessen worden. RT: 21,33 min 2-methyl-dodecyl ester-2-Propensäure, RT: 11,25 min 3TMS-Phosphat, RT: 8,95 min dodecamethyl-Pentasiloxan, RT: 8,36 min 2TMS-Oxalat, RT: 7,84 min Diphenyl-(trimethylsilyl)-phosphin, RT: 6,62 min 2TMS-Lactat, RT: 5,46 min 1,2,3-trimethyl-Benzol, RT: 5,08 min Tris-(trimethylsilyl)-borat

Tab. 23: Wiederfindung eines Metabolitmixes bestehend aus Pyr, Cit, aKG, Mal, R5P, G6P, cisAco, AMP, ADP, ATP, GLU, HIS, GLY, und TRP. Es wurden 150  $\mu$ L 10 mM Stammlösung auf den Filter aufgegeben und die Konzentration im Permeat auf eine äquivalente Verdünnung in Waschpuffer normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Bestimmung aus drei Replikaten mit der relativen Standardabweichung als Fehler.

Analyt	Wiederfindung [%]	Fehler [%]
Pyr	116.21	7.09
Mal	97.38	1.54
aKG	98.30	2.54
Cit	95.23	2.32
R5P	92.57	2.94
G6P	101.72	2.85
cis-Aco	100.98	1.55
AMP	102.33	1.68
ADP	102.35	1.60
ATP	102.27	1.66
GLU	100.47	1.08
HIS	99.75	0.69
GLY	100.02	0.77
TRP	97.16	0.40

Pentose-Phosphatweges, des Citrat-Zyklus, der oxidativen Phosphorylierung sowie von Shuttle-Systemen untersucht. Tab. 23 zeigt die Wiederfindung der 14 ausgewählten Metabolit bei der Filtration im zellfreien Milieu. Hierbei wurden die phosphorylierten Nukleotide per HPLC vermessen, cis-Aconitat per LC-MS und die übrigen Metabolite per GC-MS. Die Werte lagen zwischen  $95.32 \pm 2.32$  % bei Citrat und  $116.21 \pm 7.09$  % bei Pyruvat. Die niedrigste Wiederfindung von  $92.57 \pm 2.94$  % wurde für Ribose-5P ermittelt. Die Ursache hierfür wird allerdings nicht grundsätzlich in der unspezifischen Bindung an die Filtermembranen vermutet, sondern auf die Quantifizierung in der GC-MS zurückgeführt. Ribose-5P liefert in der zugehörigen SIR-Funktion vier spezifische m/z-Verhältnisse, diese können je nach Lauf unterschiedliche verteilt sein, wobei immer nur ein Peak ausgewertet wurde.

Bei der Untersuchung der Membranen konnte somit keine Probleme bezüglich der Integrität und des Ausblutens von störenden Substanzen beobachtet werden. Ferner lagen die Metabolit-Wiederfindungen mit Werten nahe den angestrebten 100 Prozent in einem durchaus akzeptablen Bereich. Somit wurden die beiden Filterttypen A/D und Metrigard als tauglich für weitere Untersuchungen befunden und alle Folgeversuche mit ihnen durchgeführt.

### 5.2.2 Charakterisierung der fraktionellen Filtration als Werkzeug der subzellulären Metabolomanalyse

Für die Untersuchung von zellulären Proben ist es unabdingbar sicherzustellen, dass die Zellen vom umgebenden Medium getrennt werden. Die Konzentrationen im Medium können die intrazellulären Konzentrationen (Dietmair, Timmins et al. 2010) übertreffen. Darüber hinaus übersteigt das extrazelluläre Volumen das zelluläre Volumen der Probe um ein Vielfaches. Die Folge ist, dass bei nicht ausreichender Mediumabreicherung die Störsignale aus dem extrazellulären Milieu eine Auswertung intra- und subzellulärer Messungen verhindern. Aus diesem Grund wurde die Medienabreicherung analog zu Volmer et al für den Tiefenfilter Typ A/D und für die Tiefen-/Membranfilterkombination Typ A/D und Metrigard überprüft. Hierzu wurden 50 mL CHO-DP12 Zellen in 125 mL Schüttelflaschen kultiviert. Die Probenahme erfolgte gemäß dem Protokoll zur Gesamtzellanalyse. Hierbei wurden jeweils  $1E7$ ,  $4E7$  bzw.  $8E7$  Zellen auf den Filter aufgetragen und gequenchet. Pro Zellzahl auf dem Filter wurden drei Replikate untersucht. Analysiert wurden Aminosäuren, da diese in ausreichender Menge im Medium vorliegen und es von diesen verschiedene Arten mit unterschiedlichen Eigenschaften gibt. So wurden jeweils Glutamat, Glycin, Tryptophan und Histidin als typische Vertreter der sauren, polar/neutralen, unpolaren/hydrophoben und basischen Spezies ausgewählt und untersucht.

Abb. 13 zeigt die intrazellulären Daten für das Experiment auf dem Tiefenfilter. Für die aufgetragenen Zellzahlen von  $1E7$ ,  $4E7$  und  $8E7$  Zellen pro Filter betragen die Stoffmengen für Glutamat  $3.51 \pm 0.92$ ,  $3.11 \pm 0.58$  und  $3.57 \pm 0.72$   $\text{fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ . Die intrazellulären Stoffmengen für Glycin, wurden mit  $0.35 \pm 0.11$ ,  $0.28 \pm 0.06$ ,  $0.22 \pm 0.04$   $\text{fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ , für Tryptophan mit  $0.12 \pm 0.02$ ,  $0.11 \pm 0.02$ ,  $0.11 \pm 0.02$   $\text{fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$  und für Histidin mit  $1.66 \pm 0.43$ ,  $1.47 \pm 0.26$  und  $1.66 \pm 0.3$   $\text{fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$  bestimmt. In Abb. 14 sind die intrazellulären Stoffmengen für die Tiefenfilter-Membranfilter-Kombination dargestellt. Hier lagen die intrazellulären Stoffmengen für Glutamat bei  $2.2 \pm 0.5$ ,  $2.45 \pm 0.88$  und  $2.45 \pm 0.39$   $\text{fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ , für Histidin bei  $1.25 \pm 0.28$ ,  $1.27 \pm 0.4$  und  $1.29 \pm 0.19$   $\text{fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ . Die Tryptophan- und Glycin-Stoffmengen wurden mit  $0.40 \pm 0.09$ ,  $0.31 \pm 0.06$  und  $0.26 \pm 0.03$  bzw.  $0.65 \pm 0.17$ ,  $0.55 \pm 0.16$  und  $0.39 \pm 0.06$   $\text{fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$  ermittelt. Die für den Tiefenfilter bestimmten Stoffmengen unterscheiden sich deutlich von denen des Tiefenfilter-Membranfilter-Experiments. Dies liegt daran, dass es sich hier um zwei unabhängige Schüttelkolbenkulturen handelt bei denen nicht zum gleichen Kultivierungszeitpunkt die Proben entnommen wurden. Die Metabolit-Unterschiede zwischen Abb.

13 und Abb. 14 beruhen also lediglich auf Unterschieden im Wachstum der Kulturen und nicht auf eventuellen Einflüssen des zusätzlichen Membranfilters. Auf den Aspekt der Metabolit-Wiederfindung in Anwesenheit von Zellen auf den Filtern wird aber in einem späteren Teil der Arbeit noch genauer eingegangen. Das Ziel dieses Experiments bestand darin zu überprüfen, ob Medienrückstände ausreichend gut abgereichert werden.

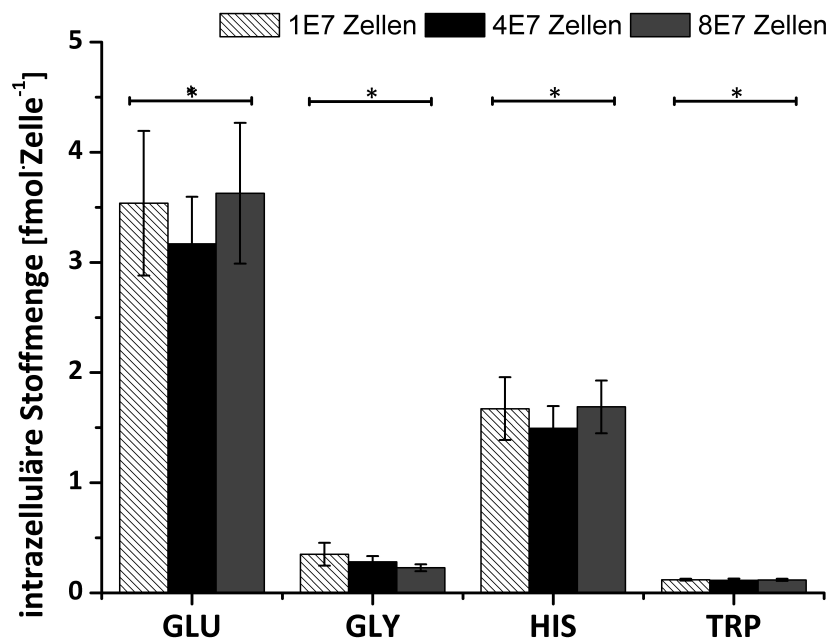


Abb. 13: Bestimmung der intrazellulären Stoffmengen für die vier untersuchten Aminosäuren GLU, GLY, TRP und HIS in Abhängigkeit der filtrierten Zellmengen auf einer Pall AD Membran. Die Filtration erfolgte bei 30 mbar, gewaschen wurde mit 35 mL Waschpuffer. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Replikate mit der Standardabweichung. Die Daten wurden mittels einer einfaktoriellen ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) überprüft: \* bedeutet statistische Insignifikanz, x heißt, dass  $H_0$  verworfen werden musste.

Die hier gezeigten Daten erlauben diese Schlussfolgerung, denn sie zeigen, dass unabhängig von der untersuchten Zellzahl und der jeweiligen Aminosäure keine signifikant unterschiedlichen intrazellulären Messwerte bestimmt wurden. Lediglich bei der Filtermembrankombination zeigte die ANOVA-Analyse, dass bei der Probenahme von 8E7 Zellen die intrazellulären Mengen von Glycin und Tryptophan von den anderen Messwerten abwichen. Hierbei ist aber zu berücksichtigen, dass in den genannten Fällen bei 8E7 Zellen die intrazellulären Stoffmengen geringer sind als bei 1E7 und 4E7 Zellen. Größere Zellzahlen werden zusammen mit einem größeren Medien-Volumen auf die Filtermembranen aufgetragen. Hierdurch ver-



ändert sich das Verhältnis aus Waschpuffer und Zellüberstand. Eine darauf folgende schlechtere Abreicherung des Mediums würde sich in einer Zunahme der intrazellulären Meßwerte in Abhängigkeit der Zellzahl äußern, sowie in ausgeprägten Unterschieden in den Einzelmesswerten und daraus resultierenden großen Messfehlern. Dieses Verhalten konnte nicht nachgewiesen werden, somit ist davon auszugehen, dass die beobachteten Unterschiede zufälliger Natur sind und der kombinierte Wasch- und Quenching-Schritt ausreichend effektiv ist sowie die folgenden Messungen nicht negativ beeinflusst werden.

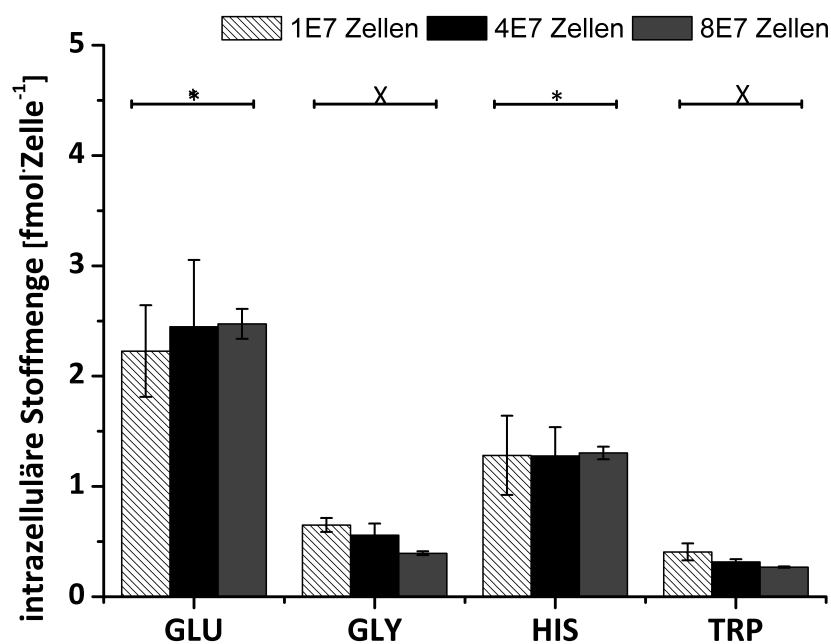


Abb. 14: Bestimmung der intrazellulären Stoffmengen für die vier untersuchten Aminosäuren GLU, GLY, TRP und HIS in Abhängigkeit der filtrierten Zellmengen auf einer Pall AD/Metrigard Membran-Kombination. Die Filtration erfolgte bei 90 mbar, gewaschen wurde mit 35 mL Waschpuffer. Die Daten wurden mittels einer einfaktoriellen ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) überprüft: \* bedeutet statistische Insignifikanz, x heißt, dass  $H_0$  verworfen werden musste.

### 5.2.3 Wiederfindung von intrazellulären Metaboliten auf den Filtern

In 5.2.1 konnte gezeigt werden, dass es bei wässrigen Standards zu keiner unspezifischen Bindung zwischen den Filtermembranen und den ausgewählten Metaboliten kommt. Die Anwendung für systembiologische Untersuchungen erweitert den Ansatz jedoch um eine biologische Matrix. Gerade die Wechselwirkung von zellulären Komponenten mit den Analyten und den Filtermembranen kann dazu führen, dass die Wiederfindung in den Proben verschlechtert wird. In der Literatur sind Beispiele für Nylon- sowie PTFE-Membranen beschrieben bei denen Acetonitril als Extraktionsmittel genutzt wurde (Rabinowitz and Kimball 2007; Dietmair, Timmins et al. 2010). Dietmair und Timmins konnten nur 9 % der auf dem Filter befindlichen Metabolite extrahieren. Im Bewusstsein dieser Problematik ist eine Überprüfung der Wiederfindung für die in dieser Arbeit eingesetzten Glasfaser-basierten Filter notwendig.

Hierfür wurden wie in 4.6 beschrieben Zellen filtriert und extrahiert. Unabhängig davon wurden reine Standardlösungen auf die Filter aufgebracht und vermessen sowie Proben erzeugt, die zusätzlich zu den Zellen noch eine entsprechende Menge des Standardmix enthielten. Der Quotient mit der Summe der reinen Zellen und des Standardmixes als Zähler und den gespikten Zellen als Nenner liefert die Wiederfindung der Metabolite in Anwesenheit der biologischen Matrix auf den Filtern. Werte größer 100 % bedeuten also, dass durch die biologische Matrix die Metabolite schlechter extrahiert werden können. Zum weiteren Verständnis der Daten ist zu berücksichtigen, dass es sich um drei unabhängige Experimente (ohne Detergenz, mit Digitonin, mit SDS) handelt. Innerhalb der drei Versuchsreihen wurden alle Proben gleichbehandelt, das heißt, dass entweder alle Teilversuche (Zelle, Standard, Zelle und Standard) oder keiner einer Detergenzienzugabe in Form des Waschens mit 5 mL Lysepuffer und 30 mL Waschpuffer unterlag. Im Ansatz ohne Detergenzien wurde nur mit 35 mL gewaschen.

Die Daten aus Tab. 24 zeigen, dass je nach untersuchter Stoffgruppe unterschiedlich präzise Wiederfindungen ermittelt wurden. Die Vertreter der Carbonsäuren wiesen unabhängig von der Zugabe von Detergenzien Wiederfindungen auf, die nahe des Zielwertes von 100 % lagen. Insbesondere Fumarat und Malat lieferten mit  $101.47 \pm 6.58$ ,  $95.25 \pm 5.74$  und  $99.53 \pm 7.43$  bzw.  $108.36 \pm 6.23$ ,  $102.14 \pm 5.29$  und  $105.01 \pm 6.74$  % für die Detergenzien-freien, Digitonin- und SDS-haltigen Versuche eine beinahe ideale und überaus gleichmäßige Wiederfindung auf. Pyruvat lieferte Wiederfindungen von  $116.90 \pm 14.06$ ,  $92.03 \pm 6.27$  und  $94.68 \pm 4.54$  %.

Aconitat weist von allen untersuchten Metaboliten die konstant höchste Wiederfindung mit  $138.32 \pm 21.54$ ,  $142.44 \pm 11.29$  und  $155.52 \pm 39.07$  % auf. Die Werte der untersuchten Zucker Glukose-6Phosphat und Ribose-5Phosphat wurden zu  $109.79 \pm 7.10$ ,  $90.86 \pm 6.92$  und  $117.42 \pm 32.12$  % bzw.  $126.10 \pm 20.17$ ,  $130.21 \pm 12.23$  und  $234.91 \pm 70.18$  % ermittelt. Die Extraktion der phosphorylierten Nukleotide lieferte Wiederfindungen um 100 %. Lediglich AMP und ADP zeigten drei auffällige Messwerte. AMP wurde ohne Detergenz zu  $168.28 \pm 9.33$  % und in Gegenwart von Digitonin zu  $124.95 \pm 4.93$  % extrahiert wohingegen ADP in Gegenwart von Digitonin nur zu  $79.30 \pm 3.18$  % wiedergefunden wurde. Ein Erklärungsversuch hierzu wird weiter unten im Text gemacht. Betrachtet man die Wiederfindungen der untersuchten Aminosäuren ohne Detergenzien, so sieht man, dass die Wiederfindungen zwischen  $115.12 \pm 6.44$  und  $123.42 \pm 5.38$  % lagen. Die Anwendung eines SDS-haltigen Lysepuffers resultiert in Wiederfindungen von  $115.97 \pm 14.45$  –  $123.03 \pm 21.43$  %. In beiden Fällen, lagen die Werte über den angestrebten 100 %. Der Digitonin-Ansatz lieferte Werte zwischen  $95.79 \pm 15.31$  und  $109.02 \pm 6.12$  %.

Tab. 24: Wiederfindung ausgewählter Metabolite unter Berücksichtigung einer biologischen Matrix im Filteransatz in An- und Abwesenheit der Detergenzien Digitonin und SDS. Bestimmt wurden die Wiederfindungen anhand der Gleichung:  $(\text{Zellen} + \text{Standard}) / \text{gespikete Zellen}$  basierend auf jeweils drei Filterreplikaten samt dem über eine Fehlerfortpflanzung ermittelten Fehler.

Metabolit	ohne Detergenz		0.1 % Digitonin		0.01 % SDS	
	Wiederfindung [%]	±	Wiederfindung [%]	±	Wiederfindung [%]	±
G6P	109.79	7.10	90.86	6.92	117.42	32.12
R5P	126.10	20.17	130.21	12.23	234.91	70.18
Pyr	116.90	14.06	92.03	6.27	94.68	4.54
Cit	107.85	7.55	111.96	8.59	115.03	7.35
cisAco	138.32	21.54	142.44	11.29	155.52	39.07
Fum	101.47	6.58	95.25	5.74	99.53	7.32
Mal	108.36	6.23	102.14	5.29	105.01	6.74
AMP	168.28	9.33	124.95	4.93	100.56	5.72
ADP	101.89	9.18	79.30	3.18	103.72	5.25
ATP	95.61	4.86	93.85	17.73	90.74	7.34
GLU	117.69	9.56	95.79	15.31	115.97	14.45
HIS	118.37	7.37	100.09	7.30	123.03	21.43
GLY	115.12	6.44	99.07	7.79	119.17	19.43
TRP	123.42	5.38	109.02	6.12	122.32	23.45

Da cis-Aconitat in den Abreicherungsexperimenten ebenso wie Glukose-6Phosphat eine besondere Bedeutung zukommt, ist es hierbei wichtig, dass zwischen dem Detergenz-freien

Ansatz zur Referenzmessung und der Detergenz-bedingten Zellyse keine störenden Unterschiede in den Wiederfindungen existieren. Eine t-Test-Analyse für die drei Werte bestätigte dies. Mit Blick auf die Genauigkeit zeigten die Daten Potential zur Verbesserung, die prinzipielle Auswertung der Daten wird durch die Nutzung von Detergenzien jedoch nicht beeinträchtigt. Die Daten für Glukose-6Phosphat hingegen lagen nah an den idealisierten 100 % wobei die Werte für Detergenz-freie und Digitonin-haltige Mileus in Anbetracht der Fehler nur gering voneinander abwichen. Die Bestimmung des zweiten Zuckers, Ribose-5P, zeigt in allen drei untersuchten Szenarien Wiederfindungen von über 120 %. Gründe hier für können die sehr geringen Stoffmengen in der Probe sein oder Wechselwirkungen mit der Matrix. Ein Abgleich mit Werten aus der Literatur zeigt aber, dass intrazelluläre Ribose/Ribulose-5P Pools mit  $0.2 \text{ fmol/Zelle}^{-1}$  in CHO-DP12-Zellen sehr niedrig sind (Volmer, Northoff et al. 2010). Ein Weg die Problematik der originär niedrigen Ribose-5P Mengen pro Probe zu umgehen, wäre es mehr Zellen auf den Filter aufzutragen. Dies würde aber eine Anpassung der Filtrationsbedingungen erfordern. Für die in dieser Methode genutzte GC-MS Methodik wurden bereits Wiederfindungen von  $98.5 \pm 10.5 \%$  für Ribose-5P geschildert, diese beziehen sich jedoch auf Proben einer Hefekultivierung mit Heißwasser-Extraktion und sind somit nur bedingt übertragbar (Vielhauer 2011). In Tab. 25 sind zum Vergleich die Wiederfindungen für MDCK-Zellen bei einer Methanol-Chloroform-Extraktion von Ritter et al. aufgelistet. Diese Arbeit galt als Grundlage für eine Optimierung der Extraktionsmethode mit Blick auf phosphorylierte Metabolite im Rahmen einer ausgelagerten Diplom-Arbeit (Illner, 2012). Im Ansatz von Ritter liegen die Wiederfindungen der Carbonsäuren und der phosphorylierten Nukleotide ebenfalls in einem Wertebereich von  $100 \pm 10 \%$ . Lediglich Glukose-6Phosphat und AMP weichen geringfügig davon ab. Auch hier fällt auf, dass von den phosphorylierten Nukleotiden AMP die höchste Wiederfindung zeigt. Die Wiederfindung von cis-Aconitat ist mit  $94.5 \pm 0.7 \%$  deutlich genauer als in dieser Arbeit. Bei den MDCK-Zellen handelt es sich um adhärent wachsende Zellen, so dass im ersten Extraktionsschritt direkt mit einem Methanol-Chloroform-Gemisch gearbeitet wurde. Die in dieser Arbeit extrahierten Filter erlaubten dies nicht, da die Gefahr bestand, dass die Chloroform-Phase den Filter verblockt und die weitere Aufarbeitung verhindert. Darüber hinaus enthielt der Ansatz von Ritter eine puffernde Tricin-Komponente.

Die in Tab. 24 gezeigten Daten legen den Schluss nahe, dass es bei der Extraktion noch weiteres Optimierungspotential gibt. In Anwesenheit von Digitonin waren die Wiederfindungen

fast durchgehend um wenige Prozent geringer als beim Ansatz ohne Detergenz. Wie oben erläutert bedeuten Werte über 100 %, dass in Anwesenheit der biologischen Matrix nicht alle Metabolite extrahiert werden. Es ist vorstellbar, dass die Zellen im nassen und somit aufgequollenen Filter nicht vollständig zugänglich sind für die Extraktionslösung. Dieser Ansatz wurde auch schon von (da Luz, Hans et al. 2013) postuliert.

Tab. 25: vergleichende Auflistung der Metabolitwiederfindungen von Ritter, Genzel et al. 2008 für eine vergleichbare Methanol-Chloroform-Extraktion von MDCK-Zellen sowie für eine Heiss-Wasser-Extraktion in Hefen mit einer identischen GC-MS-Analytik (Vielhauer 2011). Die Daten von Ritter zeigen Mittelwerte aus fünf Replikaten mit der Standardabweichung als Fehler, während Vielhauer Dreifachbestimmungen nutzt.

Metabolit	Wiederfindung [%]	±	Author
G6P	84.60	2.00	Ritter et al.
cisAco	94.50	0.70	Ritter et al.
Fumarat	93.80	2.20	Ritter et al.
Mal+CMP	90.10	3.70	Ritter et al.
AMP	111.20	1.00	Ritter et al.
ADP	98.10	1.30	Ritter et al.
ATP	98.30	3.70	Ritter et al.
G6P	101.60	13.00	Vielhauer
R5P	98.50	10.50	Vielhauer
Cit	99.00	1.30	Vielhauer
Fum	103.00	4.60	Vielhauer
Mal	97.30	4.60	Vielhauer

Die Zugabe von Digonin bewirkt eine Perforation der Zellmembran, möglicherweise verhindert dies die Bildung von Toträumen im Filter durch Zellmembranen und Debris. Um diesem Problem zukünftig zu begegnen muss ein Weg gefunden werden, um alle Zellen im Filter zu erreichen. Denkbar wäre hierbei eine Ultraschallbehandlung während der Inkubation oder die mechanische Durchmischung des Filters und seines Inhalts. Ebenso könnte eine Erhöhung der Anzahl der Extraktionsschritte erwogen werden, bei allen möglichen Optionen gilt es hierbei aber den Mehrnutzen gegenüber der potentiellen Volumen- und Stoffmengen-Verlusten kritisch zu hinterfragen. Für diese Arbeit wird nicht davon ausgegangen, dass die Zugänglichkeit der Zellen bei der Extraktion die Messungen stark verfälscht, da für die Bestimmung kompartmentärer Konzentrationen sowohl Gesamtzellanalysen als auch cytosolisch angereicherte Zellen genutzt werden. Wenn die Hypothese von da Luz zutrifft, so wäre

die mitochondriale Fraktion aufgrund ihres geringeren Volumens von der Zugänglichkeit des Extraktionsmittels stärker betroffen als die cytosolische. Gerade durch die Nutzung eines lysierenden Reagenz kann aber sichergestellt werden, dass die Mitochondrien erreicht werden.

Für die fraktionelle Filtration ist es notwendig ein präzises und auch reproduzierbares Ergebnis zu erhalten. Für die untersuchten Detergenzien lassen sich zum Teil Unterschiede feststellen, jedoch erscheint allein von den realisierten Wiederfindungen keins als vollkommen ungeeignet. Mit Blick auf die Reproduzierbarkeit zeigt sich jedoch, dass die Summe der relativen Fehler in Tab. 26 der Ansätze ohne und mit Digitonin gleich groß ist. Im SDS-haltigen System beträgt die Summe jedoch 1.72 statt 1.09. Insbesondere bei Glukose-6Phosphat, Ribose-5P, cisAconitat und den Aminosäuren kam es zu starken Schwankungen der Messwerte. Aus diesem Grund ist aus Sicht der Reproduzierbarkeit Digitonin als Komponente des Lysepuffers dem Einsatz von SDS vorzuziehen.

Tab. 26: Darstellung der relativen Fehler der Wiederfindungen und der Summe der relativen Fehler aus Tab. 24 in Abhängigkeit des Versuchansatzes.

Metabolit	ohne Detergenz	0.1 % Digitonin	0.01 % SDS
G6P	0.06	0.08	0.27
R5P	0.16	0.09	0.30
Pyruvat	0.12	0.07	0.05
Citrat	0.07	0.08	0.06
cisAco	0.16	0.08	0.25
Fumarat	0.06	0.06	0.07
Malat	0.06	0.05	0.06
AMP	0.06	0.04	0.06
ADP	0.09	0.04	0.05
ATP	0.05	0.19	0.08
GLU	0.08	0.16	0.12
HIS	0.06	0.07	0.17
GLY	0.06	0.08	0.16
Summe	1.09	1.09	1.72

### 5.2.4 Extraktstabilität in Abhängigkeit der Lagerdauer

Für die Untersuchung von metabolischen Extrakten ist es generell erstrebenswert diese unmittelbar nach der Generierung zu vermessen. Aus diversen Gründen ist dies jedoch im Laboralltag nicht immer möglich. Deshalb wurde überprüft welchen Einfluss die Lagerdauer auf die intrazellulären Stoffmengen hat und ob die Präsenz der Detergenzien Digitonin und SDS hierbei eine Rolle spielt. Hierzu wurden entsprechend Proben erzeugt und diese 24 h, 14 und 28 d nach der Extraktion vermessen. Das Metabolitspektrum orientierte sich grundlegend am Mix aus 5.2.3, jedoch konnte im Routine-Betrieb nur auf die Messplattformen HPLC und GC-MS zurückgegriffen werden. Aus diesem Grund war eine Messung der cis-Aconitat-Gehalte, die nur über eine LC-MS-Messung zugänglich sind, nicht möglich und es wurde auf eine Erfassung des cis-Aconitat-Signals verzichtet. In den Abb. 15, Abb. 16 und Abb. 17 sind die intrazellulären Stoffmengen in Abhängigkeit der Lagerdauer und des Einsatzes von Detergenzien-haltigen Lysepuffern dargestellt.

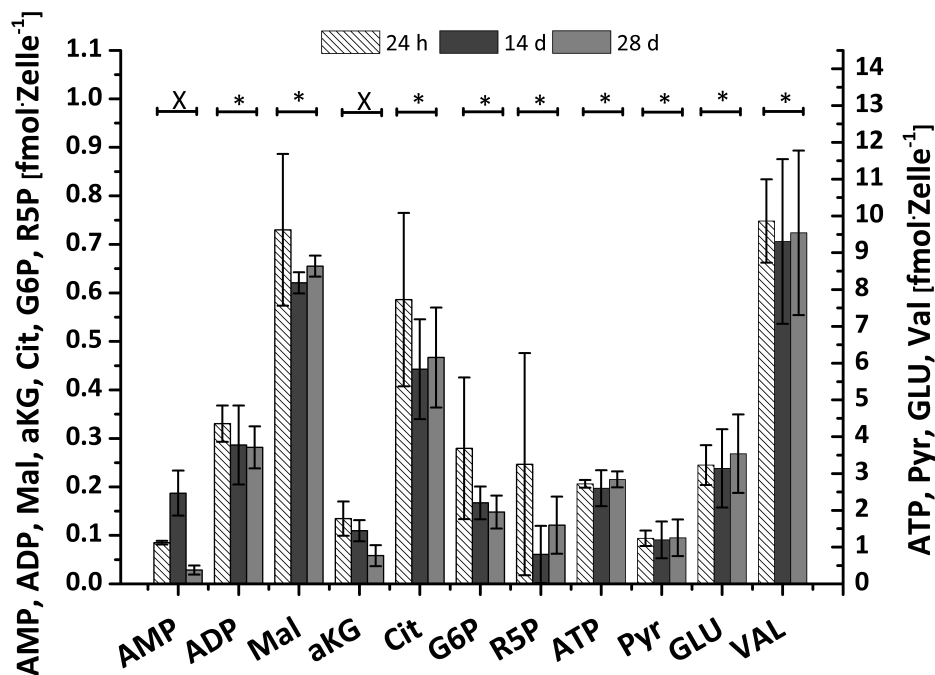


Abb. 15: intrazelluläre Stoffmengen in Abhängigkeit der Lagerdauer der Zellextrakte bei -70 °C einer Gesamtzell-Analyse ohne Detergenzien-haltigen Lysepuffer. Die Replikate eines Ansatzes wurden 24 h, 14 d und 28 d nach der Extraktion vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Filterreplikate mit der Standardabweichung als Fehler. Die Daten wurden mittels einer einfaktoriellem ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) überprüft: \* bedeutet statistische Insignifikanz, x heißt, dass  $H_0$  verworfen werden musste.

Abb. 15 zeigt die Extraktstabilität bei der Vorgehensweise einer Gesamtzell-Analyse ohne Einsatz eines Lysepuffers. Hierbei ist ersichtlich, dass die intrazellulären Stoffmengen für ADP, ATP, Malat, Citrat, Pyruvat sowie Glutamat und Valin im Laufe der Lagerdauer nahezu konstant blieben, bzw. im Fall von Malat und Citrat aufgrund der ermittelten Standardabweichung keine weitere Aussage getroffen werden konnte. Des Weiteren kann festgestellt werden, dass die per HPLC vermessenen Nukleotide und die Aminosäuren geringere Messfehler aufweisen als die GC-Messungen der Carbonsäuren und Zucker. Erklärbar ist dies durch ein Verschleppen des letzten Standards vor der Probenreihe in der Messesequenz bei den GC-MS-Messungen. Dieses Phänomen blieb bei vorherigen Messungen unentdeckt, da es nicht bei allen Metaboliten auftritt. Um diesem Problem zu begegnen wurde für die nachfolgenden Messungen immer ein Deaktivierungslauf zwischen Standardreihe und Probensequenz geschaltet, der die Standardabweichungen in Abb. 16 und Abb. 17 reduzierte. Deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Zeitfenstern traten für die AMP-, a-Ketoglutarat und Ribose-5P-Konzentrationen auf. a-Ketoglutarat und AMP sind in diesem Ansatz die einzigen Metabolite bei denen eine signifikante Abnahme der intrazellulären Stoffmenge eindeutig nachweisbar war. Diese sanken von anfänglichen  $0.134 \pm 0.035$  nach 14 d auf  $0.109 \pm 0.021$  und nach 28 d schließlich auf  $0.065 \pm 0.021$  bzw. von  $0.09 \pm 0.01$  auf  $0.18 \pm 0.04$  und schließlich  $0.03 \pm 0.01$   $\text{fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ . Dies entsprach für a-Ketoglutarat einem Rückgang auf etwa 46 % der Ursprungsstoffmenge. Betrachtet man die intrazellulären Glukose-6Phosphat Stoffmengen so findet man auch hier eine Abnahme von  $0.279 \pm 0.145$  auf  $0.167 \pm 0.033$  und schließlich  $0.148 \pm 0.033$   $\text{fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ , was einem Restgehalt von 55 % entsprach. Aufgrund der Standardabweichung der 24 h-Messung konnte hier jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass die Proben signifikant unterschiedlich in Abhängigkeit der Lagerdauer waren.

