

**Entwicklung und Anwendung einer Methode zur  
Metabolomanalyse von *Corynebacterium glutamicum***

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Sergey Strelkov**

aus Moskau (Russland)

Köln 2004

Berichtersteller:

Prof. Dr. Dietmar Schomburg  
Prof. Dr. Reinhard Krämer

Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.04

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit –einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung von Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. D. Schomburg betreut worden.

Sergey Strelkov



I. Referent: Prof. Dr. Dietmar Schomburg

II. Referent: Prof. Dr. Reihard Krämer

## Kurzzusammenfassung

Neben gut etablierten, analytischen Techniken im Proteomics- und Transkriptomicsbereich wird eine ergänzende Metabolomics-Technik für einen kompletten systembiologischen Ansatz benötigt. Heutzutage sind die kompletten Genomsequenzen vieler Organismen vollständig entschlüsselt und frei zugänglich. Doch nur für einen Teil der Gene ist die Funktion bekannt. Bei der Aufklärung von Genfunktionen ist eine analytische Methode nötig, die eine möglichst große Anzahl von Metaboliten erfasst. Hierfür bieten sich massenspektrometrische Techniken wie GC-MS und/oder LC-MS mit ihrer großen Universalität, Selektivität und Einfachheit besonders an. Wegen der großen chemischen Diversität von Metaboliten gegenüber den chemisch relativ homogenen Proteinen oder der mRNA, stellt die Entwicklung einer analytischen Methode zur Metabolomanalyse eine große Herausforderung dar. Der Modellorganismus *Corynebacterium glutamicum* wird in der Industrie für die Produktion von L-Glutamat und L-Lysin benutzt. Es besteht ein großes Interesse an der Optimierung von Produktionsstämmen, aber das Wissen über die metabolische Organisation in der Zelle ist limitiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine GC-MS basierende Methode zur Metabolomanalyse entwickelt und etabliert. Die aufgenommenen GC-MS-Chromatogramme enthalten die Information von ca. 1000 detektierten Komponenten. Davon lassen sich 300 Metabolite quantitativ, reproduzierbar messen, das entspricht ca. 50% der erwarteten Metabolite. Von diesen wurden im Rahmen dieser Arbeit 121 (88 in der polaren Phase, 33 in der lipophilen Phase) identifiziert. Durch eine Methodenoptimierung war es möglich, eine Präzision innerhalb von 6% mittlerer Standardabweichung bei der Messung allein und 15% bei Extraktion und Probennahme zusammen zu erreichen. Die Anwendung dieser Methode für die funktionelle Genomanalyse wurde am Beispiel von Deletionsmutanten des Trehalose-Stoffwechselweges durchgeführt. Entsprechend den Erwartungen ließ sich nach der Deletion der Trehalose-6-phosphatphosphatase (kodiert durch OtsB) eine ca. 100-fache Akkumulation des entsprechenden Substrates Trehalose-6-phosphat messen. Umgekehrt führte eine Deletion des Gens OtsA (kodiert für Trehalose-6-phosphatsynthase) zu einer Abnahme Trehalose-6-phosphat. Zur Evaluierung der Methodenempfindlichkeit wurden Wachstumsbedingungen (Temperatur und Kohlenstoffquelle) variiert. Es wurden dabei multiple Änderungen beobachtet, die den experimentellen Fehler überstiegen. Damit die hier entwickelte Methode als Datengrundlage für eine computergestützte Modellierung metabolischer Netzwerke eingesetzt werden kann, ist eine Kenntnis über die tatsächlichen intrazellulären Metabolitkonzentrationen notwendig. Daher wurden für 71 der identifizierten Metabolite Kalibrationskurven aufgenommen, um den jeweiligen linearen Massenbereich zu charakterisieren und Responsefaktoren zu ermitteln. Als ergänzende Technik zur Analyse von hochmolekularen nicht flüchtigen GC-MS Verbindungen wurde mit der Etablierung eines HPLC-HILIC-ESI-MS Ansatzes begonnen.

## Abstract

For complete systems biology approach a metabolomic analysis technique should be developed to complement already well established proteomic and transcriptomic analytical techniques. To date the complete genome sequences are freely available for a variety of organisms. However only a part of genes are functionally classified. For the elucidation of gene function an analytical method for simultaneous analysis of maximally possible number of metabolites must be developed. Mass spectrometry based techniques such as GC-MS and LC-MS are very suitable for this task, due to their universality, selectivity and simplicity. Because of wide chemical diversity of metabolites comparative to relatively homogenous proteins and mRNA the development of metabolic analysis method is more difficult. The model organism *Corynebacterium glutamicum* is used for the industrial production of L-glutamate and L-lysine. A lot of attention is paid on the optimization of production strains, but the knowledge about metabolic organization in the cell is limited. In this work, a GC-MS based method for metabolomic analysis was developed and established. The GC-MS chromatograms contain the information about ca. 1000 detected components. Approximately 300 metabolites can be quantitatively reproducibly analyzed and represent ca. 50% of all expected metabolites. From these 121(88 in the polar phase, 33 in the lipophilic phase) were identified. After a method optimization it was possible to achieve a precision within 6% of average standard deviation on the stage of only GC-MS measurement and 15% together with sampling and extraction. The application of the method for the functional genomics approach was demonstrated on the example of trehalose pathway knock out mutants. According to the expectations after the knock out of the trehalose-6-phosphate phosphatase (coded by OtsB) the 100 times accumulation of the corresponding substrate trehalose-6-phosphate was observed. On the other side the knock out of the gene OtsA (codes for trehalose-6-phosphate synthase) caused the decrease in the concentration of trehalose-6-phosphate. For the evaluation of the sensitivity of the method the growth conditions (temperature and carbon source) were varied. A multiple changes were observed, which were larger as experimental error. To apply the developed method as a data source for a computer modeling of metabolic pathways, information about real intracellular metabolite concentrations is required. Calibration curves were constructed for 71 of identified metabolites. The linear working area was characterized and response factors were found out. For the analysis of high molecular nonvolatile in GC-MS compounds it was started with the development of HPLC-HILIC-ESI-MS approach.

## Danksagung

Diese Doktorarbeit wäre sicher nicht zustande gekommen ohne die Unterstützung vieler hilfreicher Menschen. Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle danken:

**Meinem Doktorvater Prof. Dr. Schomburg** für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die interessante Aufgabenstellung.

**Prof. Dr. Krämer** für die hilfreichen biochemischen Diskussionen und für die Erstellung des Zweitgutachtens.

**Dr. Joachim Kopka und Dr. Vladimir Tolstikov** von Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam für die Kooperation und Hilfe bei der Methodenentwicklung.

**Prof. Dr. Franz-Joseph Marner** für die Einweisung an den massenspektrometrischen Geräten.

**PD Dr. Andreas Burkovski** für die Versorgung mit *C. glutamicum* Stämmen.

**Dr. Sebastian Horstmann** für seine Geduld in zahlreichen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Diskussionen, die Korrektur dieser Arbeit und seine Hilfsbereitschaft.

**Svetlana Tsvetkova** für konstruktive Ratschläge, Kritik und Unterstützung.

**Michael Zimmermann** für die Anweisung und Hilfe beim Programmieren.

**Martin Weinand** aus der AG Krämer für die mühesame Fermentation.

**Dr. Andreas Wolf** aus der AG Krämer für die Zusammenarbeit an den Experimenten mit Deletionsmutanten des Trehalose-6-Phosphat-Stoffwechselweges.

**der gesamten Arbeitsgruppe Schomburg** für gute Stimmung.

## Abkürzungsverzeichnis

AMDIS	<i>the automated mass spectral deconvolution and identification system</i>
AMP	Adenosin-5-monophosphat
BHI	<i>brain heart infusion</i>
BSA	N,O-bis-Trimethylsilylacetamid
BSTFA	N,O-bis-Trimethylsilyltrifluoroacetamid
CE	<i>capillary electrophoresis</i>
CI	chemische Ionisation
EI	Elektronen-Ionisation
ESI	<i>electro spray- Ionisation</i>
FTIR	<i>fourier transform infrared spectroscopy</i>
GC	<i>gas chromatography</i>
HILIC	<i>hydrophlic interaction chromatography</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ICIS	<i>interactive chemical information system</i>
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionisation</i>
MeOX	CH <sub>3</sub> ON- Methoxymierungsgruppe
MM	Minimalmedium
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MS-	<i>mass spectrometry</i>
MSTFA	N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoroacetamid
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OD	optische Dichte
PTV	<i>programmed temperature vaporizer</i>
RI	<i>retention indice</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RT	<i>retention time</i>
RT	Raumtemperatur
SSL	<i>split/splitless</i>
TIC	<i>total ion currency</i>
TLC	<i>thin layer chromatography</i>
TMS	Trimethylsilyl
TMSI	Trimethylsilylimidazol
TOF	<i>time of fly</i>
VB	<i>Visual Basic</i>

## Inhaltverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Metabolomanalyse in Bezug auf functional genomics	1
1.2. Beschreibung von generellen analytischen Ansätze zur Metabolomanalyse	2
1.3. Metabolomanalyse von Mikroorganismen	3
1.4. Modellorganismus <i>Corynebacterium glutamicum</i>	4
1.5. Derivatisierung	5
1.6. GC-Einspritztechniken	5
1.7. Elektronen-Ionisation (EI)	7
1.8. Der Quadrupol Massenfiter	8
1.9. Verallgemeinerung von GC-MS basierten Methoden für verschiedene Stoffklassen	9
1.10. Massenspektrometrische Charakterisierung von trimethylsilylierten und oxymierten Verbindungen	10
2. Material und Methoden	16
2.1. Verwendete Chemikalien, Materialien und Software	16
2.1.1 Chemikalien	16
2.1.2 Materialien, Geräte und Software	16
2.2. Biologische Methoden	21
2.2.1. Zellaufzucht	21
2.3. Probenaufarbeitung	24
2.3.1. Zellenernte	25
2.3.2. Waschen der Zellen	25
2.3.3. Anfängliche Extraktionsmethode	26
2.3.4. Optimierter Extraktiosprozess für polare Metabolite	28
2.3.5. Extraktionsvorgang, wenn sowohl die polaren als auch die lipophilen Metabolite untersucht wurden (erhöhtes Methanolvolumen und Chloroformvolumen für die effizientere Extraktion der Metabolite)	28
2.3.6. Optimierter Extraktionsvorgang für polare und apolare Metabolite	29
2.3.7. Eindampfen der Proben mit dem Speedvac-Konzentrator	29
2.3.8. Probenaufarbeitung in Mikromaßstab (nur Polare Metabolite)	30
2.3.9. Extraktionsmethoden zur Ermittlung der Vollständigkeit der initialen Extraktion	30
2.3.10. Quenching	31
2.4. Gaschromatographie	33
2.4.1. Einspritztechniken	33
2.4.2. Trennsäule und Temperaturprofile	34
2.4.3. Temperaturprofile für Hochgeschwindigkeitsmessungen	34
2.5. Massenspektrometrie (Kopplung GC-MS)	35
2.5.1. EI (Elektronen-Ionisation)	35
2.5.2. CI+ (Chemische Ionisation)	35
2.5.3. Hochgeschwindigkeitsmessungen	36
2.5.4. Reinigung der Ionisationsquelle	36
2.6. HPLC-MS (high performance liquid chromatography - mass spectrometry)	36
2.6.1. HILIC-MS (hydrophilic interaction chromatography - mass spectrometry)	36
2.7. Datenauswertung	37
2.7.1. AMDIS-Prozessierung	37
2.7.2. Weitere Prozessierung der Daten zur Vorbereitung der Peakquantifizierung mit Xcalibur	39
2.7.3. Korrektur der Peakintegration im QuanBrowser von Xcalibur	40
2.8. Softwareentwicklung	40



2.8.1. Entwicklung eines Programms ("Processing") für die Postprozessierung der qualitativen Ergebnisse von AMDIS für die quantitative Auswertung, basierend auf dem Xcalibur Development -Kit.....	40
2.8.2. Entwicklung eines Macros in der Microsoft Excel-Umgebung für die Normalisierung der Daten der QualBrowser-Reportdatei und deren Umwandlung in das Format einer zweidimensionalen Matrix.....	43
2.8.3. Entwicklung eines Programms (Processing5) für die quantitative Auswertung basierend auf dem Xcalibur Development Kit, wobei als einziger Identifikationsparameter der RI-Wert dient. ....	44
2.8.4. Erstellung einer Massenspektren- und Retentionsindexbibliothek für die qualitative Auswertung von GC-MS-Daten.....	45
2.9. Absolute Quantifizierung .....	47
2.10. Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle .....	50
3. Ergebnisse und Diskussion.....	52
3.2. Chromatographisches GC-MS-Profil des <i>C. glutamicum</i> WT ATCC 13032 ..	52
3.3 Anzahl der detektierten Peaks im GC-MS Chromatogramm .....	55
3.4. Identifizierung der Metabolite .....	56
3.4.1. Übersicht.....	56
3.4.2. Identifizierung mit Hilfe der NIST-MS Bibliothek .....	56
3.4.3. Identifikation basierend auf biochemischen Information und Standards .....	58
3.4.4. Chemische Ionisation CI+ .....	59
3.4.5. Derivatisierung mit MBDSTFA .....	60
3.4.6. Corynomycolsäuren .....	62
3.4.7. Besonderheiten bei der qualitativen Analyse einzelner Metabolite .....	63
3.5. Quantifizierung .....	65
3.5.1. Quantifizierung mit Hilfe von AMDIS .....	65
3.5.2. Quantifizierung mit Hilfe von Xcalibur .....	65
3.5.3. Entwicklung eines Programms zur Verbesserung/Beschleunigung des Auswertungsprozesses .....	68
3.5.4. Einfache Verbindung des AMDIS Ausgabefiles mit dem Xcalibur-Programm ...	70
3.5.5. Neuaufbau des Xcalibur-Quantifizierungsteils .....	71
3.5.6. Manuelle Korrektur der Peaksintegration .....	71
3.5.7. Relative und absolute Quantifizierung .....	72
3.6. Methodenetablierung.....	77
3.6.1 GC-Einspritztechnik.....	77
3.6.2. Extraktion .....	81
3.6.3. Abdampfen des Lösungsmittels .....	85
3.6.4. Derivatisierung.....	85
3.6.5. Quenching.....	88
3.7. Stabilität von Metaboliten und Derivaten .....	90
3.7.1. Stabilität von Metaboliten bei der Probenaufarbeitung .....	90
3.7.2. Stabilität der Metabolitderivate bei GC-MS Messung .....	90
3.8. Präzision.....	93
3.9. Optimierung einiger Parameter .....	96
3.9.1. Schnelle GC-MS .....	96
3.9.2. Reduzierung der Probenmenge.....	98
3.10 Anwendung der Methode .....	100
3.10.1. Glucose/Saccharose Experiment .....	100
3.10.2. Variierung von Temperatur .....	101
3.10.3. Knock-out-Mutanten des Trehalose Stoffwechselweges.....	102
3.11. HPLC-MS (high performance liquid chromatography mass spectrometry) 103	

4. Ausblick .....	109
5. Zusammenfassung .....	113
6. Anhang .....	115
6.1. Identifizierte Metabolite .....	115
6.2. Metabolitderivate.....	116
6.3. Gemessene Standards und ihre Wiederfindung im <i>C. glutamicum</i> -Extrakt..	119
6.4. Ergebnisse des Experiments 3.9.2. ....	122
7. Literaturverzeichnis .....	126

# 1. Einleitung

## ***1.1. Metabolomanalyse in Bezug auf functional genomics***

Metabolismus ist Leben.