In Abb. 16 ist die Entwicklung der intrazellulären Stoffmenge bei Einsatz eines Digitonin-haltigen Lysepuffers dargestellt. Die zuvor bezüglich der Lagerstabilität als unbedenklich identifizierten Metabolite wiesen auch in diesem Fall unkritisches Verhalten auf. Die ermittelten Werte von AMP und Ribose-5P wiesen hingegen über die drei Messpunkte erneut starke Unterschiede auf. Darüber hinaus ist nach 14 d-Lagerdauer für Pyruvat eine Abnahmen in den Proben offensichtlich. Die intrazelluläre Stoffmenge von Pyruvat sank von initialen  $0.319 \pm 0.068$  auf  $0.200 \pm 0.034$   $\text{fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ . Dieser Rückgang ist vermutlich nicht auf eine Degradation im Extrakt zurückzuführen, sondern auf eine schleichende Alterung des Filaments



der GC-MS im Laufe der Probensequenz. Im Anschluss an diese Messung wurde die Quelle erneuert und kalibriert, so dass nach 28 d Lagerdauer wieder  $0.309 \pm 0.058 \text{ fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$  gemessen wurden. Im Vergleich zu Abb. 15 und Abb. 17 fällt die Alterung des Filaments auf, da die Stoffmengen in den Proben des Digitonin-Ansatzes geringer waren. a-Ketoglutarat und Glukose-6Phosphat wiesen erneut eine Abnahme im intrazellulären Signal auf. Die a-Ketoglutarat Menge pro Zelle sank von  $0.112 \pm 0.000$  über  $0.117 \pm 0.021$  auf  $0.047 \pm 0.003 \text{ fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ . Die Entwicklung des Glukose-6Phosphat-Signals verlief von  $0.132 \pm 0.000$  über  $0.119 \pm 0.020$  auf  $0.071 \pm 0.001 \text{ fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ . Dies entspricht Restgehalten von 45 bzw. 53 %.

Die intrazellulären Stoffmengen bei Anwendung eines SDS-haltigen Waschpuffers und deren Entwicklung im Laufe der Lagerdauer sind in Abb. 17 dargestellt. Bis auf AMP, ADP, Ribose-5P, a-Ketoglutarat und Glukose-6Phosphat wiesen erneut alle untersuchten Metabolite konstante Signale auf. Die intrazelluläre a-Ketoglutarat-Stoffmenge nahm von  $0.153 \pm 0.006$  über  $0.170 \pm 0.018$  auf  $0.060 \pm 0.005 \text{ fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$  ab, Glukose-6Phosphat sank von  $0.182 \pm 0.005$  auf  $0.176 \pm 0.00$  bis zu finalen  $0.103 \pm 0.011 \text{ fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ . Dies entspricht Restgehalten von 39 bzw. 56 %.

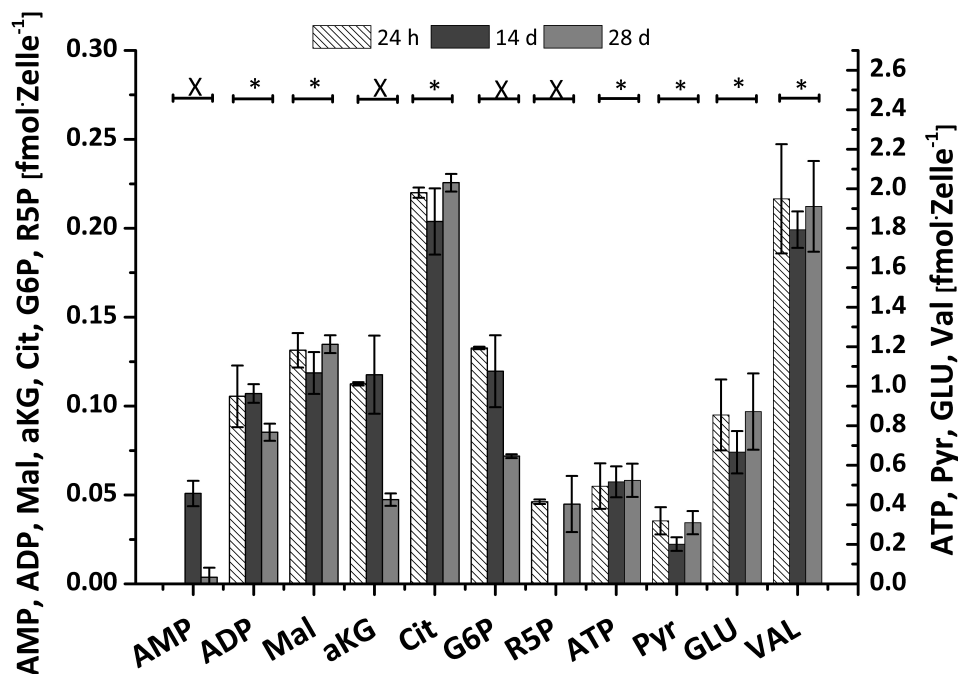


Abb. 16: intrazelluläre Stoffmengen in Abhängigkeit der Lagerdauer der Zellextrakte bei  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  von mit 0.1 % Digitonin-haltigen Lysepuffer behandelten Zellen. Die Replikate eines Ansatzes wurden 24 h, 14 d und 28 d nach der Extraktion vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Filterreplikate mit der Standardabweichung als Fehler. Die Daten wurden mittels einer einfaktoriellen ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) überprüft: \* bedeutet statistische Insignifikanz, x heißt, dass  $H_0$  verworfen werden musste.

Die Daten dieses Experimentes zeigen, dass für einen Großteil der untersuchten Metabolite eine einmonatige Lagerdauer keinen negativen Einfluss auf die Quantifizierung besaß. Lediglich  $\alpha$ -Ketoglutarat und Glukose-6Phosphat unterlagen einer Degradation, so dass nach vier Wochen nur noch etwa 40 bis 55 % der Ausgangsstoffmenge vorlagen. Ein enzymatischer Abbau ist als Erklärung auszuschließen, da einerseits eine Chloroform-Fällung stattfand und darüber hinaus das ATP-Signal konstant war. Im Falle von Metaboliten mit vielen, gut zugänglichen Keto-Gruppen, wie beispielsweise  $\alpha$ -Ketoglutarat, können Methanolreste im Extrakt dazu führen, dass die Ketone in Ketale umgewandelt werden. Die aufkonzentrierten Extrakte liegen in wässriger Form mit einem neutralen pH-Wert vor. Eine nachträgliche Umpufferung auf ein saures Milieu würde eine Ketal-Bildung verhindern. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass ein saures Milieu sich negativ auf die Lagerfähigkeit von anderen Metabolitgruppen auswirkt. Somit erscheint die zeitnahe Vermessung der frischen Zellextrakte als die praktikabelste Vorgehensweise um Metabolit-Verluste in den Proben zu vermeiden. Aufgrund der vorliegenden Daten erscheint ein Zeitfenster von 14 d als geeignet. Lorenz et al konnten für Methanol/Chloroform-Extrakte eine stabile Lagerdauer bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  von 7 Tagen ermitteln (Lorenz, Buranti et al. 2011). Für die fraktionelle Filtration ist wichtig festzuhalten, dass die Abnahme von  $\alpha$ -Ketoglutarat und Glukose-6Phosphat unabhängig vom Kontakt mit den eingesetzten Detergenzien erfolgte. Die Schwankungen in den ermittelten AMP- und Ribose-5P-Stoffmengen über die drei Messintervalle lassen darauf schließen, dass die Quantifizierung nicht korrekt erfolgte. Für AMP ist nach 14 d ein Anstieg der Stoffmenge pro Zelle zu sehen, der gänzlich im Widerspruch zu einem vermuteten Abbau des Analyten über die Lagerdauer stand. Auch eine Bildung aus dem vorhandenen ATP in den Proben ist ausgeschlossen, da die ATP-Stoffmengen in den Proben konstant blieben. Die Gründe für das schwankende AMP-Signal können sowohl in der Extraktion als auch in der Vermessung per HPLC liegen. Bei Ribose-5 scheint die bereits besprochene Alterung des Filaments der GC-MS P deutlicher ins Gewicht zu fallen als bei den anderen untersuchten Metaboliten und somit die starken Schwankungen des Messsignals über die Versuchszeitpunkte hervorzurufen.

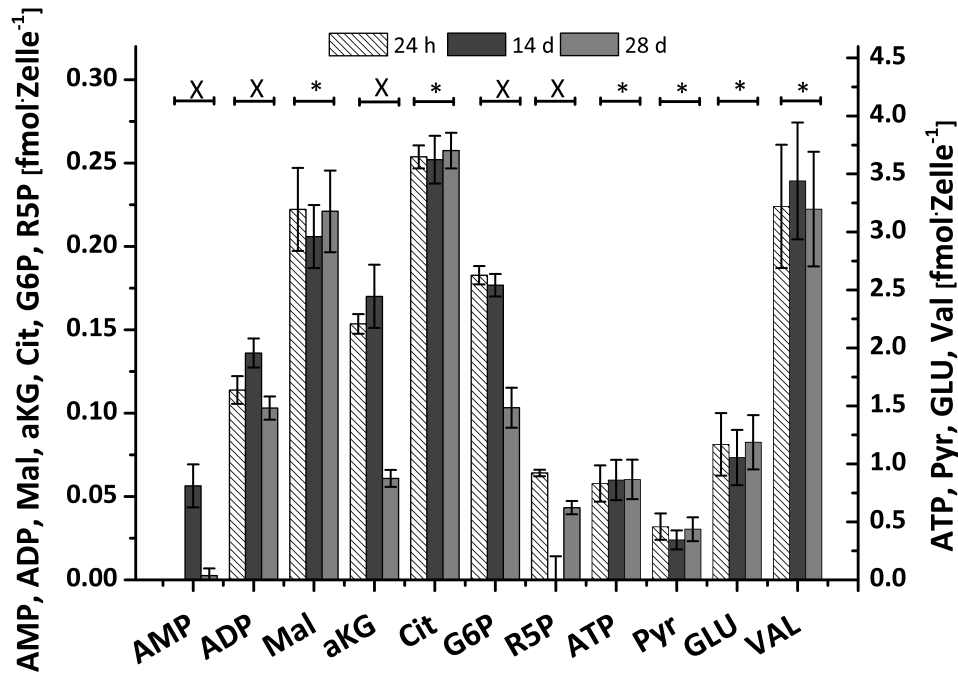


Abb. 17: intrazelluläre Stoffmengen in Abhängigkeit der Lagerdauer der Zellextrakte bei -70 °C von mit 0.01 % SDS-haltigen Lysepuffer behandelten Zellen. Die Replikate eines Ansatzes wurden 24 h, 14 d und 28 d nach der Extraktion vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Filterreplikate mit der Standardabweichung als Fehler. Die Daten wurden mittels einer einfaktoriellen ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) überprüft: \* bedeutet statistische Insignifikanz, x heißt, dass  $H_0$  verworfen werden musste.

### 5.2.5 Beurteilung der Quenching-Effizienz

Der zentrale Punkt jeder Probenahme ist ihre Quenching-Effizienz. Dies beschreibt wie schnell zelluläre Stoffwechselaktivitäten abgestoppt werden und ob die Inaktivierung der metabolischen Vorgänge über den gesamten Probenahmezyklus gewährleistet ist. Ziel metabolischer Untersuchungen ist es eine Momentaufnahme des Stoffwechsels zu erhalten und diese beispielsweise für eine mathematische Modellierung oder Stoffflussanalysen zu nutzen (Dietmair 2012; Selvarasu 2012; Ahn 2013). Ohne ein geeignetes Quenching ist durch die Enzymaktivität in den Zellen keine präzise Aussage über die Zustände in den Zellen zum Zeitpunkt der Probenahme möglich und eine weitere Interpretation der Daten nicht sinnvoll. Um einen Überblick über die zeitlichen Dimensionen zu erhalten sind in Tab. 27 die Umschlagsdauern verschiedener Metabolite für Bakterien und Säugerzellen aufgelistet. Bei den bakteriellen Systemen liegen diese je nach Metabolit zwischen wenigen Sekunden bei Glykolyseintermediaten und mehreren Minuten bei Aminosäuren. Entsprechende Daten stehen für

Säugerzellen noch nicht in ausreichender Menge zur Verfügung. Aus diesem Grund wurden die entsprechenden Umschlagsdauern anhand von Literaturdaten abgeschätzt. Der Vergleich der für Bakterien bestimmten Werte mit den aus den Literaturdaten abgeleiteten Werten legt den Schluss nahe, dass in Säugerzellen ein wesentlich langsamerer Umsatz der Stoffwechselintermediate stattfindet und somit auch ein größeres Zeitfenster zur Probennahme zur Verfügung steht. Um diese Annahme zu überprüfen wurden die intrazellulären Stoffmengen in einem Haltezeitexperiment untersucht. Hierbei wurden Proben aus einer Bioreaktorkultivierung gemäß des Protokolls zur Gesamtzellanalyse genommen und verschiedene Haltezeiten der Zellen verglichen. Die gequenchten Zellen wurden entweder direkt eingefroren oder 30 bzw. 60 Sekunden auf dem Filter ruhen gelassen.

Tab. 27: Umschlagsdauer ausgewählter Metabolitpools für Bakterien und Säugerzellen. Die Daten der bakteriellen Systeme gelten für Glykolyse- und Citrat-Zyklus-Intermediate in *E. coli* (Taymaz-Nikerel, de Mey et al. 2009), die Daten für Glutamin/Glutamat und Alanin beziehen sich auf *C. glutamicum* (Wittmann, Kromer et al. 2004). Für Säugerzellen wurden die entsprechenden Umschlagsdauern abgeschätzt indem die gemessenen Poolgrößen pro Zelle durch die Summe der zugehörigen Flüsse geteilt wurden (Lu, Sun et al. 2005; Maier, Hofmann et al. 2008; Goudar, Biener et al. 2010). In Ermangelung vollständiger Datensätze wurde auf Poolgrößen und Stoffflüsse aus CHO-Zellen und Hepatozyten zurückgegriffen.

Metabolit	Umschlagsdauer des Metabolitpools [s]	
	Bakterien	Säugerzellen
Glukose-6Phosphat	3.5	53.01
Fruktose-6Phosphat	1.6	68.87
Phosphoenolpyruvat	2.6	8.79
Pyruvat	1.5	492.92
α-Ketoglutarat	1.1	140.49
Succinat	10.5	20.74
Fumarat	0.9	34.56
Malat	3.7	62.12
Glutamin/Glutamat	4122	7249.75
Alanin	246	102.60

Ein weit verbreitetes Mittel zur Bestimmung der Quenching-Effizienz, aber auch zur generellen Vitalitätsbeurteilung von Zellen ist die von Atkinson definierte Energieladung. Diese gibt das Verhältnis der mehrfach phosphorylierten Adenosin-Spezies ADP und ATP zur Gesamtmenge aller phosphorylierten Adenosinspezies an. Je nach Zustand der Kultur liegen die physiologischen Werte zwischen 0.75 – 0.95, wobei im Idealfall, in dem nur ATP in der Zelle vor-

liegt, der Wert zu 1 wird (Atkinson 1968). In Tab. 28 sind die Energieladungen für eine 30- sowie 60-sekündige Haltezeit bei Raumtemperatur im Vergleich zu Zellen aufgeführt, die sofort nach dem Quenching eingefroren wurden. Die Werte lagen bei  $0.972 \pm 0.005$ ,  $0.966 \pm 0.011$  und  $0.965 \pm 0.012$ . Die Energieladung als alleiniges Bewertungskriterium scheint indes nicht ausreichend zu sein, da der Quotient der Adenosin-Spezies keinerlei Rückschluss auf die jeweiligen Poolgrößen, sondern nur auf die relativen Verhältnisse erlaubt. Eine wie auch immer geartete Abnahme der phosphorylierten Adenosin-Spezies oder einzelner Metabolit-Pools in der Zelle bliebe im ungünstigsten Fall unentdeckt. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zur Energieladung auch die intrazellulären Stoffmengen der phosphorylierten Nukleotide (AMP, ADP, ATP, NAD, NADP, UDP, UTP, CTP, GTP) sowie ausgewählter Zentralstoffwechselmetabolite (Glukose-6Phosphat, Citrat, Malat,  $\alpha$ -Ketoglutarat) ausgewertet. In Abb. 18 sind die intrazellulären Stoffmengen der phosphorylierten Nukleotide aufgetragen. Unabhängig von der Haltezeit der gequenchten Zellen ließ sich in den Proben kein AMP feststellen. Dies zeigt, dass ADP und ATP nicht verbraucht wurden. Die intrazellulären Stoffmengen lagen bei ADP und ATP zwischen  $0.16 \pm 0.02$  –  $0.2 \pm 0.05$  bzw.  $2.58 \pm 0.4$  –  $2.64 \pm 0.7$   $\text{fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ . Dies wird als starkes Indiz dafür gewertet, dass die energieverbrauchenden enzymatischen Reaktionen tatsächlich abgestoppt wurden. Für die Metabolite NAD und UDP konnte hingegen, basierend auf einer einfaktoriellen ANOVA-Analyse mit einem  $\alpha$  von 0.05, eine signifikante Änderung der Poolgröße über den Zeitverlauf bestimmt werden. Die Werte von NAD betragen  $0.974 \pm 0.022$ ,  $0.855 \pm 0.008$  und  $0.862 \pm 0.069$   $\text{fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ . Die intrazellulären Stoffmengen für UDP lagen für die gewählten Zeitfenster bei  $0.321 \pm 0.015$ ,  $0.325 \pm 0.01$  und  $0.283 \pm 0.011$   $\text{fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ .

Tab. 28: Energieladung von CHO-DP12 Zellen in Abhängigkeit der Haltezeit nach dem Quenching. Die Probenahme erfolgte gemäß dem Protokoll zur Gesamtzellanalyse. Dargestellt sind die anhand von drei Replikaten über einer Fehlerfortpflanzung ermittelten Werte.

Haltezeit [s]	Energieladung [-]	$\pm$
0	0.966	0.011
30	0.965	0.012
60	0.972	0.005

Abb. 19 zeigt die Poolgrößen von Metaboliten aus der Glykolyse (Glukose-6Phosphat), dem Citrat-Zyklus (Malat, Citrat) und der Glutaminolyse ( $\alpha$ -Ketoglutarat). Für Malat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, Citrat und Glukose-6Phosphat wurden  $0.56 \pm 0.03 - 0.58 \pm 0.05$ ,  $0.02 \pm 0.003 - 0.02 \pm 0.002$ ,  $0.45 \pm 0.04 - 0.49 \pm 0.04$  sowie  $0.25 \pm 0.04 - 0.28 \pm 0.02$  fmol/Zelle<sup>-1</sup> ermittelt. Wie in dem Zeitverlauf zu sehen ist, nahm die Citrat-Poolgröße von  $0.392 \pm 0.017$  auf  $0.383 \pm 0.01$  und  $0.355 \pm 0.005$  fmol/Zelle<sup>-1</sup> ab.

Der Vergleich der ermittelten Energieladungen mit Literaturwerten deutet auf ein sehr effizientes Abstoppen der metabolischen Aktivitäten der Zellen. So wurden bei gequenchten CHO, MDCK und Vero Zellen Werte zwischen 0.8 und 0.95 ermittelt (Kochanowski, Blanchard et al. 2006; Kochanowski, Blanchard et al. 2008; Ritter, Genzel et al. 2008; Sellick, Hansen et al. 2009). Anhand der Energieladung in den hier gezeigten Experimenten lässt sich also kein Einfluss der Haltezeit bei der Probenahme auf die Zellen feststellen. Der Grund für die gefundene signifikante Abnahme im NAD-Signal konnte nicht ermittelt werden. Denkbar wäre folgender Ansatz: in wachsenden Zellen liegt ein Großteil des NAD in seiner oxidierten Form vor um der Zelle ausreichend Oxidationskraft zur Verfügung zu stellen (Sellick, Hansen et al. 2009). Die katabole Reduktionsladung, also das Verhältnis von NAD zu NADH, ist somit immer niedrig (Andersen and Meyenburg 1977). Eine Abnahme der NAD-Menge in den Zellen könnte dadurch erklärt werden, dass die Synthese von NADH aus NAD wesentlich schneller abläuft als die Umwandlung von NADH zu NAD und somit in dem kleinen Zeitfenster der Probenahme, das die Zellen zum runterkühlen benötigen, mehr NAD zu NADH umgewandelt wird als andersrum. Die Abnahme des UDP-Signal zeigt, dass eine signifikante Veränderung im zellulären Signal erst sichtbar wird, wenn die gequenchten Proben bis zum Verbringen in flüssigen Stickstoff für 60 sec unbehandelt auf dem Probenteller verbleiben.

Die Ergebnisse für die untersuchten Metabolite Glukose-6Phosphat, Malat und  $\alpha$ -Ketoglutarat ergeben keine signifikanten Änderungen der untersuchten Stoffwechselintermediate und es kann auch hier davon ausgegangen werden, dass die zugehörigen enzymatischen Reaktionen der untersuchten Stoffwechselwege erfolgreich abgestoppt wurden. Lediglich die intrazelluläre Citrat-Stoffmenge wird durch die künstlich verlängerte Verweildauer der gequenchten Zellen auf dem Filter beeinflusst. Dies belegt zum einen, dass eine künstliche Verlängerung der Probenahme erst ab einer Länge von mehr als 30 sec die Citrat-Messung beeinträchtigt und zum anderen, dass diese Beeinträchtigung kleiner 10 % beträgt.

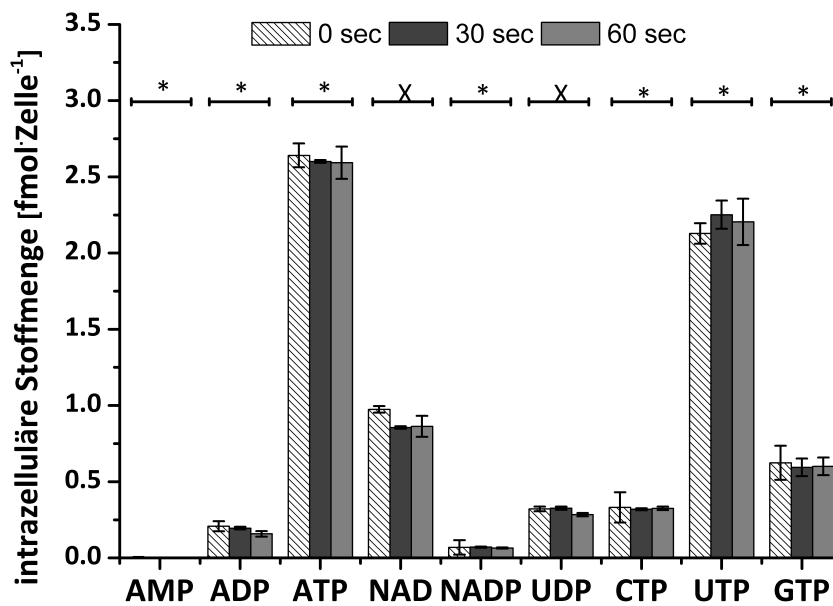


Abb. 18: Bestimmung der intrazellulären Stoffmengen phosphorylierter Nucleotide auf einer Pall AD Membran in Abhängigkeit der Haltezeit nach dem Quenching von 2E7 Zellen. Die Filtration erfolgte bei 30 mbar, gewaschen wurde mit 35 mL Waschpuffer. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Filterreplikate mit der Standardabweichung als Fehler. Die Daten wurden mittels einer einfaktoriellen ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) überprüft: \* bedeutet statistische Insignifikanz, x heißt, dass  $H_0$  verworfen werden musste.

Für eine abschließende Beurteilung des möglichen Zeitfensters für eine fraktionelle Filtration gequenchter Zellen muss noch folgende Überlegung berücksichtigt werden. Konstante intrazelluläre Stoffmengen können entweder als Zeichen für eine Abstopfung sämtlicher enzymatischer Reaktionen gedeutet werden. Unter der Annahme, dass der Zelle über externe Aufnahme weiterhin Substrate zur Verfügung stünden kann aber auch angenommen werden, dass es zu überhaupt keinem Quenching kommt und die Zellen im betrachteten Zeitraum völlig unbeeinträchtigt weiter wachsen. Die hier untersuchten Zellen wurden jedoch zeitgleich gequench und gewaschen. Somit entfällt die externe Substratversorgung. Große intrazelluläre Metabolit-Speicher könnten in diesem Fall noch zur Energieversorgung herangezogen werden. Um auch dies auszuschließen wurden in Tab. 29 die relativen Glukose-Mengen pro Zelle bezogen auf die Proben ohne Haltezeit bestimmt. Nach 30 bzw. 60 Sekunden lagen  $110.6 \pm 22.58$  bzw.  $94.34 \pm 9.97$  Prozent der Glukose in den Referenzproben vor. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es wirklich zu einem effektiven Abstoppen der zellulären Aktivitäten kommt. Dies erlaubt es die Proben mindestens 60 Sekun-

den nach dem Quenching bei Raumtemperatur zu behandeln, ohne den Großteil der untersuchten Metabolite zu beeinträchtigen. Für NAD, UDP und Citrat sind Zeiträume kleiner 30 sec anzustreben. Der Vorgang der fraktionellen Filtration wie er im weiteren Verlauf dargestellt wird beträgt etwa 21 sec.

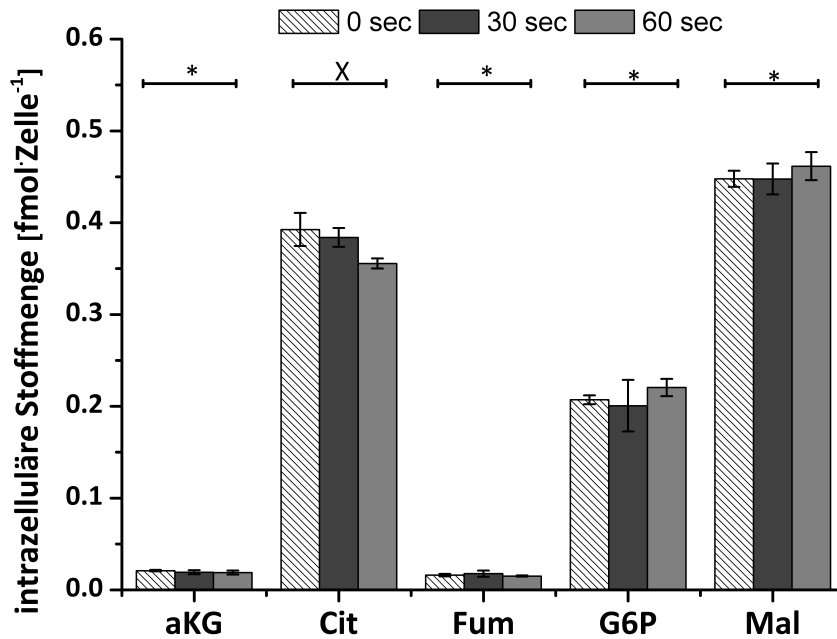


Abb. 19: Bestimmung der intrazellulären Stoffmengen von ausgewählten Zentralstoffwechselmetaboliten (Mal, aKG, Cit, G6P) auf einer Pall AD Membran in Abhängigkeit der Haltezeit nach dem Quenching von  $2E7$  Zellen. Die Filtration erfolgte bei 30 mbar, gewaschen wurde mit 35 mL Waschpuffer. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Filterreplikate mit der Standardabweichung als Fehler. Die Daten wurden mittels einer einfaktoriellen ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) überprüft: \* bedeutet statistische Insignifikanz, x heißt, dass  $H_0$  verworfen werden musste.

Tab. 29: Vergleich der intrazellulären Glukose-Vorräte gequenchter Zellen in Abhängigkeit der Haltezeit. Dargestellt sind die anhand von drei Replikaten über eine Fehlerfortpflanzung ermittelten Werte.

Haltezeit [s]	intrazelluläre Glc-Menge [%]	$\pm$
0	100.00	9.87
30	110.60	22.58
60	94.34	9.97

Hierbei muss berücksichtigt werden, dass während dieses Zeitfensters die Zellen permanent von eiskalten Quenching- und Lyse-Puffer umgeben sind und nicht wie in diesem Abschnitt



gezeigt, zwar gequenchet werden aber dann bei Raumtemperatur verbleiben. Somit ist davon auszugehen, dass die intrazellulären Metabolit-Signale durch den für die fraktionelle Filtration notwendigen zeitlichen Mehraufwand nicht verzerrt werden.

#### 5.2.6 Rückhalt intakter Mitochondrien bei der fraktionellen Filtration

Voraussetzung für die angestrebte fraktionelle Filtration und die hieraus abgeleiteten mitochondrialen Poolgrößen ist, dass die auf den Filter aufgebrachte Menge an Mitochondrien konstant ist. Mögliche Fehlerquellen sind hierbei die Auftragung der Biomasse und ein Verlust einzelner Mitochondrien aus aufgeschlossenen Zellen. Der Fehler der Biomasse wurde bereits in 5.1 untersucht und betrug 0.33 Prozent. Er ist somit vernachlässigbar gering für die Betrachtung der Konstanz der aufgebrachten mitochondrialen Masse. Eine weitere Fehlerquelle besteht darin, dass Mitochondrien durch die permeabilisierte Zellwand auf die Filtermembranen gelangen können. Sofern diese keine ausreichende Rückhaltung gewährleisten können, kommt es unweigerlich zu einem nicht reproduzierbaren Verlust der mitochondrialen Fraktion. Die Qualität der Ergebnisse in Bezug auf die ermittelten subzellulären Poolgrößen würde unweigerlich darunter leiden. Aus diesem Grund wurde untersucht inwieweit die gewählten Filtermembranen in der Lage sind freie Mitochondrien zurückzuhalten.

Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurde auf eine Fluoreszenzfärbung der Zellen zurückgegriffen. Die Anzahl verfügbarer mitochondrialer Fluoreszenzfarbstoffe ist sehr groß, fast allen ist dabei gemein, dass sie abhängig vom mitochondrialen Membranpotential binden. Da es im experimentellen Verlauf zu Schwankungen des Membranpotentials kommen könnte, wurde für dieses Experiment bewusst auf den als Membranpotential-unabhängig erachteten Farbstoff nonyl-Acrinidine-Orange (Sweet and Singh 1999) zurückgegriffen. Diesbezüglich gibt es jedoch auch abweichende Studien (Jacobson 2002). Ein Einfluss des Membranpotentials kann somit nicht ausgeschlossen werden, von allen verfügbaren Mitochondrienfarbstoffen scheint NAO allerdings am unempfindlichsten auf Änderungen des Membranpotentials zu reagieren.

Hierzu wurden die Zellen mit einer am Institut etablierten Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und anschließend mit NAO gefärbt und überschüssiger Farbstoff durch Waschen entfernt. Durch die Disintegration der Zellen durch Ultraschall wurde dafür gesorgt, dass die Mitochondrien ungehindert aus den Zellen austreten können. NAO bindet an Cardiolipin, das

hauptsächlich in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert ist. Hierdurch erfolgt also kein direkter Kontakt mit den Filtermaterialien und eine unspezifische Bindung des Farbstoffes und somit eine Verfälschung des Signals wird unterbunden. Zunächst wurde in einer Verdünnungsreihe ausgehend von 2E7 Zellen die Sensitivität der fluorometrischen Messung überprüft. In einem weiteren Experiment wurden Zellen erneut gefärbt und, zusätzlich zu ausgewählten Verdünnungen, drei Replikate von 2E7 gefärbten Zellen mit dem Protokoll zur fraktionellen Filtration filtriert. Das Permeat wurde aufgefangen und ultrazentrifugiert um eventuelle Mitochondrien im Pellet anzureichern. Diese wurden dann in einem den Proben aus der Verdünnungsreihe entsprechenden Volumen aufgenommen und gemeinsam mit diesen im Fluorometer vermessen. Die Ergebnisse der beiden Experimente sind in Abb. 20 dargestellt.

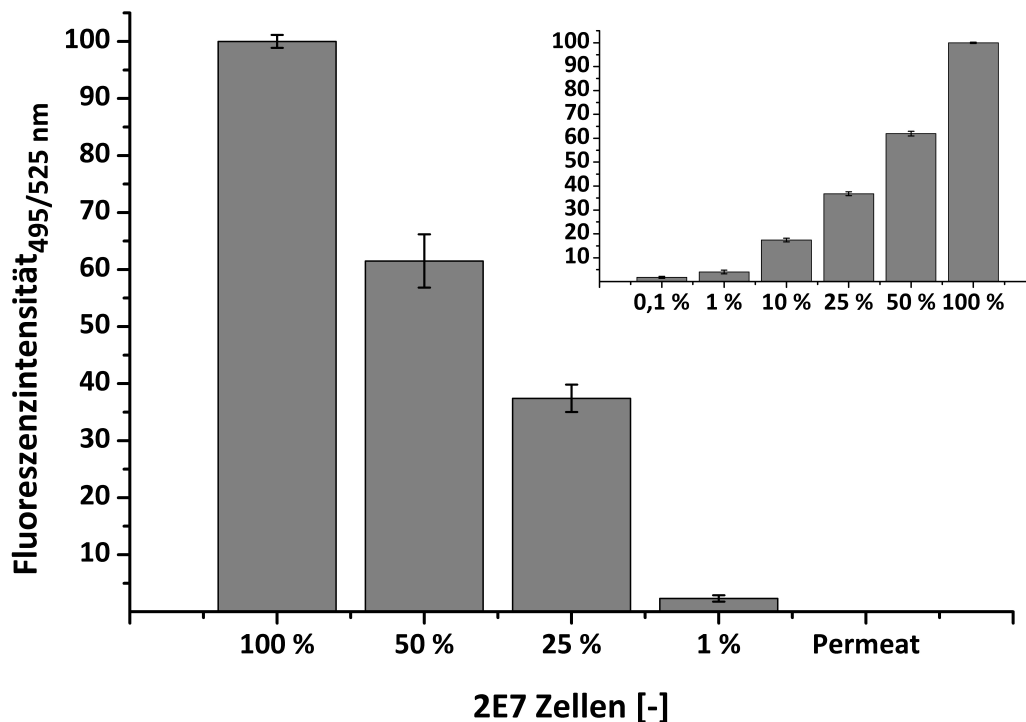


Abb. 20: Darstellung der Fluoreszenzintensität von NAO-gefärbten und aufgeschlossenen Zellen. Abbildung klein: verschiedene Verdünnungen ausgehend von 2E7 gefärbten Zellen zur Überprüfung der Messsensitivität. Abbildung groß: verschiedene Verdünnungen ausgehend von 2E7 gefärbten Zellen und simultaner Permeat-Fraktion einer Filtration von 2E7 Zellen zur Überprüfung der Durchgängigkeit der Filtermembranen für Mitochondrien. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Replikate mit der Standardabweichung als Fehler.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Messmethode ausreichend sensitiv ist um bis zu 0.1 % der gefärbten Mitochondrien aus  $2 \times 10^7$  Zellen zu detektieren. Zur Beurteilung der Eignung der Metrigard-Filtermembranen in Bezug auf die Reduzierung des potentiellen Verlusts von Mitochondrien ist das Signal der Permeat-Fraktion ausschlaggebend. Da in den Permeatproben keine Fluoreszenz gemessen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass weniger als 0.1 % der Mitochondrien über die Filtermembranen verloren gingen.

Der fluorometrische Nachweis gefärbter Mitochondrien ermöglicht die Abschätzung ob und wie viel der intakten Mitochondrien beim Filtrieren verlustig gehen. Eine Aussage bezüglich der mitochondrialen Integrität ist mit diesem Ansatz nicht möglich und wird deshalb mit Hilfe eines speziellen Markermetaboliten später gesondert betrachtet.

#### 5.2.7 Reduktion des Monocarboxylat-Leakage während der Probenahme

Ein bekanntes und bisher noch nicht zufrieden stellend gelöstes Problem beim Quenching mit niedrigen Temperaturen ist das im 3.3.1 erläuterte Leakage. Hierbei kommt es zu einem Verlust von zellulären Metaboliten während der Probenahme. Bisherige Experimente haben gezeigt, dass die Osmolalität hierbei eine entscheidende Rolle spielt (Volmer, Northoff et al. 2010). Eine genaue Erklärung hierfür ist noch nicht gefunden, bekannt ist aber, dass insbesondere Pyruvat anfällig für Leakageverluste ist. Die Autoren haben hier einen Zusammenhang mit Monocarboxylat-Transportern vermutet. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit überprüft ob die Zugabe eines Inhibitors des Monocarboxylat-Transporters 1 den Verlust von Monocarboxylaten verringern kann. Hierzu wurde Phloretin eingesetzt, das eine Inhibitionskonstante  $IC_{0.5}$  von  $1.4 \mu\text{M}$  besitzt und nicht ausschließlich selektiv auf den Monocarboxylat-Transporter 1 wirkt (Poole and Halestrap 1993). Darüber hinaus wurde überprüft ob die Pufferung des Waschpuffers oder dessen veränderte Osmolalität einen Einfluss auf das Leakage-Verhalten besitzt. Ausgehend von einer Referenzmessung mit gepuffertem Waschpuffer (pH 7.1) und einer Osmolalität von  $280 \text{ mOsmol} \cdot \text{kg}^{-1}$  wurden die Änderungen der erhaltenen intrazellulären Stoffmengen in Anwesenheit von Phloretin, dem Entfall der Pufferung sowie bei zwei ausgewählten Osmolalitäten bestimmt. Hierbei wurde das Filtrationsprotokoll zur Gesamtzellanalyse angewandt, die Wahl der untersuchten Monocarboxylate fiel dabei auf Pyruvat, Malat, Glutamat und Valin.

Abb. 21 zeigt die intrazellulären Stoffmengen von Pyruvat, Malat, Glutamat und Valin unter den unterschiedlichen Wasch- und Quenchingbedingungen. Unter den Referenzbedingungen von pH 7.1 und 280 mOsmol·kg<sup>-1</sup> wurden 3.345±0.111 fmol·Zelle<sup>-1</sup> an Pyruvat gemessen. Die Zugabe von Phloretin führte zu einer nicht signifikanten Erhöhung auf 4.414±0.941 fmol·Zelle<sup>-1</sup>. Der Entfall der Pufferung der Wasch- und Quenchinglösung sowie die hypotonen bzw. hypertonen Bedingungen reduzierten die intrazellulären Mengen auf 3.392±0.195, 3.057±0.692 und 3.389±0.546 fmol·Zelle<sup>-1</sup>.

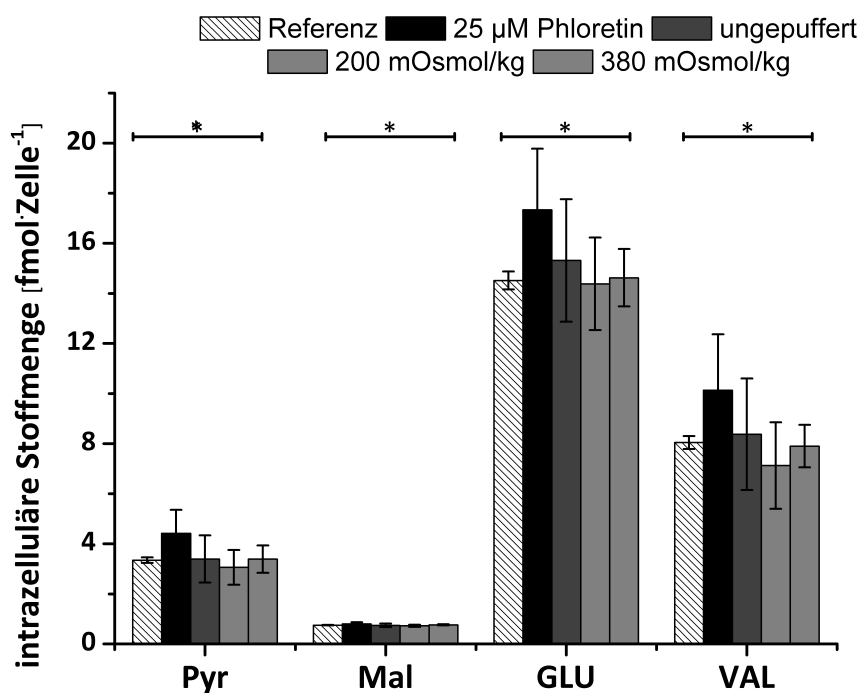


Abb. 21: intrazelluläre Stoffmengen von Pyruvat, Malat, Glutamat und Valin in Abhängigkeit der Waschpufferbeschaffenheit. Untersucht wurde der Einfluss von Phloretin, einem Inhibitors von Monocarboxylat-Transportern, der Pufferung des Waschpuffers sowie zweier abweichender Osmolalitäten im Waschpuffer. Die Puffervarianten basieren auf einem 10 mM KPO<sub>4</sub> Grundpuffer mit einem pH-Wert von 7.1 und einer Osmolalität von 280 mOsmol·kg<sup>-1</sup>, die Änderungen in den jeweiligen Auslenkungen sind in der Legende entsprechend kenntlich gemacht. Als Referenz gilt hierbei der Ansatz mit pH 7.1 und 280 mOsmol·kg<sup>-1</sup> ohne weitere Zusätze. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Filterreplikate mit der Standardabweichung als Fehler. Die Daten wurden mittels einer einfaktoriellem ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) überprüft: \* bedeutet statistische Insignifikanz, x heißt, dass H0 verworfen werden musste.

Im Vergleich zu 0.753±0.011 fmol·Zelle<sup>-1</sup> in der Referenz wurden 0.802±0.069, 0.742±0.002, 0.726±0.044 und 0.762±0.024 fmol·Zelle<sup>-1</sup> in den anderen Ansätzen an Malat gemessen. Ausgehend von 14.517±0.361 fmol·Zelle<sup>-1</sup> Glutamat in der Referenzfiltration wurden durch die

Zugabe des Phloretins, dem Entfall der Pufferung sowie der Änderungen der Osmolalität  $17.336 \pm 2.444$ ,  $15.313 \pm 0.583$ ,  $14.383 \pm 1.846$  und  $14.623 \pm 1.147$   $\text{fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$  gemessen. Die Entwicklung der Valin-Gehalte der Zellen zeigte ein ähnliches Verhalten. Die Valinmenge in der Referenzmessung betrug  $8.043 \pm 0.256$   $\text{fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ . Die Variationen des Waschpuffers resultierten in intrazellulären Messwerten von  $10.133 \pm 2.228$ ,  $8.375 \pm 0.409$ ,  $7.126 \pm 1.728$  und  $7.902 \pm 0.849$   $\text{fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ . Die Ergebnisse zeigen, dass für alle vier untersuchten Metabolite die höchsten Stoffmengen für den Phloretin-Ansatz bestimmt wurden. Alle weiteren Modifikationen des Wasch- und Quenchingpuffers führten zu einer Abnahme der intrazellulären Metabolit-Level. Hierbei ist aber zu berücksichtigen, dass aufgrund der bestimmten Fehler keine signifikanten Unterschiede vorliegen sondern allenfalls eine Tendenz abgeleitet werden kann. Eine Erklärung warum trotz Einsatz von Phloretin, einem Inhibitor des Monocarboxylat-Transporters, keine signifikante Erhöhung der intrazellulären Level erreicht werden konnte, liegt vermutlich darin, dass er nur im Waschpuffer präsent ist. Die Metabolite unterliegen einem Efflux aus den Zellen in die Quenchinglösung. Somit müsste Phloretin entgegen dieses Stoffstroms zu den Transportern gelangen. Diesem Problem kann begegnet werden, wenn ein definiertes Volumen einer Phloretin-Lösung der Zellsuspension vor Auftragung auf den Filter zugesetzt wird. Hierbei ist dann zu überprüfen ob das zur Verfügung stehende Zeitfenster ausreicht um eine effektive Inhibierung der Monocarboxylat-Transporter zu gewährleisten. Eine weitere Schlussfolgerung dieses Experiments wäre, dass die Pufferung der Quenchinglösung mit Blick auf das Metabolit-Leakage überflüssig ist und mit Hinblick auf die Salzfracht für die MS-Anlagen entfallen sollte. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass bei der Herstellung des Waschpuffers durch die Zugabe von NaCl der pH-Wert der Lösung in einem ungepufferten System auf pH-Werte von 5 – 6 absinken kann. Der cytosolische pH-Wert von Zellen liegt jedoch, abhängig vom Zelltyp, im neutralen Bereich. So wurden Werte um 7.2 bis 7.4 (Llopis 1998; Alberts 2014) publiziert. Um bei der fraktionellen Filtration möglichst schonend vorzugehen, wurde deshalb nicht auf eine Pufferung der Waschlösungen verzichtet.

### 5.2.8 Abreicherung der zytosolischen Fraktion

Wie zuvor beschrieben basiert der Ansatz der fraktionellen Filtration darauf gequenschte, cytosolisch abgereicherte Zellen zu erhalten um über einen Vergleich mit ebenfalls gequenschten aber intakten Zellen die cytosolischen und mitochondrialen Poolgrößen ableiten zu können. Voraussetzung hierfür ist die selektive Abreicherung der cytosolischen Fraktion ohne die mitochondriale Integrität zu zerstören. Die hierzu gängigen Techniken wurden in 3.3.1 vorgestellt. Für den experimentellen Ansatz dieser Arbeit wurde auf Detergenzien im Lysepuffer zurückgegriffen. Die Bewertung der Effizienz und Güte der Cytosol-Abreicherung wurde anhand der Markermetabolite Glukose-6Phosphat und cis-Aconitat durchgeführt. Glukose-6Phosphat diente hierbei als Abreicherungssignal des Cytosols, während die Bewertung der mitochondrialen Integrität über die Konstanz im cis-Aconitat-Pool der Zellen erfolgte.

Zunächst wurde eine Auswahl an Erfolg versprechenden Detergenzien für eine gezielte Zelllyse getroffen, indem anhand von mikroskopischen Untersuchungen der Einfluss von Detergenzien auf die Zellen untersucht wurde. Darüber hinaus konnte in diesem Ansatz die Handhabung der entsprechenden Lösungen überprüft werden. Getestet wurden Natriumdodecylsulfat (SDS), Digitonin, Ethanol, TritonX und CHAPS. Von diesen kamen TritonX und CHAPS für weitere Untersuchungen nicht in Frage, da sie eine zu starke Schaumbildung aufwiesen, als dass sie für eine Filtrationsanwendung geeignet erschienen. Für die verbliebenen drei Kandidaten wurde versucht geeignete Konzentrationsbereiche zu ermitteln. Ausgehend von diesen Werten wurde mittels statistischer Versuchsplanung eine Wirkungsflächenanalyse durchgeführt um in Wechselwirkung mit variierenden Wasch- und Lysepuffervolumina die idealen Konzentrationen der Detergenzien zu ermitteln. Die Modellaussagen wurden anschließend experimentell überprüft und als Grundlage zur subzellulären Analyse einer Batch-Kultivierung von CHO-DP12 –Zellen genutzt.

Abb. 22 zeigt die mit verschiedenen Ethanolkonzentrationen im Lysepuffer erreichten Abreicherungen des Cytosols. Durch den Einsatz von 1 % (v/v) Ethanol in 5 mL Lysepuffer wurden noch  $92.88 \pm 4.82$  % des Ausgangssignals wieder gefunden. Ethanol sorgt für eine strukturelle Störung sowie eine Umordnung der Membran (Sun 1985). Die mitochondriale Integrität lag bei  $103.3 \pm 2.66$  %. Eine Erhöhung auf 5 bzw. 10 % Ethanol ergab eine cytosolische Abreicherung auf  $92.69 \pm 8.47$  bzw.  $88.70 \pm 1.62$  %. Von der mitochondrialen Fraktion wurden  $101.12 \pm 7.84$  bzw.  $104.84 \pm 2.54$  % gemessen.

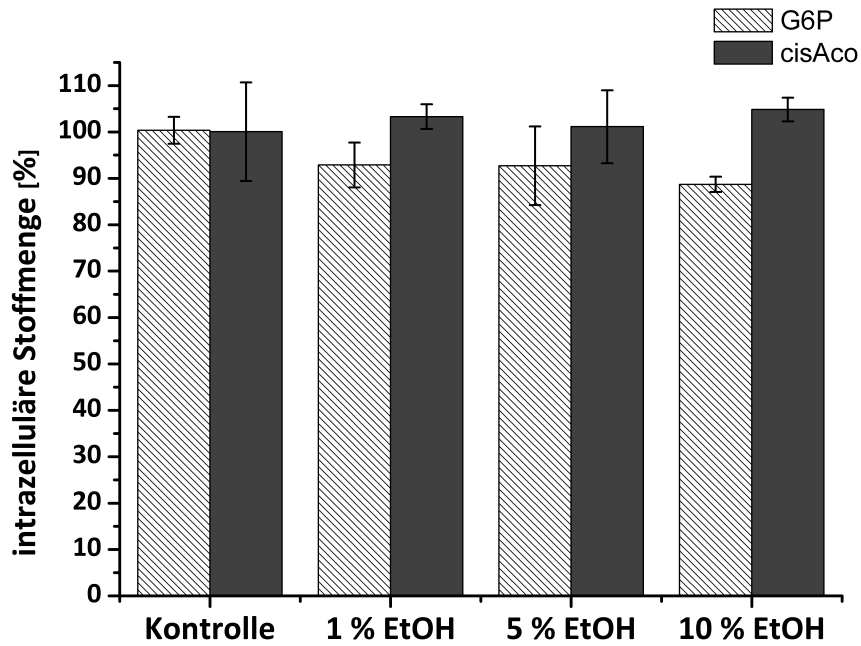


Abb. 22: Darstellung des Einflusses von verschiedenen Ethanolkonzentrationen im Lysepuffer auf das cytosolische Restsignal auf der Filtermembran sowie die mitochondriale Integrität von subzellulären Filtrationen. Die Berechnung erfolgte anhand der zellspezifischen G6P- und cisAco-Stoffmengen in Bezug auf den regulären Filtrationsvorgang für die Gesamtzellanalyse. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier subzellulärer und sechs regulärer Filterreplikate mit der relativen Standardabweichung als Fehler.

In Abb. 23 ist der Einfluss ausgewählter SDS-Konzentrationen im Lysepuffer auf die Cytosolabreicherung und die Mitochondrien-Stabilität dargestellt. Das Waschen mit 5 mL eines 0.005, 0.01 sowie 0.025 %igen Lysepuffers reicherte das Cytosol bis auf  $64.17 \pm 11.2$ ,  $28.26 \pm 2.17$  und  $33.76 \pm 4.01$  % des Ausgangsignals in der Kontroll-Filtration ab. Hierbei wurden  $89.56 \pm 7.47$ ,  $97.13 \pm 1.42$  und  $115.82 \pm 5.03$  % des mitochondrialen Markers aus der Referenz wiedergefunden. Der Einfluss verschiedener Digitonin-Konzentrationen in 5 mL Lysepuffer auf die Abreicherung des Cytosols ist in Abb. 24 dargestellt. Durch die Zugabe von 0.002 % (m/v) konnte das Cytosol bis auf  $81.62 \pm 7.66$  % abgereichert werden. Die Mitochondrien blieben hierbei zu  $97.12 \pm 2.27$  % intakt. Eine Erhöhung auf 0.01 bzw. 0.025 % führte zu einem cytosolischen Restsignal auf dem Filter von  $58.57 \pm 7.63$  sowie  $18.92 \pm 1.83$  %. Die mitochondriale Integrität wurde mit  $93.49 \pm 2.65$  bzw.  $99.15 \pm 10.56$  % berechnet.

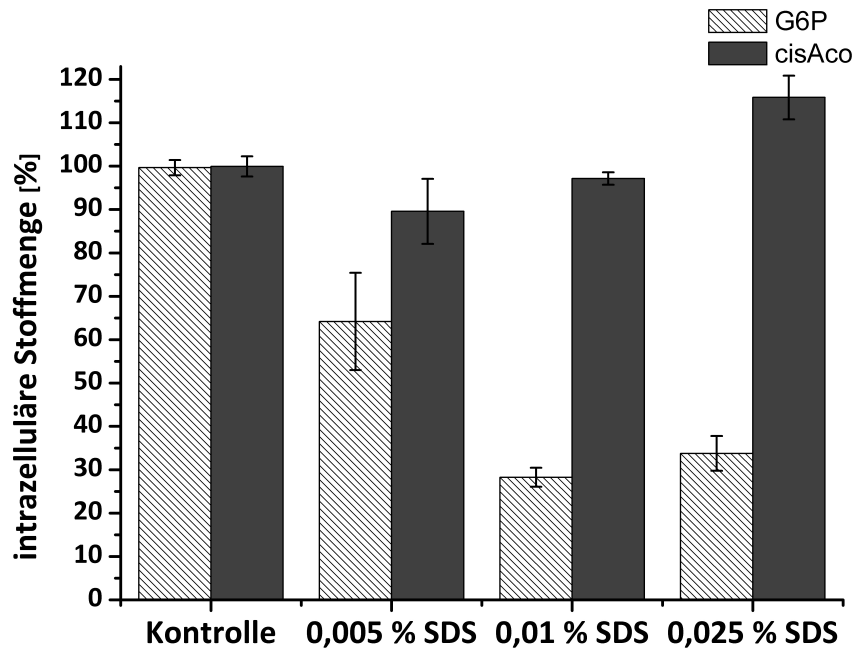


Abb. 23: Darstellung des Einflusses von verschiedenen SDS-Konzentrationen im Lysepuffer auf das cytosolische Restsignal auf der Filtermembran sowie die mitochondriale Integrität von subzellulären Filtrationen. Die Berechnung erfolgte anhand der zellspezifischen G6P- und cisAco-Stoffmengen in Bezug auf den regulären Filtrationsvorgang für die Gesamtzellanalyse. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier subzellulärer und sechs regulärer Filterreplikate mit der relativen Standardabweichung als Fehler.

Betrachtet man die Glukose-6Phosphat-Signale in Abhängigkeit der Ethanol-Konzentration, so ist davon auszugehen, dass wünschenswerte cytosolische Abreicherungen erst mit wesentlich höheren Ethanol-Konzentrationen erreicht werden. Dies führt jedoch unweigerlich zu einem erhöhten apparativen Aufwand, da ab einem gewissen Punkt besondere Schutzmaßnahmen aufgrund der Entflammbarkeit des Lysepuffers berücksichtigt werden müssten. Dies war einer der Gründe den Ethanol-Ansatz nicht weiter zu verfolgen. Die Daten der getesteten SDS-Konzentrationen belegen, dass durch die Zugabe von SDS eine effektive Abreicherung des Cytosols unter weitestgehender Beibehaltung der mitochondrialen Masse erzielt werden kann. Zu Berücksichtigen sind hierbei die Ergebnisse des Ansatzes mit 0.025 % SDS im Lysepuffer in Bezug auf den tendenziellen Anstieg sowohl des Glukose-6Phosphat- als auch des cis-Aconitat-Signals. Im Experiment war zu beobachten, dass der frisch angesetzte Lysepuffer zunächst klar war, mit Abkühlen auf Filtrationstemperatur von etwa 4 – 6 °C die Löslichkeitsgrenze von SDS überschritten wurde. Es ist somit nicht auszuschließen, dass ungelöstes SDS auf den Filtermembranen verblieben ist und die weitere Extraktion bzw. Mes-



sung beeinflusst hat. Die zuvor gezeigte Unbedenklichkeit von SDS und Digitonin in 5.2.3 für die Metabolit-Wiederfindungen galt nur für Konzentrationen unterhalb der Löslichkeitsgrenze. Es konnte somit im Gegensatz zu Ethanol sowohl für SDS als auch für Digitonin ein ausgeprägter konzentrationsabhängiger Einfluss der Detergenzien auf die Zelllyse festgestellt werden. Darüber hinaus ließen beide Substanzen die mitochondriale Fraktion weitestgehend intakt. Aus diesem Grund wurde sowohl für Digitonin als auch für SDS jeweils ein zentral zusammengesetztes, experimentelles Design mit einer Wirkungsflächenanalyse durchgeführt um für die Detergenzkonzentration im Lysepuffer, das Lysepuffervolumen und das Waschpuffervolumen die ideale Kombination der Faktorstufen zu ermitteln. Die Versuchspläne enthielten jeweils 6 Zentrumsunkte und sind im Abschnitt 4.11 hinterlegt. Die Abb. 25, Abb. 26, Abb. 27 und Abb. 28 zeigen die Korrelation zwischen den jeweils berechneten Modellen und den zugrunde liegenden experimentellen Daten.

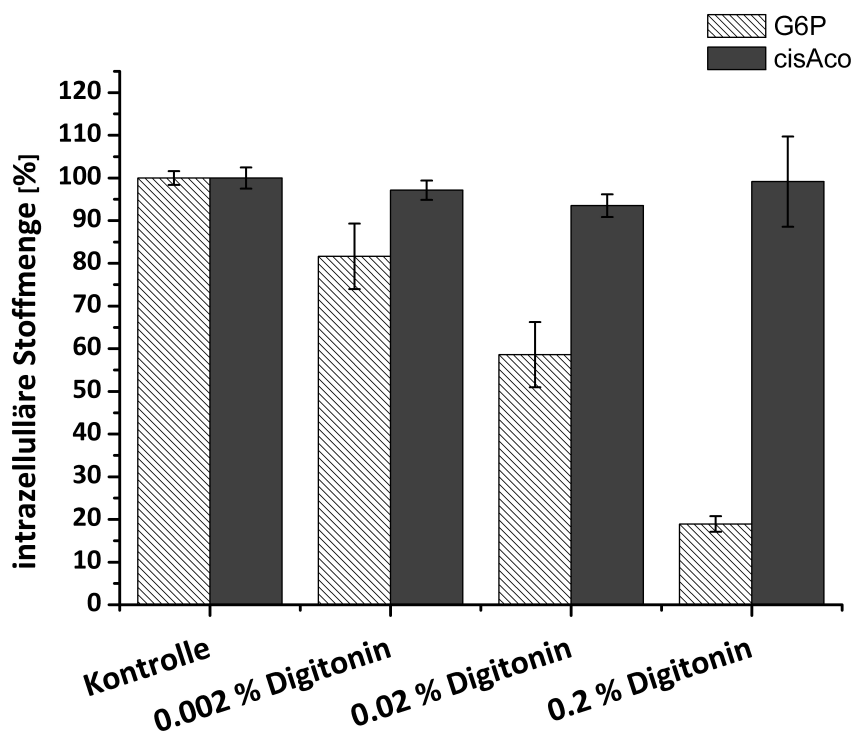


Abb. 24: Darstellung des Einflusses von verschiedenen Digitonin-Konzentrationen im Lysepuffer auf das cytosolische Restsignal auf der Filtermembran sowie die mitochondriale Integrität von subzellulären Filtrationen. Die Berechnung erfolgte anhand der zellspezifischen G6P- und cisAco-Stoffmengen in Bezug auf den regulären Filtrationsvorgang für die Gesamtzellanalyse. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier subzellulärer und sechs regulärer Filterreplikate mit der relativen Standardabweichung als Fehler.

In Abb. 25 ist zu sehen, dass das Modell zur Digitonin-basierten Cytosol-Abreicherung einen Korrelationskoeffizient von 0.86 mit den erhobenen Messdaten aufweist, wohingegen aus Abb. 26 hervorgeht, dass das Modell für die mitochondriale Integrität im Digitonin-Ansatz wesentlich schlechter zu den Daten passt. Der Korrelationskoeffizient betrug hierbei 0.7457. Die entsprechenden Modelle für den SDS-basierten Ansatz sind noch schlechter in Einklang mit den zugehörigen experimentellen Daten zu bringen. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten lagen bei 0.62 und 0.1727 (Abb. 27, Abb. 28). In Tab. 30 sind die für die jeweiligen Detergenzien ermittelten Wahrscheinlichkeiten aufgeführt, dass die zugrunde liegenden Einzelfaktoren in den Modellen zur Cytosol-Abreicherung bzw. zur mitochondrialen Integrität Null betragen. Hierbei handelt es sich um die zu überprüfende Nullhypothese ( $H_0$ ). Wahrscheinlichkeiten kleiner 0.05 bedeuten, dass  $H_0$  mit mind. 95 %iger Wahrscheinlichkeit abgelehnt werden kann und die entsprechenden Faktoren für die Zielgrößen signifikant sind. Im Falle für Digitonin bedeutet dies, dass bei der cytosolischen Abreicherung das Lysepuffer-Volumen (0.0225) sowie die Detergenzienkonzentration (0.0006) einen signifikanten Einfluss haben.

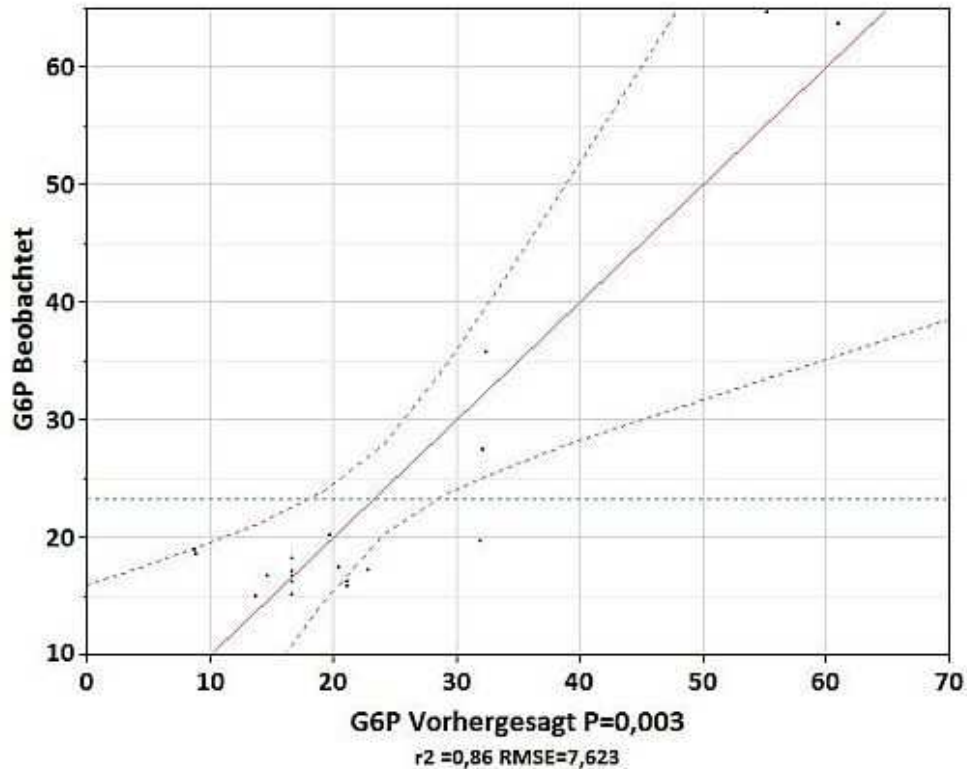


Abb. 25: Vergleich des berechneten, zentral zusammengesetzten Modells zur Digitonin-basierten Cytosol-Abreicherung mit den experimentellen Werten aus dem Versuchsplan in Tab. 21. Der Korrelationskoeffizient  $r^2$  beträgt 0.86.

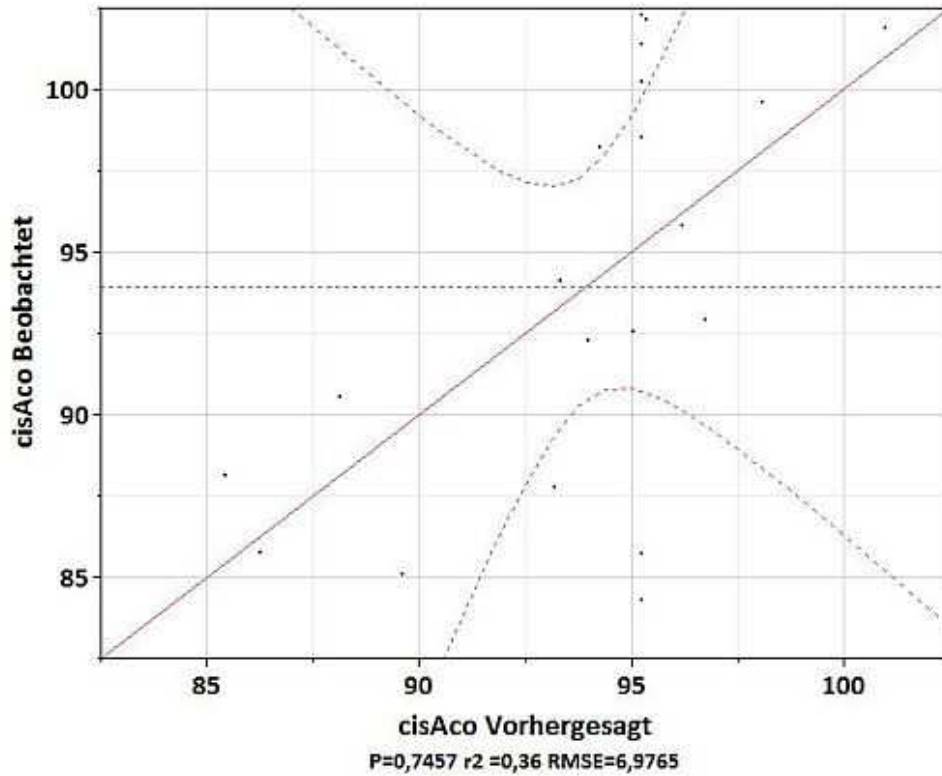


Abb. 26: Vergleich des berechneten, zentral zusammengesetzten Modells zur Mitochondrien-Integrität bei einer Digitonin-basierten Cytosol-Abreicherung mit den experimentellen Werten aus dem Versuchsplan in Tab. 21. Der Korrelationskoeffizient  $r^2$  beträgt 0.7457.

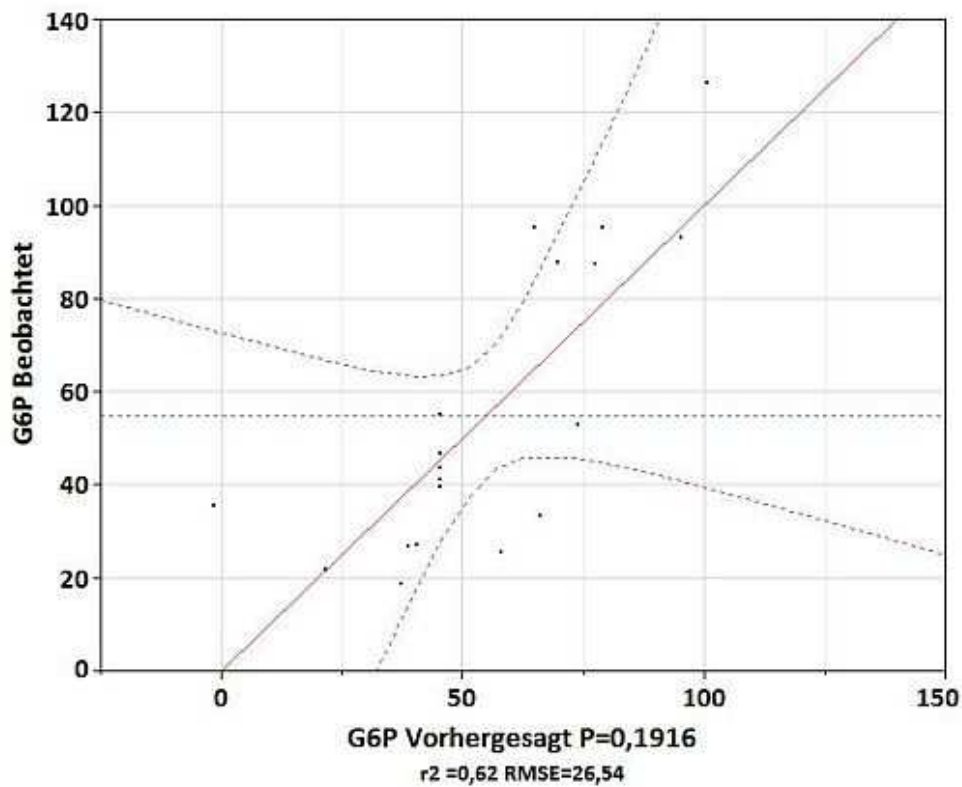


Abb. 27: Vergleich des berechneten, zentral zusammengesetzten Modells zur SDS-basierten Cytosol-Abreicherung mit den experimentellen Werten aus dem Versuchsplan in Tab. 21. Der Korrelationskoeffizient  $r^2$  beträgt 0.62.