Relativ kleine Verbindungen, die aus zellulären Stoffwechselwegen hervorgehen bezeichnet man als Metabolite. Sie stellen letztendlich das Ergebnis aller zellulären Prozesse dar, greifen aber umgekehrt auch in das regulatorische Netzwerk der Zelle ein. Analog zu den Begriffen *Proteome* oder *Transcriptome* kann die Summe der in einem Organismus syntetisierten Metaboliten als sein *Metabolom* bezeichnet werden. Entsprechend stellt ein analytischer Ansatz, der auf die Analyse eines Metaboloms zielt, einen als *Metabolomics* zu bezeichnenden Ansatz dar.

Heutzutage sind für viele Organismen ihre kompletten Genomsequenzen bekannt und zugänglich [1, 2]. Funktionell sind aber in jedem Genom lediglich zwischen 30-70% aller Gene funktionell klassifiziert. Dazu kommt, dass von diesen Genen nur ein geringer Prozentsatz (ca. 10%) durch ein biochemisches Experiment charakterisiert wurden. Für alle anderen wurde eine Zuordnung durch Sequenzhomologien mit anderen Organismen festgelegt, was nicht unbedingt richtig ist.

Um biologische Funktionen und eine Verbindung Gen-Enzym-Metabolit festzustellen, kann eine Perturbation auf genetischer Ebene durchgeführt werden und anschließend die Antwort des Systems beobachtet werden. Andererseits kann ein schon interessanter Phänotyp analysiert werden. Die Analyse kann auf verschiedenen Ebenen durchgeführt werden. Die Transkriptomanalyse ist mittlerweile sehr gut etabliert und apparativ einfach zugänglich [3]. Im Proteomicsbereich sind für die Analytik der meisten Proteine 2-D Elektrophorese [4-6] und HPLC(*high performance liquid chromatography*) [7], gekoppelt mit massenspektrometrischen Techniken wie MALDI (*matrix assisted laser desorption ionisation*)[8, 9] und ESI (*electro spray ionization*) [7, 10] gut etablierte Techniken. Heutzutage ist es möglich nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ ein Proteom zu charakterisieren [11, 12].

Transcriptomics- und Proteomics- Ansätze müssen aber durch einen Metabolomics- Ansatz komplettiert werden, um biochemische Prozesse in der Zelle besser verstehen zu können und um letztendlich zu einer systembiologischen Betrachtungsweise zu gelangen. Beispielsweise werden Genveränderungen nicht immer auf der Transkriptomebene widerspiegelt [13]. Weiterhin wirken sich Veränderungen auf der Transcriptomebene nicht

unbedingt auf den Proteinlevel aus. Dazu kommt, dass viele zelluläre Prozesse durch Metabolite reguliert werden. Dies wurde eingehend am Beispiel des Glycolyestoffwechselweges in verschiedenen Organismen gezeigt [14].

## **1.2. Beschreibung von generellen analytischen Ansätze zur Metabolomanalyse**

Bei den Untersuchungen von Metabolitenleveln kann die Anzahl von analysierten Metaboliten verschieden sein. Dies hängt mit der Zielsetzung der jeweiligen Analyse zusammen. Wenn nur ein oder wenige Metabolite von Interesse sind, wird meist eine *metabolic target* Analyse angewendet. Dieser Ansatz ist für eine genaue Quantifizierung optimiert. Beim *metabolic profiling* werden mit einer bestimmten Methode mehrere analysierbare Metabolite untersucht [15, 16]. Die analytische Methode kann oft im Bezug auf eine begrenzte Anzahl von Metaboliten oder für ein breites Spektrum von Stoffen optimiert werden. Für eine einfache Charakterisierung von verschiedenen Organismen ist das *metabolic fingerprinting* die Methode der Wahl. Die grundlegende Idee ist dabei, mit Hilfe einer einfachen, schnellen Analyse von Rohextrakten oder sogar ganzen Zellen Organismen aufgrund eines für sie spezifischen Musters (spektrale Information z.B. FTIR oder eines Gesamtchromatogramms) unterscheiden zu können. Das kann beispielsweise mit Hilfe von NMR (*nuclear magnetic resonance*) [17, 18] oder FTIR (*fourier transform infrared spectroscopy*) [19] erfolgen.

Mit dem Metabolomicsansatz versucht man das ganze Metabolom ohne Ausnahmen zu erfassen. Der Ansatz kann auf verschiedenen Fragestellungen angewandt werden. So z.B. für Analyse von metabolischen Veränderungen entlang einer Wachstumskurve oder zur Korrelationsanalyse von Metaboliten unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Darüber hinaus ist es möglich, über einen *functional genomics*-Ansatz Änderungen in einem Genom auf Metabolitebene zu detektieren. Da dabei Genfunktionen unbekannt sind und der Bereich im metabolischen Netzwerk, in dem die Veränderungen stattfinden, nicht genau vorhergesagt werden kann, muss in jedem Fall das komplette Metabolom untersucht werden. Dies bedeutet, dass das Hauptziel dieses analytischen Ansatzes darin besteht, möglichst alle Unterschiede im Gehalt von jedem Metabolit zwischen einem nativen Organismus und einer Mutante zu detektieren. Es wird versucht, eine Optimierung auf eine bestimmte Gruppe von Komponenten zu vermeiden und die Methode generell für alle Metabolite zu optimieren. Absolute Metabolitkonzentrationen sind dabei nicht essentiell, weil immer ein Interesse an einem Vergleich zwischen verschiedenen Proben besteht [20, 21].

Aufgrund der chemischen Diversität von Metaboliten gegenüber Proteinen und mRNA stellt die Analytik von allen Stoffwechselprodukten eine große Herausforderung dar. Es gibt keine universelle Methode, die eine Analyse von allen Metaboliten gleichzeitig ermöglichen könnte. Deswegen müssen mehrere sich ergänzende *metabolic profiling*-Methoden im Rahmen des *metabolomics*-Ansatzes entwickelt werden. Es müssen bestimmte Anforderungen an eine Methode für die Metabolomanalyse gestellt werden. Die Methode sollte schnell sein, zuverlässig, empfindlich, geeignet für die Automatisierung und durch sie soll eine signifikante Anzahl von Metaboliten abgedeckt werden. Große Fortschritte wurden in der Metabolomanalyse für Pflanzen gemacht. Beispielsweise wurden in einem Blattextrakt von *Arabidopsis thaliana* mit Hilfe von GC-MS (*gas chromatography–mass spectrometry*) 326 Stoffe detektiert und relativ quantifiziert [22]. Bei Verwendung dieser Methode wurden einige Metabolite *de novo* identifiziert [23]. Es wurde auch versucht, durch diese Methode eine große Anzahl von Verbindungen gleichzeitig in einem chromatographischen Lauf absolut zu quantifizieren [15]. Da jedoch nur relativ kleine (bis Trisaccharide) Moleküle in der GC flüchtig sind, werden für die Analyse von Sekundärmetaboliten aus *Cucurbita maxima* Blättern und *Arabidopsis thaliana* HPLC-MS basierte Methoden angewendet [16, 24, 25].

### **1.3. Metabolomanalyse von Mikroorganismen**

Der *metabolomics*-Ansatz für einen „einfacheren“ Organismus wie ein Bakterium sollte einige Vorteile bringen. Die Wachstumsbedingungen können besser kontrolliert werden, die biologische Variabilität ist kleiner und es gibt keine Probleme mit der Kompartimentierung [26].

Die Untersuchungen von bakteriellen Zellen wurden über eine lange Zeit hinweg nur für eine begrenzte Anzahl von Stoffen durchgeführt. In Kombination von enzymatischen Analysen, HPLC und HPLC-MS wurden 29 intrazelluläre Metabolite aus dem Citratzyklus, der Glycolyse und einige Nucleotide in *Escherichia coli* quantitativ analysiert [27]. Ca. 70 intrazelluläre Metabolite konnten mittels einer TLC (*thin layer chromatography*)-Methode bei der Analyse von verschiedenen *E. coli* Stämmen detektiert werden und davon 10 identifiziert und relativ quantifiziert werden [28]. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie wurden in Hefe (*Pichia anomala*) 9 Metabolite analysiert und 7 Metabolite quantitativ gemessen [29]. In einer weiteren Studie wurden mittels NMR in Hefe 35 phosphorylierte Metabolite analysiert [30]. In metabolischen Flussanalysen wurden in *Corynebacterium glutamicum* 12 mit Isotopen markierte Metabolite mittels NMR untersucht [31]. Durch die MALDI-TOF-MS-Methode (*matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry*) wurden Lysin, Alanin, Glucose und Saccharose analysiert [32, 33]. Bei einer weiteren metabolischen *Flux-*

Analyse wurden Aminosäuren mit Hilfe von GC-MS untersucht [34]. Ein HPLC-Ansatz wurde zusammen mit enzymatischen Assays für die Bestimmung von 12 Metaboliten verwendet [35]. In einer komplexen Studie mit Proteom- und Transkriptomanalysen wurden 24 Metabolite mit Hilfe von Enzymassay, HPLC-UV und GC-MS quantitativ gemessen [36]. In der bakteriellen Taxonomie wurden verschiedene Organismen aufgrund von 12 Zuckern mittels GC-MS charakterisiert [37]. Mit direkter Infusion einer Hefekultur in ein ESI-MS wurden 25 Metabolite analysiert [38]. Vor kurzem wurde ein analytischer Ansatz, der auf CE-ESI-MS (*capillary electrophoresis electrospray ionisation mass spectrometry*) basiert für *Bacillus subtilis* beschrieben [39]. Die Anzahl von analysierten Metaboliten ist dabei mit Metabolomanalysen von Pflanzen vergleichbar. Es war mit dieser Methode möglich, gleichzeitig ca. 1700 Peaks zu detektieren. Von diesen wurden 150 Metabolite identifiziert und quantifiziert. Obwohl diese Methode im Vergleich zur GC-MS keine Begrenzungen in der Flüchtigkeit hat, ist die Analyse von einer Probe sehr zeitaufwändig (ca. 16 Stunden). GC-MS ist technisch einfacher und bietet vor allem einen großen Zeitvorteil (je ca. 1 Stunde für polare und lipophile Substanzen). Für die großen, nicht flüchtigen Metabolite kann die GC-MS basierte Methode mit der ebenfalls technisch relativ einfachen HPLC-MS (die Zeit für einen chromatographischen Lauf beträgt ca. 1 Stunde [24, 25]) ergänzt werden.

### **1.4. Modellorganismus *Corynebacterium glutamicum***

Das Bakterium *Corynebacterium glutamicum*, das befähigt werden kann viel Glutamat ins Medium zu exkretieren, wurde in der Mitte der 50er Jahre von japanischen Wissenschaftlern isoliert [40]. Das *Corynebacterium glutamicum* ist ein gram-positives aerob wachsendes Bodenbakterium, das zur Familie der Actinomyceten gehört und ist verwandt mit Pathogenen wie *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium leprae* und *Mycobacterium tuberculosis*. Es ist anpassungsfähig, so dass es auf verschiedenen Zuckern oder organischen Säuren wachsen kann. Unter optimalen Bedingungen kann dieser Organismus innerhalb einiger Tage große Mengen Glucose in Glutamat umwandeln. Daher ist *C. glutamicum* in der Lebensmittel und Futtermittelindustrie bedeutend. Neben Glutamat wird auch Lysin mit der Hilfe genetisch modifizierter Stämme [41] produziert. Die Weltproduktion beträgt dabei ungefähr  $1 \times 10^6$  Tonnen Glutamat und  $3 \times 10^5$  Tonnen Lysin pro Jahr [42]. Die industrielle Bedeutung dieses Bakteriums bildet eine Motivationsgrundlage zur Untersuchung dieses Organismus.

Das Genom des *C. glutamicum* Stammes ATTC 13032 wurde im Jahr 2003 vollständig entschlüsselt [2] wobei ungefähr 3000 proteinkodierende Gene identifiziert wurden. Durch

die Homologie zu bekannten Proteinen konnte theoretisch für 82% dieser Gene ihre vermutliche biologische Funktionen zugeordnet werden.

## 1.5. Derivatisierung

Die Derivatisierung spielt bei der GC-Analyse von biologischen Proben eine sehr wichtige Rolle. Erstens ist es möglich bei der Zuckeranalyse die Anzahl von Zuckerisomeren stark zu reduzieren, was die Komplexität des Chromatogramms deutlich verringert [43-45]. Dies wird durch eine Oximierungsreaktion erreicht. Als Oximierungsreagenzien können Hydrochloride von Hydroxylamin oder Methoxyamin, gelöst in Pyridin, verwendet werden.

In einem zweiten Schritt ist es wichtig, die Flüchtigkeit der Komponenten zu erhöhen. Das wird hauptsächlich durch eine Veresterung erreicht. Die universellste Methode ist dabei das Silylieren. Bei dieser Methode werden bei Verwendung von genug aggressiven Reagenzien nicht nur Carboxylgruppen sondern auch Hydroxy- und Aminogruppen derivatisiert. Die nach der Reaktion gebildeten Ester sind nicht nur flüchtiger sondern auch thermisch stabiler als die Ausgangssubstanzen. Mehr über Derivatisierung wird im Kapitel 3.6.4. diskutiert.

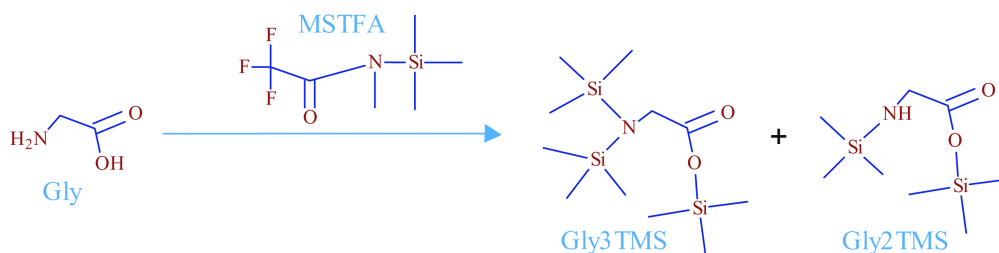


Abb. 1.0. Trimethylsilylierung von Glycin.

## 1.6. GC-Einspritztechniken

### Splitinjektion

Bei dieser Einspritztechnik werden die aus der eingespritzten Probenflüssigkeit entstehenden Dämpfe meistens stark ungleich geteilt: Ein kleiner Teil wird durch das Trägergas in die Trennsäule übertragen, während der Hauptteil durch den Splitausgang am unteren Ende des Verdampfers abgeführt wird. Der Anteil der Probe, der in die Säule gelangt, liegt normalerweise im Bereich von 0.3 bis 20% [46]. Drei Arten von Einspritzung mit Split sind im Gebrauch:

1. Einspritzung in eine permanent beheizte Kammer.
2. PTV-Einspritzung (*programmed temperature vaporizing*), Verdampfung mit programmierter Temperatur.

3. *On-column*-Einspritzung mit Split, bei der die Probendämpfe nach einer unbelegten Vorsäule geteilt werden.

Die Probendämpfe werden aus zwei völlig verschiedenen Gründen geteilt: einerseits zur Vermeidung einer Säulenüberladung, andererseits zur Erzeugung scharfer chromatographischer Anfangsbanden.

### **Splitlose Einspritzung**

Splitlose Einspritzung wird ohne Splitfluss- d.h. ohne Verlust eines Teils der Probe durch den Splitausgang- ausgeführt mit einem Injektor, der auch für Splitinjektion geeignet ist. Teilung wird vermieden, um eine höhere Empfindlichkeit zu erzielen. Vor der Einspritzung wird der Splitausgang geschlossen. Weil nun die Säule der einzige Ausgang aus der Verdampferkammer ist, transportiert das Trägergas (fast) die ganze Probe in die Säule.

### ***On-column*-Einspritzung**

Bei *on-column-Einspritzung* wird die (flüssige) Probe direkt in den Säuleneingang eingebracht. Dafür sind zwei Aspekte wichtig: Die verdampfende Probe soll nicht mit einer Verdampferkammer oder einer analogen Vorrichtung außerhalb der Säule in Kontakt kommen und die Einspritzzone im Säuleneingang soll ofenthermostatisiert sein. Es gibt keine Verdampfung bei einer Temperatur über jener der Trennsäule.

### **PTV-Eispritzung (PTV= *programmed temperature vaporizing*)**

Bei der PTV-Einspritzung wird die Probe indirekt, d.h. über eine Verdampferkammer, in die Trennsäule geführt- mit teilweisem (Split) oder vollständigem (splitlos) Proben transfer. Im Gegensatz zur klassischen verdampfenden Einspritzung befindet sich die Temperatur der Kammer unter dem Probensiedepunkt (meistens gegeben durch das Lösungsmittel). Nach dem Rückzug der Spritzenadel (sofort oder nach einer Wartezeit) wird die Verdampferkammer mit hoher Geschwindigkeit aufgeheizt. Die Temperatur des Injektors kann auch mit einem wählbaren Programm erhöht werden.

### **PTV-solvent *split*-Einspritzung**

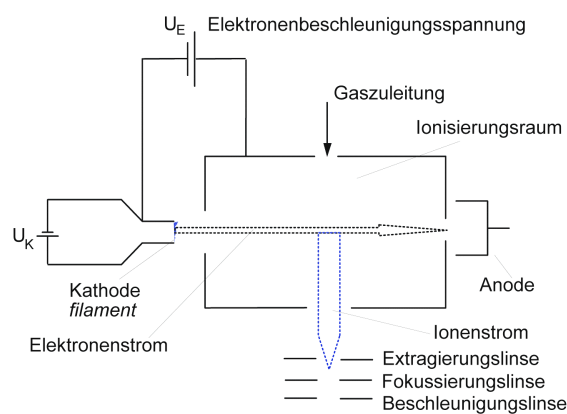
Bei PTV-solvent *split*-Einspritzung (oder *large volume*-Einspritzung) wird die Probe bei offenem Splitventil in einen kühlen Injektor gespritzt. Das Lösungsmittel und die flüchtigen Probenkomponenten verdampfen bei dieser Temperatur. Die Lösungsmitteldämpfe werden



unter Splitbedingungen abgeführt, d.h. der Hauptteil fließt durch den Splitausgang weg. Am Ende der Lösungsmittelabdampfung wird das Splitventil geschlossen, der Injektor aufgeheizt und das höhersiedende Probenmaterial splitlos in die Säule übertragen. In der splitlosen Einspritzung werden die Lösungsmitteldämpfe mit dem Säulenfluss aus der Verdampferkammer in die Säule übertragen. Bereits bei einem Einspritzvolumen von  $2\mu\text{L}$  kann die Verdampfung 2min dauern. Da die Verdampfungsgeschwindigkeit vom Fluss durch die Verdampferkammer abhängt, kann sie durch einen offenen Splitausgang drastisch erhöht werden. Dies ist vor allem für die PTV-Einspritzung grosser Probenvolumen von Interesse. Beispielsweise bilden  $100\mu\text{L}$  Lösungsmittel 15-40mL Dampf, der mit Trägergas leicht auf 100mL verdünnt wird [46]. Würde er durch die Trennsäule abgeführt, so wäre eine Lösungsmittelabdampfzeit (Lösungsmittelpeakbreite) von möglicherweise über einer Stunde zu erwarten. Bei einem Splitfluss von z.B. 50mL/min ist die Abdampfung bereits nach 2min beendet.

### 1.7. Elektronen-Ionisation (EI)

Die Elektronen-Ionisationsquelle (Elektronenstoßionisationsquelle) wurde von Dempster entwickelt und von Bleakney [47] und Nier [48] weiterentwickelt. Die Ionisationstechnik ist gut geeignet für Moleküle in der Gasphase und führt zur einer massiven Fragmentierung, so dass Molekülionen nicht immer beobachtet werden können. In Abb. 1.1 ist die Elektronen-Ionisationsquelle schematisch dargestellt.



**Abb 1.1.** Schematische Darstellung der EI- Ionisationsquelle.

Die Quelle besteht aus einer beheizten Rheniumkathode (*filament*), die Elektronen emittiert. Die Elektronen werden in Richtung Elektronenfänger (Anode) beschleunigt und kollidieren mit den gasförmigen Moleküle der zu analysierenden Probe, die in die Quelle injiziert wird. Jedes Elektron kann aufgrund des Welle/Teilchen Dualismus als eine Welle beschrieben werden, deren Wellenlänge  $\lambda$  sich wie folgt ergibt:

$$\lambda = \frac{h}{m v}$$

$m$  bezeichnet die Masse des Elektrons,  $v$ - seine Geschwindigkeit und  $h$  die Plancksche Konstante. Die Wellenlänge beträgt bei einer kinetischen Energie von 20eV 2.7Å und 1.4Å bei 70eV. Diese Wellenlänge entspricht in etwa der Länge einer chemischen Bindung. Entspricht die Frequenz eines Elektrons mit der Energie  $\hbar v$  der Energiedifferenz eines elektronischen Überganges innerhalb des Moleküls, ist die Resonanzbedingung erfüllt und das Molekül geht in einen angeregten Zustand über. Bei einer genügend großen Energie wird ein Elektron von angeregten Molekül ausgestoßen. Im Durchschnitt wird bei 70eV auf 1000 Moleküle ein Ion produziert. Auf ein Molekül wird dabei eine Energiemenge von 10-20eV übertragen. Da nur 10eV für die Ionisation der meisten organischen Moleküle ausreicht, führt der Energieüberschuss zu einer starken Fragmentierung des Moleküls. Das Fragmentierungsmuster liefert Informationen über die Struktur eines Moleküls.

### 1.8. Der Quadrupol Massenfilter

Die Massentrennung in einem Quadrupolsystem erfolgt durch die Überlagerung eines homogenen elektrostatischen Feldes mit einem Hochfrequenzfeld. Jeweils zwei, einander gegenüberliegende Elektroden sind miteinander verbunden (Abb 1.2). An die beiden Elektrodenpaare wird eine aus einer Gleichspannung  $U$  und einer hochfrequenten Wechselspannung  $V$  zusammengesetzte Spannung  $\varphi=(U+V\cos\omega t)$  angelegt. Ionen der Masse  $m$ , die in das Elektrodensystem eingeschossen werden, bewegen sich unter dem Einfluß des hochfrequenten Feldes auf einer Wellenbahn durch das System. Mit den Abkürzungen (für einfach geladener Ion)

$$\omega t = 2\xi \quad ; \quad a = \frac{8eU}{mr_0^2\omega^2} \quad ; \quad q = \frac{4eV}{mr_0^2\omega^2}$$

$m$  – Masse des Ions

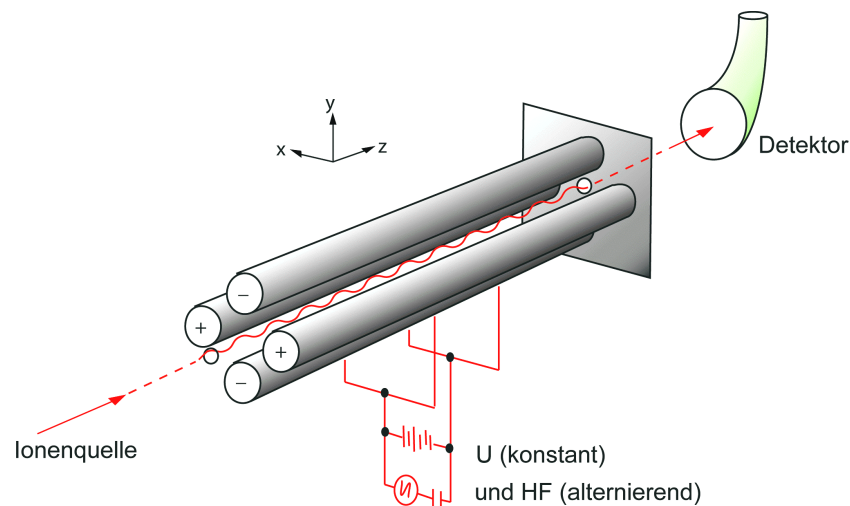
$r$  – Radius des zwischen den Quadrupolstäben zur Verfügung stehenden Raums

$e$  – Elementarladung  
 $U$  – Gleichspannung  
 $V$  – Wechselspannung  
 $\omega$  - Kreisfrequenz  
 $\xi = \pi ft$   
 $f$  – Frequenz der Wechselspannung

werden die Bahngleichungen der Ionen in  $x$ - und  $y$ - Richtung durch Mathieu'sche Differenzialgleichungen beschrieben:

$$x'' + (a + 2q \cos 2\xi) \cdot x = 0$$

$$y'' - (a + 2q \cos 2\xi) \cdot y = 0$$



**Abb.1.2.** Quadrupol-Massenfilter

In die  $z$ -Richtung bewegen sich die Ionen mit ihrer ursprünglichen Geschwindigkeit. Nur für bestimmte Werte der Größen  $a$  und  $q$  gelangen die Ionen durch das ganze Stabsystem hindurch, ohne sich vorher quer zu ihrer Einschussrichtung so weit aufzuschaukeln, dass sie auf eine der vier Elektroden auftreffen und dort entladen werden und somit nicht zum Detektor gelangen.

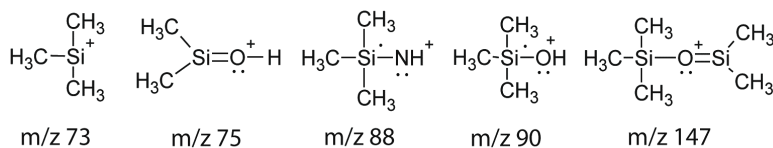
## **1.9. Verallgemeinerung von GC-MS basierten Methoden für verschiedene Stoffklassen**

Ein breites Spektrum von Verbindungen verschiedener Natur kann mit GC oder GC-MS analysiert werden. Dabei wird die Flüchtigkeit von Komponenten durch eine Veresterung erhöht [43]. Die Derivatisierung durch Trimethylsilylierung ist seit langem für verschiedene

Klassen von chemischen Verbindungen bekannt [43, 49, 50]. In der Zuckeranalytik konnte zunächst die Anzahl von ringförmigen und offenkettigen Isomeren durch eine Oxymierungsreaktion verringert werden. Anschließend wurden die Stoffe trimethylsilyliert [51]. Die Ähnlichkeit von Derivatisierungsreaktionen macht es möglich, eine generelle Methode für die gleichzeitige Derivatisierung von allen Komponenten zu entwickeln. Diese Idee wurde für Proben pflanzlicher Herkunft erfolgreich angewendet [15, 22, 44, 45, 52]. Neben der Möglichkeit freie Fettsäuren als trimethylsilylierte Derivate zu analysieren, besteht eine Möglichkeit, große, nicht flüchtige Fette und Phospholipide zu hydrolysieren und durch die Analyse der dadurch freigesetzten Fettsäuren Informationen über diese Substanzen zu erhalten. Die Hydrolyse von Lipiden und die anschließende Veresterung von Fettsäuren kann in einem Schritt durch eine Transmethylierung erreicht werden [53].

### 1.10. Massenspektrometrische Charakterisierung von trimethylsilylierten und oxymierte Verbindungen

Für wichtige Stoffklassen sind bereits Informationen über die massenspektrometrische Charakterisierung ihrer Trimethylsilylderivate vorhanden. Allgemein produzieren TMS-Derivate (Trimethylsilylderivate) von organischen Verbindungen nach EI-Ionisierung für die TMS-Gruppe charakteristische Ionen [54]. Die Ionen, die nur für die TMS-Gruppe charakteristisch sind und keinen Beitrag zur Strukturaufklärung leisten, sind in Abb.1.3 dargestellt.



**Abb. 1.3.** Fragmente, die allgemein für TMS-Derivate charakteristisch sind.

### Aminosäuren

Bei Aminosäurederivaten treten die in Abb.1.3 dargestellten Ionen am häufigsten auf. Weitere Fragmentierungsreaktionen spielen eher eine untergeordnete Rolle [54].

In der Tabelle 1.1 sind einige allgemeine Fragmentionen für Aminosäuren zusammengefasst. Die meisten von ihnen tragen nicht zur Strukturaufklärung bei.

**Tabelle 1.1.** Allgemeine Fragmentationen für Aminosäuren.

Fragmentierung	Herkunft
M-15	M-CH <sub>3</sub>
M-29	M-(CH <sub>3</sub> +CH <sub>2</sub> )
M-43	M-(CH <sub>3</sub> +CO)
M-72	M-((CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Si-H)
M-73	M-(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Si
M-87	M-CH <sub>3</sub> ((CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Si-H)
M-89	M-(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> SiO
M-90	M-(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> SiOH
M-102	M-(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Si-CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub>
M-104	M-CH <sub>3</sub> -(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> SiO
M-105	M-CH <sub>3</sub> -(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> SiOH
M-116	M-((CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> SiCO <sub>2</sub> -H)
M-117	M-(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> SiCO <sub>2</sub> H
M-133	M-CH <sub>3</sub> -CO-(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> SiOH
M-162	M-(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Si-(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> SiO
218	M-R (für α-Aminosäuren)

Das allgemeine Fragmentierungsmuster für α-Aminosäuren ist in Abb.1.4 dargestellt.

Die häufigsten, charakteristischen Fragmente von TMS-α-Aminosäuren sind M-15 (CH<sub>3</sub>), M-43 (CH<sub>3</sub>+CO), M-117 (CO<sub>2</sub>TMS) und M-R. Als konkretes Beispiel ist die massenspektrometrische Fragmentierung von zweifach silyliertem Alanin (α-Spaltung) in Abbildung 1.5 dargestellt.