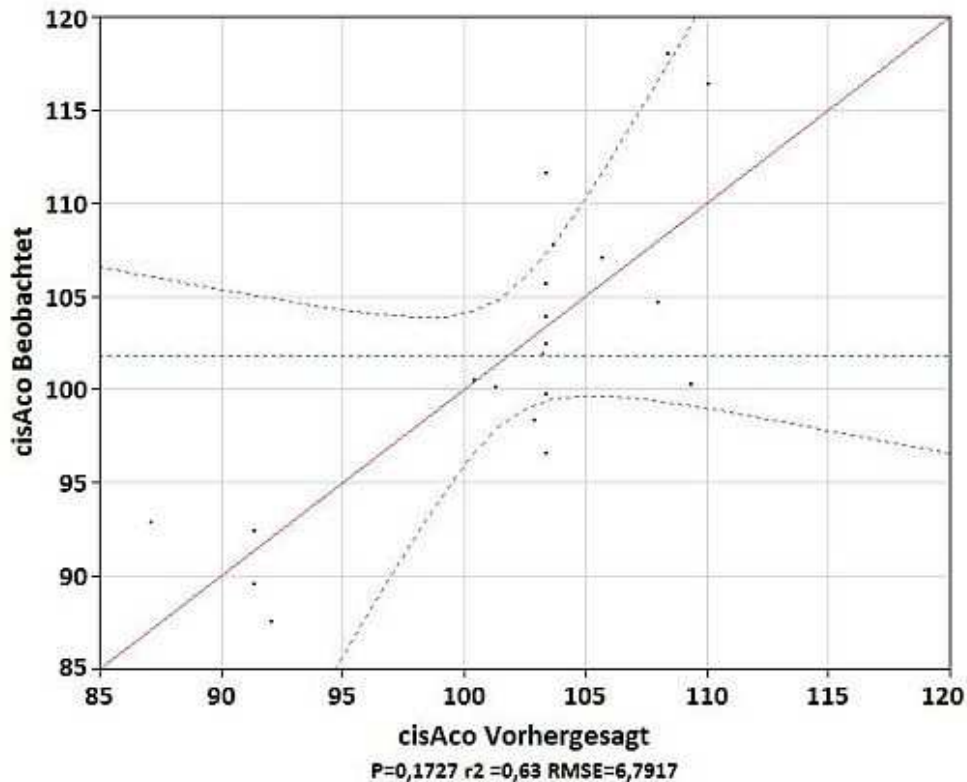


Abb. 28: Vergleich des berechneten, zentral zusammengesetzten Modells zur Mitochondrien-Integrität bei einer SDS-basierten Cytosol-Abreicherung mit den experimentellen Werten aus dem Versuchsplan in Tab. 21. Der Korrelationskoeffizient  $r^2$  beträgt 0.1727.

Für die Mitochondrien-Stabilität konnte kein signifikanter Einflussfaktor ermittelt werden. Im Ansatz mit SDS konnte lediglich  $H_0$  für die Detergenzienkonzentration sicher verworfen werden (0.0188 und 0.0245). Über eine Wirkungsflächen-Analyse konnten die Faktor-Stufen-Kombinationen für das Digitonin-Modell bestimmt werden, bei denen die cytosolische Fraktion bestmöglich abgereichert wird oder die mitochondriale Fraktion weitestgehend intakt bleibt. Aufgrund der geringen Übereinstimmung des Modells zur Vorhersage der cisAconitat-Mengen mit den beobachteten Werten konnten nur die Lösungen für die Glukose-6Phosphat-Modelle betrachtet werden. Die berechneten Kombinationen zur maximalen Glukose-6Phosphat -Abreicherung betragen 43.65 mL Waschpuffer, 12.5 mL Lyse-Puffer und 0.122 % (m/v) Detergenz im Lysepuffer. Die schlechte Übereinstimmung der Modellvorhersage mit den experimentellen Werten führte zu technisch nicht umsetzbaren Modelllösungen für den SDS-basierten Ansatz.

Tab. 30: Wahrscheinlichkeiten, dass die untersuchten Faktoren in den Modellen 0 betragen und somit für die Zielgröße (G6P und cisAco) nicht relevant sind (H0). Wahrscheinlichkeiten < 0.05 werden dahin gehend interpretiert, dass H0 mit mind. 95 %iger Wahrscheinlichkeit abgelehnt werden kann. Entsprechende Werte sind mit einem Asterisk markiert.

Detergenz	Faktor	Wahrscheinlichkeit:Wert ist im Modell 0	
		G6P	cisAco
Digitonin	Volumen-WP	0.0697	0.5193
	Volumen-LP	0.0225*	0.1957
	Detergenzkonzentration	0.0006*	0.4441
SDS	Volumen-WP	0.2939	0.1893
	Volumen-LP	0.2530	0.0739
	Detergenzkonzentration	0.0188*	0.0245*

Aufgrund des spezifischeren Wirkmechanismus von Digitonin und der geringen Vorhersagekraft der SDS-basierten Modelle wurde der SDS-Ansatz nicht weiter verfolgt. Die aus dem statistischen Modell bestimmten Faktor-Level für Digitonin wurden in einem anschließenden Versuch überprüft. Die resultierenden cytosolischen Restsignale auf den Filtern der fraktionellen Filtration sowie die berechneten mitochondrialen Integritäten sind in Abb. 29 dargestellt. Durch die angepassten Einstellungen konnte die cytosolische Fraktion bis auf  $12.78 \pm 0.46$  % abgereichert werden. Hierbei wurde eine mitochondriale Integrität von  $94.87 \pm 4.12$  % erreicht. Dies entspricht einer Verbesserung von etwa 6 % in Bezug auf die Glukose-6Phosphat-Abreicherung, die durch eine reine Erhöhung der Digitoninkonzentration im Lysepuffer erzielt wurde. In Bezug auf das cisAco-Signal auf den Filtern wurde durch die veränderten Einstellungen aus dem DoE keine Veränderung erzielt. Der Unterschied in der Modellgüte von Digitonin und SDS kann mit den unterschiedlichen Wirkmechanismen begründet werden. Durch die spezifische Bindung von Digitonin an Cholesterin und andere beta-Hydroxysterole (Hesketh 1996; Miyamoto, Yamashita et al. 2008), die primär in der Zellmembran vorkommen, ist die Wirkung auf diesen Zellbereich fokussiert. Für SDS als anionisches Detergenz wurde berichtet, dass es zur Entfaltung von Proteinen, unter anderem auch Membran-Proteinen (Huang 1981; Curnow 2007; Dutta 2010), führt. Dieser Vorgang ist wesentlich weniger spezifisch als der bei Digitonin. Hiermit steht die Modellaussage im Einklang, dass die Detergenzienkonzentration von SDS sowohl die cytosolische Abreicherung beeinflusst als auch die mitochondriale Integrität, während die Digitoninkonzentration nur Einfluss auf die Cytosol-Abreicherung nimmt. Darüber sind die durch Digitonin erzeugten Poren mit 8 – 20 nm (Esparis-Ogando, Zurzolo et al. 1994; Olofsson, Bride et al. 2009) so klein, dass möglicherweise kleine Mitochondrien oder mitochondriale Bruchstü-

cke in den Zellen gehalten werden könnten, die andernfalls den Membranfilter passieren würden. Bahnemann hat ebenfalls Ergebnisse zur Digitonin-basierten Zellyse präsentiert, die in diese Richtung deuten. Die von Bahnemann ermittelten Konzentrationen sind jedoch, ebenso wie in anderen Publikationen, um den Faktor 10 geringer als die in dieser Arbeit bestimmten (Niklas, Melnyk et al. 2011; Bahnemann J. 2012). Die Expositionszeiten bei der fraktionellen Filtration liegen jedoch im Sekundenbereich, während die genannten alternativen Protokolle mehrere Minuten dauern können.

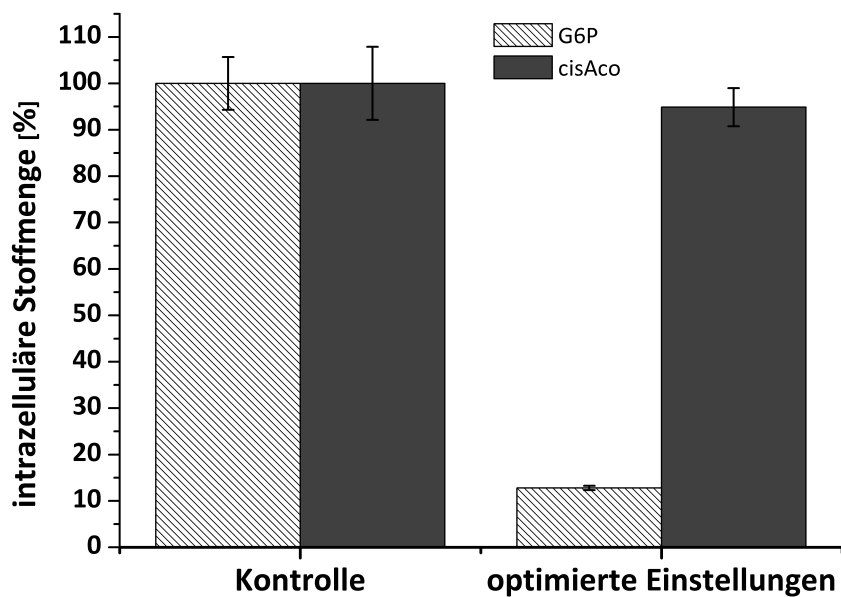


Abb. 29: Überprüfung des cytosolischen Restsignals sowie der mitochondrialen Integrität auf den Filtermembranen mit den im DoE ermittelten Einstellungen der Digitoninkonzentration im Lysepuffer sowie der Volumina des Lyse- und Waschpuffers (0.122 % Digitonin, 12.5 mL Lysepuffer, 43.65 mL Waschpuffer). Die Berechnung erfolgte anhand der zellspezifischen G6P- und cisAco-Stoffmengen in Bezug auf den regulären Filtrationsvorgang für die Gesamtzellanalyse. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier subzellulärer und sechs regulärer Filterreplikate mit der relativen Standardabweichung als Fehler.

### 5.3 Anwendung der fraktionellen Filtration bei der subzellulären Metabolomanalyse in Säugerzellen

Nachdem in 5.2 die Anwendbarkeit einer fraktionellen Filtration bei Säugerzellen überprüft und geeignete Parameter bestimmt wurden, konnte anschließend in einem Modellprozess der Stoffwechsel von CHO-Zellen im Laufe des Kulturverlaufes analysiert werden. Hierzu wurden zwei Batch-Bioreaktorkultivierungen des CHO-DP12-Stammes durchgeführt und zu drei definierten Prozessphasen Proben für die zelluläre und subzelluläre Metabolom-Analyse entnommen. Die untersuchten Prozessphasen zeichneten sich durch a) Glukose- und Glutaminüberschuss im Medium, b) Glukoseverfügbarkeit aber Glutamin-Limitierung sowie c) Glukose- und Glutamin-Limitierung aus.

#### 5.3.1 Kulturverlauf und extrazelluläre Metabolitkonzentrationen

In Abb. 30 ist die Entwicklung der Lebendzelldichte sowie der Glukose- und Glutaminkonzentration im Medium über den Kulturverlauf dargestellt. Die Kulturen wurden jeweils mit  $3.94 \cdot 10^5 \pm 0.19$  bzw.  $3.65 \cdot 10^5 \pm 0.55$  Zellen  $\cdot \text{mL}^{-1}$  inokuliert. Im Laufe ihres Wachstums erreichten sie finale Lebendzellichten von  $7.98 \cdot 10^7 \pm 0.15$  und  $8.5310^7 \pm 0.15$  Zellen  $\cdot \text{mL}^{-1}$  an Tag 6 bzw. 7. Hier zeigte sich, dass das Wachstum beider Kulturen nahezu identisch verlief, der Übergang in die Absterbephase im zweiten Bioreaktor jedoch einen Tag später einsetzte.

Um repräsentative Probennahmezeitpunkte zu ermitteln wurden die Prozesse mittels einer offline-Analytik für Glukose und Glutamin täglich überwacht. Proben für die zelluläre und subzelluläre Metabolomuntersuchung in der ersten Prozessphase, in der Glukose und Glutamin im Überschuss vorlagen, wurden am ersten Tag nach der Inokulation genommen. Bisherige Studien konnten zeigen, dass der  $k_m$ -Wert des Glutamin-Transporters, abhängig von der Art der untersuchten Zelllinie, zwischen 0.09 und 0.15 mM beträgt (Glacken 1988; Jeong 1995; Linz 1997). Aus diesem Grund wurde ein Glutamin-Wert von 0.15 mM als Grenze zur zweiten Prozessphase definiert, die sich durch eine Limitierung in der Glutaminversorgung aber nicht durch eine limitierte Glukoseversorgung der Zellen auszeichnet. Für beide Kulturen gilt, dass dieser Zeitpunkt mit gemessenen Konzentrationen von  $0.152 \pm 0.003$  bzw.  $0.09 \pm 0.006$  mM am fünften Tag nach der Inokulation eintrat. Dementsprechend wurden erneut Metabolomproben erzeugt. In der Literatur wurden limitierende Glukosekonzentrationen von 0.01 mM berichtet (Link, Backstrom et al. 2004), die in dieser Arbeit die dritte Pro-

zessphase kennzeichnen, in der sowohl Glukose als auch Glutamin das Wachstum der Zellen beschränken. In Bioreaktor 1 ist dieser Punkt sieben Tage nach der Inokulation erreicht, in Bioreaktor 2 nach 8 Tagen, entsprechend wurden auch hier Metabolomproben entnommen. Betrachtet man die Glukose- und Laktatkonzentrationen im Medium über die Dauer der Kultivierung in Abb. 31, so stellt man fest, dass die Laktatkonzentration von anfänglich  $2.70 \pm 0.15$  mM in den folgenden vier Tagen auf  $21.79 \pm 3.48$  mM anstieg.

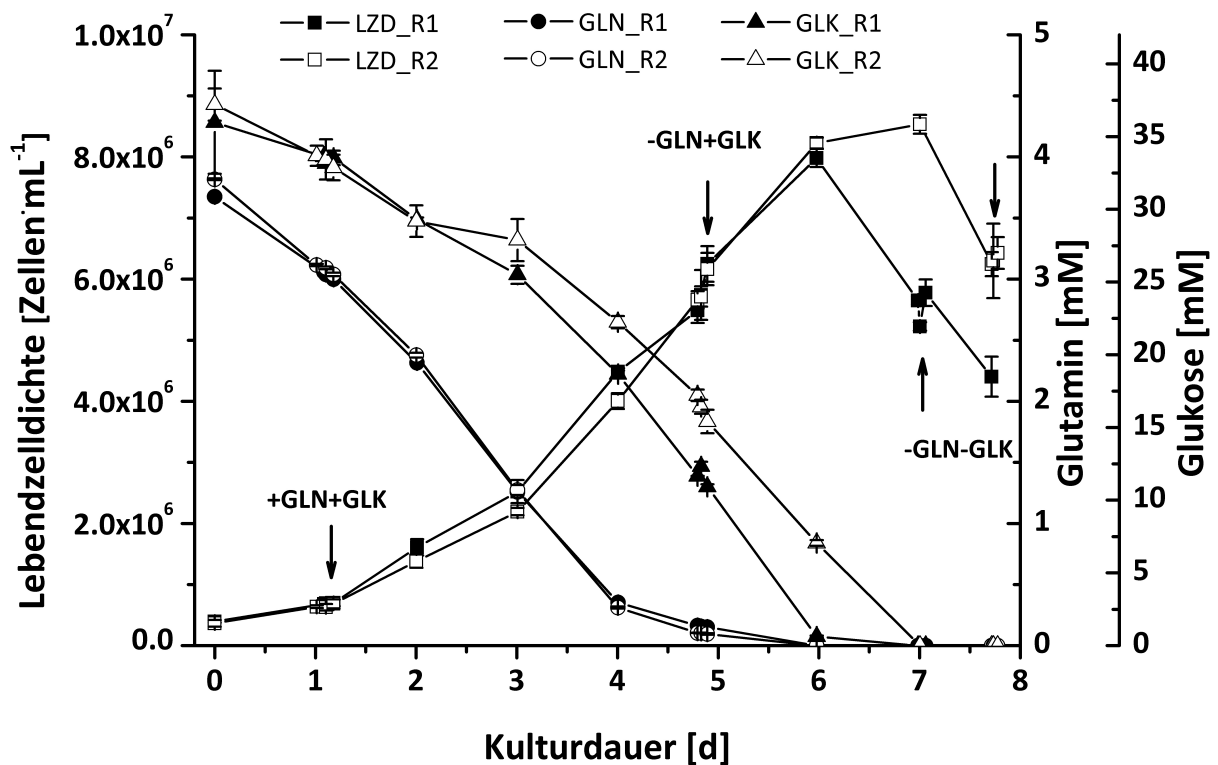


Abb. 30: Kulturverläufe zweier Batch-Kultivierungen zur Untersuchung zellulärer und subzellulärer Metabolit-Pools in CHO-DP12-Zellen. Dargestellt sind die Entwicklung der Lebendzellichte (LZD), der Glutamin (GLN) sowie der Glukose-Konzentration (GLK) im Medium anhand der Mittelwerte einer Dreifachbestimmung pro Reaktor mit der Standardabweichung als Fehler. Proben für metabolische Untersuchungen wurden zu drei Zeitpunkten entnommen: a) in Gegenwart von Glukose und Glutamin, b) nach Verbrauch von Glutamin und c) nach Verbrauch von Glutamin und Glukose. Die Zeitpunkte sind reaktorspezifisch durch Pfeile markiert.

In den folgenden Tagen wurde von den Zellen weiterhin Glukose verbraucht, die Laktatkonzentration blieb zwischen Tag 5 und dem Ende der Kultivierung aber konstant zwischen  $20.18 \pm 4.93$  und  $21.12 \pm 1.78$  mM. In Abb. 32 sind die zellspezifischen Verbrauchs- und Bildungsrate aufgetragen. Hierbei ist ersichtlich, dass der Glukoseverbrauch pro Zelle mit zunehmender Prozessdauer ebenso wie die Laktatbildungsrate stetig abnahm. Der Quotient aus der zellspezifischen Laktatbildungs- und Glukoseverbrauchsrate gibt einen Hinweis auf



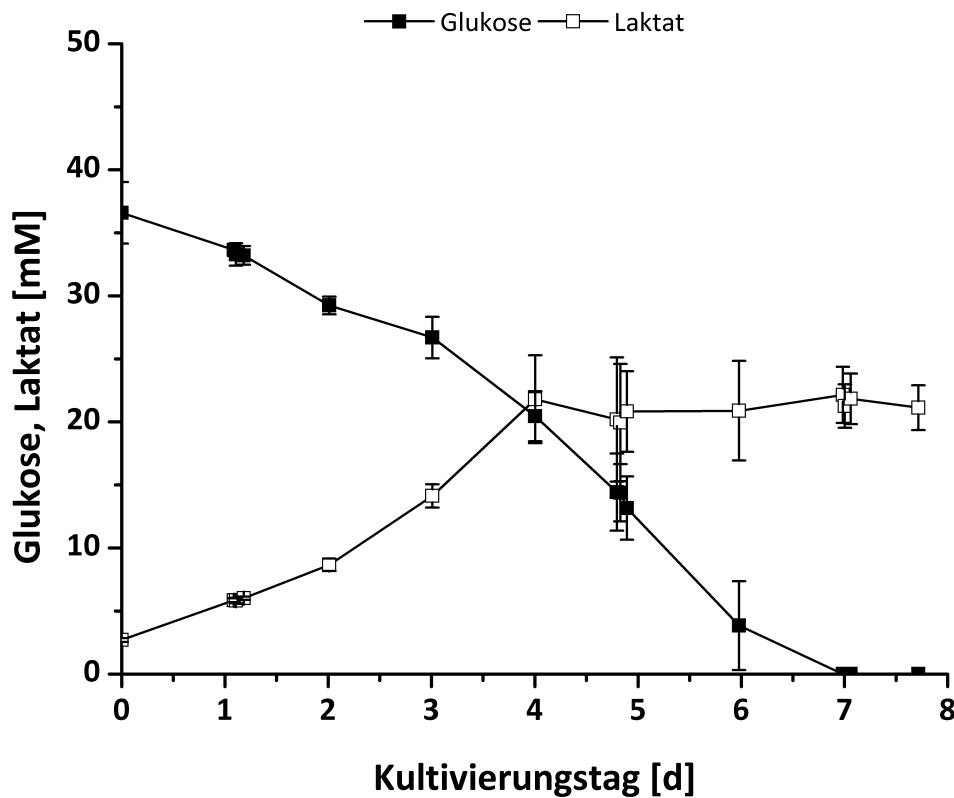


Abb. 31: Verlauf der gemittelten Glukose- und Laktatkonzentrationen über die Kulturdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte beider Bioreaktoren mit der Standardabweichung als Fehler (n=6).

die Effizienz des Stoffwechsels der Zellen. Theoretisch kann aus einem Mol Glukose zwei Mol Laktat gebildet werden, wenn nur glykolytische Aktivität vorliegt und das resultierende Pyruvat nicht in den Citrat-Zyklus überführt wird. Zum Teil sind die resultierenden Verhältnisse aber auch größer, da die Zelle in der Lage ist Kohlenstoffkörper über Shuttle-Systeme aus dem Mitochondrium ins Cytosol zu bringen und dort zu Laktat umzuwandeln. Die in Abb. 32 abgebildeten Quotienten zeigen, dass in den ersten beiden Tagen nach der Inokulation 0.97 bzw. 0.66 Mol Laktat pro Mol Glukose gebildet werden. Am dritten und vierten Tag beträgt dieser Wert 2.25 bzw. 1.2. Erst ab dem fünften Kulturtag sank der Wert auf 0.27 um daraufhin weiter abzunehmen. Dies zeigt, dass in den ersten vier Tagen eine ineffiziente Glukoseverstoffwechslung stattfand, die in steigenden Laktatkonzentrationen im Medium resultierte. Betrachtet man parallel hierzu in Abb. 33 die Glutaminverfügbarkeit im Medium, so stellt man fest, dass Glutamin zwischen dem vierten und fünften Tag der Kultivierung limitierend wurde. Parallel hierzu betrug an Tag 5 nach der Inokulation die Glutamatkonzentration  $3.06 \pm 0.16$  mM und stieg bis zum Ende der Kultur auf  $3.45 \pm 0.09$  mM.

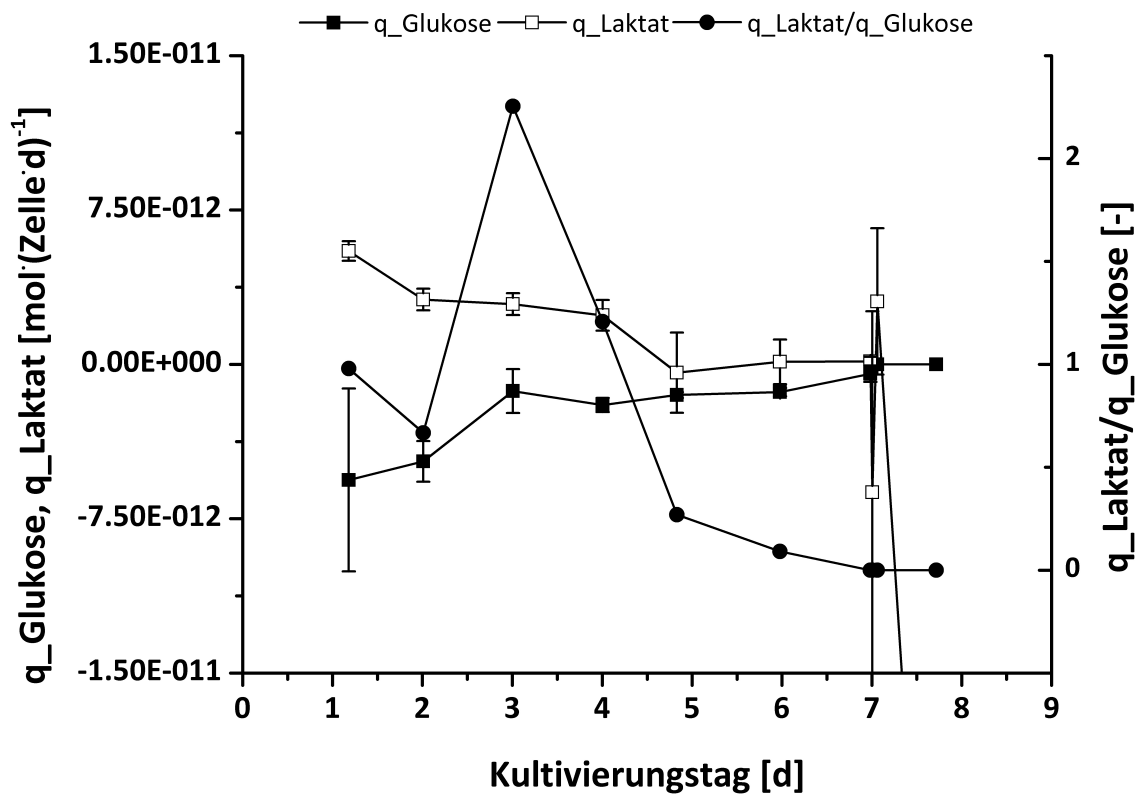


Abb. 32: zellspezifische Glukose- und Laktatverbrauchsraten ( $q$ ) und Quotient der Raten über die Kulturdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung als Fehler ( $n=6$ ).

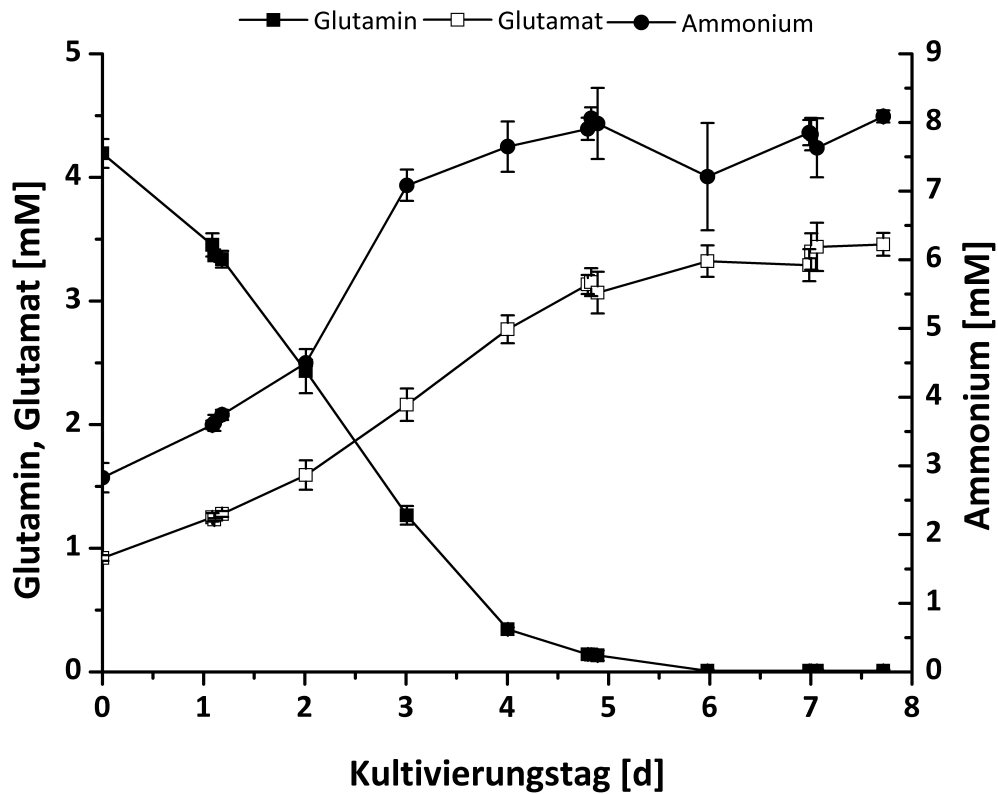


Abb. 33: Verlauf der gemittelten Glutamin-, Glutamat- und Ammoniumkonzentrationen über die Kulturdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte beider Bioreaktoren mit der Standardabweichung als Fehler ( $n=6$ ).

Die Ammoniumkonzentrationen im Medium betragen an Tag 5  $7.98 \pm 0.51$  mM und blieben bis zum Ende der Prozesse mit  $8.00 \pm 0.08$  mM stabil. Abb. 34 zeigt den Verlauf der Pyruvat-, Alanin- und Aspartatkonzentrationen im Medium. Zu Beginn der Kultivierung betrug die Pyruvatkonzentration  $2.07 \pm 0.07$  mM und nahm stetig ab, zum Zeitpunkt der Glutaminlimitierung betrug die extrazelluläre Konzentration noch  $0.46 \pm 0.16$  mM. Am sechsten Tag nach der Inokulation war mit  $0.06 \pm 0.15$  mM die Phase der Pyruvatlimitierung erreicht. Die Alaninkonzentration zeigte einen gegenläufigen Trend, zu Beginn lagen  $0.52 \pm 0.01$  mM in den Reaktoren vor. Durch den Stoffwechsel der Zellen stieg die Konzentration im Medium auf  $1.61 \pm 0.10$  mM zum Zeitpunkt der Glutaminlimitierung an Tag 5 nach der Inokulation. Bis zum Ende des Prozesses sank die Konzentration auf  $1.48 \pm 0.21$  mM. Eine Auswertung mit einem zweiseitigen T-Test zeigte jedoch, dass diese Unterschiede zwischen Phase 2 und 3 nicht signifikant waren. Die in dieser Arbeit genutzten CHO-DP12 Zellen zeigten ebenso einen Anstieg der Aspartat-Konzentration von  $2.44 \pm 0.06$  mM zum Zeitpunkt der Inokulation auf  $2.97 \pm 0.09$  mM an Tag 5 und somit zum Zeitpunkt der Glutaminlimitierung. Nach diesem Zeitpunkt nahm die Konzentration auf  $2.43 \pm 0.17$  mM zum Ende der Kultivierung ab.

Die Bildung von Laktat unter aeroben Bedingungen bei erhöhtem Glukoseverbrauch wird auch als deregulierte Glykolyse bezeichnet (Ozturk and Wei-Shou 2005) und ist für die Zellen energetisch unvorteilhaft, da jedes Mol Glukose theoretisch zu 36 Mol ATP umgesetzt werden könnte, wenn es sowohl die Glykolyse als auch den Citrat-Zyklus durchläuft. Zudem wurde berichtet, dass Laktat das Zellwachstum beeinträchtigen kann (Ozturk, Riley et al. 1992; Lao 1997; Cruz 2000). Bei der Verstoffwechslung von Glukose zu Laktat gewinnt die Zelle pro Mol Glukose nur 2 Mol ATP. Allerdings wird hierbei durch die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat  $\text{NAD}^+$  aus NADH gewonnen, dass der Glykolyse wieder als Edukt zur Verfügung steht. Für schnell wachsenden Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass die Gründe für den erhöhten glykolytischen Fluss in einer Überexpression der Glukosetransporter GLUT3 und GLUT1 (Macheda, Rogers et al. 2005) sowie der an der Glykolyse beteiligten Enzyme liegen (Moreno-Sanchez, Rodriguez-Enriquez et al. 2007). Darüber hinaus ist bekannt, dass wachsende Zellen etwa 30 % mehr Energie benötigen als ruhende Zellen (Mulukutla, Khan et al. 2010). Die Zelle kann dem zuvor beschriebenen ineffizienten Glukosestoffwechsel begegnen, indem sie Glutamin umwandelt und als  $\alpha$ -Ketoglutarat in den Citrat-Zyklus einspeist. Dieser Vorgang ist als Glutaminolyse bekannt (Zhao 2013). Zunächst wird hierbei

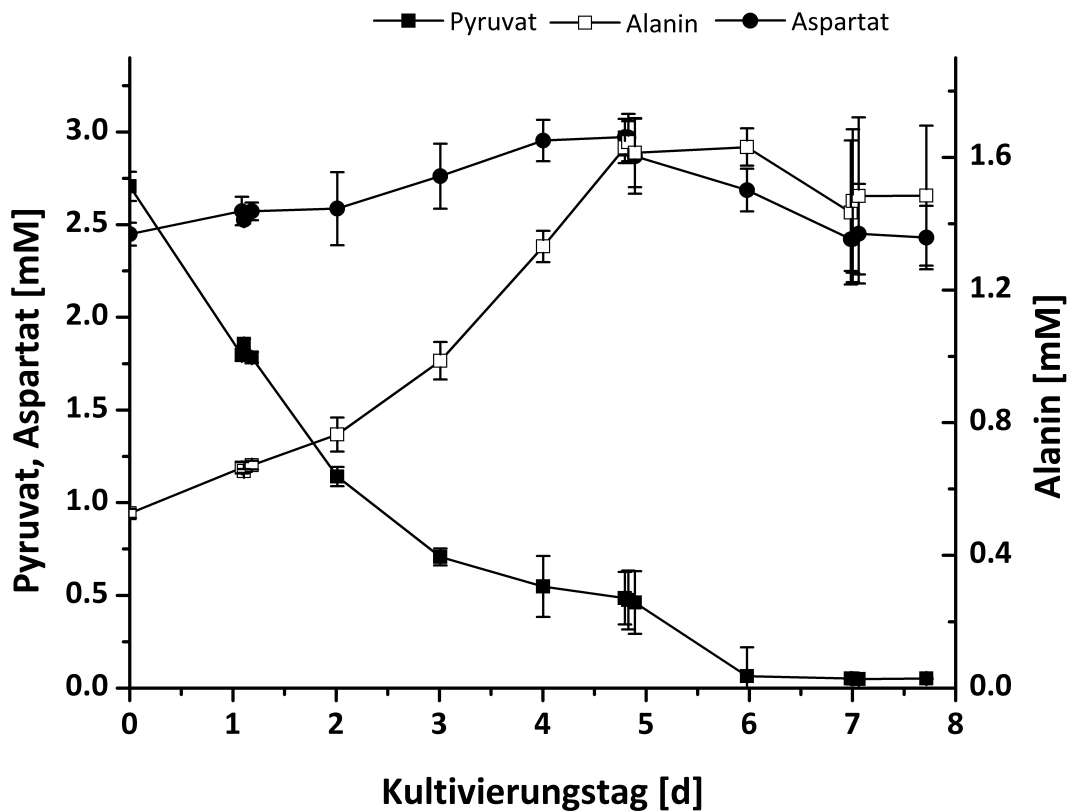


Abb. 34: Verlauf der gemittelten Pyruvat-, Alanin- und Aspartatkonzentrationen über die Kulturdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte beider Bioreaktoren mit der Standardabweichung als Fehler (n=6).