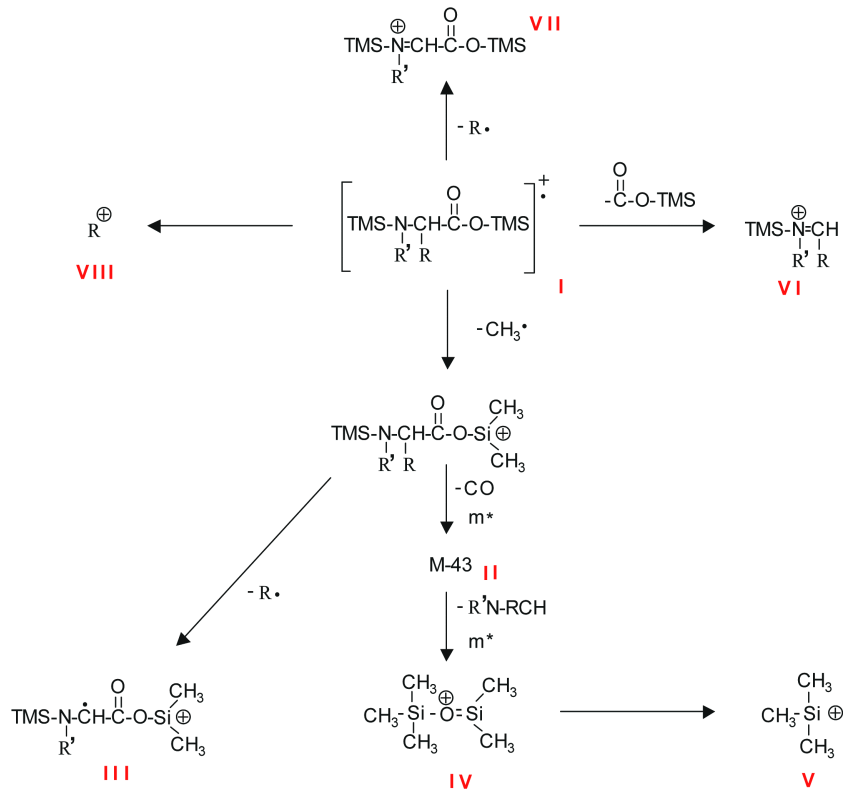


Abb. 1.4. Massenspektrometrischer Fragmentierungsweg von TMS- $\alpha$ -Aminosäuren.

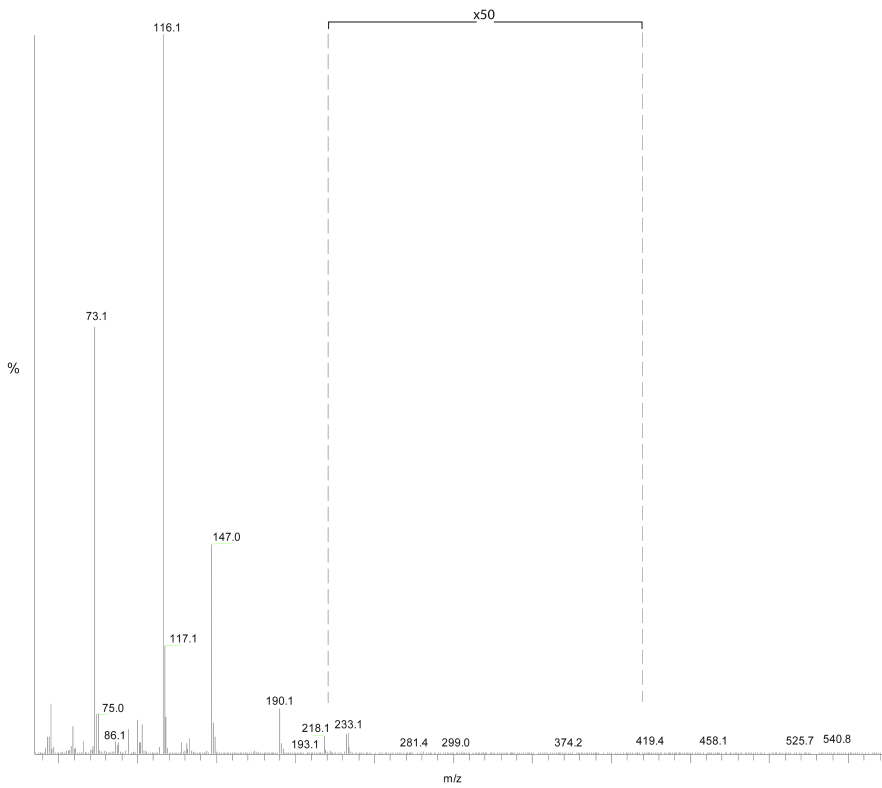
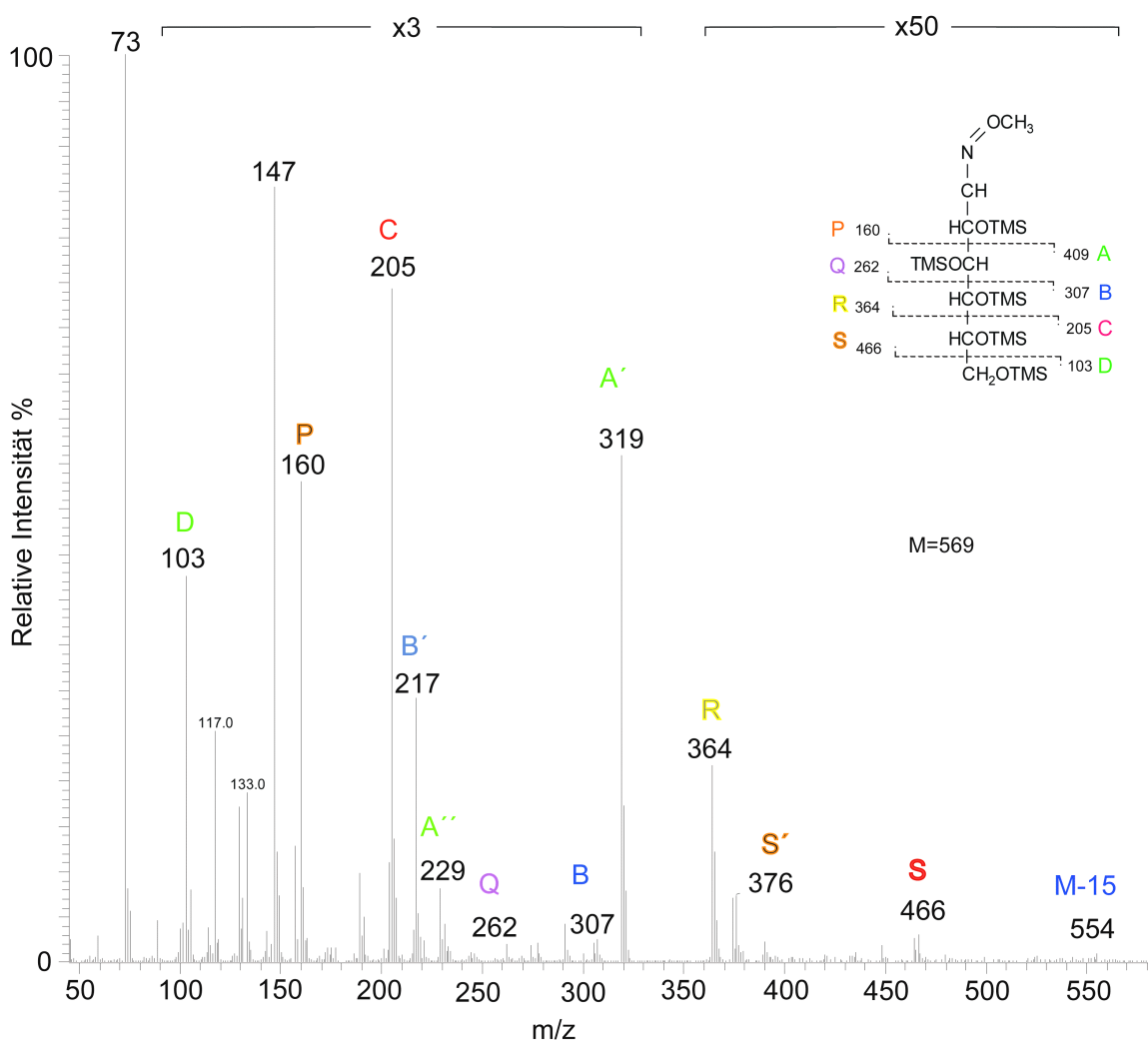


Abb. 1.5. Massenspektrometrische Fragmentierung von Alanin2TMS (N,O-di-TMS-Alanin).

## Methoxymierte und trimethylsilylierte Zucker

Für die meisten Zucker ist, wie für Aminosäuren, ein allgemeines Fragmentierungsmuster charakteristisch [51, 55]. Außer den üblichen, für alle trimethylsilylierten Verbindungen charakteristischen Fragmentationen  $m/z=73$  und  $m/z=147$  (siehe oben), wird in erster Linie die Kohlenstoffkette fragmentiert (Abb. 1.6). Darüber hinaus kann ein M-15 Fragment gefunden werden und zusätzlich Fragmente, die durch den Verlust von TMSOH ( $m/z=90$ ) von jedem Spaltungsfragment der Kohlenstoffkette entstehen.

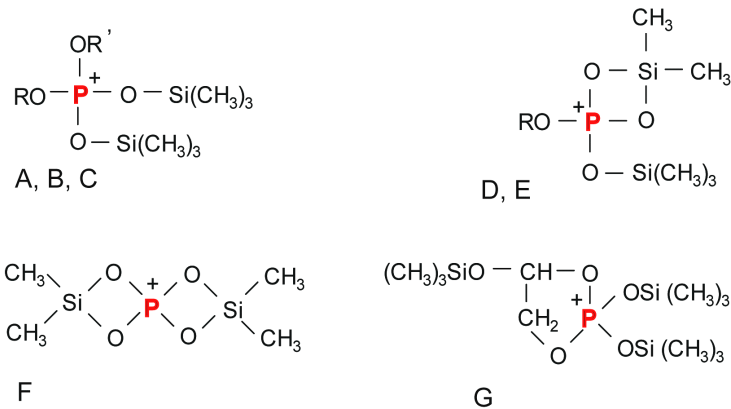


**Abb. 1.6.** Hauptfragmentierungsmuster und Massenspektrum von Penta-O-trimethylsilyl-D-glucose-O-methoxim, Molekularmasse  $M=569$ .

In dem oben gezeigten Beispiel hat das größte Ion eine Masse von  $m/z=554$ , dies entspricht dem Verlust eines Methylradikals vom Molekularion. Das Ion  $m/z=466$  repräsentiert das Fragment S. (siehe Abb. 1.6). Durch einen Strich wird der Verlust einer TMSOH-Gruppe angezeigt.

## Methoximierte und trimethylsilylierte Zuckerphosphate und ähnliche Verbindungen

Die Massenspektren von derivatisierten Zuckerphosphaten zeigen ein ähnliches Fragmentierungsmuster [50, 56]. Generell fehlen in den Massenspektren die Molekularionen oder sie sind nur mit einer sehr kleinen Intensität im Massenspektrum vorhanden. Dagegen können aus den Molekularionen hervorgehende Folgeprodukte als schwache Peaks von  $M+1$  und  $M+73$  oft gefunden werden. In diesem Zusammenhang sollten die Zuordnungen von einem Molekularionpeak in Massenspektren von unbekanntem Zuckerphosphaten mit Vorsicht festgelegt werden. Das Fragmentation mit der höchsten Masse ist normalerweise das Fragment  $[M-15]^+$ , das durch den Verlust eines Methylradikals von einer TMS-Gruppe entsteht. In den Spektren dominieren Ionen, die durch Umlagerungsreaktionen entstehen. Sie enthalten das resonanzstabilisierte Phosphoniumkation (Abb. 1.7).



**Abb. 1.7.** Charakteristische Ionen in Massenspektren von phosphorylierten und methoximierten Zuckern und ähnlichen Verbindungen. (A)  $R=R'=Si(CH_3)_3$ ,  $m/z=387$ , (B)  $R=H$  und  $R'=Si(CH_3)_3$ ,  $m/z=315$ , (C)  $R=R'=H$ ,  $m/z=243$ , (D)  $R=Si(CH_3)_3$ ,  $m/z=299$ , (E)  $R=H$ ,  $m/z=227$ , (F)  $m/z=211$ , (G)  $m/z=357$

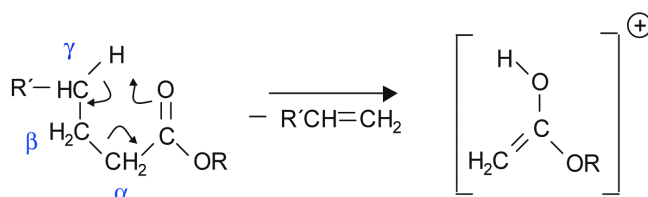
Die Ionen A, B und C werden durch eine Migration der TMS-Gruppe und/oder eines Wasserstoffatoms auf das Fragment, das die Phosphatgruppe trägt, gebildet. Die Ionen D, E und F sind Fragmentationen, die aus den Ionen A, B und C entstehen. Das phosphathaltige Fragmentation G mit der Masse  $m/z=357$  enthält zwei zusätzliche Kohlenstoffatome aus der Kohlenstoffkette und ist ebenfalls charakteristisch für diese Derivate. Die Unterschiede in der Intensität der Ionen A-E spiegeln die Stereochemie der Moleküle wider.

## Ester von organischen Säuren

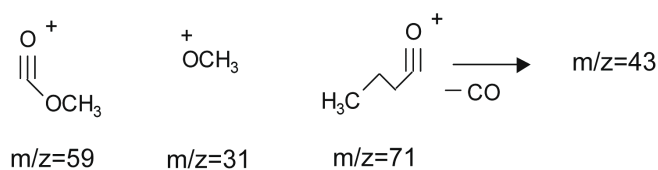
Verbindungen, in denen eine polarisierte Doppelbindung, z.B. eine C=O- Gruppe und eine dazu  $\gamma$ -ständige C-H, O-H- oder N-H-Gruppe vorhanden sind, werden in vielen Fällen



besonders leicht durch eine McLafferty-Umlagerung gespalten [57]. Sie ist besonders charakteristisch für Säuren und Säurederivate (Abb. 1.8).



**Abb. 1.8.** McLafferty Umlagerung von Carbonsäureestern.



**Abb. 1.9.** Fragment-Ionen, die durch eine  $\alpha$ -Spaltung und CO Verlust entstehen (Methylester).

Die Molekülonen der Methylester geradkettiger, aliphatischer Säuren erreichen meist eine hohe Intensität. Als Hauptabbauprodukt für Methylester entsteht ein Ion mit  $m/z=74$ .

Durch weitere Umlagerungsreaktionen können die Fragmente  $m/z=143$  und  $m/z=87$  entstehen [58]. Die Fragmentationen  $m/z=31$ ,  $m/z=59$ ,  $m/z=71$  lassen sich durch eine  $\alpha$ -Spaltung erklären. Aus  $m/z=71$  entsteht durch Verlust von CO ein Fragment mit  $m/z=43$  (Abb 1.9).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Chemikalien, Materialien und Software

#### 2.1.1 Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von Fluka-Sigma-Aldrich & Co (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland) und Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen und hatten p.a.-Qualität. Für die schnelle Aufzucht von Bakterien wurde BHI-Bouillon (BHI= *Brain Heart Infusion*) (Difco, Detroit, USA) mit folgender Zusammensetzung verwendet: Kälberhirninfusion 200g, Rinderherzinfusion 250g, Proteose-Pepton 10g, Dextrose 2g, NaCl 5g, Dinatriumphosphat 2.5g. Eine Mischung von Methylestern bakterieller Säuren wurde von Supelco (Deisenhofen, Deutschland) gekauft. Methyl-d,l-threo-Corynomycolat C32 wurde von Matreya (Pleasant Gap, USA) bezogen. MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid) zur Derivatisierung wurde von CS Chromatography Service GmbH (Langerwehe, Deutschland) gekauft. Das Helium für die GC entsprach dem Reinheitsgrad 4.6, 99.996% (Vol.), der Stickstoff zum Trocknen der Proben entsprach dem Reinheitsgrad 4.0, 99.99% (Vol.). Iso-Butan 99.5% (Vol.) wurde von Messer Griesheim (Krefeld, Deutschland) bezogen. Das destillierte Wasser für biologische Arbeiten wurde frisch vorbereitet in einer Seralpur Delta UV (Seral, Ransbach-Baumbach, Deutschland) Anlage, ultra-filtriert durch einen 0.2 µm Supor-DCF-Filter (Gelman Sciences Inc., Montreal, PQ, Canada). Für HPLC Trennungen wurden das „LiChrosolv“ Wasser (Merck, Deutschland) und „LC-MS Chromasolv“ Acetonitril (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland) verwendet.

#### 2.1.2 Materialien, Geräte und Software

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Massenspektrometer</b>	
TraceMS (EI/CI-Quadrupol-MS)	Thermo Electron (Finnigan), Dreieich
LCQ (ESI-IonTrap-MS)	Thermo Electron (Finnigan), Dreieich

### **GC-System**

Gaschromatograph TraceGC	Thermo Electron (Finnigan), Dreieich
Helium-Reinigungssystem Gas-Clean	Varian, Darmstadt
Autosampler AS2000	Thermo Electron (Finnigan), Dreieich

### **HPLC-System**

Binäre Pumpe HP1100	Agilent (Hewlett Packard), Waldbronn
Online Entgaser HP1100	Agilent (Hewlett Packard), Waldbronn
Autosampler HP 1100	Agilent (Hewlett Packard), Waldbronn

### **Aufkonzentrator (*SpeedVac*)**

<b>Concentrator 5301</b>	Eppendorf, Hamburg
--------------------------	--------------------

### **Zentrifugen**

5417 C und 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Z383K	Hermle, Wehingen

### **Schüttler**

Ceromat BS-1 und Ceromat R	B.Braun Biotech, Melsungen
KL2C	Otto (Edmund Bühler) Hechingen

### **Sonstige Geräte**

pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
pH-Elektrode Typ Nr. 6280	Schott-Geräte, Hofheim
Spektralphotometer Ultrospec 2000	Pharmacia,Uppsala (Schweden)
Rotorkonzentrator Rotavapor RE111	Büchi, Flawil (Schweiz)
Membranpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Reinstwasseranlage Seralpur Delta UV	Seral, Ransbach-Baumbach
Analysenwaage FA-210-4	Faust, Köln
Laborwaage SBA 52	Scaltec, Heiligenstadt
Heizblock	Bibby/Stuart Scientific, Redhill Surrey, (UK)
Aufsatz zum Trocknen mit Stickstoff	Feinmechanische Werkstatt, Universität zu Köln
Ultraschallbad Sonorex RK100H	Bandelin, Berlin
Temperierbad IKA TS2	Janke&Kunkel / IKA, Staufen
Mixer IKAMAG RH	Janke&Kunkel / IKA, Staufen

Mikromixer (Vortex) Reax Top und Reax2000	Heidolph Instr., Schwabach
Filtereinsatz 30mL mit 100-160µm Filterplatte	Carl Roth, Karlsruhe
GC-Spritzen 10µL mit 70mm Nadel (konisch) und 5µL mit 50mm Nadel (abgeschrägt)	SGE, Darmstadt
LC-Spritze 100µL	SGE, Darmstadt
LC-Spritze 250µL	Unimetrics, Shorewood (US)
Pipetten	Eppendorf, Hamburg

## Materialien

## Hersteller

### Chromatographische Säulen

#### GC-Säule

DB5ms 30m×0.25mm×0.25µm

J&W Scientific, Folsom (CA)

#### HPLC-Säulen

TSKgel Amide-80 2.0mm×250mm×5µm

Tosohaas, Stuttgart

Aqua 2.0mm×250mm, 5µ C18

Phenomenex, Aschaffenburg

SecurityGuard C18(ODS)4×3.0mmID

Phenomenex, Aschaffenburg

#### GC-Liner

Silcosleeve 120.0×2.0ID×2.75OD mm

Restek, Bad Homburg

Glas 120.0×2.0ID×2.95OD mm

Restek, Bad Homburg

Glas 105.0×5.0ID×8.0ODmm

Thermo Electron (Finnigan), Dreieich

#### Septen

Für Gaschromatographie,

Thermolite 12.5mm und 17mm

Restek, Bad Homburg

Für Probengläser, 8-ST 101

Chromacol, Herts (UK), Kupfer,  
Pfungstadt

#### Sonstige Materialien

Deaktivierte Glaswatte

Restek, Bad Homburg

Probengläser 1.8mL N8-1

Macherey-Nagel, Düren

Mikroeinsatz G30s

CS-Chromatographie, Langerwehe

Schraubkappen 8-SC	Chromacol, Herts (UK), Kupfer, Pfungstadt
Zentrifugenröhrchen 29×103mm 253205	Herolab, Wiesloch
DURAN 7mL Glasröhrchen12×100mm K248.1	
mit gasdichtem Schraubverschluss	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 2mL, 1.5mL, 0.5mL	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 2mL	
mit Sicherheits- und Schraubverschluß	Biozym, Hess. Oldendorf
Falcon-Gefäße 15mL und 50mL	Eppendorf, Hamburg
Filter für Zellen Supor-450 25mm, 0.45µm Porengröße	Pall, Dreieich
Filter zum Sterilfiltrieren Acrodisc	Pall, Dreieich
Filter für Wasser Supor DCF	Gelman Sciences Inc., Montreal (Canada)

**Software (Hersteller)****Beschreibung**

Xcalibur 1.2 (Thermo Electron (Finnigan), Dreieich)	Instrumentensteuerung und Datenaufnahme Verwendet für: -quantitative Auswertung von GC-MS Daten -einfache manuelle Auswertung von LC- und GC-MS Daten
AMDIS 2.1 (NIST, Gaithersburg, USA)	automatische qualitative Auswertung von GC-MS Daten, Aufbau der MS-Bibliothek <a href="http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/">http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/</a>
MS-Search 1.7	Aufbau der MS-Bibliothek
MS-Search 2.0 (NIST, Gaithersburg, USA)	Identifikation von unbekanntem Stoffen aufgrund ihrer Massenspektren mit Hilfe von MS-Bibliotheken <a href="http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/">http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/</a>
Processing 1-5 (selbst-programmiert)	Automatische Auswertung von GC-MS Daten auf Xcalibur Basis

Macros 2, Postprocess2 (selbst-programmiert)	Umwandlung von Xcalibur-Reports in ein übersichtliches Format
---	--

***Programiersprachen und Ressourcen***

VisualBasic 6	Erstellung von Programmen
---------------	---------------------------

Xcalibur Development Kit	Xcalibur-basiertes Entwicklungskit
--------------------------	------------------------------------

VisualBasicEditor for Applications	Erstellung von Makros in der MS-Office Umgebung
---------------------------------------	--

NIST-MS Library	MS Bibliothek mit ca. 100000 MS-Spektren
-----------------	--

***Datenbanken***

KEGG	Stoffwechselkarten <a href="http://www.genome.ad.jp/kegg/">http://www.genome.ad.jp/kegg/</a>
------	---

ChemFinder	Physikalische und chemische Eigenschaften von Metaboliten <a href="http://chemfinder.cambridgesoft.com/">http://chemfinder.cambridgesoft.com/</a>
------------	---

Beilstein	Physikalische und chemische Eigenschaften von Metaboliten
-----------	--

---

## 2.2 Biologische Methoden

### 2.2.1. Zellaufzucht

Wenn nicht anders beschrieben, wurde für die Experimente *Corynebakterium glutamicum* Wildtyp ATCC13032 benutzt. Die Zellen wurden auf BHI-Agar in einer Petrischale bei 4<sup>0</sup>C aufbewahrt und alle drei Monate auf eine neue Petrischale übertragen.

### BHI-Kultur

Um die Zellen zum aktiven Wachstum zu bringen und die Zellenmenge zu erhöhen, wurde eine BHI-Kultur eingesetzt.

Von der Petrischale wurden die Zellen unter einer Sterilbank mit einem Glasstab in 20mL BHI-Medium (37g/L) angeimpft und bei 30<sup>0</sup>C 6-8 Stunden auf einem Schüttler (180rpm) inkubiert.

### Minimalmedium

Für alle weiteren Schritte wurde das Minimalmedium MM1 verwendet. Die Zusammensetzung dieses Mediums ist in folgender Tabelle dargestellt:

**Tabelle 2.1.** Zusammensetzung des MM1 Mediums

Stoff	Endkonzentration	Bemerkung
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g/L	Stickstoffquelle
Harnstoff	5 g/L	Stickstoffquelle
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	2 g/L	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g/L	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.25 g/L	
CaCl <sub>2</sub>	0.01 g/L	
Glukose	20 g/L	Kohlenstoffquelle
Biotin	0.2 mg/L	Vitamin H
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	28.5 mg/L	Spurensalze
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16.5 mg/L	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	6.4 mg/L	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.764 mg/L	
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.128 mg/L	
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.044 mg/L	
Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.064 mg/L	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.048 mg/L	
SrCl <sub>2</sub>	0.05 mg/L	
BaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.05 mg/L	
KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.028 mg/L	

Das Minimalmedium wurde aus verschiedenen Stammlösungen zusammengemischt. Zuerst wurde eine Grundstocklösung in 947mL destilliertem Wasser vorbereitet, auf pH=7 mit 5M KOH eingestellt und autoklaviert.

**Tabelle 2.2.** Grundstocklösung

Stoff	Menge g/947mL
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5
Harnstoff	5
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	2
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2

Als nächstes wurden eine 25g/L  $\text{MgSO}_4$ -Lösung und eine 10g/L  $\text{CaCl}_2$ -Lösung in destilliertem Wasser vorbereitet und autoklaviert.

20 mg Biotin wurde in 100mL destilliertem Wasser gelöst und durch ein Sterilfilter filtriert.

Die Glucose-Lösung (500g/L) wurde durch einen Sterilfilter filtriert.

Für die Spurensalze wurde eine 1000-fache Stammlösung angesetzt, die mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf pH=1 eingestellt und durch einen Sterilfilter filtriert wurde.

**Tabelle 2.3.** Spurensalzlösung

Stoff	Menge, g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	28.5
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6.4
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.764
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.128
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.044
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.064
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.048
$\text{SrCl}_2$	0.05
$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.028

Anschließend wurden alle Lösungen in einem Schüttelkolben entsprechend dem Zielvolumen zusammengemischt.



**Tabelle 2.4.** Komponenten für die Zusammensetzung des Minimalmediums

Komponente	Vol für 100mL Kultur
Grundstock-Lösung	94.7mL
MgSO <sub>4</sub> -Lösung	1mL
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	100µL
Glucose-Lösung	4mL
Biotin-Lösung	100µL
Spurensalz-Lösung	100µL

Die Stammlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt.

### Übernachtskultur

Für die Adaptation des Organismus auf die Bedingungen des Minimalmediums wurde eine Übernachtskultur eingesetzt.

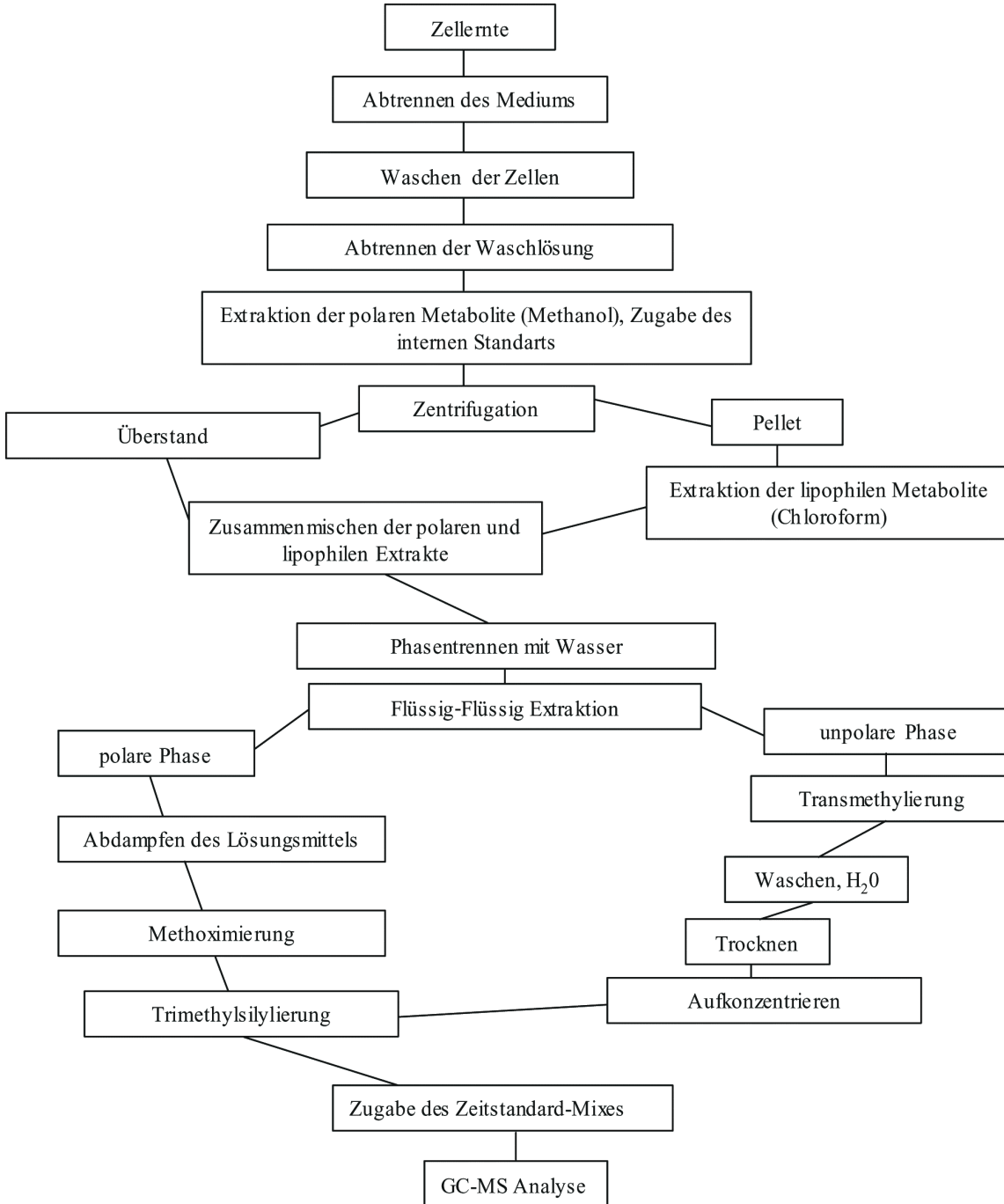
Dafür wurden 2-3mL der inkubierten BHI-Kultur in 10-30mL Minimalmedium überimpft und bei 30°C über Nacht auf einem Schüttler (180rpm) inkubiert.

### Hauptkultur

Die MM1-Hauptkultur wurde mit der Übernachtskultur so angeimpft, dass sich bei 600 nm eine optische Dichte von 1 ergab. Standardbedingungen für Schüttelkolben-Fermentation waren 30°C, mit ungehinderter Luftzufuhr, wobei die Schüttelgeschwindigkeit 180rpm betrug. Das Wachstum wurde im Laufe der Fermentation mit Hilfe von OD-Bestimmungen verfolgt.