Glutamin mit dem an der mitochondrialen Matrix assoziierten Enzym Glutaminase unter Abspaltung eines Ammonium-Ions in Glutamat umgewandelt. Die weitere Verstoffwechslung von Glutamat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat erfolgt durch drei verschiedene Enzyme. Das Substrat kann von der Glutamat-Dehydrogenase desaminiert und in  $\alpha$ -Ketoglutarat umgewandelt werden. Alternativ kann eine Transaminierung von Glutamat auf Pyruvat durch das Enzym Glutamat-Pyruvat-Transaminase erfolgen, so dass Alanin und  $\alpha$ -Ketoglutarat entstehen (Altamirano, Paredes et al. 2000). Die dritte Möglichkeit besteht darin, dass Glutamat durch das Enzym Glutamat-Oxalacetat-Transaminase unter Verbrauch von Oxalacetat in  $\alpha$ -Ketoglutarat und Aspartat umgewandelt werden. Diesen drei Varianten ist gemein, dass zusätzliches Substrat in den Citrat-Zyklus eingebracht wird und als C5-Körper zur Verfügung steht. Der Kohlenstoffeintrag aus der Glykolyse ist jedoch eingeschränkt, so dass verhindert werden muss, dass Intermediate des Citrat-Zyklus akkumulieren. Dies kann erfolgen, indem Malat durch die mitochondriale Malat-Dehydrogenase unter Bildung von NADPH und  $\text{CO}_2$  in Pyruvat umgewandelt wird. Das Pyruvat kann anschließend über einen Pyruvat-Carrier in das

Cytosol ausgeschleust werden. Alternativ kann Malat über einen Malat-a-Ketoglutarat-Antiporter, der Teil des Aspartat-Malat-Shuttles ist, in das Cytosol transportiert werden um dort von der cytosolischen Malat-Dehydrogenase in Pyruvat umgewandelt zu werden. In beiden Varianten kann anschließend die Umwandlung mittels der cytosolischen Laktat-Dehydrogenase erfolgen und das resultierende Laktat ins Medium ausgeschieden werden. In der Literatur finden sich mehrere Beispiele für einen Anstieg der Alanin-Konzentration im Kulturüberstand bzw. der beteiligten Stoffflüsse (Ahn and Antoniewicz 2012; Selvarasu 2012; Nicolae, Wahrheit et al. 2014). Alanin entsteht üblicherweise bei der Transaminierungsreaktion zwischen Pyruvat und Glutamat (Altamirano, Paredes et al. 2000) und fungiert als Ammoniumsensenke in der Zelle (Sharfstein, Tucker et al. 1994). Selbiges wurde überdies für die Aspartatbildung in Tumorzellen berichtet (Colemann and Lavietes 1981; Keleher, Bryan et al. 1987). Ausgehend von den extrazellulären Konzentrationen lässt sich folgern, dass die Zellen in Abhängigkeit der Nährstoffverfügbarkeit unterschiedliche Stoffwechselphasen zeigten. Solange Glukose und Glutamin in nicht limitierenden Konzentrationen vorlagen, fand eine ausgeprägte glykolytische Aktivität der Zellen statt und Glukose wurde zu Laktat umgesetzt. Aufgrund der ausgeprägten Laktatbildung und der Akkumulation von Glutamat wird nicht davon ausgegangen, dass der Großteil der Glukose in den Citrat-Zyklus floss. Anstelle dessen wurde vermutlich Glutamin in dieser Phase als a-Ketoglutarat in den Citrat-Zyklus eingebracht. Dies führte zu einem Anstieg der Ammoniumkonzentration im Medium bei gleichzeitiger Bildung von Glutamat. Die Ammoniumakkumulation wiederum förderte die Bildung von Alanin und Aspartat als Gegenreaktion um eine Ammonium-bedingte Vergiftung der Zellen zu verhindern. Zeitgleich stieg die Glutamatkonzentration. Diese Annahmen stehen im Einklang mit bisher veröffentlichten Studien. So konnten Templeton et al. zeigen, dass der Stofffluss durch den Citrat-Zyklus in der frühen und späten exponentiellen Phase im Vergleich zu der stationären Phase vergleichsweise gering ist und zu Beginn des Prozesses viel Laktat und Alanin gebildet wurde (Templeton, Dean et al. 2013). Ebenso konnten Ahn et al zeigen, dass während der exponentiellen Phase vermehrt Laktat und Alanin von den Zellen gebildet wird und Glutamin in den Citrat-Zyklus gelangt, wohingegen in der stationären Phase diese Stoffflüsse deutlich abnehmen bzw. sich im Falle von Laktat sogar umkehren (Ahn and Antoniewicz 2011). Desphande et al konnten ebenfalls einen Netto-Produktion von Alanin in CHO-Zellen zeigen, durch den Einsatz  $^{13}\text{C}$ -markierter Glukose konnten sie überdies belegen, dass ein Teil des gebildeten Alanins aus der markierten Glukose, z.B. in Form von Pyruvat, stamm-

te (Desphande, Yang et al. 2009). Die hier getroffenen Beobachtungen decken sich in der ersten Prozessphase mit den Ergebnissen von Wahrheit et al. (Wahrheit, Niklas et al. 2014). In Schüttelkolben-Experimenten mit CHO-K1-Klonen unter Nutzung des identischen Mediums konnten die Autoren in der ersten Prozessphase eine Abnahme von Pyruvat sowie einen Anstieg von Alanin beobachten. Darüber hinaus nahm die Glutamat-Konzentration im Überstand bis zum vollständigen Verbrauch des Glutamins im Medium stetig zu. Basierend auf Stoffflussanalysen konnten die Autoren zeigen, dass Pyruvat zu Alanin transaminiert wurde während Glutamin zu Glutamat umgewandelt wurde. Glutamat wiederum speiste den Citrat-Zyklus durch eine weitere Umwandlung zu  $\alpha$ -Ketoglutarat durch die Enzyme Glutamat-Dehydrogenase und Aspartat-Aminotransferase. Ebenso deutete das Verhältnis der spezifischen Laktat- und Glukose-Raten erst mit Eintreten der Glutamin-Limitierung eine Verstoffwechslung von Laktat an. Da es sich bei den Experimenten von Wahrheit et al. um Versuche im nicht geregelten Schüttelkolben handelte, zeigten sich in den späteren Prozessphasen Unterschiede im Vergleich zu der hier vorliegenden Arbeit in den Metabolit-Profilen. Die Autoren schlussfolgerten aus ihren Ergebnisse, dass die Hexokinase der Geschwindigkeitslimitierende Schritt der Glykolyse sei, während im Citrat-Zyklus die mitochondriale Isocitrat-Dehydrogenase limitierend wirkt. Auch wenn die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten in sich schlüssig zusammen passen und im Einklang mit bekannter Literatur stehen, lassen die extrazellulären Daten nur begründete Schlussfolgerungen zu. Um die hier getroffenen Vermutungen zu belegen, bedarf es jedoch zusätzlicher Stoffflussanalysen. Sofern diese auch die Flussaufspaltung im Citrat-Zyklus umfassen sollen, empfiehlt es sich zusätzlich zu  $^{13}\text{C}$ -Glukose auch Untersuchungen mit  $3\text{-}^{13}\text{C}$ -Glutamin durchzuführen um die Exkretion der  $^{13}\text{C}$ -Atome in Form von Laktat und Alanin zu berücksichtigen.

### 5.3.2 Einfluss der Substratverfügbarkeit auf intra- und subzelluläre Metabolitpools

Wie in Abb. 30 dargestellt wurden zu drei repräsentativen Zeitpunkten Proben für die metabolische Untersuchung der CHO-Zellen genommen. Für ein leichteres Verständnis und die bessere Zuordnung der Probennahmezeitpunkte in den Prozessverlauf, gibt Tab. 31 eine kurze Übersicht wann welche Probe erzeugt wurde.

Die in 5.2.8 identifizierten optimierten Parameter zur Cytosolabreicherung wurden bei der finalen Kultivierung genutzt um Zugang zu den mitochondrialen Metabolitpools zu erhalten. Hierbei wurden die in Abb. 35 gezeigten Abreicherungen und mitochondrialen Integritäten erreicht. In den Phasen ohne Substratlimitierung sowie zum Zeitpunkt als nur eine Glutaminlimitierung vorlag konnte das Cytosol auf  $13.55 \pm 1.78$  bzw.  $14.67 \pm 2.85$  % abgereichert werden, die Mitochondrien wiesen zu diesem Zeitpunkt eine Integrität von  $89.78 \pm 3.43$  und  $92.57 \pm 6.6$  % auf. In der dritten Prozessphase wurde die cytosolische Abreicherung mit  $28.61 \pm 31.59$  berechnet, die mitochondriale Integrität betrug  $100.84 \pm 2.03$  %. Die ermittelten Werte für die cytosolische Abreicherung in der dritten Prozessphase erscheinen im Vergleich zu den ersten beiden Prozessphasen stark schwankend. Hierbei ist aber zu berücksichtigen, dass die zum Ende der Kulturdauer vorliegenden intrazellulären Glukose-6Phosphat-Mengen nah an der analytischen Nachweisbarkeitsgrenze lagen. Im Vergleich mit den in 5.2.8 realisierten cytosolischen Abreicherungen und mitochondrialen Integritäten konnte gezeigt werden, dass die in Vorversuchen ermittelten Pufferbedingungen für die fraktionierte Filtration auch bei den Bioreaktorkultivierungen eine zufriedenstellende cytosolische Abreicherung erzielen ohne die Mitochondrien hierbei zu schädigen. Für einen Vergleich der intrazellulären Metabolitpools zwischen den einzelnen Phasen müssen die analytisch bestimmten Stoffmengen pro Zelle in intra- sowie subzelluläre Konzentrationen umgerechnet werden. Diese wurden basierend auf den in Tab. 32 dargestellten Phasen-spezifischen zellulären Durchmessern berechnet. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass Mitochondrien 22 % des zellulären Volumens ausmachen (Alberts 1989).

Tab. 31: Zuordnung der Metabolomproben in den Prozessverlauf

Metabolomprobe	Tag nach Inokulation [d]	Kommentar
+GLN+GLC	1	Keine Glutamin- oder Glukoselimitierung
-GLN+GLC	5	Glutaminlimitierung aber keine Glukoselimitierung
-GLN-GLC	7; 8	sowohl Glutamin- als auch Glukoselimitierung

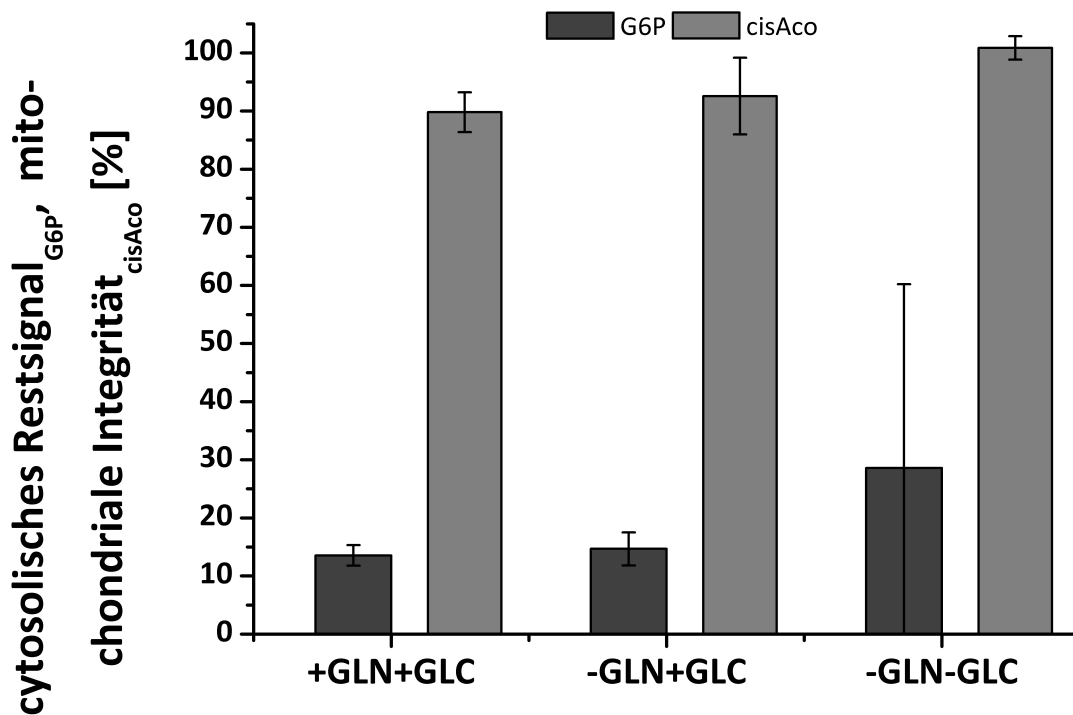


Abb. 35: Darstellung des cytosolischen Restsignals sowie der mitochondrialen Integrität von fraktionierten Zellen zu den drei gewählten Probenahmezeitpunkten jeweils bezogen auf die unbehandelte Kontrollmessung. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung in beiden Bioreaktoren ( $n=6$ ), die zugehörigen Fehler wurden mittels Fehlerfortpflanzung berechnet.

Für die Intermediate der Glykolyse ergaben sich somit die in Abb. 36 dargestellten Konzentrationen. In Gegenwart von Glukose und Glutamin betrug die Glukose-6Phosphat-Konzentration  $2.76 \pm 0.29$  mM und nahm in den folgenden Prozessphasen auf  $1.94 \pm 0.29$  bzw.  $0.13 \pm 0.02$  mM ab. Ebenso war der Rückgang der cytosolischen Pools für 3-Phosphoglycerat und 2-Phosphoglycerat von  $1.74 \pm 0.08$  auf  $1.35 \pm 0.08$  und 0 mM bzw. von  $0.1 \pm 0.02$  mM auf  $0.08 \pm 0.02$  und 0 mM zwischen den ersten beiden Prozessphasen weniger ausgeprägt im Vergleich zum Zeitpunkt als sowohl eine Glukose- als auch Glutaminlimitierung auf die Zellen wirkten. Ebenso verhält es sich mit Phosphoenolpyruvat und Pyruvat die von  $0.11 \pm 0.01$  mM auf  $0.1 \pm 0.01$  und 0 mM bzw. von  $3.33 \pm 1.33$  mM auf  $0.77 \pm 0.32$  und  $0.01 \pm 0.01$  mM abnahmen. Lediglich der intrazelluläre Gesamt-Pool von Fruktose-6Phosphat und Fruktose-1,6-bisPhosphat stieg von der ersten zur zweiten Prozessphase von  $2.32 \pm 0.31$  mM auf  $3.05 \pm 0.27$  an und betrug in der Phase von gleichzeitiger Glukose- und Glutaminlimitierung  $2.6 \pm 0.29$  mM.



Tab. 32: Zelldurchmesser in Abhängigkeit der jeweiligen Prozessphasen. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit der Standardabweichung als Fehler.

Prozessphase	Zelldurchmesser [ $\mu\text{m}$ ]
+GLN+GLC	11.62 $\pm$ 0.07
-GLN+GLC	11.65 $\pm$ 0.21
-GLN-GLC	12.02 $\pm$ 0.64

In Abb. 37 ist dargestellt, dass die mitochondrialen Konzentrationen der im Citrat-Zyklus beteiligten Metabolite unterschiedliche Konzentrationsprofile aufwiesen. Während Pyruvat in den drei Prozessphasen von 4.26 $\pm$ 1.3 auf 0.35 $\pm$ 0.16 und schließlich 0.15 $\pm$ 0.01 mM abnimmt, fiel die Abnahme der Citrat-Konzentration in den ersten beiden Prozessphasen von 5.91 $\pm$ 0.59 auf 5.6 $\pm$ 0.38 mM geringer aus. Zum Ende der Kultivierung betrug die mitochondriale Konzentration 1.18 $\pm$ 0.09 mM. Cis-Aconitat nahm über die drei Prozessphasen mit 0.30 $\pm$ 0.01, 0.29 $\pm$ 0.02 und 0.21 $\pm$ 0.00 mM stetig ab. Die Messungen von  $\alpha$ -Ketoglutarat und Succinat sind von größeren Fehlern betroffen und liefern Werte von 0.68 $\pm$ 0.08, 1.06 $\pm$ 1.21 und 0.33 $\pm$ 0.08 mM bzw. 1.81 $\pm$ 0.95, 2.49 $\pm$ 1.24 sowie 1.27 $\pm$ 0.85 mM. Somit lässt sich nicht zweifelsfrei feststellen ob nach Eintreten der Glutaminlimitierung tatsächlich ein Anstieg der jeweiligen Konzentrationen erfolgte. Fumarat konnte nur in der ersten Prozessphase im Mitochondrium mit 0.28 $\pm$ 0.32 mM gemessen werden. Malat zeigte ähnlich wie Citrat eine geringere Abnahme der kompartmentären Konzentrationen von 3.22 $\pm$ 0.27, 1.81 $\pm$ 0.12 und 1.02 $\pm$ 0.08 mM. Die ermittelten zellulären Aminosäurekonzentrationen sind in Abb. 38 dargestellt. In der ersten Prozessphase ohne Substratlimitierung waren die cytosolische und mitochondriale Glutaminkonzentrationen mit 47.02 $\pm$ 21.79 und 52.78 $\pm$ 21.21 mM annähernd gleich groß. Mit Eintreten der Glutaminlimitierung nahmen die kompartmentären Konzentrationen auf 1.61 $\pm$ 0.85 und 0.80 $\pm$ 0.26 mM ab. Zum Ende der Kultivierung konnten nur noch 0.05 $\pm$ 0.03 sowie 0.27 $\pm$ 0.03 mM im Cytosol bzw. Mitochondrium gemessen werden. Für Glutamat konnte ebenfalls eine Prozessphasen-abhängige Abnahme der kompartmentären Metabolitpools beobachtet werden. In Phase 1 lagen im Cytosol 103.92 $\pm$ 15.44 mM und im Mitochondrium 40.41 $\pm$ 10.64 mM vor. Nach Verbrauch des extrazellulären Glutamins in Phase 2 nahmen die cytosolischen und mitochondrialen Konzentrationen auf 53.92 $\pm$ 12.62 und 14.60 $\pm$ 6.70 mM ab. In der letzten Phase des Prozesses sanken die Konzentrationen auf

1.80±3.99 und 2.64±3.10 mM ab. Demgegenüber zeigte Alanin einen gegenläufigen Trend zur Glutaminverfügbarkeit im Medium. Über die Prozessdauer stieg die intrazelluläre Konzentration von 16.25±2.35 auf 34.57±6.99 und schließlich 33.96±14.70 mM an. Aspartat lag über den Kulturverlauf mit Konzentrationen von 67.10±22.34, 13.79±22.48 und 14.51±3.65 mM im Cytosol vor, während in den Mitochondrien Konzentrationen von 50.89±27.56, 26.09±36.12 und 10.44±2.35 mM vorherrschten. In Abb. 39 sind die cytosolischen und mitochondrialen Konzentrationsverläufe der phosphorylierten Nukleotide AMP, ADP und ATP über die Kulturdauer dargestellt. Von diesen wies AMP die geringsten cytosolischen und mitochondrialen Konzentrationen auf mit 0.06±0.04, 0.03±0.03 und 0.05±0.02 mM bzw. mit 0.16±0.04, 0.14±0.03 und 0.11±0.01 mM. Die ADP-Konzentration im Cytosol betrug 0.65±0.12, 0.43±0.11 und schließlich 0.30±0.08 mM, die mitochondriale Konzentration lag bei 0.46±0.01, 0.35±0.00 und 0.34±0.03 mM. ATP war in beiden Kompartimenten deutlich höher konzentriert, die Konzentration im Cytosol betrug 6.28±0.38, 4.43±0.41 und 1.63±0.11 mM und in den Mitochondrien 1.00±0.07, 0.45±0.042 sowie 0.30±0.09 mM. Leitet man aus den verfügbaren kompartimentären Konzentrationen die jeweiligen Verhältnisse der für zelluläre Reaktionen zur Verfügung stehende Energie in Form mehrfach geladener Adenylate, also die Adenlyt-Energieladung, ab, zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Kompartimenten. Während dieser Wert berechnet für die Gesamtzelle von 0.93±0.01 auf 0.93±0.02 und 0.86±0.02 mM abnahm, so betrug die Werte für das Cytosol und das Mitochondrium 0.94±0.02, 0.94±0.02 und 0.89±0.03 mM bzw. 0.75±0.03, 0.66±0.04 und 0.62±0.06 mM. Dies zeigt wiederum, dass ein verallgemeinernder Ansatz metabolischer Untersuchungen ohne Betrachtung des kompartimentären Aufbaus einer Zelle wichtige Details überlagert. Betrachtet man die kompartimentären Gesamt-AxP-Konzentrationen, so stellt man fest, dass diese im Cytosol deutlich stärker abnahmen als in den Mitochondrien. Wie in Tab. 34 ersichtlich nahm sie im Cytosol von 7.00±0.55 mM auf 1.99±0.22 mM ab, während im Mitochondrium eine Abnahme von 1.63±0.13 mM auf 0.76±0.14 mM erfolgte.

Wie in 5.3.1 aufgeführt, deuten die extrazellulären Verläufe der Substrate und Stoffwechselprodukte darauf hin, dass bis zum Eintreten der Glutaminlimitierung eine ineffiziente Glukoseverstoffwechslung in den Zellen stattgefunden hat. Sofern nun eines der Enzyme in der Glykolyse, das Fruktose-6Phosphat oder Fruktose-1,6-bisPhosphat als Substrat nutzt, langsamer als die nachgeschalteten Enzyme agiert, kann es theoretisch zu einem Aufstau des Fruktose-1- und Fruktose-1,6-bisPhosphat-Gesamt-Pools kommen. Tatsächlich liegt die

durch Phosphofructo-Kinase katalysierte Umwandlung von Fruktose-6Phosphat zu Fruktose-1,6-bisPhosphat weit weg von ihrem Gleichgewicht, so dass angenommen wird, dass Phosphofructo-Kinase das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Glykolyse ist (Bosca and Corredor 1984). Darüber hinaus wird die Kinaseaktivität auf mehreren Ebenen reguliert. Ein niedriger pH-Wert sorgt für eine Inhibierung des Enzyms, ebenso wie erhöhte ATP- und Citrat-Konzentrationen zu einer allosterischen Hemmung führen (Ui 1966; Wu and Davis 1981). Ui konnte zeigen, dass, in Abhängigkeit des pH-Wertes, ATP-Konzentrationen von 1 – 3 mM dazu führten, dass die Aktivität von Phosphofructo-Kinase in zellfreien Extrakten stark inhibiert wird. Je saurer das Milieu, desto ausgeprägter ist dieser Effekt. Wie in Abb. 39 gezeigt, lagen in den ersten beiden Prozessphasen cytosolische ATP-Konzentrationen von mehr als 3 mM vor. Ebenso waren die cytosolischen Citrat-Konzentrationen in den ersten beiden Prozessphasen höher als in der dritten und könnten zu einer allosterischen Hemmung der Kinase geführt haben. Darüber hinaus tritt Fruktose-6Phosphat auch als Intermediat des Pentose-Phosphat-Wegs in Erscheinung. Da zum Zeitpunkt der Probenahme in der dritten Prozessphase kein Wachstum der Zellen mehr stattfand, ist davon auszugehen, dass der Fluss durch den Pentose-Phosphatweg für die Biomassesynthese abgegeben ist. Eventuell zur Verfügung stehende Substrate können nun in Fruktose-6Phosphat umgewandelt und in die Glykolyse eingespeist worden sein. Wie zuvor beschrieben gehen Wahrheit et al davon aus, dass die Hexokinase das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Glykolyse ist (Wahrheit, Niklas et al. 2014). Unabhängig hiervon greifen nach wie vor die oben genannten Regulationsmechanismen der Phosphofructo-Kinase.

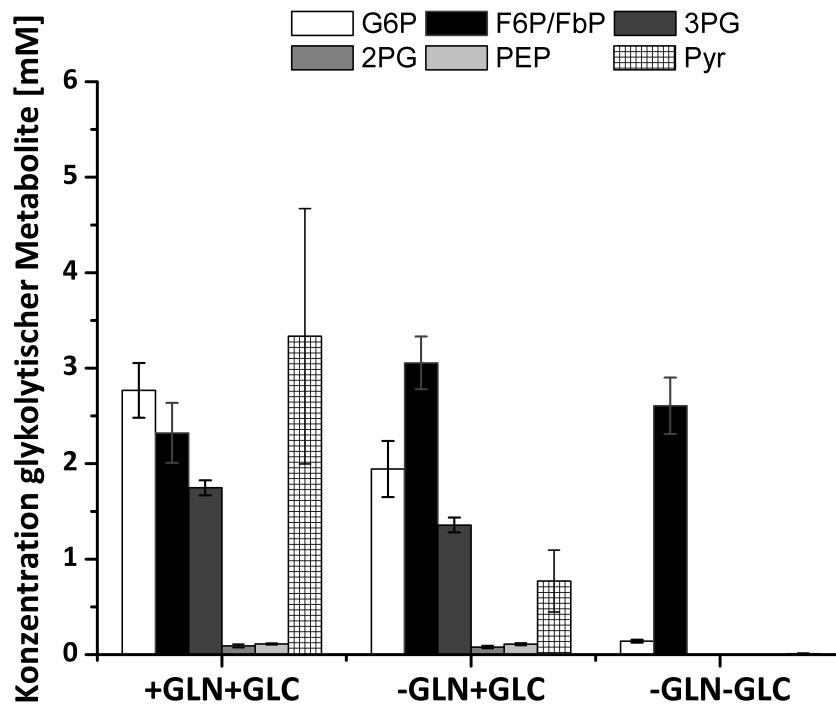


Abb. 36: cytosolische Konzentrationen ausgewählter Intermediate der Glykolyse in CHO-DP12 Zellen in Abhängigkeit der Prozessphasen eines Batch-Prozesses. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung in beiden Bioreaktoren (n=6), die zugehörigen Fehler wurden mittels Fehlerfortpflanzung berechnet.

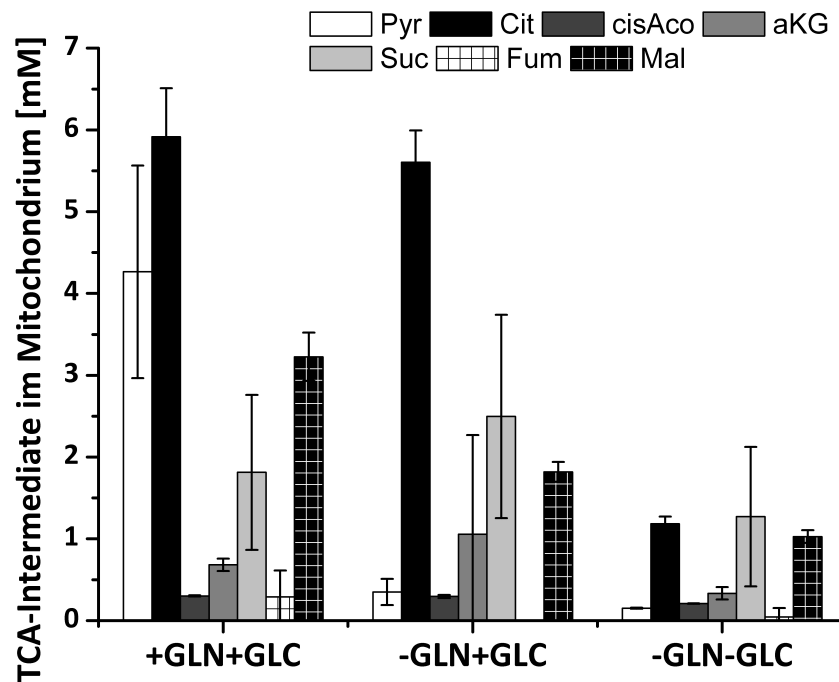


Abb. 37: mitochondriale Konzentrationen ausgewählter Intermediate des Citrat-Zyklus in CHO-DP12 Zellen in Abhängigkeit der Prozessphasen eines Batch-Prozesses. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung in beiden Bioreaktoren (n=6) mit der Standardabweichung als Fehler.

Vergleicht man die Abnahme der cytosolischen und mitochondrialen Pyruvatkonzentrationen so stellt man fest, dass die Abnahme im Cytosol um etwa den Faktor 5 erfolgte wohingegen im Mitochondrium die Pyruvatkonzentration mit Beginn der Glutaminlimitierung um den Faktor 12 reduziert wurde. Wie bereits in 5.3.1 beschrieben, tendieren Säugerzellen in Anwesenheit von Glutamin dazu, dieses als  $\alpha$ -Ketoglutarat in den Citrat-Zyklus einzuschleusen. Hierbei ist denkbar, dass es zu einem Rückstau der vorgeschalteten Metabolite kommt, da die enzymatischen Umsatzreaktionen konzentrationsabhängig sind. Darüber hinaus steht im Cytosol Alanin zur Verfügung aus dem Pyruvat gewonnen werden kann.

Citrat und Malat, deren Konzentrationen mit Beginn der Glutaminlimitierung im Vergleich zu anderen Metaboliten der jeweiligen Stoffwechselwege nur gering abnahmen, sind in wichtige Shuttle-Prozesse involviert. Eine Erklärung könnte hierfür die herausragende Bedeutung der Shuttle-Systeme für den Transport von Reduktionsäquivalenten in der Zelle sein. Über den Citrat-Shuttle erfolgt der Transport von Citrat vom Mitochondrium in das Cytosol um dort beispielsweise für die Synthese von Fettsäuren genutzt zu werden. Darüber hinaus ist dieses Transportsystem involviert in der Bereitstellung von NADPH. Das Malat-Aspartat-Shuttle hingegen sorgt dafür, dass NADH aus dem Cytosol in die Mitochondrien transportiert wird um schlussendlich bei der oxidativen Phosphorylierung zur Erzeugung von ATP genutzt zu werden. Zusätzlich zu den bisherigen, auf den unterschiedlichen Reaktionskinetiken basierenden Vermutungen, könnten auch intra- und subzelluläre Regulationsmechanismen existieren, die sicherstellen, dass ausreichend Intermediate für diese wichtigen Transportsysteme zur Verfügung stehen.

Die hier gezeigten cytosolischen und mitochondrialen Glutaminkonzentrationen unterstützen die zuvor getroffene These, dass in Anwesenheit nicht-limitierender extrazellulärer Glutaminkonzentrationen, Glutamin zunächst in den Citrat-Zyklus eingespeist wurde. Da hierdurch der reguläre Fluss von C3-Körpern aus der Glykolyse in den Citrat-Zyklus beeinflusst wird, müssen diese abgeleitet werden. Dies kann zum einen in Form der beobachteten Laktatbildung erfolgen, zum anderen hingegen auch durch die Bildung von Alanin. Die Alanin-Akkumulation konnte sowohl auf extrazellulärer als auch auf intrazellulärer Ebene nachgewiesen werden. Die hier gezeigten zellulären Glutamatkonzentrationen unterstützen zudem die in 5.2.2 getroffene Aussage, dass die extrazellulären Medienkomponenten hinreichend gut abgereichert werden und die zelluläre Metabolitanalysen nicht beeinträchtigen. Während im Verlauf der Kultivierung die extrazellulären Glutamatkonzentrationen bis auf

3.45±0.09 mM anstiegen, nahmen die zellulären Konzentrationen konstant ab. Medienrückstände auf dem Filter hätten hier zu irrtümlich ansteigenden zellulären Glutamat-Konzentrationen geführt.

Die cytosolischen und mitochondrialen Konzentrationen von Glutamat und Aspartat nahmen von Phase 1 zu Phase 3, ebenso wie die in Abb. 37 gezeigten mitochondrialen Malat-Konzentrationen, ab. Diese drei Metabolite sind am Malat-Aspartat-Shuttle beteiligt, dessen Aufgabe es ist Reduktionsäquivalente aus dem Cytosol in das Mitochondrium zu befördern bzw. den Stoffaustausch zwischen den Kompartimenten zu gewährleisten. In der Literatur ist beschrieben, dass dieses Shuttle-System aktiv ist wenn Glukose bzw. Laktat als Substrat genutzt werden (Ramakrishna, Edwards et al. 2001) bzw. eine hohe Aktivität der Glykolyse vorliegt (Locasale and Cantley 2011). Niklas et al haben gezeigt, dass der Fluss durch das Malat-Aspartat-Shuttle im Laufe der Kultivierung und somit in den verschiedenen metabolischen Phasen abnimmt (Niklas, Schrader et al. 2011).

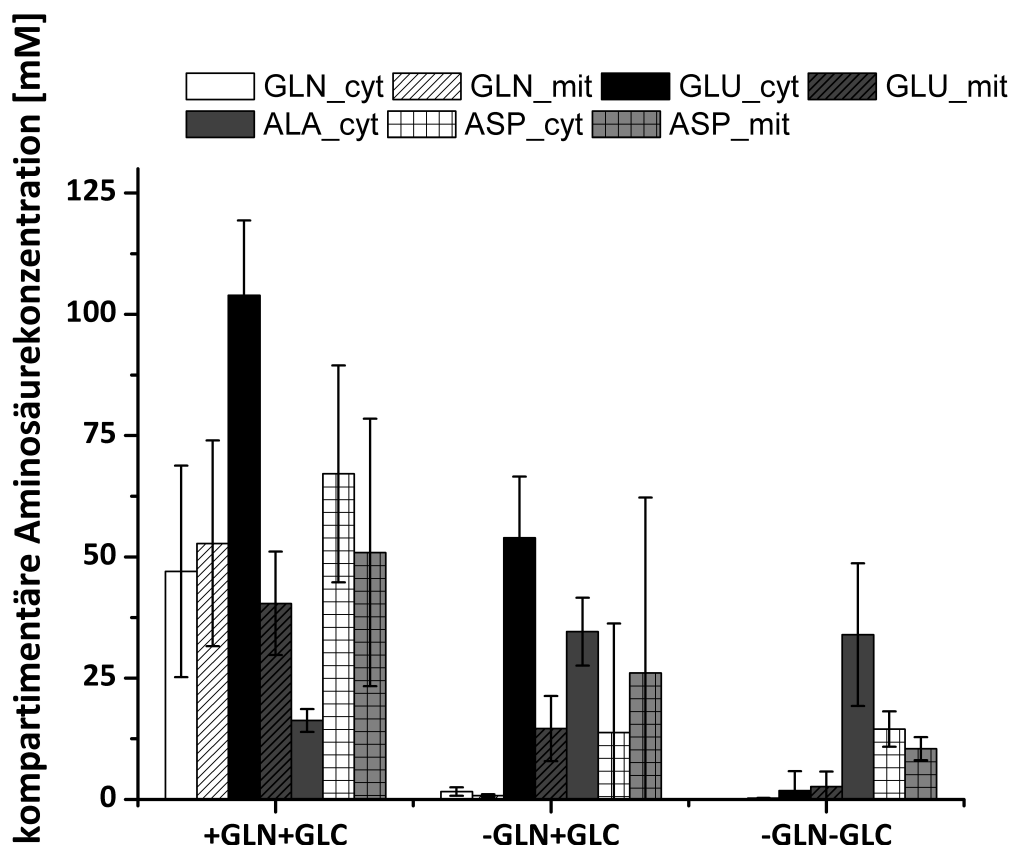


Abb. 38: kompartimentäre Konzentrationen ausgewählter Aminosäuren in CHO-DP12 Zellen in Abhängigkeit der Prozessphasen eines Batch-Prozesses. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung in beiden Bioreaktoren (n=6). Die zugehörigen Fehler cytosolischer Messungen wurden mittels Fehlerfortpflanzung berechnet, die mitochondrialen Werte zeigen die Standardabweichung als Fehler.

Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass über die Dauer der Kultur der Bedarf an NADH im Mitochondrium abnahm, da das Zellwachstum nachließ. Folglich konnte die Aktivität des Shuttle-Systems reduziert werden. Wenn, wie in 5.3.1 vermutet, in Anwesenheit von Glutamin ein reduzierter Fluss von der Glykolyse in den Citrat-Zyklus erfolgte, Glutamin jedoch als  $\alpha$ -Ketoglutarat in diesen eingebracht wurde, so müssen diese zusätzlichen C-Körper auch wieder aus dem Zyklus entfernt werden um einen Rückstau zu verhindern. Diese Funktion kann vom Malat-Aspartat-Shuttle übernommen werden. Die hier gezeigte Abnahme der im Shuttle beteiligten Metabolite kann ein Indiz dafür sein, dass die Shuttle-Aktivität im Laufe der Zeit reduziert wurde.

Bei den gezeigten Werten der Adenosin-Phosphat-Spezies fällt auf, dass die kompartmentären AMP- und ATP-Konzentrationen ein geradezu inverses Verhalten aufwiesen. Während AMP in der mitochondrialen Fraktion höher konzentriert war als in der cytosolischen, wies das Cytosol eine im Vergleich zu den Mitochondrien deutlich erhöhte ATP Konzentration auf. Auf den ersten Blick sind diese Ergebnisse überraschend, da die Mitochondrien dafür bekannt sind der Ort der oxidativen Phosphorylierung und somit der ATP-Synthese zu sein (Tasseva, Bai et al. 2013; Kioka, Kato et al. 2014). Im Gegensatz hierzu waren die Unterschiede der kompartmentären ADP-Konzentrationen weniger stark ausgeprägt. Betrachtet man die cytosolischen und mitochondrialen ATP/ADP-Verhältnisse über den Zeitverlauf so stellt man fest, dass die cytosolischen Verhältnisse fünf- bis zehnmal höher waren als die mitochondrialen. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen, die in Rattenzellen Werte zwischen 5.9 und 8 ergeben haben (Schwenke, Soboll et al. 1981). Es wurden auch bereits Werte von bis zu 63 berichtet (Soboll, Scholz et al. 1978). In HeLa-Zellen konnte Imamura mittels einer FRET-basierten Untersuchung zeigen, dass die cytosolischen ATP-Konzentrationen größer waren als die gemessenen mitochondrialen Konzentrationen (Imamura, Nhat et al. 2009). Schätzt man aus diesen FRET-Signalen die resultierenden Konzentrationen ab, so ergeben sich Werte von 6 mM im Cytosol und etwa 1.5 mM im Mitochondrium. Für diese Unterschiede macht Imamura die Translokation von ATP über die mitochondrielle Membran als Ursache aus. Untersuchungen von Sidorenko et al. in MDCK-Zellen untermauern diese Annahme (Sidorenko, Wahl et al. 2008). Aus thermodynamischen Gesichtspunkten ist der Abtransport von ATP aus den Mitochondrien sinnvoll um die weitere Produktion zu fördern. Als Triebkraft für diesen Transport von den Mitochondrien in das Cytosol wurde das Membranpotential der Mitochondrien identifiziert (Klingenberg and Rottenberg 1977).

Die in Tab. 33 gezeigten Daten werfen die Frage auf ob die kompartmentären Level an phosphorylierten Adenylaten von der Zelle wahrgenommen werden und entsprechende Regulationsmechanismen auslösen. Für den gesamtzellulären Energiehaushalt ist bekannt, dass die AMP-aktivierte Protein-Kinase (AMPK) bei fallendem Energiegehalt der Zelle die ATP-Produktion durch das Fördern katabole Prozesse anregt und gleichzeitig den ATP-Verbrauch reduziert, indem sie nicht essentielle ATP-konsumierende Stoffwechselwege abschaltet (Hardie 2003; Oakhill, Steel et al. 2011; Hardie, Ross et al. 2012). Desweiteren ist bekannt, dass die AMPK über Transport-Systeme zwischen dem Zytosol und dem Nukleus ausgetauscht werden kann (Kodiha, Rassi et al. 2007).

Tab. 33: Vergleich der Prozessphasen-spezifischen Adenylat-Energieladungen für die Gesamtzelle sowie die untersuchten Kompartimente. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung in beiden Bioreaktoren (n=6), die zugehörigen Fehler wurden mittels Fehlerfortpflanzung berechnet.

AECs	gesamt intrazellulär	+/-	cytosolisch	+/-	mitochondrial	+/-
+GLN+GLC	0.93	0.01	0.94	0.02	0.75	0.03
-GLN+GLC	0.93	0.02	0.94	0.02	0.66	0.04
-GLN-GLC	0.86	0.02	0.89	0.03	0.62	0.06

Tab. 34: Darstellung der Prozessphasen-spezifischen kompartmentären AxP-Poolgrößen. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung in beiden Bioreaktoren (n=6), die zugehörigen Fehler wurden mittels Fehlerfortpflanzung berechnet.

AxP Poolgröße [mM]	cytosolisch	+/-	mitochondrial	+/-
+GLN+GLC	7.00	0.55	1.63	0.13
-GLN+GLC	4.90	0.57	0.95	0.08
-GLN-GLC	1.99	0.22	0.76	0.14

Eine Erklärung für die vergleichsweise ausgeprägte Abnahme der Gesamt-AxP-Konzentrationen im Cytosol im Vergleich zu den Mitochondrien könnte der Abbau von AMP im Cytosol liefern. Chapman konnte bereits 1970 eine erhöhte Adenylat-Deaminase Aktivität in Leberzellen von Ratten beobachten um einer Abnahme der Adenylat-Energieladung zu begegnen (Chapman and Atkinson 1973). Dieses Verhalten konnte in Zell-Extrakten von Asziten durch Chapman bestätigt werden (Chapman, Miller et al. 1976). Darüberhinaus konnten Matsumoto et al. zeigen, dass in humanen lymphoblastoidalen Zellen der Abbau von AMP in Nukleotide und Purine erfolgt, um die Energieladung zu erhöhen sofern sie unter 0.6 fiel (Matsumoto, Raivio et al. 1979). Da die Adenylat-Energieladung in der Zelle eine



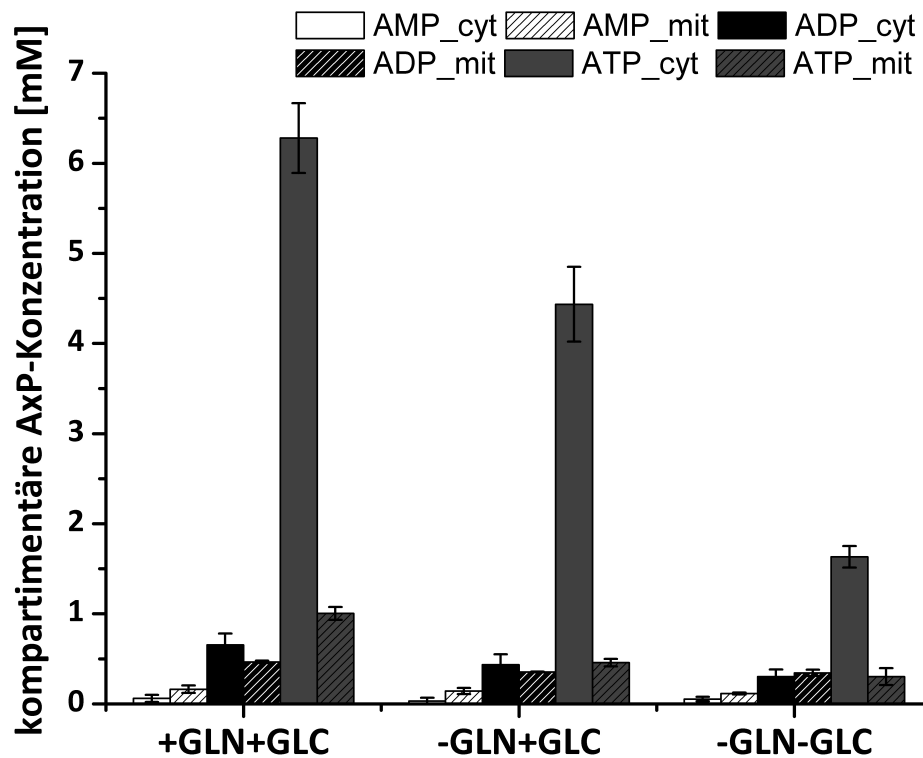


Abb. 39: kompartimentäre Konzentrationen phosphorylierter Nucleotide in CHO-DP12 Zellen in Abhängigkeit der Prozessphasen eines Batch-Prozesses. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung in beiden Bioreaktoren (n=6), die zugehörigen Fehler wurden für cytosolische Werte mittels Fehlerfortpflanzung berechnet, mitochondriale Werte zeigen die Standardabweichung als Fehler.

bedeutende Rolle in der Homöostasis besitzt (Atkinson 1977), ist es für die Zelle von großer Bedeutung diesen entsprechend zu regulieren. Somit könnte die hier beobachtete Abnahme der Adenosin-Phosphat-Pools eine zelluläre Maßnahme darstellen, um die zelluläre Energieladung auf einem physiologischen Niveau zu halten und das obwohl die Zellen bereits zunehmenden Substratlimitierungen unterliegen. Da die Mitochondrien der Ort des Großteils der ATP-Synthese sind und ATP anschließend in das Cytosol transportiert wird, liegt der Schluss nahe, dass der AMP-Abbau vermutlich im Cytosol stattfindet. Würde man die AXP-Differenzmenge von Phase 1 und 3 als AMP veranschlagen und die cytosolische Energieladung berechnen, so ergäben sich Werte von  $0.67 \pm 0.23$  und  $0.28 \pm 0.07$  für die Phasen 2 und 3. Diese Werte stehen im Widerspruch zu den Prozessphasen-spezifischen Viabilitäten von 98 und 88 %. Zusätzlich zu den hier beschriebenen Mechanismen der Zelle um der Abnahme der Energieladung zu begegnen, stellt sich die Frage in welchem Kompartiment die entsprechenden Sensoren lokalisiert sind. Die cytosolische AMPK wird sowohl durch das Verhältnis

von AMP zu ATP, aber neueren Studien zufolge auch durch das ADP- zu ATP-Verhältnis (Hardie 2003; Hardie 2011), aktiviert. Wie beschrieben waren die mitochondrialen ADP-ATP-Verhältnisse im Mitochondrium größer als im Cytosol. In Anwesenheit von hoher Glukose-Konzentrationen bindet Hexokinase direkt an Mitochondrien und nutzt den mitochondrialen ATP-Pool, während bei geringerer Glukose-Verfügbarkeit cytosolisches ATP genutzt wird (Wilson 2003; Wahrheit, Niklas et al. 2014). Der direkte Abzug mitochondrialen ATPs durch die Hexokinase würde folglich das ADP-ATP-Verhältnis niedriger erscheinen lassen, als es eigentlich ist. Anhand dieses Beispiels zeigt sich, dass eine Weiterleitung des mitochondrialen ADP-ATP-Konzentrationsverhältnisses ins Cytosol oder in den Nukleus ebenso gravierende Folgen wie eine direkte Messung und Regulation vor Ort im Mitochondrium besäße. Es erscheint somit plausibel, dass die Mitochondrien ausschließlich als Produktionsstandort fungieren während die Überwachung und Regulation der Energieladung im Cytosol erfolgt.

Die hier gewonnenen Einblicke in den Energiehaushalt von CHO-Zellen zeigen, dass die Berücksichtigung der Kompartimentierung bei der metabolischen Analyse von Zellen einen höheren Informationsgehalt liefert als bisherige Gesamtzellanalysen. Die hier genutzte Methodik soll im Folgenden mit anderen Arbeiten verglichen werden, wobei sich diese Gegenüberstellung auf subzelluläre bzw. mitochondriale Studien beschränkt. Wahrheit et al haben einen Digitonin-basierten Ansatz genutzt um Mitochondrien aus CHO-K1-Zellen zu isolieren und in Mikrotiterplatten verschiedenen Substraten ausgesetzt (Wahrheit, Nonnenmacher et al. 2015). Über die Bestimmung der Sauerstoffaufnahme in den Tüpfeln wurde bewertet welche Substrate sich auf die mitochondriale metabolische Aktivität auswirken bzw. zu einer stark kontrollierten Substrat-Gruppe gehören. Im Falle der kontrollierten Metabolite führte eine zeitgleiche Zugabe von ADP zu einer stärkeren Zunahme der Sauerstoffaufnahme als die alleinige Zugabe des Substrates. Zu dieser Gruppe gehörten Citrat, Iso-Citrat, Glutamat und Glutamin während  $\alpha$ -Ketoglutarat, Malat, Fumarat und Succinat nicht kontrolliert wurden. Der von Wahrheit et al genutzte Ansatz nutzt die gleichen Prinzipien des Zellaufschlusses, unterscheidet sich allerdings im weiteren Vorgehen und der Zielsetzung. Der Fokus liegt hier auf den Sauerstoffaufnahmeleistungen und nicht auf den zellulären und subzellulären Metabolit-Pools. Die Analyse dieser Pools rückt in den Fokus der hier bereits zitierten FRET-basierten Arbeiten (Imamura, Nhat et al. 2009; Kennedy, Madreiter et al. 2014). Dieser Ansatz setzt voraus, dass die Zellen gentechnisch modifiziert werden um notwendige Reporter-Moleküle zu exprimieren. Anhand dieser können die zellulären und subzellulären Meta-

bolit-Level analysiert werden. Wie bereits beschrieben hat Imarura mit dieser Technik mitochondriale Adenosin-Phosphat-Level untersucht und festgestellt, dass das ATP-AMP-Verhältnis in den Mitochondrien von HeLa-Zellen geringer ist als im Zytosol, was auch in der hier vorliegenden Arbeit gefunden wurde. Bei der Modifizierung von Zellen stellt sich die Frage in wie weit die Expression der Reporter-Moleküle das metabolische Verhalten der Zellen beeinflusst. Ob die bei den modifizierten Zellen gewonnen Erkenntnisse auch auf die Ursprungszelllinie übertragbar sind, ist schwer zu beurteilen. Einen ähnlichen Ansatz verfolgten Lewis et al bei der Betrachtung cytosolischer und mitochondrialer NADH-abhängiger Stoffwechselwege (Lewis, Parker et al. 2014). Hierbei wurden Reaktionen die NADH als Kofaktor nutzen betrachtet, indem Wasserstoff zum Tracing eingesetzt wurde. Auf diese Weise konnte die Richtung der Serin-Glycin-Interkonversion zwischen Cytosol und den Mitochondrien untersucht werden. Allerdings wurde auch hier ein Reporter-System benötigt, in diesem Fall eine neomorphe Isocitrat-Dehydrogenase. Dies wiederum begrenzt den Umfang der untersuchbaren Metabolite und wirft erneut die Frage auf ob die Messmethodik Einfluss auf die Zellen besitzt. Ebenso wie für den FRET-gestützten Ansatz gilt, dass für jeden Zielmetaboliten ein entsprechendes Reporter-System in die Zelle eingebracht werden muss. Einen anderen Ansatz verfolgen Chen et al (Chen, Freinkman et al. 2016). Sie nutzten die Immunoaffinität-basierte Aufreinigung von Epitop-getaggten Mitochondrien mittels geeigneter Beads. Auf diese Weise sind die Autoren in der Lage bis zu 100 polare Metabolite per LC-MS zu vermessen. Die Aufreinigung der Mitochondrien erfolgt hierbei innerhalb einiger Minuten. Als Marker für die Abreicherung der mitochondrialen Fraktion werden hierbei das Enzym Citrat-Synthase sowie das CoenzymA genutzt. Die Autoren haben den Einfluss dreier unterschiedlicher Inhibitoren auf das Metabolit-Profil untersucht. Der Fokus lag besonders auf dem NADH-NAD-Verhältnis und, im Unterschied zu dieser Arbeit, weniger auf der Energieladung der Zellen. Aus den gezeigten Daten lassen sich grob die cytosolischen und mitochondrialen AMP-, ADP- und ATP-Konzentrationen ablesen. Für die cytosolische Fraktion betragen sie etwa 0.02, 0.15 und 4.5 mM, für die mitochondriale Messung etwa 0.02, 0.065 und 0.045 mM. Die absoluten Konzentrationen der cytosolischen Fraktion von AMP, ADP und ATP in Phase 1 dieser Arbeit in Höhe von 0.06, 0.65 und 6.28 mM stimmen mit den Werten von Chen et al in der Dimension überein. Die Werte der mitochondrialen Fraktion von Chen et al unterscheiden sich jedoch gänzlich von den Werten dieser Arbeit in Höhe von 0.16, 0.46 und 1.00 mM. Da es sich in der Arbeit von Chen et al um HeLa-Zellen handelt,

kann der Grund hierfür in den unterschiedlichen Zelltypen sowie abweichender Kulturbedingungen gesucht werden. Interessant ist hierbei jedoch, dass die Kompartiment-spezifischen Energieladungen zwischen beiden Arbeiten übertragbar sind. Bei Chen et al lagen die cytosolischen und mitochondrialen Energieladungen etwa um 0.97 und 0.59, während sie in der vorliegenden Arbeit 0.94 und 0.75 betragen. Auch wenn die zugrunde liegenden methodischen Ansätze unterschiedlich sind, so zeigen doch beide, dass die Energieladungen von Cytosol und Mitochondrium deutlich variieren und dass ein Gesamtzell-Ansatz an dieser Stelle viele Informationen zum zellulären Zustand überdeckt.

#### 5.4. Betrachtung theoretischer Störquellen bei der fraktionellen Filtration

Bei der hier dargestellten Methode zur quantitativen Untersuchung cytosolischer und mitochondrialer Metabolit-Konzentrationen, ist es offensichtlich, dass die Wahl der organellären Volumina die resultierenden kompartmentären Konzentrationen beeinflusst. Den Werten lag die Annahme zugrunde, dass 22 % des zellulären Volumens auf Mitochondrien entfallen (Atkinson 1977). Weitere Literaturquellen geben die mitochondrialen Volumina mit 28 % an (Schaper, Meiser et al. 1985), dies zeigt, dass der gewählte Ausgangswert nach Alberts durchaus mit anderen Quellen in Einklang steht. Für eine weitere Präzisierung der Ergebnisse ist es dennoch notwendig Zelllinien-spezifisch die kompartmentären Volumina zu bestimmen und in die Berechnungen einzubeziehen. Eine der wichtigsten Entdeckungen, die in 5.3.2 gemacht wurden, ist, dass sich die kompartmentären Energieladungen stark zwischen Cytosol und Mitochondrium unterscheiden. Für die Energieladung spielt das zugrunde gelegte Volumen der Kompartimente jedoch keine Rolle, eine Berechnung über die jeweiligen Konzentrationen führt zum selben Ergebnis wie die Berechnung über die Kompartimentspezifischen Stoffmengen. Die Kernaussage der Arbeit bleibt also von der Wahl der Anteile der subzellulären Volumina unbeeinträchtigt.

Eine weitere Überlegung anlässlich der Genauigkeit der hier gezeigten Ergebnisse betrifft die Eigenschaft bestimmter cytoskeletaler Proteine an Metabolite zu binden (Li, Gianoulis et al. 2010). Sofern die Bindung in einem ausreichenden Rahmen erfolgen sollte, führt dies zu falsch positiven oder negativen Quantifizierungsergebnissen bei der fraktionellen Filtration. Im Folgenden kommt es nun auf die Größe der zu betrachtenden Proteine an. Digitonin erzeugt in tierischen Zellen Poren mit einer Größe von 8 – 20 nm. Dieser Vorgang ist abhängig von der eingesetzten Konzentration (Holmuhamedov and Lemasters 2009; Olofsson, Bridle et al. 2009) und der Expositionszeit (Bangham, Horne et al. 1962; Lange and Ramos 1983; Vervesi, Bernardes et al. 1991; Hofhaus, Shakeley et al. 1996; Saks, Veksler et al. 1998; Kuznetsov, Veksler et al. 2008). Protein-Metabolit-Komplexe mit einer Größe kleiner 2 kDa würden also direkt bei der fraktionellen Filtration aus dem Cytosol ausgeschwemmt. Für Komplexe größer 2 kDa gilt zu überlegen ob deren Anzahl ausreichend ist um die Messergebnisse nachhaltig zu stören. Hierzu kann folgende Rechnung durchgeführt werden. Nach Milo (Milo 2013) enthält eine Säugetierzelle etwa  $2 \times 10^7$  Proteine pro  $\mu\text{m}^3$ . Der durchschnittliche Zelldurchmesser in dieser Arbeit betrug ungefähr 11  $\mu\text{m}$ , was in etwa einem Volumen von 696.7  $\mu\text{m}^3$  entsprach. Unter zur Hilfenahme der Avogadro-Konstante lässt sich die Menge an Ge-

samtprotein pro Zelle mit etwa 3.12 fmol bestimmen. Berechnet man diese Menge über die zelluläre Zusammensetzung und das Zellrockengewicht die Niklas (Niklas, Schrader et al. 2011) für Age1.hn—Zellen angibt und nimmt die durchschnittliche Proteingröße mit 33 kDa nach Milo an, so ergeben sich etwa 3.72 fmol Gesamtprotein pro Zelle. Die Zusammensetzung des Proteoms ausgewählter Organismen kann anhand von Proteomkarten, wie zum Beispiel von Liebermeister et al veröffentlicht (Liebermeister, Noor et al. 2014) und im Internet zugänglich gemacht (<http://www.proteomaps.net/>), betrachtet werden. Für *Mus musculus*, einem nahen Verwandten von Hamsterzellen, gilt, dass etwa 3 – 4 % des Proteoms auf das Cytoskelett entfallen (Geiger, Velic et al. 2013). Die glykolytischen Enzyme tragen etwa 4 % zum Proteom bei, wobei ATP-assoziierte Enzyme wie Hexokinase 1, Phosphofruktokinase, Phosphoglycerinkinase und die Pyruvatkinase nur 0.016, 0.015, 0.34 und 0.12 % zum Gesamtproteom beitragen. Im Gegensatz hierzu wurden in dieser Arbeit Metabolit-Pools im Bereich einiger fmol·Zelle<sup>-1</sup> (z.B. 3 fmol·Zelle<sup>-1</sup> an ATP) gemessen. In Anbetracht dieser Zahlen ist der zu erwartende Einfluss von cytosolischen Protein-Metabolit-Komplexen als gering zu erachten.

Bei dem in dieser Arbeit verfolgten Ansatz der fraktionellen Filtration ist zu berücksichtigen, dass er auf der Trennung des Cytosols von den Mitochondrien basiert. Darüber hinaus existieren weitere Organell-Typen, die Stoffwechselaktivitäten aufweisen. Im Nukleus beispielsweise finden enzymatische Prozesse statt, die an der Replikation oder Reparatur des Erbgutes beteiligt sind. Für diese essentiellen Bestandteile der zellulären Aktivität wird auch Energie benötigt (Buttgereit and Brand 1995; Dzeja, Bortolon et al. 2002). In der Literatur wird davon ausgegangen, dass die Membran des Nukleus für 60 kDa-große Proteine, je nach Autor zum Teil noch größer, permeabel ist (Mattaj and Englmeier 1998; Weis 2003; Wang and Brattain 2007). Dies bedeutet, dass ein Großteil der im Nukleus befindlichen Metabolite bei der fraktionellen Filtration ausgewaschen werden und somit die mitochondrialen Ergebnisse nicht beeinträchtigt. Organelle wie die Peroxisome sowie das endoplasmatische Retikulum sind in den Fettsäurestoffwechsel bzw. die Faltung und Glykosylierung von Proteinen involviert (Fransen, Nordgren et al. 2012; Breitling and Aebi 2013; Wanders 2014; Shrimal, Chepanova et al. 2015). Der Ansatz der fraktionellen Filtration bedingt also, dass vereinfachend alle Organellen außer den Mitochondrien dem Cytosol zugerechnet werden. Da in dieser Arbeit jedoch der Fokus auf den zentralen Kohlenstoffstoffwechsel der Zellen gelegt wurde, wird die Aussagekraft der Ergebnisse hierdurch nicht beeinträchtigt. Ebenso ist es für

die hier gezeigten Ergebnisse irrelevant, dass bei der Filtration nicht aktiv zwischen toten und lebendigen Zellen unterschieden wird. Zum einen weisen tote Zellen eine stark reduzierte strukturelle Integrität auf (Niles, Moravec et al. 2007) und verlieren somit beim Filtrationsvorgang die in ihnen befindlichen Metabolite. Zum anderen spielt ihr Anteil an der Gesamtpopulation eine geringe Rolle, wie bereits in 5.3.2 beschrieben.

Abschließend zeigt ein Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Metabolit-Level in Prozessphase 1 mit Literatur-Werten, dass die hier gewonnenen Ergebnisse durchaus in den bereits publizierten Größenordnungen für gesamt-zelluläre Stoffmengen lagen. Volmer sowie Dietmair et al. haben in CHO ATP-Stoffmengen zwischen  $1.5 - 4.7 \text{ fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$  ermittelt (Dietmair, Timmins et al. 2010; Volmer, Northoff et al. 2010). In dieser Arbeit wurden  $3 \text{ fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$  ermittelt. Zudem bestimmten Volmer et al. in ihren Experimenten den Pyruvat-Pool mit  $6 \text{ fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ , in dieser Arbeit wurden  $2.5 \text{ fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$  gemessen. Ritter et al. haben sowohl MDCK- als auch Vero-Zellen untersucht und fanden für 3-Phosphoglycerat, Citrat und Glukose-6Phosphat  $0.09$ ,  $0.89$  sowie  $0.03 \text{ fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$  bzw.  $0.13$ ,  $2.05$  sowie  $0.23 \text{ fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$  (Ritter, Genzel et al. 2008). Entsprechend hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit  $0.04$ ,  $0.01$  und  $0.05 \text{ fmol} \cdot \text{Zelle}^{-1}$  gemessen. In anbetracht der Unterschiede in Bezug auf den Zelltyp sowie der unterschiedlichen Kultivierungsmethoden kann davon ausgegangen werden, dass die mit Hilfe der fraktionellen Filtration gewonnenen Werte in einem physiologisch akzeptablen Bereich liegen.

## 6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Untersuchung subzellulärer Metabolit-Pools entwickelt. Da diese auf einer fraktionellen Filtration, also der Freilegung der Mitochondrien durch gezielte Abreicherung des Cytosols, basiert musste in 5.2.1 gezeigt werden, dass die Wahl der Filtermembranen keinen Einfluss auf die Ergebnisse besaß. In der Tat wurde gezeigt, dass die gewählten Boro-Silicat-Membranen die metabolischen Untersuchungen weder durch Freigabe störender Substanzen noch durch unspezifische Metabolit-Bindung beeinflussen. Da bei einer Filtrations-basierten Probenahme bereits geringste Mengen Mediums auf den Filtern die zellulären Metabolit-Level überlagern, wurde in 5.2.2 erfolgreich überprüft ob der durchgeführte Waschschrift die Medienreste ausreichend abreichert. Darüber hinaus liefert der gezeigte Ansatz metabolische Wiederfindungen, die eine Auswertung der Ergebnisse ermöglichen und die vergleichbar sind mit bereits publizierten Werten, wie in 5.2.3 dargestellt. Die erreichte Quenching-Effizienz ermöglicht es sogar Metabolit-Pools zu untersuchen, die sehr anspruchsvoll in Bezug auf die Gesamtdauer der Probenahme sind. Hierzu gehören insbesondere phosphorylierte Nukleotide und Zuckerverbindungen. Die Untersuchungen haben ergeben, dass für einen Großteil der Metabolite die Lagerzeiten bis zu 4 Wochen bei  $-70\text{ °C}$  betragen können, ohne dass es zu einem Abbau in den Proben kommt. Dies wurde in 5.2.4 und 5.2.5 dargestellt. Ausgehend von diesen Erkenntnissen und den Ergebnissen aus 5.2.6 zum Rückhalt der mitochondrialen Fraktion durch den  $0.5\text{ }\mu\text{m}$  Filter, wurde die Abreicherung des Cytosols unter Wahrung der mitochondrialen Integrität optimiert. Die resultierenden Parameter der Filtration lieferten eine etwa 90 prozentige Abreicherung des Cytosols und ließen ca. 89 % der Mitochondrien intakt.

Basierend auf diesem Protokoll wurde in 5.3 eine Batch-Kultivierung von CHO-Zellen durchgeführt und zu drei repräsentativen Zeitpunkten beprobt: 1) in Anwesenheit von Glukose und Glutamin, 2) in Anwesenheit von Glukose und gleichzeitiger Glutaminlimitierung und c) zum Zeitpunkt von Glukose- und Glutamin-Limitierung. Die extrazellulären Daten legen den Schluss nahe, dass die Zellen in Anwesenheit von Glukose und Glutamin einen ineffizienten Stoffwechsel aufweisen, der in der Bildung von Laktat, Glutamat und Alanin mündet. Mit dem Eintreten der Glutamin-Limitierung der Zellen endete auch die Bildung von Glutamat und Alanin. Die Betrachtung der zellulären Metabolit-Level zeigte, dass entgegen der bisherigen Erwartungen die mitochondrialen ATP-Level im Vergleich zu den cytosolischen deutlich geringer sind. Dieses Bild zeigte sich auch bei den cytosolischen und mitochondrialen Adeny-



lat-Energieladungen. Die in 5.3.2 gezeigten Ergebnisse verdeutlichen warum eine kompartimentspezifische Untersuchung notwendig ist. Würde man die Energieladungen nur gesamtzellulär betrachten, so entginge einem diese Information. Darüber hinaus legen die Daten nahe, dass es zu einem im Cytosol lokalisierten Abbau von AMP kommt um die cytosolische Energieladung aufrecht zu halten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die in dieser Arbeit erarbeitete Methodik den Ansprüchen, die eine subzelluläre Metabolom-Analyse erfordert, gerecht wird. Basierend auf dem entwickelten Ansatz konnte eine metabolische Untersuchung von CHO-Zellen auf cytosolischer und mitochondrialer Ebene durchgeführt werden, die einen detaillierteren Einblick in den Energiestoffwechsel ermöglichte, als es eine rein gesamtzelluläre Betrachtung zugelassen hätte.

## 7. Ausblick

Der hier vorgestellte Ansatz zur subzellulären Metabolom-Analyse in Säugerzellen basiert auf einer gezielten Abreicherung des Cytosols von der mitochondrialen Fraktion. Ausgehend von dieser Differenzmessung werden über bereits bekannte Volumenverhältnisse der Organellen die subzellulären Metabolitkonzentrationen berechnet. Wie in 5.4 bereits erläutert, spiegeln die hier angenommenen volumenbezogenen Werte die bisher veröffentlichten Daten. Eine genauere Beschreibung der cytosolischen und mitochondrialen Volumina, insbesondere auch über den Gesamtverlauf einer Kultivierung und der zugehörigen Prozessphasen, liefert eine noch genauere Grundlage zur Berechnung der kompartmentären Metabolitkonzentrationen. Diese Daten können beispielsweise mittels einer Auswertung Rasterelektronen-mikroskopischer Bilder erhoben werden, wie es bereits bei der Bestimmung organelärer Volumina in Pflanzenzellen durchgeführt wurde (Winter, Robinson et al. 1994). Das hier gezeigte Protokoll wurde speziell für die CHO-DP12 Zelllinie entwickelt. Für eine Übertragung dieses Protokolls auf andere Zellen, müssen die Lyse-Bedingungen speziell angepasst werden. Hierzu gehören eine Optimierung der Waschpuffervolumina, sowie des Volumens und die Konzentration des Lysepuffers.

Die hier dargestellte Methode erlaubt es zukünftig cytosolische und mitochondriale Metabolit-Pools getrennt voneinander zu untersuchen. Dies kann bei der Modellierung des kompartmentierten, zellulären Stoffwechsels genutzt werden. Nicolae et al. haben bereits beschrieben, dass die Aufnahme mitochondrialer Pyruvat-Pools in das Stoffwechselmodell notwendig war (Nicolae, Wahrheit et al. 2014). Die hier gezeigte Methode kann experimentell belegte Daten liefern, insbesondere in Form von  $^{13}\text{C}$ -Analysen, die die Modellierung unterstützen. Des Weiteren können diese Daten genutzt werden um die Transporter-Aktivitäten zwischen Cytosol und der mitochondrialen Matrix quantitativ zu beschreiben. Hieraus ließe sich dann auch eine Aussage über den Gesamtenergiebedarf treffen, den die Zellen für den Stoffaustausch zwischen Cytosol und Mitochondrien aufbringen müssen. Basierend auf einer Stoffflussanalyse in CHO-DP12 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Berücksichtigung von intrazellulären Shuttle-Systemen in Stofffluss-Modellen zu einer Reduktion des für die Zellen frei verfügbaren ATPs führt (Meinhold 2012). Wenn diese Ergebnisse zu einer Optimierung der Transportersysteme, beispielsweise durch perfekt ausbalancierte Prozessbedingungen, von Produktionszelllinien genutzt werden, ermöglicht dies eine Effizienzsteigerung von industriellen Prozessen.

Die zukünftige Charakterisierung von Produktionszelllinien kann ebenfalls von den Erkenntnissen einer subzellulären Metabolom-Analyse profitieren. Durch das Identifizieren von Produktionszelllinien, die beispielsweise besonders ausgeprägte mitochondriale Stoffwechseaktivität aufweisen, die mit erhöhter Produktivität einhergehen, können neue Ziele für das Screening von Hoch-Produzenten entwickelt werden.

Die in dieser Arbeit aufgezeigten Unterschiede in den cytosolischen und mitochondrialen Energieladungen der Zellen liefern zudem Ansatzpunkte um den Energiehaushalt der Zelle und dessen Regulierung weitergehend zu untersuchen. Die genauen Regulationsmechanismen der kompartmentären Energieladungen müssen identifiziert und daraufhin untersucht werden ob diese Erkenntnisse für weitere Produktivitätssteigerungen genutzt werden können. So ist zu überlegen, ob die Energieverfügbarkeit der Zellen gesteigert werden kann, wenn anstatt des postulierten cytosolischen AMP-Abbaus ein Rücktransport von AMP in die Mitochondrien veranlasst werden kann. Das AMP stünde dort wieder für weitere ATP-Synthesereaktionen zur Verfügung und die cytosolische Energieladung bliebe aufrecht erhalten, ohne dass der Gesamt-Pool der phosphorylierten Nukleotide abnimmt. Dieser Ansatz müsste einhergehen mit einer Steigerung der matrix-lokalisierten Umwandlung von AMP zu ADP.

Kompartiment-spezifische Metabolomuntersuchungen können zudem bei der Untersuchung von Krankheiten eingesetzt werden. Dies kann durch das Identifizieren bestimmter krankheitsassoziierter, mitochondrialer Metabolitprofile erfolgen. Hierauf aufbauend ist es dann möglich Regulationsmechanismen zu beschreiben und spezifische Therapien zu entwickeln.