### 2.3 Probenaufarbeitung

Der komplette Probenaufarbeitungsprozess ist in folgendem Fließschema dargestellt:



**Abb. 2.1.** Fließdiagramm des Probenaufarbeitungsprozesses.

### 2.3.1. Zellenernte

Für die Zellenernte wurden Zentrifugationsgefäße aus Polypropylen mit gasdichtem Schraubverschluss ausgewählt, die bei hohen Zentrifugationsgeschwindigkeiten mechanisch stabil sind und die folgenden Extraktionsschritte mit organischen Lösungsmitteln in dem selben Gefäß zulassen.

Die bis zu einer bestimmten  $OD_{600}$  kultivierten Zellen ( $OD_{600}=4-5$  für die beginnende exponentielle Wachstumsphase und  $OD_{600}=34-35$  für die stationäre Wachstumsphase) wurden vom Medium in 50 mL Polypropylen-Zentrifugationsröhrchen durch Zentrifugation (2 min, 12000 g (Festwinkelrotor) bei  $30^{\circ}\text{C}$ ) getrennt. Um später immer die gleiche Menge an Bakterien für die Extraktion zu verwenden, wurde vor der Zentrifugation das Volumen der Probe anhand der aktuellen OD angepasst. Da das optimale Volumen bei  $OD_{600}=5$  40mL beträgt ist das benötigte Probenvolumen wie folgt zu berechnen:

$$V(\text{mL})=200/OD$$

Der Überstand wurde verworfen.

### 2.3.2. Waschen der Zellen

Nach dem Abtrennen des Mediums, wurde das Pellet mit 40 mL vorgewärmter NaCl-Lösung ( $30^{\circ}\text{C}$ , 0.9%) schnell und ohne Resuspendieren gespült und die Spüllösung wurde verworfen. Dieser Schritt dient zur Entfernung von Medienresten. Das Waschen der Zellen wurde ebenfalls mit 40mL dieser 0.9%igen NaCl-Lösung durch Resuspendieren der Zellen durchgeführt. Um die Zellen schnell resuspendieren zu können, war es hilfreich ein Stäbchen zu benutzen und zuerst nur 20mL der Waschlösung zu nehmen. Dadurch wurde ein effizienteres Resuspendieren erreicht. Abschließend wurden dann weitere 20mL 0.9%iger NaCl-Lösung in das Zentrifugationsröhrchen gegeben und kräftig durchmischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2 min, 12000 g (Festwinkelrotor) bei  $30^{\circ}\text{C}$ ) wurde der Überstand verworfen und das Pellet noch einmal wie oben beschrieben gespült.

### **2.3.3. Anfängliche Extraktionsmethode**

Als Basis für die Entwicklung einer neuen Methode zur Messung intrazellulärer Metabolite wurde die Strategie für die Untersuchung des pflanzlichen Metaboloms übernommen [22, 23].

#### **2.3.3.1 Extraktionsvorgang, wenn sowohl die polaren als auch die lipophilen Metabolite untersucht werden (primäre Methode)**

Das Pellet wurde mit Hilfe einer 1mL Eppendorfpipette in 1.4mL Methanol resuspendiert und vollständig in ein 2mL Eppendorfgefäß überführt. Als interne Standards wurden 50µL 0.2g/L Ribitolösung und 50µL 2g/L Nonadekansäuremethylester in Chloroform zugegeben. Das Eppendorfgefäß wurde in ein Heizbad gestellt und dort für 15min bei 70°C inkubiert, wobei die Extraktion polarer Metabolite stattfand. Nach der Zentrifugation bei 12000g für 5min wurde der Überstand in ein 7mL Glasgefäß mit gasdichtem Schraubverschluss überführt und geschlossen. Das Pellet wurde mit 750µL Chloroform resuspendiert und lipophile Metabolite bei 35°C (5min) extrahiert.

Das Eppendorfgefäß wurde 5min bei 14000g zentrifugiert, der Überstand – vorsichtig und möglichst ohne Pellet – mit dem methanolischen Extrakt in dem Glasgefäß vereinigt. Das Pellet wurde verworfen. Zu dem Gemisch wurden 1.4mL Wasser gegeben. Durch häftiges Durchmischen (5 min Vortex) fand die flüssig-flüssig Extraktion statt, wobei sich die Metabolite gemäß ihrer Polarität zwischen der wässrigen und der Chloroform- Phase verteilen. Anschließend wurden die beiden Phasen durch Zentrifugation (15min, 4000rpm) getrennt. Von der Methanol-Wasser-Phase wurde 1mL in ein 1.8mL Probenglas zum Trocknen überführt.

Von der Chloroform-Phase wurden 700µL in ein 7mL Glasgefäß mit gasdichtem Schraubverschluß überführt.

#### **2.3.3.2 Transmethylierung der unpolaren Phase**

Zu der Chloroform-Phase wurden 900µL Chloroform und 1mL Methanol mit 3%(Vol.) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gegeben. Das Gefäß wurde fest geschlossen und bei 100°C für 4 Stunden in einem Heizblock inkubiert. Nach dem Abschluss der Reaktion wurde die Lösung 2 mal mit 4mL Wasser gewaschen (extrahiert). Dazu wurden 4mL Wasser zugegeben, das Gefäß für 2min geschüttelt (Vortex) und für 5min bei 4000rpm zentrifugiert. Das Wasser wurde jedes Mal mit einer Pasteurpipette entnommen und verworfen. Zu der verbliebenen Chloroform-Phase

wurde eine Spatelspitzen  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  zum Trocknen gegeben und das Gefäß mit der Probe leicht geschüttelt. Nach dem Sedimentieren des  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (5 Min stehenlassen) wurde die flüssige Phase vorsichtig in ein Probenglas überführt und war damit für weitere Aufkonzentrierungs- und Derivatisierungsschritte vorbereitet.

#### **2.3.3.3 Aufkonzentration mittels eines Stickstoffstroms**

Die 1.8mL Probengläser mit den methanolischen Extrakten polarer Metabolite wurden in einen Heizblock mit Aufsatz für das Abblasen gestellt und die Flüssigkeit bei  $30^\circ\text{C}$  unter einem leichten Stickstofffluß für ungefähr 30min - abhängig vom Probenvolumen - abgedampft. Die Vollständigkeit des Trocknes wurde optisch kontrolliert.

Unter gleichen Bedingungen wurde die unpolare Phase nach der Transmethylierung aufkonzentriert.

#### **2.3.3.4 Derivatisation der polaren Phase**

Zuerst wurden die Proben methoxymiert. Dafür wurden zu der getrockneten Probe  $50\mu\text{L}$  einer Pyridinlösung von Methoxyaminhydrochlorid ( $20\text{mg}/\text{mL}$ ) zugegeben. Das Probenglas wurde fest verschlossen. Die Derivatisierung fand über 90min bei  $30^\circ\text{C}$  auf einem Schüttler bei 250rpm statt.

Dem ersten Derivatisierungsschritt folgte eine Silylierung mit MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid). Zu der Probe wurden  $80\mu\text{L}$  MSTFA gegeben, das Probenglas wurde wieder fest verschlossen und die Derivatisierung erfolgte über 30min bei  $37^\circ\text{C}$  auf einem Schüttler bei 250rpm. Anschließend wurde die Probe zur Komplettierung der Reaktion bei Raumtemperatur für weitere 2 Stunden inkubiert.

#### **2.3.3.5 Derivatisation der unpolaren Phase**

Zu der bis auf  $60\mu\text{L}$  aufkonzentrierten Probe wurden  $10\mu\text{L}$  Pyridin und  $10\mu\text{L}$  MSTFA gegeben. Das Probenglas wurde fest verschlossen und die Probe wurde bei  $37^\circ\text{C}$  auf einem Schüttler bei 250rpm für 30min inkubiert. Anschließend wurde die Probe zur Komplettierung der Reaktion bei Raumtemperatur für 2 Stunden stehen gelassen.

#### **2.3.3.6. Alkanmix**

Dem Derivatisierungsprozess folgte die Zugabe eines Zeitstandard-Mixes für die Gaschromatographie. Dafür wurden je  $20\mu\text{L}$  von Dekan ( $\text{C}_{10}\text{H}_{22}$ ), Dodekan( $\text{C}_{12}\text{H}_{26}$ ),

Pentadekan( $C_{15}H_{32}$ ) und je 20mg von Nonadekan( $C_{19}H_{40}$ ), Docosan( $C_{22}H_{46}$ ), Oktakosan( $C_{28}H_{58}$ ), Dotriakontan( $C_{32}H_{66}$ ) und Hexatriakontan( $C_{36}H_{74}$ ) in 10mL Cyklohexan zusammengemischt. Von dieser Lösung wurden zu jeder Probe 20 $\mu$ L gegeben.

Alternativ wurde eine 10-fach konzentrierte Lösung vorbereitet und von dieser nur 2 $\mu$ L zu jeder Probe gegeben.

Anschließend wurden die Proben heftig gemischt (Vortex) und in Probengläser mit Inserts für kleine Volumen umpipettiert.

### **2.3.4. Optimierter Extraktiosprozess für polare Metabolite**

Die Zellen wurden nach dem Waschen in den gleichen Zentrifugationsgefäßen der Extraktion unterworfen. Zu jeder Probe wurden 3mL Methanol und als interner Standard 50  $\mu$ L Ribitol-Lösung (0.2 g/L) gegeben und das Pellet resuspendiert (Vortex). Danach wurden die Proben für 15 min im Ultraschallbad bei 65 $^{\circ}$ C behandelt, wobei überwiegend polare Metabolite extrahiert werden.

Anschließend wurden die Proben bei 14000g für 5min zentrifugiert, vom Überstand 1 mL des Extraktes abgenommen und in gasdichte, 1.8mL Probengläser mit Schraubverschluss überführt.

### **2.3.5. Extraktionsvorgang, wenn sowohl die polaren als auch die lipophilen Metabolite untersucht wurden (erhöhtes Methanolvolumen und Chloroformvolumen für die effizientere Extraktion der Metabolite)**

Bei dieser Methode wurde die Zellenmenge bei der Ernte gegenüber der zuvor beschriebenen Methode um den Faktor 1.2 reduziert  $V(\text{ml})=167/\text{OD}$ . Nach dem Waschen wurden nur 2.5mL Methanol und 50 $\mu$ L Ribitolösung (0.2g/L) und 50 $\mu$ L Methylnonadecanoat in Chloroform (2g/L) zugegeben. Nach dem unter 2.3.4 beschriebenen Extraktionsvorgang und anschließender Zentrifugation bei 14000g für 5min wurde der Überstand in ein 7mL Glasgefäß umpipettiert und das Glasgefäß geschlossen. Das Pellet wurde mit 1340  $\mu$ L Chloroform resuspendiert und bei 37 $^{\circ}$ C für 5min extrahiert. Nach der Zentrifugation bei 14000g für 5min wurde der Überstand in ein 2mL Eppendorfgefäß umpipettiert und erneut bei 14000g für 5min zentrifugiert und der Überstand mit dem methanolischen Extrakt vereinigt. Nach Zugabe von 2.5 ml Wasser fand die flüssig-flüssig-Extraktion wie unter 2.3.3.1. beschrieben statt. Anschließend wurden die beiden Phasen durch Zentrifugation

(15min bei 4000rpm) getrennt. Von der Methanol-Wasser-Phase wurden 1800mL entnommen und in ein 1.8mL Probenglaß zum Eindampfen überführt.

Von der Chloroform Phase wurden 1250µL entnommen und in ein 7mL Glasgefäß mit gasdichtem Schraubverschluß überführt. Alle weiteren Schritte fanden wie unter 2.3.3.1 beschrieben statt.

### 2.3.6. Optimierter Extraktionsvorgang für polare und apolare Metabolite

Bei dieser Methode wurde die Zellenmenge bei der Ernte um den Faktor 2 reduziert  $V(\text{ml})=100/\text{OD}$ . Die Aufarbeitungsprozedur entspricht (2.3.5) mit folgenden Unterschieden:

**Tabelle.2.5.** Kurze Zusammenfassung der Methoden 2.3.5 und 2.3.6

Parameter	2.3.5	2.3.6
Methanol (Extraktion)	2.5mL	700µL
Ribitollösung	50µL	25µL
Methylnonadecanoat	50µL	25µL
Methanol-Extrakt	7mL Glasgefäß	2mL Eppendorfgefäß
Chloroform (Extraktion)	1340µL	375µL
Chloroform-Extrakt	2mL Eppendorfgefäß	0.5mL Eppendorfgefäß
Wasser (Phasentrennung)	2.5mL	700µL
polare Phase	1800µL	500µL
lipophile Phase	1250µL	350µL

Alle weiteren Schritte fanden wie unter 2.3.3.1 beschrieben statt mit der Ausnahme, dass das Probenvolumen und das Volumen von weiteren Reagenzien 2-fach reduziert wurde.

### 2.3.7. Eindampfen der Proben mit dem Speedvac-Konzentrator

Die 1.8mL Probengläser mit methanolischen Extrakten polarer Metabolite wurden in einem Speedvac-Konzentrator innerhalb von ca. 4 Stunden abgedampft. Dabei wurde ein vorgegebenes Programm für alkoholische Lösungen benutzt.

**2.3.8. Probenaufarbeitung in Mikromaßstab (nur polare Metabolite)**

Die Zellenernte gleicht dem oben beschriebenen Prozess im Makromaßstab, das Probenvolumen wurde jedoch 30-fach reduziert  $V(\text{mL})=6.7/\text{OD}$ . Die Zellen wurden vom Medium in einem 2mL Reaktionsgefäß für 2min bei 12000g getrennt, mit 1.5 mL 0.9%NaCl-Lösung gespült, in 1.5mL dieser Lösung resuspendiert, bei 12000g für 2min zentrifugiert und abschließend mit 1.5mL der Lösung gespült. Die Extraktion fand im gleichen Reaktionsgefäß statt. Dazu wurden 500µL Methanol zugegeben, das Pellet resuspendiert und die Proben im Ultraschallbad für 15min bei 65°C inkubiert. Nach der Extraktion und der Zentrifugation (14000g, 5min) wurde der Überstand in ein neues Probenglas überführt, eingedampft und dann die getrocknete Probe mit 5µL Methoxyaminhydrochlorid-Lösung in Pyridin (20mg/ml) und 8µL MSTFA derivatisiert.

**2.3.9. Extraktionsmethoden zur Ermittlung der Vollständigkeit der initialen Extraktion.**

Die Proben wurden wie unter 2.3.4 beschrieben ohne Zugabe von Ribitolösung extrahiert.

**Tabelle 2.6.** Zusammenfassung der Experimente mit verschiedenen zusätzlichen Extraktionsschritten.

Probenbezeichnung	Extraktionsschritte		
	1	2	3
X	Zellaufschluss und Extraktion mit 3mL Methanol, 15min 70°C, Ultraschall	-	-
A	wie X, Extrakt wurde verworfen	3mL Methanol, 15min 70°C, Ultraschall	-
B	wie A	3mL Methanol, 15min Raumtemperatur	-
C	wie A	3mL Wasser, 15min Raumtemperatur	-
D	wie A	3mL Methanol, 15min Raumtemperatur, Extrakt wurde verworfen	3mL Methanol, 15 min Raumtemperatur

Für jede Probenart wurde eine Dreifachmessung durchgeführt. Für die Proben (A) wurde der erste Extrakt verworfen. Nach der Zugabe von 3mL Methanol und anschließendem Resuspendieren des Pellets wurde die Extraktion nach 2.3.4 wiederholt. Für die Proben (B) wurde eine zusätzliche Extraktion ohne Ultraschall bei RT für 15min durchgeführt. Für die



Proben (C) wurde eine zusätzliche Extraktion ohne Ultraschall bei RT mit 3mL Wasser für 15min durchgeführt. Die Proben (D) wurden mit dem gleichen Vorgang wie beiden Proben (B) zweimal extrahiert. Anschließend wurden alle Proben in 1.8mL Glasgefäße überführt und 12.5 µL Ribitolösung wurde zugegeben.

### 2.3.10. Quenching

Um den Metabolismus bei der Zellaufarbeitung möglichst schnell zu blockieren, wurden Versuche unternommen biochemische Reaktionen durch eine rasche Temperaturenniedrigung zu verlangsamen. Dies sollte mit Hilfe von unter 0°C gekühlten Alkohol- Wasser Gemischen mit verschiedenem Alkoholgehalt erreicht werden.

#### Variante 1

20mL Probe wurde bei der Probennahme mit 20mL einer vorgekühlten (-50°C) Lösung von 60% Methanol und 40% 90mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> gemischt (Endkonzentration 30% Methanol) und bei 4500 rpm und -9°C für 5min zentrifugiert. Nach dem Abtrennen des Mediums wurden die Zellen mit 35mL einer 30%igen methanolischen Lösung mit 0.9% NaCl gewaschen und bei 4500rpm zentrifugiert. Weitere Aufarbeitungsschritte wurden wie bei 2.3.4 durchgeführt.

#### Variante 2

Der Versuch wurde mit Hilfe eines Trockeneisbades durchgeführt. Die Temperatur wurde während des Experiments kontrolliert.

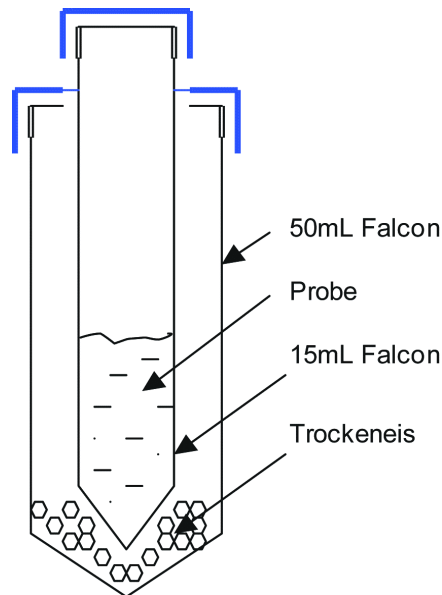
2mL Bakteriensuspension (OD<sub>600</sub>=8.5) wurden mit 3mL Methanol (-75°C) gemischt (Endkonzentration 60% Methanol) und die Zellen über einen Filter (Super-450, Porengröße 0.45µm) vom Medium abgetrennt. Das Methanol wurde in einem Trockeneisbad (CO<sub>2</sub>-Bad) vorgekühlt. Der Filter wurde ebenfalls im Trockeneisbad konstant gekühlt. Die Zellen wurden auf dem Filter mit 3×1mL 60% Methanol (-50°C) gewaschen. Der Filter mit den Zellen wurde aus dem Filtereinsatz mit Hilfe einer Pinzette entfernt, rund gefaltet (Zellen nach innen) und in ein 2mL Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden mit 500µL Methanol vom Filter gewaschen. Zu der Probe wurden 1mL Chloroform und 400µL Wasser gegeben. Die Zellen wurden bei -80°C für 60min kalt extrahiert. Der Extrakt wurde bei 7000rpm und -9°C für 3min abgetrennt und in ein Reagenzglas dekantiert. Das Pellet wurde erneut kalt extrahiert und mit dem ersten Extrakt vereinigt. Die Probe wurde bis auf 2mL eingengt, in ein Eppendorfgefäß überführt und unter Stickstoffstrom bei 0°C getrocknet. Die weitere

Aufarbeitung folgte dem für den Mikromaßstab beschriebenen Prozess (2.3.8.) mit 7.5µL Methoxyaminhydrochlorid-Lösung und 7.5µL MSTFA.

### Variante 3

Der Versuch wurde mit Hilfe eines Trockeneisbades durchgeführt. 2mL Bakteriensuspension ( $OD_{600}=8.5$ ) wurden in einem 15mL-Falcongefäß mit 3mL Methanol ( $-75^{\circ}\text{C}$ ) (Endkonzentration 60% Methanol) gemischt.

Die 15mL-Falcongefäße wurden in größere 50mL-Falcongefäße, die mit Trockeneis gefüllt waren, bei 7000 rpm für 2min zentrifugiert.



**Abb. 2.2.** Einsatz für ultrakaltes Zentrifugieren.

Danach wurden die Zellen mit 2mL Methanol ( $-75^{\circ}\text{C}$ ) gewaschen und wieder auf Trockeneis zentrifugiert und abschließend mit 2mL Methanol ( $-75^{\circ}\text{C}$ ) ohne Resuspendieren gespült. Die Zellen wurden in 2mL 50%igem, kaltem Methanol resuspendiert. Bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für 60min wurde eine kalte Extraktion durchgeführt. Der Extrakt wurde bei 7000rpm und  $-9^{\circ}\text{C}$  für 3min zentrifugiert und in ein Reagenzglas überführt. Das Pellet wurde erneut kalt extrahiert und der Überstand mit dem ersten Überstand vereinigt. Die Probe wurde bis auf 2mL eingengt, in ein Eppendorfgefäß überführt und unter Stickstoffstrom bei  $0^{\circ}\text{C}$  eingedampft. Die weitere Aufarbeitung folgte dem für den Mikromaßstab beschriebenen Prozess (2.3.8.) mit 7.5µL Methoxyaminhydrochlorid-Lösung und 7.5µL MSTFA.

## **2.4. Gaschromatographie**

### **2.4.1. Einspritztechniken**

#### **PTV (programmed temperature vaporizer)**

Es wurde mit leeren Silcosleeve- oder Glas-Injektorröhrchen (*liner*) und zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit bei quantitativen Messungen mit Glaswatte befülltem Glaslinern gearbeitet. Dafür wurde ein kurzer ca. 1cm langer Pfropf der Glaswatte 7-8cm tief in den Liner eingeschoben. Der Liner wurde in ein Reagenzglas mit Stopfen gestellt und so mit 200µL MSTFA befüllt, dass die Glaswatte benetzt wurde und anschließend 30min bei 70°C inkubiert. Danach wurde der Liner in den Injektor eingebaut und für 2 Stunden unter 1mL/min Heliumfluss bei 300°C ausgeheizt.

Die Probe wurde durch einen Autosampler mit einer 10µL SGE-Spritze mit einer 80mm langen Nadel (Einstichtiefe 51mm) eingespritzt. Vor jeder Einspritzung wurde die Spritze mit je 5×8µL Cyclohexan und 1×8µL Probe gespült und nach jeder Einspritzung mit 5×8µL Acetonitril. Für Mikroproben mit insgesamt 13µL Probenvolumen wurde das Spülvolumen auf 2µL reduziert.

#### **PTV Split**

Der Heliumfluss betrug 1mL/min, der Splitfluss betrug 25mL/min. 1µL oder 2µL Probe wurden in den PTV-Injektor bei 70°C eingespritzt und das Lösungsmittel innerhalb von 0.2min abgedampft. Zur Übertragung der Probe auf die Säule wurde die Temperatur mit einer Geschwindigkeit von 14°Cs<sup>-1</sup> bis auf 280°C erhöht und 2min bei dieser Temperatur gehalten.

#### **PTV Splitless**

Bei Splitlessinjektionen wurden 0.5 µL oder 1µL der Probe bei den oben beschriebenen Bedingungen für Splitinjektionen eingespritzt, wobei die Splitlesszeit 0.7min betrug.

#### **Split- und Splitlessinjektionen mit SSL Injektor**

Es wurden 2µL der Probe manuell mit einer SGE-Spritze (51mm Nadel) in den auf 250°C geheizten SSL-Injektor eingespritzt. Vor jeder Einspritzung wurde die Spritze mit je 5×5µL

Cyclohexan und 1×5µL Probe gespült und nach jeder Einspritzung mit 5×5µL Acetonitril gespült. Der Heliumfluss betrug 1mL/min und der Splitfluss betrug 25mL/min.

### 2.4.2. Trennsäule und Temperaturprofile

Die chromatographische Trennung wurde auf einer 0.25mm×0.25µm×30m DB5ms Säule bei einem Heliumfluss von 1mL/min durchgeführt. Der Heliumfluss wurde digital kontrolliert. Dafür wurde vor der Messung eine „Column Evaluation“ durchgeführt. Die Anfangstemperatur bei der Einspritzung betrug 70°C. Nach einer einminütigen Isotherme wurde die Ofentemperatur mit einer Geschwindigkeit von 1°Cmin<sup>-1</sup> bis auf 76°C erhöht und dann mit 6°Cmin<sup>-1</sup> bis auf 325°C. Die Endtemperatur wurde für 10min gehalten. Anschließend wurde der Ofen wieder bis auf 70°C abgekühlt und war für die nächste Einspritzung bereit.

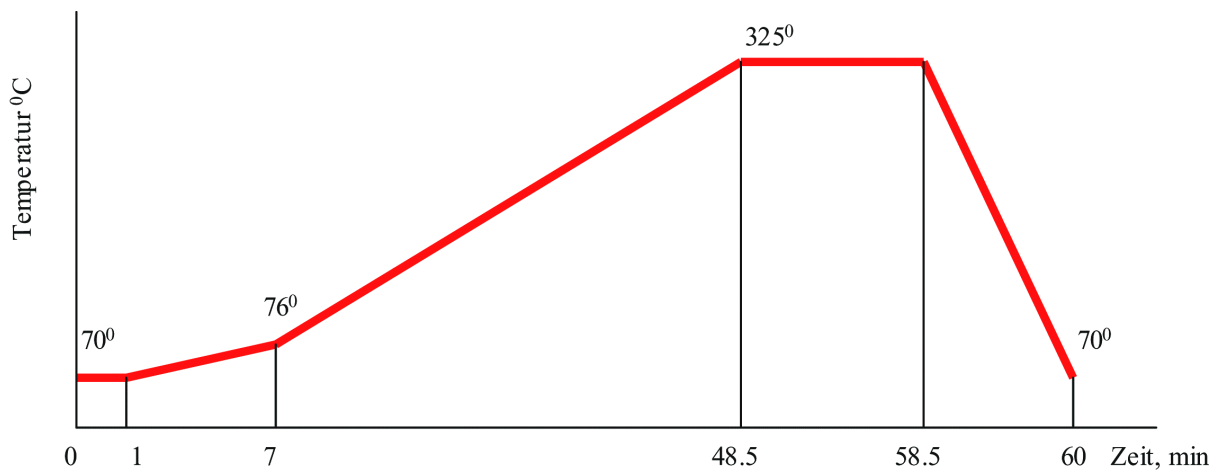
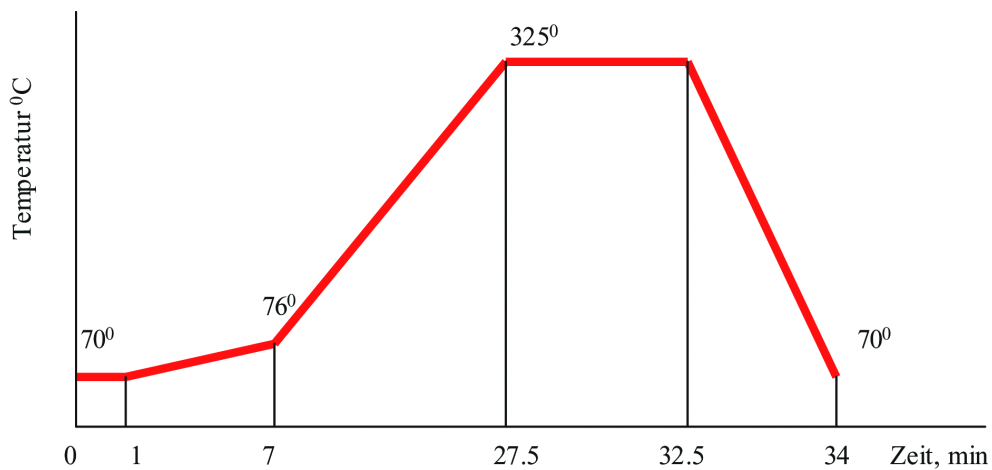


Abb. 2.3. Temperaturprogramm für die GC (Standardgradient)

### 2.4.3. Temperaturprofile für Hochgeschwindigkeitsmessungen

Das Temperaturprogramm wurde wie folgt geändert:

Die Anfangstemperatur bei der Einspritzung betrug 70°C. Nach einer einminütigen Isotherme wurde die Ofentemperatur mit einer Geschwindigkeit von 1°Cmin<sup>-1</sup> bis auf 76°C erhöht und dann mit 12°Cmin<sup>-1</sup> bis auf 325°C. Diese Temperatur wurde für 5min gehalten.



**Abb. 2.4.** Temperaturprogramm für die schnelle GC.

## 2.5. Massenspektrometrie (Kopplung GC-MS)

### 2.5.1. EI (Elektronen-Ionisation)

Für die Ionisation wurde der EI –Modus bei 70eV gewählt.

Die Optimierung der Betriebsparameter wurde gemäß der Bedienungsanleitung für das Instrument mit Perfluorotri-N-butylamin als Referenzgas durchgeführt. Die Quelltemperatur wurde auf 220°C und die Temperatur für die *Transfer-Line* auf 250°C eingestellt. Die Detektorspannung wurde auf 350V für normale Analysen und auf 500V für hochempfindliche Spurenanalysen eingestellt. Die den vollständigen Massenbereich abdeckenden Massenspektren wurden von 45 bis 585amu bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von 2 Scans/s aufgenommen. Die „Solvent delay“-Zeit betrug 6.2min. Der Emissionsstrom betrug 150 µA.

### 2.5.2. CI+ (Chemische Ionisation)

Für einige Experimente wurde alternativ die chemische Ionisation (CI+) gewählt. Diese wurde mit einer universellen EI/CI-Ionisationsquelle durchgeführt. Als CI-Gas wurde Isobutan verwendet. Der CI-Gasdruck wurde am Ausgang der Gasflasche gemessen und auf 0.35kg/cm<sup>2</sup> eingestellt. Das Optimieren der Betriebsparameter wurde gemäß der Bedienungsanleitung für das Instrument durchgeführt. Der Emissionsstrom wurde auf 350µA eingestellt, alle anderen Parameter entsprachen dem EI-Modus.

### 2.5.3. Hochgeschwindigkeitsmessungen

Die Aufnahmegeschwindigkeit des Massenspektrometers wurde auf 4 Scans/s erhöht.

### 2.5.4. Reinigung der Ionisationsquelle

Die Ionisationsquelle wurde auseinander genommen und die Linsen sorgfältig mit einer  $\text{Al}_2\text{O}_3$  – Suspension poliert. Die Arbeitsoberfläche des *Traps* und des *Repellers* wurden auf gleiche Weise gereinigt. Alle gereinigten Teile wurden sorgfältig mit Leitungswasser und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Dem Spülen folgte eine fünfminütige Behandlung mit Methanol im Ultraschallbad und das Entfetten mit Chloroform oder Dichlormethan.