## 8. Literatur

- Ahn, W. S. and M. R. Antoniewicz (2011). "Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry." Metabolic Engineering **13**: 598-609.
- Ahn, W. S. and M. R. Antoniewicz (2012). "Towards dynamic metabolic flux analysis in CHO cell cultures." Biotechnology Journal **7**(1): 61-74.
- Ahn, W. S., Antoniewicz, M. R. (2013). "Parallel labeling experiments with [1,2-<sup>13</sup>C]glucose and [U-<sup>13</sup>C]glutamine provide new insights into CHO cell metabolism." Metabolic Engineering **15**(34-47).
- Al-Fageeh, M. B., R. J. Marchant, et al. (2006). "The cold-shock response in cultured mammalian cells: Harnessing the response for the improvement of recombinant protein production." Biotechnology and Bioengineering **93**(5): 829-835.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1989). Molecular biology of the cell. New York, Garland Pub.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2014). Molecular Biology of the Cell. New York, Garland Pub.
- AlRabiah, H., E. Correa, et al. (2013). "High-throughput phenotyping of uropathogenic E. coli isolates with Fourier transform infrared spectroscopy." Analyst **138**(5): 1363-1369.
- Altamirano, C., A. Illanes, et al. (2001). "Analysis of CHO cells metabolic redistribution in a glutamate-based defined medium in continuous culture." Biotechnology Progress **17**(6): 1032-1041.
- Altamirano, C., A. Illanes, et al. (2001). "Analysis of CHO cells metabolic redistribution in a glutamate-based defined medium in continuous culture." Biotechnol Prog **17**(6): 1032-41.
- Altamirano, C., C. Paredes, et al. (2000). "Improvement of CHO Cell Culture Medium Formulation: Simultaneous Substitution of Glucose and Glutamine." Biotechnol Prog. **16**: 69-75.
- Amantonico, A., P. Urban, et al. (2010). "Single-Cell MALDI-MS as an Analytical Tool for Studying Intrapopulation Metabolic Heterogeneity of Unicellular Organisms." Analytical Chemistry **82**(17): 7394-7400.
- Andersen, K. B. and K. V. Meyenburg (1977). "Charges of Nicotinamide Adenine-Nucleotides and Adenylate Energy-Charge as Regulatory Parameters of Metabolism in Escherichia-Coli." Journal of Biological Chemistry **252**(12): 4151-4156.
- Andoh, Y., Okazaki, S., Ueoka, R. (2013). "Molecular dynamics study of lipid bilayers modeling the plasma membranes of normal murine thymocytes and leukemic GRSL cells." Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes **1828**(4): 1259-1270.
- Atkinson, D. E. (1968). "Energy Charge of Adenylate Pool as a Regulatory Parameter . Interaction with Feedback Modifiers." Biochemistry **7**(11): 4030-&.
- Atkinson, D. E. (1977). Cellular energy metabolism and its regulation. New York, Academic Press.
- Aubry, L. and G. Klein (2006). "Purification techniques of subcellular compartments for analytical and preparative purposes." Methods Mol Biol **346**: 171-85.
- Bahnemann, J., Kayo, S., Wahrheit, J., Heinzle, E., Pörtner, R., Zeng, A.-P. (2014). "In search of an effective cell disruption method to isolate intact mitochondria from Chinese hamster ovary cells." Engineering in Life Sciences **14**: 161–169.
- Bahnemann J., K. S., Wahrheit J., Heinzle E., Pörtner R, Zeng A.P. (2012). "In search of an effective cell disruption method to isolate intact mitochondria from CHO cells." Engineering in Life Sciences.
- Bangham, A. D., R. W. Horne, et al. (1962). "Action of saponin on biological cell membranes." Nature **196**: 952-955.
- Barbas, C., E. Moraes, et al. (2011). "Capillary electrophoresis as a metabolomics tool for non-targeted fingerprinting of biological samples." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **55**: 823-831.

- Bartolomeo, M. and F. Maisano (2006). "Validation of a Reversed-Phase HPLC Method for Quantitative Amino Acid Analysis." *Journal of Biomolecular Techniques* **17**(2): 131-137.
- Baydoun, A. R., P. W. Emery, et al. (1990). "Substrate-dependent regulation of intracellular amino acid concentrations in cultured bovine aortic endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **173**(3): 940-8.
- Becerra, S., J. Berrios, et al. (2012). "Exploring the effect of mild hypothermia on CHO cell productivity." *Biochemical Engineering Journal* **60**: 1-8.
- Bell, G., T. Kayano, et al. (1990). "Molecular biology of mammalian glucose transporters." *Diabetes Care* **13**(3): 198-208.
- Berlin, E., Hannah, J. S., Yamane, K., Peters, R. C., Howard, B. V. (1996). "Fatty acid modification of membrane fluidity in Chinese hamster ovary (TR715-19) cells." *Int J Biochem Cell Biol.* **28**(10): 1131-1139.
- Bermejo, C., F. Haerizadeh, et al. (2010). "Dynamic analysis of cytosolic glucose and ATP levels in yeast using optical sensors." *Biochem J* **432**(2): 399-406.
- Bhatt, D., X. Chen, et al. (2012). "A sensitive HPLC-based method to quantify adenine nucleotides in primary astrocyte cell cultures." *Journal of Chromatography B* **889-890**: 110-115.
- Bi, H., K. Krausz, et al. (2013). "Optimization of harvesting, extraction, and analytical protocols for UPLC-ESI-MS-based metabolomic analysis of adherent mammalian cancer cells." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **405**(15): 5279-5289.
- Bolten, C. J. and C. Wittmann (2008). "Appropriate sampling for intracellular amino acid analysis in five phylogenetically different yeasts." *Biotechnol Lett* **30**(11): 1993-2000.
- Bonarius, H. P., A. Ozemre, et al. (2001). "Metabolic-flux analysis of continuously cultured hybridoma cells using (13)CO(2) mass spectrometry in combination with (13)C-lactate nuclear magnetic resonance spectroscopy and metabolite balancing." *Biotechnol Bioeng* **74**(6): 528-38.
- Bort, J. A., V. Shanmukam, et al. (2014). "Reduced quenching and extraction time for mammalian cells using filtration and syringe extraction." *Journal of Biotechnology* **182-183**: 97-103.
- Bosca, L. and C. Corredor (1984). "Is phosphofructokinase the rate-limiting step of glycolysis?" *Cell* **9**(9): 372-373.
- Breitling, J. and M. Aebi (2013). "N-Linked Protein Glycosylation in the Endoplasmic Reticulum " *Biochimica et Biophysica Acta* **1833**(11): 2430-2437.
- Buha, S., A. Panchal, et al. (2011). "HPLC-FLD for the Simultaneous Determination of Primary and Secondary Amino Acids from Complex Biological Sample by Pre-column Derivatization " *Journal of Chromatographic Science* **49**(2): 118-123.
- Buscher, J. M., D. Czernik, et al. (2009). "Cross-Platform Comparison of Methods for Quantitative Metabolomics of Primary Metabolism." *Analytical Chemistry* **81**(6): 2135-2143.
- Butcher, E., E. Berg, et al. (2004). "Systems biology in drug discovery." *Nature Biotechnology* **22**: 1253-1259.
- Buttgereit, F. and M. Brand (1995). "A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells." *Biochemical Journal* **312**(1): 163-167.
- Canelas, A. B., C. Ras, et al. (2008). "Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics." *Metabolomics* **4**(3): 226-239.
- Cao, B., G. Wang, et al. (2011). "GC-TOFMS analysis of metabolites in adherent MDCK cells and a novel strategy for identifying intracellular metabolic markers for use as cell amount indicators in data normalization." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **400**(9): 2983-2993.
- Chambers, E., D. M. Wagrowski-Diehl, et al. (2007). "Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses." *Journal of Chromatography B* **852**: 22-34.
- Chapman, A., A. Miller, et al. (1976). "Role of the adenylate deaminase reaction in regulation of adenine nucleotide metabolism in Ehrlich ascites tumor cells." *Cancer Res.* **36**(3): 1144-1150.
- Chapman, A. G. and D. E. Atkinson (1973). "Stabilization of Adenylate Energy Charge by the Adenylate Deaminase Reaction." *J. Biol. Chem.* **248**: 8309-8312.
- Chen, W. W., E. Freinkman, et al. (2016). "Absolute Quantification of Matrix Metabolites Reveals the Dynamics of Mitochondrial Metabolism." *Cell* **166**(5): 1324-1337.

- Cipollina, C., A. ten Pierick, et al. (2009). "A comprehensive method for the quantification of the non-oxidative pentose phosphate pathway intermediates in *Saccharomyces cerevisiae* by GC-IDMS." *Journal of Chromatography B* **877**(27): 3231-3236.
- Colemann, P. S. and B. B. Lavietes (1981). "Membrane cholesterol, tumorigenesis, and the biochemical phenotype of neoplasia." *CRC Crit Rev Biochem* **11**(4): 341-393.
- Collins, T., M. Berridge, et al. (2002). "Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells." *The EMBO Journal* **21**: 1616-1627.
- Contreras-Sanz, A., T. Scott-Ward, et al. (2012). "Simultaneous quantification of 12 different nucleotides and nucleosides released from renal epithelium and in human urine samples using ion-pair reversed-phase HPLC." *Purinergic Signalling* **8**(4): 741-751.
- Cromski, P., H. Muhamadali, et al. (2015). "A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis – a marriage of convenience or a shotgun wedding." *Analytica Chimica Acta* **879**: 10-23.
- Cruz, H., Freitas, C., Alves, P., Moreira, J., Carrondo, M. (2000). "Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells." *Enzyme and Microbial Technology* **27**(1-2): 43-52.
- Curnow, P., Booth, P. J. (2007). "Combined kinetic and thermodynamic analysis of alpha-helical membrane protein unfolding." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(48): 18970-18975.
- da Luz, J., E. Hans, et al. (2013). "Automated fast filtration and on-filter quenching improve the intracellular metabolite analysis of microorganisms." *Engineering in Life Sciences*.
- Dang, C. and G. Semenza (1999). "Oncogenic alterations of metabolism." *Trends in Biochemical Sciences* **24**: 68-72.
- Dauner, M. and U. Sauer (2000). "GC-MS Analysis of Amino Acids Rapidly Provides Rich Information for Isotopomer Balancing." *Biotechnology Progress* **16**(4): 642-649.
- De Giorgi, F., L. Lantigue, et al. (2000). "Electrical coupling and plasticity of the mitochondrial network." *Cell Calcium* **28**(5-6): 365-370.
- de Val, I., S. Kyriakopoulos, et al. (2013). "An optimized method for extraction and quantification of nucleotides and nucleotide sugars from mammalian cells." *Analytical Biochemistry* **443**(2): 172-180.
- Dekoning, W. and K. Vandam (1992). "A Method for the Determination of Changes of Glycolytic Metabolites in Yeast on a Subsecond Time Scale Using Extraction at Neutral Ph." *Analytical Biochemistry* **204**(1): 118-123.
- Desphande, R., T. Yang, et al. (2009). "Towards a metabolic and isotopic steady state in CHO batch cultures for reliable isotope-based metabolic profiling." *Biotechnology Journal* **4**(2): 247-263.
- Detmer, S. and D. Chan (2007). "Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**: 870-879.
- Dettmer, K., P. A. Aronov, et al. (2007). "Mass spectrometry-based metabolomics." *Mass Spectrom Rev* **26**(1): 51-78.
- Dettmer, K., N. Nurnberger, et al. (2011). "Metabolite extraction from adherently growing mammalian cells for metabolomics studies: optimization of harvesting and extraction protocols." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399**(3): 1127-1139.
- Dietmair, S., M. P. Hodson, et al. (2012). "Metabolite profiling of CHO cells with different growth characteristics." *Biotechnol Bioeng* **109**(6): 1404-14.
- Dietmair, S., Hodson, M. P., Quek, L.-E., Timmins, N. E., Chrysanthopoulos, P., Jacob, S. S., Gray, P., Nielsen, L. K. (2012). "Metabolite profiling of CHO cells with different growth characteristics." *Biotechnology and Bioengineering* **109**(6): 1404-1414.
- Dietmair, S., N. E. Timmins, et al. (2010). "Toward quantitative metabolomics of mammalian cells: Development of a metabolite extraction protocol." *Anal Biochem*.
- Dong, J., C.-F. Mandenius, et al. (2008). "Evaluation and optimization of hepatocyte culture media factors by design of experiments (DoE) methodology." *Cytotechnology* **57**(3): 251-261.
- Dumont, J., D. Ewart, et al. (2015). "Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives." *Critical Reviews in Biotechnology* **18**: 1-13.

- Dutta, A., Kim, T.-Y., Moeller, M., Wu, J., Alexiev, U., Klein-Seetharaman, J. (2010). "Characterization of membrane protein non-native states. 2. The SDS-unfolded states of rhodopsin." Biochemistry **49**(30): 6329-6340.
- Dzeja, P., R. Bortolon, et al. (2002). "Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer." Proceedings of the National Academy of Science **99**(15): 10156-10161.
- Ehrlich, G., D. Goerlitz, et al. (1981). "Liquid Chromatographic Procedure for Fermentation Product Analysis in the Identification of Anaerobic Bacteria." Applied and Environmental Microbiology **42**(5): 878-885.
- Elowitz, M., M. Surette, et al. (1999). "Protein mobility in the cytoplasm of Escherichia coli." Journal of Bacteriology **181**: 197-203.
- Escobar-Morreale, H., S. Samino, et al. (2012). "Metabolic Heterogeneity in Polycystic Ovary Syndrome Is Determined by Obesity: Plasma Metabolomic Approach Using GC-MS." 2012 **58**(6): 999-1009.
- Esparis-Ogando, A., C. Zurzolo, et al. (1994). "Permeabilization of MDCK cells with cholesterol binding agents: dependence on substratum and confluency." American Journal of Physiology - Cell Physiology **267**: 166-176.
- Farre, E. M., A. R. Fernie, et al. (2008). "Analysis of subcellular metabolite levels of potato tubers (*Solanum tuberosum*) displaying alterations in cellular or extracellular sucrose metabolism." Metabolomics **4**(2): 161-170.
- Fiehn, O. (2002). "Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes." Plant Mol Biol. **48**(1-2): 155-171.
- Fiehn, O., J. Kopka, et al. (2000). "Metabolite profiling for plant functional genomics." National Biotechnology **18**: 1157-1161.
- Fransen, M., M. Nordgren, et al. (2012). "Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease." Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease **1822**(9): 1363-1373.
- Geiger, T., A. Velic, et al. (2013). "Initial quantitative proteomic map of 28 mouse tissues using the SILAC mouse." Molecular and Cellular Proteomics **12**(6): 1709-1722.
- Glacken, M. W., Adema, E., Sinskey, A. J. (1988). "Mathematical description of hybridoma culture kinetics: I. Initial metabolic rates." Biotechnol Bioeng. **32**: 491.
- Gohlke, R. (1959). "Time-of-Flight Mass Spectrometry and Gas-Liquid Partition Chromatography." Analytical Chemistry **31**(4): 535-541.
- Gohlke, R. (1962). "Time-of-Flight Mass Spectrometry. Application to Capillary Column Gas Chromatography." Analytical Chemistry **34**: 1332-1333.
- Gomes, L., G. Benedetto, et al. (2011). "During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability." Nature Cell Biology **13**: 589-598.
- Goudar, C., R. Biener, et al. (2010). "Metabolic flux analysis of CHO cells in perfusion culture by metabolite balancing and 2D [C-13, H-1] COSY NMR spectroscopy." Metabolic Engineering **12**(2): 138-149.
- Goudar, C., R. Biener, et al. (2006). "Towards industrial application of quasi real-time metabolic flux analysis for mammalian cell culture." Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology **101**: 99-118.
- Greenblum, S., P. Turnbaugh, et al. (2012). "Metagenomic systems biology of the human gut microbiome reveals topological shifts associated with obesity and inflammatory bowel disease " Proceedings of the National Academy of Science **109**(2): 594-599.
- Guerrasio, R., C. Haberhauer-Troyer, et al. (2014). "Metabolic profiling of amino acids in cellular samples via zwitterionic sub-2  $\mu\text{m}$  particle size HILIC-MS/MS and a uniformly  $^{13}\text{C}$  labeled internal standard." Analytical and Bioanalytical Chemistry **406**(3): 915-922.
- Guo, A., T. Jewison, et al. (2013). "ECMDB: The E. coli Metabolome Database " Nucleic Acid Research **41**(1): 625-630.

- Hara, K., K. Yonezawa, et al. (1994). "1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells " PNAS **91**(16): 7415-7419.
- Hardie, G. (2003). "Minireview: The AMP-Activated Protein Kinase Cascade: The Key Sensor of Cellular Energy Status." Endocrinology **144**(12): 5179-5183.
- Hardie, G. (2011). "AMP-activated protein kinase—an energy sensor that regulates all aspects of cell function." Genes and Development **25**: 1895-1908.
- Hardie, G., F. Ross, et al. (2012). "AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis." Nature Reviews Molecular Cell Biology **13**(4): 251-262.
- Henry, O., M. Jolicoeur, et al. (2011). "Unraveling the metabolism of HEK-293 cells using lactate isotopomer analysis." Bioprocess and Biosystems Engineering **34**(3): 263-273.
- Hesketh, J. E., Pryme, I. F. (1996). Cytoskeleton in Specialized Tissues and in Pathological States. Greenwich, Connecticut, JAI Press Inc.
- Hirayama, A., K. Kami, et al. (2009). "Quantitative Metabolome Profiling of Colon and Stomach Cancer Microenvironment by Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry " Cancer Research **69**(4918-4926).
- Hofhaus, G., R. M. Shakeley, et al. (1996). "Use of polarography to detect respiration defects in cell cultures." Methods Enzymol. **264**: 476-483.
- Hofmann, U., K. Maier, et al. (2008). "Identification of metabolic fluxes in hepatic cells from transient <sup>13</sup>C-labeling experiments: Part I. Experimental observations." Biotechnol Bioeng **100**(2): 344-54.
- Holmuhamedov, E. and J. J. Lemasters (2009). "Ethanol exposure decreases mitochondrial outer membrane permeability in cultured rat hepatocytes." Arch Biochem Biophys. **481**(2): 226–233.
- Hornig-Do, H. T., G. Gunther, et al. (2009). "Isolation of functional pure mitochondria by superparamagnetic microbeads." Anal Biochem **389**(1): 1-5.
- Hou, B. H., H. Takanaga, et al. (2011). "Optical sensors for monitoring dynamic changes of intracellular metabolite levels in mammalian cells." Nat Protoc **6**(11): 1818-33.
- Huang, C.-J., H. Lin, et al. (2012). "Industrial production of recombinant therapeutics in Escherichia coli and its recent advancements." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **39**(3): 383-399.
- Huang, K. S., Bayley, H. Liao, M. J., London, E., Khorana, H. G. (1981). " Refolding of an integral membrane protein, denaturation, renaturation, and reconstitution of intact bacteriorhodopsin and two proteolytic fragments." Journal of Biochemistry **256**(8): 3802-3809.
- Hutwimmer, S., S. Wagner, et al. (2008). "Algorithm-based design of synthetic growth media stimulating virulence properties of Metarhizium anisopliae conidia." Journal of Applied Microbiology **105**(6): 2026-2034.
- Ideker, T., T. Galiski, et al. (2001). "A new approach to decoding life: systems biology." Annual Review of Genomics and Human Genetics **2**: 343-372.
- Illner, M. (2012). Entwicklung und Optimierung einer Methode zur Metabolitextraktion aus CHO-Zellen. Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik. Stuttgart, Universität Stuttgart. **Diplom**.
- Imamura, H., K. P. Nhat, et al. (2009). "Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(37): 15651-6.
- Ivanova, L. and S. Uhlig (2008). "A bioassay for the simultaneous measurement of metabolic activity, membrane integrity, and lysosomal activity in cell cultures." Anal Biochem **379**(1): 16-9.
- Jackson, A., S. Werner, et al. (2013). "Targeted metabolomic analysis of Escherichia coli by desorption electrospray ionization and extractive electrospray ionization mass spectrometry." Analytical Biochemistry **375**(2): 272-281.
- Jacobson, J., Duchon, M. R., Heales, S. J. R. (2002). "Intracellular distribution of the fluorescent dye nonyl acridine orange responds to the mitochondrial membrane potential: implications for assays of cardiolipin and mitochondrial mass." Journal of Neurochemistry **82**: 224-233.



- Jensen, M., J. Joseph, et al. (2006). "Compensatory Responses to Pyruvate Carboxylase Suppression in Islet  $\beta$ -Cells - PRESERVATION OF GLUCOSE-STIMULATED INSULIN SECRETION." Journal of Biological Chemistry **281**: 22342-22351.
- Jeong, Y. H., Wang, S. S. (1995). "Role of glutamine in hybridoma cell culture: effects on cell growth, antibody production, and cell metabolism." Enzyme and Microbial Technology **77**: 45.
- Jones, R. and C. Thompson (2009). "Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth." Genes and Development **23**: 537-548.
- Kaufmann, H., X. Mazur, et al. (1999). "Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells." Biotechnology and Bioengineering **63**(5): 573-582.
- Keleher, J. K., B. M. Bryan, et al. (1987). "Analysis of tricarboxylic acid-cycle metabolism of hepatoma cells by comparison of I4CO<sub>2</sub> ratios." Biochem J. **246**(633-639).
- Kell, D. (2006). "Systems biology, metabolic modelling and metabolomics in drug discovery and development." Drug Discovery Today **11**(23-24): 1085-1092.
- Kendig, D. M. and J. B. Tarloff (2007). "Inactivation of lactate dehydrogenase by several chemicals: implications for in vitro toxicology studies." Toxicol In Vitro **21**(1): 125-32.
- Kennedy, B., C. Madreiter, et al. (2014). "Adaptations of Energy Metabolism Associated with Increased Levels of Mitochondrial Cholesterol in Niemann-Pick Type C1-deficient Cells." The Journal of Biological Chemistry **289**: 168278-16289.
- Kennedy, R. T., M. A. Lorenz, et al. (2011). "Reducing Time and Increasing Sensitivity in Sample Preparation for Adherent Mammalian Cell Metabolomics." Analytical Chemistry **83**(9): 3406-3414.
- Khoo, S. H. G. and M. Al-Rubeai (2009). "Metabolic characterization of a hyper-productive state in an antibody producing NS0 myeloma cell line." Metabolic Engineering **11**(3): 199-211.
- Kim, J. Y., Y.-G. Kim, et al. (2012). "CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential." Appl Microbiol Biotechnol. **93**: 917-930.
- Kimball, E. and J. Rabinowitz (2006). "Identifying Decomposition Products in Extracts of Cellular Metabolites." Analytical Biochemistry **358**(2): 273-280.
- Kioka, H., H. Kato, et al. (2014). "Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation." PNAS **111**(1): 273-278.
- Kleine, T., U.-G. Maier, et al. (2009). "DNA transfer from organelles to the nucleus: the idiosyncratic genetics of endosymbiosis." Annual Review of Plant Biology **60**: 115-138.
- Klingenberg, M. and H. Rottenberg (1977). "Relation between the Gradient of the ATP/ADP Ratio and the Membrane Potential across the Mitochondrial Membrane." Eur. J. Biochem. **73**(125-130).
- Kochanowski, N., F. Blanchard, et al. (2006). "Intracellular nucleotide and nucleotide sugar contents of cultured CHO cells determined by a fast, sensitive, and high-resolution ion-pair RP-HPLC." Anal Biochem **348**(2): 243-51.
- Kochanowski, N., F. Blanchard, et al. (2008). "Influence of intracellular nucleotide and nucleotide sugar contents on recombinant interferon-gamma glycosylation during batch and fed-batch cultures of CHO cells." Biotechnol Bioeng **100**(4): 721-33.
- Kodiha, M., J. Rassi, et al. (2007). "Localization of AMP kinase is regulated by stress, cell density, and signaling through the MEK-->ERK1/2 pathway." American Journal of Physiology - Cell Physiology **293**(5): 1427-1436.
- Kopka, J., N. Schauer, et al. (2005). "GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database." Bioinformatics **21**(8): 1635-8.
- Krastanov, A. (2010). "Metabolomics - the state of art." Biotechnology & Biotechnological Equipment **24**(1): 1537-1543.
- Kronthaler, J., G. Gstraunthaler, et al. (2012). "Optimizing High-Throughput Metabolomic Biomarker Screening: A Study of Quenching Solutions to Freeze Intracellular Metabolism in CHO Cells " OMICS: A Journal of Integrative Biology **16**(3): 90-97.
- Kuznetsov, A. V., V. Veksler, et al. (2008). "Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells." Nat Protoc. **3**(6): 965-976.
- Lange, Y. and B. V. Ramos (1983). "Analysis of the distribution of cholesterol in the intact cell." J Biol Chem **258**(24): 15130-4.

- Lao, M.-S., Toth, D. (1997). "Effects of Ammonium and Lactate on Growth and Metabolism of a Recombinant Chinese Hamster Ovary Cell Culture." *Biotechnology Progress* **13**(5): 688-691.
- Lee, Y., M. Yap, et al. (2003). "Low-glutamine fed-batch cultures of 293-HEK serum-free suspension cells for adenovirus production." *Biotechnology Progress* **19**: 501-509.
- Lei, Z., D. Huhman, et al. (2011). "Mass Spectrometry Strategies in Metabolomics." *JBC Papers* **22**(286): 25435-25442.
- Lewis, C. A., S. J. Parker, et al. (2014). "Tracing compartmentalized NADPH metabolism in the cytosol and mitochondria of mammalian cells." *Molecular Cell* **55**(2): 253-263.
- Ley, D., K. Seresht, et al. (2015). "Multi-omic profiling of EPO-producing Chinese hamster ovary cell panel reveals metabolic adaptation to heterologous protein production." *Biotechnology and Bioengineering* **112**(11): 2373-2387.
- Li, X., T. A. Gianoulis, et al. (2010). "Extensive in vivo metabolite-protein interactions revealed by large-scale systematic analyses." *Cell* **143**(4): 639-650.
- Liebermeister, W., E. Noor, et al. (2014). "Visual account of protein investment in cellular functions." *Proceedings of the National Academy of Science* **111**(23): 8488-8493.
- Lin, C. Y., H. Wu, et al. (2007). "Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics." *Metabolomics* **3**(1): 55-67.
- Link, T., M. Backstrom, et al. (2004). "Bioprocess development for the production of a recombinant MUC1 fusion protein expressed by CHO-K1 cells in protein-free medium." *J Biotechnol* **110**(1): 51-62.
- Linz, M., Zeng, A. P., Wagner, R., Deckwer, W. D. (1997). "Stoichiometry, kinetics and regulation of glucose and amino acid metabolism of recombinant BHK cell line in batch and continuous cultures." *Biotechnol Prog.* **13**: 453.
- Liu, X., S.-T. Yang, et al. (2014). "The application of omics in pharmaceutical bioprocessing." *Pharmaceutical Bioprocessing* **2**(1): 1-4.
- Liu, X., C.-C. Zhang, et al. (2014). "LC-based targeted metabolomics analysis of nucleotides and identification of biomarkers associated with chemotherapeutic drugs in cultured cell models." *Anti-Cancer Drugs* **25**(6): 690-703.
- Llopis, J., McCaffery, J. M., Miyawaki, A., Farquhar, M. G., Tsien, R. Y. (1998). "Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(12): 6803-6808.
- Locasale, J. W. and L. C. Cantley (2011). "Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth." *Cell Metab* **14**(4): 443-51.
- Lombardi, A., M. Damon, et al. (2000). "Characterisation of oxidative phosphorylation in skeletal muscle mitochondria subpopulations in pig: a study using top-down elasticity analysis." *FEBS Letters* **475**: 84-88.
- Lorenz, M., C. Buranti, et al. (2011). "Reducing Time and Increasing Sensitivity in Sample Preparation for Adherent Mammalian Cell Metabolomics." *Analytical Chemistry* **83**(9): 3406-3414.
- Lu, H., M. A. Schmidt, et al. (2005). "A microfluidic electroporation device for cell lysis." *Lab Chip* **5**(1): 23-9.
- Lu, S. B., X. M. Sun, et al. (2005). "Insight into metabolism of CHO cells at low glucose concentration on the basis of the determination of intracellular metabolites." *Process Biochemistry* **40**(5): 1917-1921.
- Lv, W. and T. Yang (2012). "Identification of possible biomarkers for breast cancer from free fatty acid profiles determined by GC-MS and multivariate statistical analysis." *Clinical Biochemistry* **45**(1-2): 127-133.
- Macheda, M. L., S. Rogers, et al. (2005). "Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer." *Journal of Cellular Physiology* **202**(3): 654-662.
- Madden, E. A. and B. Storrie (1987). "The preparative isolation of mitochondria from Chinese hamster ovary cells." *Anal Biochem* **163**(2): 350-7.
- Maier, K., U. Hofmann, et al. (2008). "Identification of metabolic fluxes in hepatic cells from transient <sup>13</sup>C-labeling experiments: Part II. Flux estimation." *Biotechnol Bioeng* **100**(2): 355-70.

- Marteijn, R. C. L., O. Jurrius, et al. (2003). "Optimization of a feed medium for fed-batch culture of insect cells using a genetic algorithm." *Biotechnology and Bioengineering* **81**(3): 269-278.
- Martin, W. (2010). "Evolutionary origins of metabolic compartmentalization in eukaryotes." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**(1541): 847-55.
- Masakapalli, S. K., P. Le Lay, et al. (2010). "Subcellular flux analysis of central metabolism in a heterotrophic Arabidopsis cell suspension using steady-state stable isotope labeling." *Plant Physiol* **152**(2): 602-19.
- Matasci, M., D. L. Hacker, et al. (2008). "Recombinant therapeutic protein production in cultivated mammalian cells: current status and future prospects " *Drug Discovery Today: Technologies* **5**(2-3): 37-42.
- Matsumoto, S. S., K. O. Raivio, et al. (1979). "Adenine nucleotide degradation during Adenine nucleotide degradation during Adenosine accumulation and adenylate energy charge correlation." *J. Biol. Chem.* **254**: 8956-8962.
- Mattaj, I. and L. Englmeier (1998). "Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase." *Annual Review of Biochemistry* **67**: 265-306.
- Meinhold, H. (2012). Stoffflussanalyse in Säugerzellen: Untersuchung des Einflusses der Kompartimentierung auf die Flussverteilung in CHO DP12 Zellen. *Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik*. Stuttgart, Universität Stuttgart. **Diplom**.
- Michelsen, U. and J. von Hagen (2009). "Isolation of subcellular organelles and structures." *Methods Enzymol* **463**: 305-28.
- Milo, R. (2013). "What is the total number of protein molecules per cell volume? A call to rethink some published values." *Bioessays* **35**(12): 1050-1055.
- Miyamoto, K., T. Yamashita, et al. (2008). "Reversible membrane permeabilization of mammalian cells treated with digitonin and its use for inducing nuclear reprogramming by Xenopus egg extracts." *Cloning Stem Cells* **10**(4): 535-42.
- Monteiro, F., V. Bernal, et al. (2014). "Metabolic profiling of insect cell lines: Unveiling cell line determinants behind system's productivity." *Biotechnology and Bioengineering* **111**(4): 816-828.
- Moreno-Sanchez, R., S. Rodriguez-Enriquez, et al. (2007). "Energy metabolism in tumor cells." *FEBS Journal* **274**(6): 1393-1418.
- Moseley, H. N. (2013). "Error Analysis and Propagation in Metabolomics Data Analysis." *Comput Struct Biotechnol J* **4**(5).
- Mulukutla, B. C., S. Khan, et al. (2010). "Glucose metabolism in mammalian cell culture: new insights for tweaking vintage pathways." *Trends Biotechnol* **28**(9): 476-484.
- Nadwodnik, J. and G. Lohaus (2008). "Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*." *Planta* **227**(5): 1079-89.
- Nasution, U., W. van Gulik, et al. (2008). "A metabolome study of the steady-state relation between central metabolism, amino acid biosynthesis and penicillin production in *Penicillium chrysogenum*." *Metabolic Engineering* **10**: 10-23.
- Neermann, J. and R. Wagner (1996). "Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells." *Journal of Cellular Physiology* **166**: 152-169.
- Newswire, P. (2016). "Global Biopharmaceuticals Market is Expected to Grow With 10% CAGR During 2015 - 2020: P&S Market Research " Retrieved 02.01.2016, 2016, from <http://www.prnewswire.com/news-releases/global-biopharmaceuticals-market-is-expected-to-grow-with-10-cagr-during-2015---2020-ps-market-research-537061921.html>.
- Nicolae, A., J. Wahrheit, et al. (2014). "Non-stationary <sup>13</sup>C metabolic flux analysis of Chinese hamster ovary cells in batch culture using extracellular labeling highlights metabolic reversibility and compartmentation." *BMC Systems Biology* **8**.
- Niessen, J., G. Jedlitschky, et al. (2007). "Subfractionation and purification of intracellular granule-structures of human platelets: an improved method based on magnetic sorting." *J Immunol Methods* **328**(1-2): 89-96.

- Niklas, J., A. Melnyk, et al. (2011). "Selective permeabilization for the high-throughput measurement of compartmented enzyme activities in mammalian cells." Anal Biochem.
- Niklas, J., V. Sandig, et al. (2011). "Metabolite channeling and compartmentation in the human cell line AGE1.HN determined by (13)C labeling experiments and (13)C metabolic flux analysis." J Biosci Bioeng.
- Niklas, J., E. Schrader, et al. (2011). "Quantitative characterization of metabolism and metabolic shifts during growth of the new human cell line AGE1.HN using time resolved metabolic flux analysis." Bioprocess and Biosystems Engineering **34**(5): 533-545.
- Niles, A., R. Moravec, et al. (2007). "A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers." Analytical Chemistry **366**(2): 197-206.
- Nogales, J., S. Gudmundsson, et al. (2012). "Detailing the optimality of photosynthesis in cyanobacteria through systems biology analysis." Proceedings of the National Academy of Science **109**(7): 2678-2683.
- O'Hagan, S., W. Dunn, et al. (2005). "Closed-loop, multiobjective optimization of analytical instrumentation: gas chromatography/time-offlight mass spectrometry of the metabolomes of human serum and of yeast fermentations." Analytical Chemistry **77**: 290-303.
- Oakhill, J., R. Steel, et al. (2011). "AMPK Is a Direct Adenylate Charge-Regulated Protein Kinase." Nature **332**(6036): 1433-1435.
- Oguchi, S., H. Saito, et al. (2006). "pH Condition in temperature shift cultivation enhances cell longevity and specific hMab productivity in CHO culture." Cytotechnology **52**(3): 199-207.
- Okamoto, K. and J. Shaw (2005). "Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes." Annual Review of Genetics **39**: 503-536.
- Okumoto, S. (2010). "Imaging approach for monitoring cellular metabolites and ions using genetically encoded biosensors." Current Opinion in Biotechnology **21**(1): 45-54.
- Oliver, S., M. Winson, et al. (1998). "Systematic functional analysis of the yeast genome." Trends Biotechnology **16**: 373-378.
- Olofsson, J., H. Bride, et al. (2009). "Direct Access and Control of the Intracellular Solution Environment in Single Cells." Anal. Chem. **81**(5): 1810-1818.
- Olofsson, J., H. Bridle, et al. (2009). "Direct Access and Control of the Intracellular Solution Environment in Single Cells." Anal Chem. **81**(5): 1810-1818.
- Ozturk, S. and H. Wei-Shou (2005). Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies. Boca Raton, US, Taylor&Francis Group.
- Ozturk, S. S., M. R. Riley, et al. (1992). "Effects of Ammonia and Lactate on Hybridoma Growth, Metabolism, and Antibody-Production." Biotechnology and Bioengineering **39**(4): 418-431.
- Pabst, M., J. Grass, et al. (2010). "Nucleotide and Nucleotide Sugar Analysis by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry on Surface-Conditioned Porous Graphitic Carbon." Analytical Chemistry **82**(23): 9782-9788.
- Paramalli, A., K. Eskridge, et al. (2007). "Development of serum-free media in CHO-DG44 cells using a central composite statistical design." Cytotechnology **54**(1): 57-68.
- Passarella, S. and A. Atlante (2007). "Teaching the role of mitochondrial transport in energy metabolism." Biochemistry and Molecular Biology Education **35**(2): 125-132.
- Pfizenmaier, J., J.-C. Matuszczyk, et al. (2014). "Changes in intracellular ATP-content of CHO cells as response to hyperosmolality." Biotechnology Progress **31**(5): 1212-1216.
- Poole, R. C. and A. P. Halestrap (1993). "Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes." Am J Physiol **264**(4 Pt 1): C761-82.
- Popp, O., D. Müller, et al. (2016). "A hybrid approach identifies metabolic signatures of high-producers for Chinese ham-ster ovary clone selection and process optimization." Biotechnology and Bioengineering.
- Purwaha, P., P. Lorenzi, et al. (2014). "Targeted metabolomic analysis of amino acid response to L-asparaginase in adherent cells." Metabolomics **10**: 909-919.
- Rabinowitz, J. D. and E. Kimball (2007). "Acidic acetonitrile for cellular metabolome extraction from Escherichia coli." Analytical Chemistry **79**(16): 6167-6173.

- Rajapakse, N., K. Shimizu, et al. (2001). "Isolation and characterization of intact mitochondria from neonatal rat brain." *Brain Res Brain Res Protoc* **8**(3): 176-83.
- Ramakrishna, R., J. S. Edwards, et al. (2001). "Flux-balance analysis of mitochondrial energy metabolism: consequences of systemic stoichiometric constraints." *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **280**(3): R695-R704.
- Rambold, A., B. Kostelecky, et al. (2011). "Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation." *Proceedings of the National Academy of Science* **108**: 10190-10195.
- Reaves, M. L. and J. D. Rabinowitz (2010). "Metabolomics in systems microbiology." *Curr Opin Biotechnol*.
- Rehberg, M., A. Rath, et al. (2014). "Changes in intracellular metabolite pools during growth of adherent MDCK cells in two different media." *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**(1): 385-397.
- Ritter, J. B., Y. Genzel, et al. (2008). "Simultaneous extraction of several metabolites of energy metabolism and related substances in mammalian cells: optimization using experimental design." *Anal Biochem* **373**(2): 349-69.
- Rizzi, M., M. Baltes, et al. (1997). "In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: II. Mathematical model." *Biotechnology and Bioengineering* **55**(4): 592-608.
- Robards, K., P. Haddad, et al. (1997). *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*. London, Academic Press.
- Rödiger, J., E. Rapp, et al. (2013). "Impact of cultivation conditions on N-glycosylation of influenza virus a hemagglutinin produced in MDCK cell culture." *Biotechnology and Bioengineering* **110**(6): 1691-1703.
- Ross Fischer, L. and D. Chapital (1987). "Simultaneous Determination of Carbohydrates and Products of Carbohydrate Metabolism in Fermentation Mixtures by HPLC." *Journal of Chromatographic Science* **25**(3): 112-117.
- Sagan, L. (1967). "On the origin of mitosing cells." *Journal of Theoretical Biology* **14**: 225-274.
- Saks, V. A., V. I. Veksler, et al. (1998). "Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo." *Mol Cell Biochem*. **184**(1-2): 81-100.
- Savelkoul, P. J., Janickova, H., Kuipers, A.A., Hageman, R. J., Kamphuis, P. J., Delozal, V. Broersen, L. M (2012). "A specific multi-nutrient formulation enhances M1 muscarinic acetylcholine receptor responses in vitro." *J Neurochem*. **120**(4): 631-640.
- Schaper, J., E. Meiser, et al. (1985). "Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts." *Circulation Research* **56**(3): 377-391.
- Schaub, J., C. Clemens, et al. (2011). "Advancing Biopharmaceutical Process Development by System-Level Data Analysis and Integration of Omics Data." *Adv Biochem Eng Biotechnol*.
- Schaub, J., C. Schiesling, et al. (2006). "Integrated sampling procedure for metabolome analysis." *Biotechnol Prog* **22**(5): 1434-42.
- Schwenke, J. D., S. Soboll, et al. (1981). "Mitochondrial and cytosolic ATP/ADP ratios in rat liver in vivo." *Biochem J*. **200**(405-408).
- Sellick, C. A., A. S. Croxford, et al. (2011). "Metabolite Profiling of Recombinant CHO Cells: Designing Tailored Feeding Regimes That Enhance Recombinant Antibody Production." *Biotechnology and Bioengineering* **108**(12): 3025-3031.
- Sellick, C. A., R. Hansen, et al. (2009). "Effective quenching processes for physiologically valid metabolite profiling of suspension cultured Mammalian cells." *Anal Chem* **81**(1): 174-83.
- Sellick, C. A., D. Knight, et al. (2010). "Evaluation of extraction processes for intracellular metabolite profiling of mammalian cells: matching extraction approaches to cell type and metabolite targets." *Metabolomics* **6**(3): 427-438.
- Selvarasu, S., Ho, Y. S., Chong, P. K., Wong, N. S., Yusufi, F. N., Yap, M. G., Lee, D.-Y. (2012). "Combined in silico modeling and metabolomics analysis to characterize fed-batch CHO cell culture." *Biotechnology and Bioengineering* **109**(6): 1415-1429.
- Shahzad, K. and J. Loor (2012). "Application of Top-Down and Bottom-up Systems Approaches in Ruminant Physiology and Metabolism." *Current Genomics* **13**(5): 379-394.

- Shakibaie, M., F. Tabandeh, et al. (2011). "Kinetics, Experimental and Simulation Studies of Chinese Hamster Ovary Cell Growth in a Packed-Bed Bioreactor." World Applied Sciences Journal **15**(11): 1568-1575.
- Sharfstein, S. T., S. N. Tucker, et al. (1994). "Quantitative in-Vivo Nuclear-Magnetic-Resonance Studies of Hybridoma Metabolism." Biotechnology and Bioengineering **43**(11): 1059-1074.
- Shrimal, S., N. Cherepanova, et al. (2015). "Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum." Seminars in Cell & Developmental Biology **41**: 71-78.
- Sidorenko, Y., A. Wahl, et al. (2008). "Comparison of metabolic flux distributions for MDCK cell growth in glutamine- and pyruvate-containing media." Biotechnology Progress **24**(2): 311-320.
- Soboll, S., R. Scholz, et al. (1978). "Subcellular metabolite concentrations. Dependence of mitochondrial and cytosolic ATP systems on the metabolic state of perfused rat liver." Eur J Biochem **87**(2): 377-90.
- Soga, T., Y. Ohashi, et al. (2003). "Quantitative Metabolome Analysis Using Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry." Journal of Proteome Research **2**(5): 997-0017.
- Stangherlin, A., A. Koschinski, et al. (2014). "Analysis of Compartmentalized cAMP: A Method to Compare Signals from Differently Targeted FRET Reporters." Methods in Molecular Biology **1071**: 59-71.
- Studzinska, S. and B. Buszewski (2013). "Effect of mobile phase pH on the retention of nucleotides on different stationary phases for high-performance liquid chromatography." Analytical and Bioanalytical Chemistry **405**(5): 1663-1672.
- Sun, G. Y., Sun, A. Y. (1985). "Ethanol and membrane lipids." Alcohol Clin Exp. Res **9**(2): 164-180.
- Sweet, S. and G. Singh (1999). "Changes in mitochondrial mass, membrane potential, and cellular adenosine triphosphate content during the cell cycle of human leukemic (HL-60) cells." Journal of Cellular Physiology **180**(1): 91-96.
- Tasseva, G., H. D. Bai, et al. (2013). "Phosphatidylethanolamine Deficiency in Mammalian Mitochondria Impairs Oxidative Phosphorylation and Alters Mitochondrial Morphology." Journal of Biological Chemistry **288**: 4158-4173.
- Tautenhahn, R., K. Cho, et al. (2012). "An accelerated workflow for untargeted metabolomics using the METLIN database." Nature Biotechnology **30**: 826-828.
- Taymaz-Nikerel, H., M. de Mey, et al. (2009). "Development and application of a differential method for reliable metabolome analysis in *Escherichia coli*." Anal Biochem **386**(1): 9-19.
- Teleki, A., S.-K. A., et al. (2014). "Alkaline conditions in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) for intracellular metabolite quantification using tandem mass spectrometry." Anal Chem. **submitted**.
- Templeton, N., J. Dean, et al. (2013). "Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture." Biotechnology and Bioengineering **110**(7): 2013-2024.
- Teng, Q., W. L. Huang, et al. (2009). "A direct cell quenching method for cell-culture based metabolomics." Metabolomics **5**(2): 199-208.
- Tillack, J., Noack, S. (2012). "Error Propagation Analysis for Quantitative Intracellular Metabolomics." Metabolites **2**(4): 1012-1030.
- Tokuoka, M., N. Sawamura, et al. (2010). "Simple metabolite extraction method for metabolic profiling of the solid-state fermentation of *Aspergillus oryzae*." J Biosci Bioeng.
- Trummer, E., K. Fauland, et al. (2006). "Process parameter shifting: Part II. Biphasic cultivation—A tool for enhancing the volumetric productivity of batch processes using Epo-Fc expressing CHO cells." Biotechnology and Bioengineering **94**(6): 1045-1052.
- Ui, M. (1966). "A role of phosphofructokinase in pH-dependent regulation of glycolysis." Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects **124**(2): 310-322.
- van der Giezen, M. (2009). "Hydrogenosomes and mitosomes: conservation and evolution of functions." Journal of Eukaryotic Microbiology **56**: 221-231.
- Vergara, M., S. Becerra, et al. (2014). "Differential Effect of Culture Temperature and Specific Growth Rate on CHO Cell Behavior in Chemostat Culture." PLoS ONE **9**(4): 393865.

- Vervesi, A. E., C. F. Bernardes, et al. (1991). "Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ." *J Biol Chem.* **266**(22): 14431-14434.
- Vielhauer, O., Zakhartsev, M., Horn, T., Takors, R., Reuss, M. (2011). "Simplified absolute metabolite quantification by gas chromatography–isotope dilution mass spectrometry on the basis of commercially available source material." *Journal of Chromatography B* **879**: 3859-3870.
- Volmer, M., S. Northoff, et al. (2010). "Fast filtration for metabolome sampling of suspended animal cells." *Biotechnol Lett.*
- Wagstaff, J., R. Masterton, et al. (2013). "1H NMR Spectroscopy Profiling of Metabolic Reprogramming of Chinese Hamster Ovary Cells upon a Temperature Shift during Culture." *PLoS ONE* **8**(10): e77195.
- Wahrheit, J., Nicolae, A., Heinzle, E. (2014). "Dynamics of growth and metabolism controlled by glutamine availability in Chinese hamster ovary cells." *Appl Microbiol Biotechnol.* **98**: 1771-1783.
- Wahrheit, J., J. Niklas, et al. (2011). "Evaluation of sampling and quenching procedures for the analysis of intracellular metabolites in CHO suspension cells." *BMC Proc* **5 Suppl 8**: P82.
- Wahrheit, J., J. Niklas, et al. (2014). "Metabolic control at the cytosol-mitochondria interface in different growth phases of CHO cells." *Metabolic Engineering* **23**: 9-21.
- Wahrheit, J., Y. Nonnenmacher, et al. (2015). "High-throughput respiration screening of single mitochondrial substrates using permeabilized CHO cells highlights control of mitochondria metabolism." *Engineering in Life Sciences* **15**: 184-194.
- Wanders, R. (2014). "Metabolic functions of peroxisomes in health and disease." *Biochimie* **98**: 36-44.
- Wang, R. and M. Brattain (2007). "The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa." *FEBS Letters* **581**(17): 3164-3170.
- Weis, K. (2003). "Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle." *Cell* **112**(4): 441-451.
- Wiendahl, C., J. J. Brandner, et al. (2007). "A microstructure heat exchanger for quenching the metabolism of mammalian cells." *Chemical Engineering & Technology* **30**(3): 322-328.
- Wilson, J. E. (2003). "Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function." *Journal of Experimental Biology* **206**(2049-2057).
- Winter, H., D. G. Robinson, et al. (1994). "Subcellular volumes and metabolite concentrations in spinach leaves." *Planta* **193**(4): 530-535.
- Wishart, D., T. Jewison, et al. (2012). "HMDB 3.0—The Human Metabolome Database in 2013." *Nucleic Acid Reseach* **41**: 801-807.
- Wittmann, C., J. O. Kromer, et al. (2004). "Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria." *Anal Biochem* **327**(1): 135-9.
- Wong, D., K. Wong, et al. (2005). "Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures." *Biotechnology and Bioengineering* **89**(2): 164-177.
- Wu, L., M. Mashego, et al. (2004). "Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly 13C-labeled cell extracts as internal standards." *Analytical Biochemistry* **336**(2): 164-171.
- Wu, T.-F. and E. J. Davis (1981). "Regulation of glycolytic flux in an energetically controlled cell-free system: The effects of adenine nucleotide ratios, inorganic phosphate, pH, and citrate." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **209**(1): 85-99.
- Wurm, M., B. Schopke, et al. (2010). "Microtechnology meets systems biology: the small molecules of metabolome as next big targets." *J Biotechnol* **149**(1-2): 33-51.
- Wurm, M. and A. P. Zeng (2012). "Mechanical disruption of mammalian cells in a microfluidic system and its numerical analysis based on computational fluid dynamics." *Lab Chip* **12**(6): 1071-7.
- Xie, L. Z. and D. I. C. Wang (1994). "Applications of Improved Stoichiometric Model in Medium Design and Fed-Batch Cultivation of Animal-Cells in Bioreactor." *Cytotechnology* **15**(1-3): 17-29.
- Young, J. (2013). "Metabolic flux rewiring in mammalian cell cultures." *Current Opinion in Biotechnology* **24**(6): 1108-1115.

- Zalai, D., K. Koczka, et al. (2015). "Combining mechanistic and data-driven approaches to gain process knowledge on the control of the metabolic shift to lactate uptake in a fed-batch CHO process." Biotechnology Progress **31**(6): 1657-1668.
- Zamorano, F., A. V. Wouwer, et al. (2010). "A detailed metabolic flux analysis of an underdetermined network of CHO cells." Journal of Biotechnology **150**(4): 497-508.
- Zelles, L. and Q. Bai (1993). "Fractionation of fatty acids derived from soil lipids by solid phase extraction and their quantitative analysis by GC-MS." Soil Biology and Biochemistry **25**(4): 495-507.
- Zhang, A., H. Sun, et al. (2012). "Modern analytical techniques in metabolomics analysis." Analyst **137**: 293.
- Zhao, Y., Butler, E. B., Tan, M (2013) "Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics." Cell Death and Disease **Volume**, DOI: 10.1038/cddis.2013.60
- Zhou, W. C., J. Rehm, et al. (1997). "Alteration of mammalian cell metabolism by dynamic nutrient feeding." Cytotechnology **24**(2): 99-108.
- Zhu, J. (2012). "Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production." Biotechnol Adv. **30**(5): 1158-1170.



## 9. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: schematische Darstellung der Glukoseaufnahme in das Cytosol von Säugerzellen über Glukose-Transporter (GLUT) mit anschließender Verstoffwechslung in der Glykoselyse bzw. Einspeisen des Glukose-6-Phosphats in den Pentose-Phosphat-Weg. .... 12
- Abb. 2: schematische Darstellung des Stoffaustauschs zwischen dem Cytosol (aussen) und Mitochondrien (Ellipse) in Säugerzellen und den zugehörigen Stoffwechselwegen sowie Transportmechanismen. Dies umfasst den regulären Citrat-Zyklus (mitte) sowie das Malat-Aspartat-Shuttle (links), das Citrat-Malat-Shuttle (rechts oben) und die Glutaminolyse (rechts unten). Der Stoffaustausch erfolgt über die aufgelisteten Transporter. Ox-a-Ant: Malat-a-Ketoglutarat Antiporter; A-G-Ant: Aspartat-Glutamat-Antiporter; Cit-Carr: Citrat-Carrier; Pyr/H-Sym: Pyruvat-H<sup>+</sup>-Symporter; GLU: mitochondrialer Glutamat-Transporter; GLN: mitochondrialer Glutamin-Transporter..... 13
- Abb. 3: Skizzierter Ablauf einer klassischen invasiven Metabolomuntersuchung in Zellen. Zunächst werden die Zellen, z.B. in einem Bioreaktor, kultiviert. Anschließend werden Proben genommen und der Stoffwechsel der Zellen gestoppt (Quenching). In den meisten Fällen ist eine Abreicherung des Mediums notwendig. In der folgenden Aufarbeitung der Zellproben werden die Metabolite der Zellen zugänglich gemacht und aufgereinigt. Sie sind nun bereit vermessen zu werden um die relevanten Metabolite zu quantifizieren. Sobald diese Daten vorliegen, können die zellulären Konzentrationen bestimmt werden und diese Daten weiter nach Mustern oder Auffälligkeiten untersucht werden. .... 17
- Abb. 4: schematische Darstellung der Funktionsweise einer chromatographisch gekoppelten Massenspektrometrie-Analyse. Zunächst erfolgt eine chromatographische Trennung des Analytgemisches. Anschließend werden die Einzelsubstanzen ionisiert und im Massenselektor aufgetrennt. Im Detektor werden die Ionen detektiert und die Ursprungsanalyte anhand der charakteristischen Masse-Ladungsverhältnisse identifiziert. .... 24
- Abb. 5: exemplarische Darstellung der Auswertung von <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C-Signalen bei der IDMS-Analytik. Hierzu wird der Quotient aus dem <sup>12</sup>C- und dem <sup>13</sup>C-Signal gebildet und gegen die bekannten <sup>12</sup>C-Konzentrationen im Kalibrierstandard aufgetragen. Die resultierende Kalibriergerade ermöglicht eine Quantifizierung des Zielanalyten in den unbekanntenen Proben..... 26
- Abb. 6: schematischer Aufbau der Filtrationsanlage. Dargestellt sind die Anordnung der Filtertypen, sowie ihre Orientierung zur Zellsuspension. Des Weiteren ersichtlich sind eine Waschflasche und das Druckregelventil vor der Unterdruckpumpe. .... 34
- Abb. 7: Darstellung der intrazellulären Stoffmengen der untersuchten Metabolite in fmol·Zelle<sup>-1</sup> für die jeweiligen Berechnungsmethoden (Gauss und Triplikat). Die Daten wurden ausgehend von drei Replikaten bestimmt. .... 51
- Abb. 8: Auftragung der jeweiligen Stoffmengen pro Zellen in fmol der per LC-MS gemessenen Metabolite. Die Stoffmengen sind in aufsteigender Reihenfolge sortiert (GDP, 6PG, cis-Aco, GTP, 2PG/3PG, GMP, iso-Cit, Fum, FbP, PEP, F6P, AMP, G6P, aKG, ADP, ATP, Citr, Mal, Suc). Die Daten wurden ausgehend von drei Replikaten bestimmt. .... 53

- Abb. 9: Auftragung der jeweiligen Stoffmengen pro Zellen in fmol der per GC-MS gemessenen Metabolite. Die Stoffmengen sind in aufsteigender Reihenfolge sortiert (Pyr, Mal, Cit, Fum, GLU, VAL). Die Daten wurden ausgehend von drei Replikaten bestimmt..... 54
- Abb. 10: Auftragung der jeweiligen Fehler in fmol Zelle<sup>-1</sup> der per LC-MS gemessenen Metabolite. Die Fehler sind in aufsteigender Reihenfolge sortiert (cis-Aco, 6PG, GDP, GMP, GTP, 2PG/3PG, Fum, FbP, PEP, F6P, iso-Cit, AMP, G6P, ADP, ATP, Mal, Cit, aKG, Suc). Die Daten wurden ausgehend von drei Replikaten bestimmt. .... 54
- Abb. 11: Auftragung der jeweiligen Fehler pro Zellen in fmol der per GC-MS gemessenen Metabolite. Die Stoffmengen sind in aufsteigender Reihenfolge sortiert (Cit, GLU, VAL, Pyr, Fum, Mal). Die Daten wurden ausgehend von drei Replikaten bestimmt..... 55
- Abb. 12: GC-MS Chromatogramme der Leerextraktionen von mit Wasser konditionierten und mit Waschpuffer filtrierten Tiefenfilter (AD), Membranfilter (M) und einer Kombination von beiden (ADM). Die Proben wurden mit der TMS-Methode derivatisiert und dann im Fullscan-Modus vermessen. Zur Beurteilung des Hintergrundes ist eine Leerderivatisierung (Leer) mit gemessen worden. RT: 21,33 min 2-methyl-dodecyl ester-2-Propensäure, RT: 11,25 min 3TMS-Phosphat, RT: 8,95 min dodecamethyl-Pentasiloxan, RT: 8,36 min 2TMS-Oxalat, RT: 7,84 min Diphenyl-(trimethylsilyl)-phosphin, RT: 6,62 min 2TMS-Lactat, RT: 5,46 min 1,2,3-trimethyl-Benzol, RT: 5,08 min Tris-(trimethylsilyl)-borat ..... 59
- Abb. 13: Bestimmung der intrazellulären Stoffmengen für die vier untersuchten Aminosäuren GLU, GLY, TRP und HIS in Abhängigkeit der filtrierten Zellmengen auf einer Pall AD Membran. Die Filtration erfolgte bei 30 mbar, gewaschen wurde mit 35 mL Waschpuffer. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Replikate mit der Standardabweichung. Die Daten wurden mittels einer einfaktoriellen ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) überprüft: \* bedeutet statistische Insignifikanz, x heißt, dass H0 verworfen werden musste..... 62
- Abb. 14: Bestimmung der intrazellulären Stoffmengen für die vier untersuchten Aminosäuren GLU, GLY, TRP und HIS in Abhängigkeit der filtrierten Zellmengen auf einer Pall AD/Metrigard Membran-Kombination. Die Filtration erfolgte bei 90 mbar, gewaschen wurde mit 35 mL Waschpuffer. Die Daten wurden mittels einer einfaktoriellen ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) überprüft: \* bedeutet statistische Insignifikanz, x heißt, dass H0 verworfen werden musste..... 63
- Abb. 15: intrazelluläre Stoffmengen in Abhängigkeit der Lagerdauer der Zellextrakte bei -70 °C einer Gesamtzell-Analyse ohne Detergenzien-haltigem Lysepuffer. Die Replikate eines Ansatzes wurden 24 h, 14 d und 28 d nach der Extraktion vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Filterreplikate mit der Standardabweichung als Fehler. Die Daten wurden mittels einer einfaktoriellen ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) überprüft: \* bedeutet statistische Insignifikanz, x heißt, dass H0 verworfen werden musste..... 69
- Abb. 16: intrazelluläre Stoffmengen in Abhängigkeit der Lagerdauer der Zellextrakte bei -70 °C von mit 0.1 % Digitonin-haltigem Lysepuffer behandelten Zellen. Die Replikate eines Ansatzes wurden 24 h, 14 d und 28 d nach der Extraktion vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Filterreplikate mit der Standardabweichung als Fehler. Die Daten wurden mittels einer einfaktoriellen ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) überprüft: \* bedeutet statistische Insignifikanz, x heißt, dass H0 verworfen werden musste..... 71

- Abb. 17: intrazelluläre Stoffmengen in Abhängigkeit der Lagerdauer der Zellextrakte bei -70 °C von mit 0.01 % SDS-haltigem Lysepuffer behandelten Zellen. Die Replikate eines Ansatzes wurden 24 h, 14 d und 28 d nach der Extraktion vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Filterreplikate mit der Standardabweichung als Fehler. Die Daten wurden mittels einer einfaktoriellen ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) überprüft: \* bedeutet statistische Insignifikanz, x heißt, dass  $H_0$  verworfen werden musste..... 73
- Abb. 18: Bestimmung der intrazellulären Stoffmengen phosphorylierter Nukleotide auf einer Pall AD Membran in Abhängigkeit der Haltezeit nach dem Quenching von 2E7 Zellen. Die Filtration erfolgte bei 30 mbar, gewaschen wurde mit 35 mL Waschpuffer. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Filterreplikate mit der Standardabweichung als Fehler. Die Daten wurden mittels einer einfaktoriellen ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) überprüft: \* bedeutet statistische Insignifikanz, x heißt, dass  $H_0$  verworfen werden musste. .... 77
- Abb. 19: Bestimmung der intrazellulären Stoffmengen von ausgewählten Zentralstoffwechselmetaboliten (Mal, aKG, Cit, G6P) auf einer Pall AD Membran in Abhängigkeit der Haltezeit nach dem Quenching von 2E7 Zellen. Die Filtration erfolgte bei 30 mbar, gewaschen wurde mit 35 mL Waschpuffer. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Filterreplikate mit der Standardabweichung als Fehler. Die Daten wurden mittels einer einfaktoriellen ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) überprüft: \* bedeutet statistische Insignifikanz, x heißt, dass  $H_0$  verworfen werden musste..... 78
- Abb. 20: Darstellung der Fluoreszenzintensität von NAO-gefärbten und aufgeschlossenen Zellen. Abbildung klein: verschiedene Verdünnungen ausgehend von 2E7 gefärbten Zellen zur Überprüfung der Messsensitivität. Abbildung groß: verschiedene Verdünnungen ausgehend von 2E7 gefärbten Zellen und simultaner Permeat-Fraktion einer Filtration von 2E7 Zellen zur Überprüfung der Durchgängigkeit der Filtermembranen für Mitochondrien. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Replikate mit der Standardabweichung als Fehler..... 80
- Abb. 21: intrazelluläre Stoffmengen von Pyruvat, Malat, Glutamat und Valin in Abhängigkeit der Waschpufferbeschaffenheit. Untersucht wurde der Einfluss von Phloretin, einem Inhibitors von Monocarboxylat-Transportern, der Pufferung des Waschpuffers sowie zweier abweichender Osmolalitäten im Waschpuffer. Die Puffervarianten basieren auf einem 10 mM  $KPO_4$  Grundpuffer mit einem pH-Wert von 7.1 und einer Osmolalität von  $280 \text{ mOsmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ , die Änderungen in den jeweiligen Auslenkungen sind in der Legende entsprechend kenntlich gemacht. Als Referenz gilt hierbei der Ansatz mit pH 7.1 und  $280 \text{ mOsmol} \cdot \text{kg}^{-1}$  ohne weitere Zusätze. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Filterreplikate mit der Standardabweichung als Fehler. Die Daten wurden mittels einer einfaktoriellen ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) überprüft: \* bedeutet statistische Insignifikanz, x heißt, dass  $H_0$  verworfen werden musste..... 82
- Abb. 22: Darstellung des Einflusses von verschiedenen Ethanolkonzentrationen im Lysepuffer auf das cytosolische Restsignal auf der Filtermembran sowie die mitochondriale Integrität von subzellulären Filtrationen. Die Berechnung erfolgte anhand der zellspezifischen G6P- und cisAco-Stoffmengen in Bezug auf den regulären Filtrationsvorgang für die Gesamtzellanalyse. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier subzellulärer und sechs regulärer Filterreplikate mit der relativen Standardabweichung als Fehler. .... 85

- Abb. 23: Darstellung des Einflusses von verschiedenen SDS-Konzentrationen im Lysepuffer auf das cytosolische Restsignal auf der Filtermembran sowie die mitochondriale Integrität von subzellulären Filtrationen. Die Berechnung erfolgte anhand der zellspezifischen G6P- und cisAco-Stoffmengen in Bezug auf den regulären Filtrationsvorgang für die Gesamtzellanalyse. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier subzellulärer und sechs regulärer Filterreplikate mit der relativen Standardabweichung als Fehler. .... 86
- Abb. 24: Darstellung des Einflusses von verschiedenen Digitonin-Konzentrationen im Lysepuffer auf das cytosolische Restsignal auf der Filtermembran sowie die mitochondriale Integrität von subzellulären Filtrationen. Die Berechnung erfolgte anhand der zellspezifischen G6P- und cisAco-Stoffmengen in Bezug auf den regulären Filtrationsvorgang für die Gesamtzellanalyse. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier subzellulärer und sechs regulärer Filterreplikate mit der relativen Standardabweichung als Fehler. .... 87
- Abb. 25: Vergleich des berechneten, zentral zusammengesetzten Modells zur Digitonin-basierten Cytosol-Abreicherung mit den experimentellen Werten aus dem Versuchsplan in Tab. 21. Der Korrelationskoeffizient  $r^2$  beträgt 0.86..... 88
- Abb. 26: Vergleich des berechneten, zentral zusammengesetzten Modells zur Mitochondrien-Integrität bei einer Digitonin-basierten Cytosol-Abreicherung mit den experimentellen Werten aus dem Versuchsplan in Tab. 21. Der Korrelationskoeffizient  $r^2$  beträgt 0.7457..... 89
- Abb. 27: Vergleich des berechneten, zentral zusammengesetzten Modells zur SDS-basierten Cytosol-Abreicherung mit den experimentellen Werten aus dem Versuchsplan in Tab. 21. Der Korrelationskoeffizient  $r^2$  beträgt 0.62..... 89
- Abb. 28: Vergleich des berechneten, zentral zusammengesetzten Modells zur Mitochondrien-Integrität bei einer SDS-basierten Cytosol-Abreicherung mit den experimentellen Werten aus dem Versuchsplan in Tab. 21. Der Korrelationskoeffizient  $r^2$  beträgt 0.1727. .... 90
- Abb. 29: Überprüfung des cytosolischen Restsignals sowie der mitochondrialen Integrität auf den Filtermembranen mit den im DoE ermittelten Einstellungen der Digitoninkonzentration im Lysepuffer sowie der Volumina des Lyse- und Waschpuffers (LP, WP). Die Berechnung erfolgte anhand der zellspezifischen G6P- und cisAco-Stoffmengen in Bezug auf den regulären Filtrationsvorgang für die Gesamtzellanalyse. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier subzellulärer und sechs regulärer Filterreplikate mit der relativen Standardabweichung als Fehler..... 92
- Abb. 30: Kulturverläufe zweier Batch-Kultivierungen zur Untersuchung zellulärer und subzellulärer Metabolit-Pools in CHO-DP12-Zellen. Dargestellt sind die Entwicklung der Lebenszellichte (LZD), der Glutamin- (GLN) sowie der Glukose-Konzentration (GLK) im Medium anhand der Mittelwerte einer Dreifachbestimmung pro Reaktor mit der Standardabweichung als Fehler. Proben für metabolische Untersuchungen wurden zu drei Zeitpunkten entnommen: a) in Gegenwart von Glukose und Glutamin, b) nach Verbrauch von Glutamin und c) nach Verbrauch von Glutamin und Glukose. Die Zeitpunkte sind reaktorspezifisch durch Pfeile markiert. .... 94
- Abb. 31: Verlauf der gemittelten Glukose- und Laktatkonzentrationen über die Kulturdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte beider Bioreaktoren mit der Standardabweichung als Fehler (n=6). 95

Abb. 32:	zellspezifische Glukose- und Laktatverbrauchsraten (q) und Quotient der Raten über die Kulturdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung als Fehler (n=6).....	96
Abb. 33:	Verlauf der gemittelten Glutamin-, Glutamat- und Ammoniumkonzentrationen über die Kulturdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte beider Bioreaktoren mit der Standardabweichung als Fehler (n=6).....	96
Abb. 34:	Verlauf der gemittelten Pyruvat-, Alanin- und Aspartatkonzentrationen über die Kulturdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte beider Bioreaktoren mit der Standardabweichung als Fehler (n=6).....	98
Abb. 35:	Darstellung des cytosolischen Restsignals sowie der mitochondrialen Integrität von fraktionierten Zellen zu den drei gewählten Probenahmezeitpunkten jeweils bezogen auf die unbehandelte Kontrollmessung. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung in beiden Bioreaktoren (n=6), die zugehörigen Fehler wurden mittels Fehlerfortpflanzung berechnet. ....	102
Abb. 36:	cytosolische Konzentrationen ausgewählter Intermediate der Glykolyse in CHO -DP12 Zellen in Abhängigkeit der Prozessphasen eines Batch-Prozesses. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung in beiden Bioreaktoren (n=6), die zugehörigen Fehler wurden mittels Fehlerfortpflanzung berechnet. ....	106
Abb. 37:	mitochondriale Konzentrationen ausgewählter Intermediate des Citrat-Zyklus in CHO -DP12 Zellen in Abhängigkeit der Prozessphasen eines Batch-Prozesses. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung in beiden Bioreaktoren (n=6)mit der Standardabweichung als Fehler. ....	106
Abb. 38:	kompartimentäre Konzentrationen ausgewählter Aminosäuren in CHO -DP12 Zellen in Abhängigkeit der Prozessphasen eines Batch-Prozesses. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung in beiden Bioreaktoren (n=6). Die zugehörigen Fehler cytosolischer Messungen wurden mittels Fehlerfortpflanzung berechnet, die mitochondrialen Werte zeigen die Standardabweichung als Fehler. ....	108
Abb. 39:	kompartimentäre Konzentrationen phosphorylierter Nukleotide in CHO -DP12 Zellen in Abhängigkeit der Prozessphasen eines Batch-Prozesses. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung in beiden Bioreaktoren (n=6), die zugehörigen Fehler wurden für cytosolische Werte mittels Fehlerfortpflanzung berechnet, mitochondriale Werte zeigen die Standardabweichung als Fehler. ....	111