## 2.6. HPLC-MS (*high performance liquid chromatography - mass spectrometry*)

### 2.6.1. HILIC-MS (*hydrophilic interaction chromatography - mass spectrometry*)

Bei der Analyse wurde eine HILIC-TSKgel-Amide-80 Säule der Maße 2.0mm×250mm×5µm verwendet. Die mobile Phase bestand aus Acetonitril (B) und 6.5mM Ammoniumacetat (A), das mit Essigsäure auf pH5.5 eingestellt wurde. Die Chromatographie wurde bei einem Fluss der mobilen Phase von 0.15mL/min durchgeführt. Verschiedene Gradienten von 0% A bis maximal 55% A über die Dauer eines Gradients von insgesamt 70min wurden getestet.

Die HPLC-Säule wurde über ein ESI-Interface ohne Split an das LCQ-MS angeschlossen. Die anderen Parameter waren:

- *Sheath gas* 0.8L/min (60Units)
- *Spray voltage* 5kV
- *Capillary temperature* 250°C
- *Normalized collision energy* 35%

Die Massenspektren wurden als Full-Scan-Spektren von 150 bis 2000amu bei 1amu Massengenauigkeit aufgenommen. Die  $\text{MS}^2$ -Experimente wurden im *Depending-Scan*-Messmodus durchgeführt, der *Wideband-activation*-Parameter wurde auf „Off“

umgeschaltet. Die Kollisionsenergie betrug 35% während der Parameter Q - „*activation*“ auf Q=0.25 eingestellt wurde.

Die mit Methanol extrahierten und getrockneten Proben wurden in 500µL Acetonitril:Wasser 1:1(Vol.) gelöst und 10 bis 100µL der gelösten Probe wurden mit dem Autosampler injiziert.

## 2.7. Datenauswertung

Die die Rohdaten der GC-MS-Messung enthaltenden Dateien mit der Erweiterung „.RAW“ wurden für jedes Experiment in einem gemeinsamen Ordner gesammelt und auf den Auswertungsrechner übertragen.

### 2.7.1. AMDIS-Prozessierung

Die qualitative Auswertung der Messdaten erfolgte mittels des Programms AMDIS (the automated mass spectral deconvolution and identification system) mit Hilfe der vorher aufgebauten Massenspektrenbibliothek. Diese besteht aus den zwei Dateien Cory4.msl und Cory4.CID. Für die Kalibrierung des Retentionsindexsystems wurde die AlkanmixPTV.csl Bibliothek aufgebaut und benutzt. Als *Target Compound Library* wurde „Cory4.msl“ definiert und als *RI Calibration Library* „AlkanmixPTV.csl“. Die optimalen Detektionsparameter sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

**Tabelle 2.7.** Optimierte Einstellungen für AMDIS Processing.

<i>Parameter</i>	<i>Einstellung</i>
Minimum Match Factor	50
Multiple Identifications per Compound	Ja
Show standards	Ja
Use Retention Index	Ja, Nonpolar
RI window	5+0
Level	Very Strong 20 maximum
Low m/z, High m/z	Ja, Auto
Threshold	Off
Scan Direction	Low to High
Data File Format	Xcalibur Raw File
Instrument Type	Quadrupole
Component width	12
Omit m/z	Nein
Adjacent Peak Substraction	Two
Resolution	High
Sensitivity	High
Shape Requirements	Medium

Target Compound Library	Cory4.msl
RI Calibration Library	AlkanmixPTV.csl
Internal Standard Library	Nicht nötig
RI Calibration Data	Irgendein File mit .CAL, z.B Onsite.Cal
Solvent Tailing	Ja m/z 84
Column Bleed	Ja m/z 207

### Kalibration des Retentionsindex-Systems

Zuerst wurde ein beliebiger .RAW-File aus dem Experiment geöffnet. Die Art der Analyse auf *RI Calibration/Performance* umgestellt, die *Settings* gespeichert und die Analyse gestartet. Nach diesem Lauf wurde die Richtigkeit der gefundenen Zeitstandards kontrolliert. In der folgenden Tabelle sind die Sollwerte für die einzelnen Zeitstandards aufgelistet:

**Tabelle 2.8.** Alkangemisch und erwartete Retentionszeiten für die einzelnen Alkane.

Standart	Ungefähre Retentionszeit, min
Dekan	5-6
Dodekan	12-13
Pentadekan	19-20
Nonadekan	26-28
Dokosan	31-33
Oktakosan	39-41
Dotriakontan	43-45
Hexatriakontan	47-49

Beim Auftreten eines Identifizierungsfehlers bei der Detektion der Alkane, wurden die betroffenen Alkane im Chromatogramm manuell gesucht und in die Bibliothek AlkanmixPTV.csl eingetragen, die alten Einträge wurden dabei gelöscht. Danach wurde die Analyse erneut durchgeführt.

### Automatische Auswertung mehrerer Files

Der Parameter unter „*Settings-Type of analysis*“ wurde auf „*Use RI Calibration Data*“ umgestellt und gespeichert. Vor einem neuen Analysedurchlauf wurde eine Ausführungsliste vordefiniert.



**Tabelle 2.9.** Einstellungen in AMDIS bei „batch job“ Processing von mehreren Dateien.

Batch Job Parameter	Einstellung
Use RI Calibration Data	Ja
Generate report	Ja
Report all hits	Nein
Report only hits	1
Instrument	Xcalibur Raw Files
Analysis settings will be taken from	AMDIS standard settings

Diese Liste wurde als .job Datei unter dem Namen des aktuellen Experimentes gespeichert und die Analyse gestartet. Der so erzeugte Reportfile war nach der Analyse als Textdatei .txt unter dem Namen der .job-Datei im Ordner mit den .RAW-Dateien zu finden.

### 2.7.2. Weitere Prozessierung der Daten zur Vorbereitung der Peakquantifizierung mit Xcalibur

Der Ausgabe file von AMDIS wurde mit dem Processing Programm eingelesen. Der Parameter *Delta-RI-Window* wurde auf 10 gestellt und Min-MS-Fit auf 50. Am Ende des Programmlaufes, wenn nach der optischen Dichte gefragt wird, wurden für jede Probe entsprechende Korrekturkoeffizienten eingetragen. Der Korrekturkoeffizient K enthielt die optische Dichte OD und verschiedene Verdünnungsfaktoren:

$$K = \frac{OD \cdot V_1 \cdot V_2}{V_3}$$

V<sub>1</sub>- Volumen der Probe in mL;

V<sub>2</sub>- Volumen des für das Trocknen abgenommenen methanolischen Extraktes in mL;

V<sub>3</sub>- Volumen des Methanols für die Extraktion in mL.

Diejenigen Parameter, die für alle Proben in Rahmen eines Experimentes gleich waren, wurden auf 1 gesetzt.

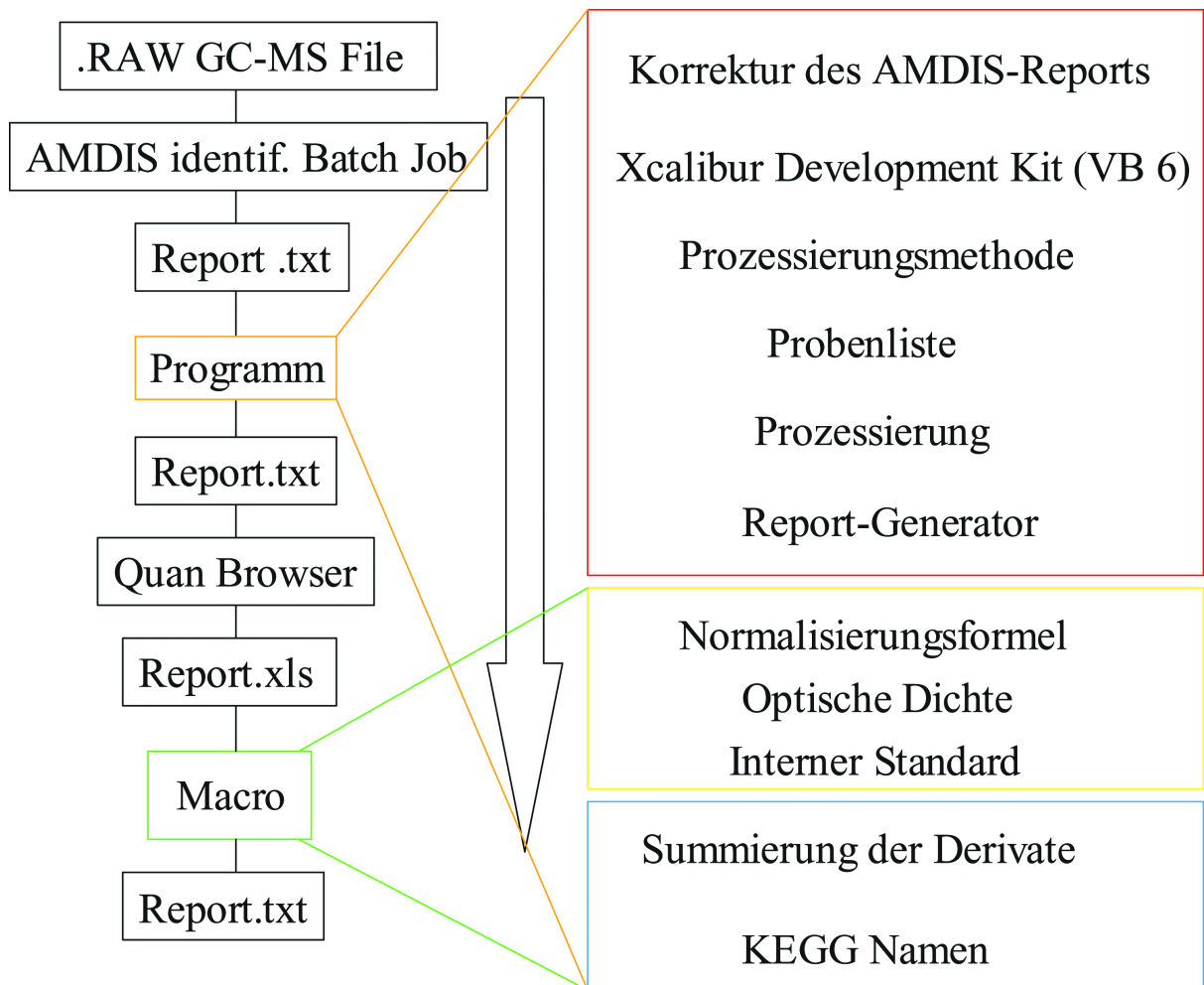
### **2.7.3. Korrektur der Peakintegration im QuanBrowser von Xcalibur**

Nach dem Durchlauf des Programms wurde die automatisch erstellte *sample*-Liste als .sld Datei im *QuanBrowser* von Xcalibur geöffnet. Die Peaks wurden auf die Richtigkeit der integrierten Fläche unter dem jeweiligen Peak geprüft und wenn es nötig war, manuell korrigiert. Die korrigierten Parameter wurden in einer .XQN-Datei gespeichert und ein Bericht wurde als *Long-Excel-Report* erstellt. Dabei wurde der Ausgabefile in der Microsoft-Excel-Umgebung automatisch geöffnet. Um die Zusammenfassung der normalisierten Daten in einer Liste zu bekommen, wurde parallel im Hintergrund das *Macros2.xls*-Dokument geöffnet und das Excel-Macro „Postprocess2“ durchgeführt.

## **2.8. Softwareentwicklung**

### **2.8.1. Entwicklung eines Programms (“Processing”) für die Postprozessierung der qualitativen Ergebnisse von AMDIS für die quantitative Auswertung, basierend auf dem Xcalibur Development -Kit**

Da die Benutzung von Xcalibur für die Quantifizierung von großen Datenmengen sehr erschwert war und darüber hinaus nur in manuellem Betrieb möglich war, wurde entschieden auf der Basis des - mit dieser Software mitgelieferten - Entwicklungskits ein neues Programm zu entwickeln. Um die Module des Kits einbauen zu können, musste die Programmiersprache des Kits -Visual-Basic 6- benutzt werden. Aufgabe des Programms war zum einen die automatische Übertagung der Retentionszeiten der von AMDIS identifizierten Metabolite in ein Xcalibur-Format zum zweiten sollte das Programm eine Bedienungsoberfläche bereitstellen, die es ermöglicht, schnell und einfach auf alle für die Quantifizierung notwendigen Parameter zugreifen zu können. Dabei war es wichtig, eine Report-Datei zu bekommen, in der auf verständlicher Weise die große Anzahl der Metabolite und deren Menge dargestellt werden konnte. Das komplette Fließschema des Auswertungsalgorithmus und die Bausteine, die in das zu entwickelnde Programm eingebaut werden sollten, ist in Abb 2.5 zu sehen.

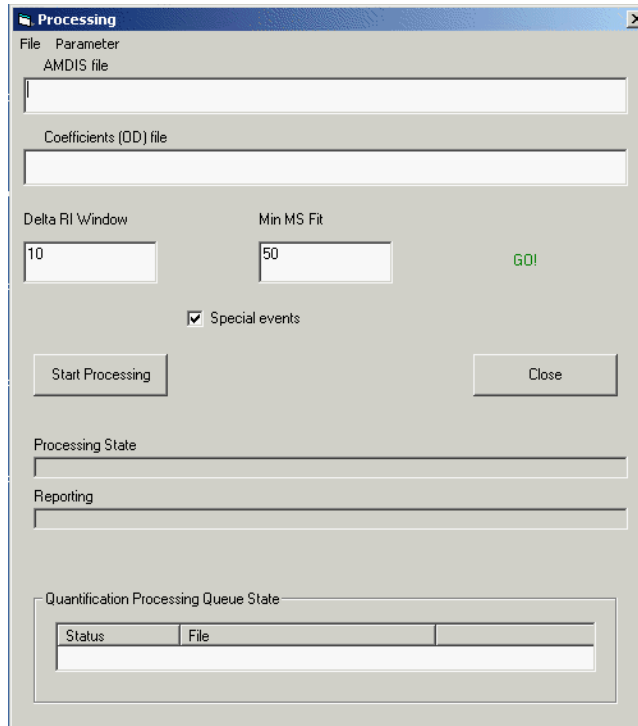


**Abb. 2.5.** Fließdiagramm der kompletten Datenauswertung.

Alle Parameter, die für die Quantifizierung mit dem Avalon-Algorithmus (Grundalgorithmus für Peakintegration) nötig waren, wurden in einem Textfile unter dem Namen „Names&Masses“ zusammengefasst. Als zweite Quellendatei wurde – ebenfalls im Textformat - eine Matrix mit KEGG Namen eingelesen („AMDIS\_KEGG\_Library\_new.txt“). Diese dient der Umwandlung von Derivatnamen nach ihrer Summierung in die normalen Metabolitennamen entsprechend der KEGG Datenbanknomenklatur. Die Zuordnung von Derivaten zu den entsprechenden Metaboliten wurde ebenso in dieser Datei gespeichert.

### Kurze Beschreibung des Programms

Das Programm wurde in Form eines typischen Windows-Interfaces ausgestaltet.



**Abb.2.6.** Interface des Processing Programms.

Auf der ersten Stufe wird der AMDIS-Report korrigiert. Zunächst werden die falsch identifizierten Verbindungen entfernt. Als falsch identifiziert wird eine Komponente mit einem Retentionsindexwert (RI) (die Formel für RI-Bestimmung ist in 2.8.4 angegeben) außerhalb des RI-Fensters definiert. Der Parameter ist durch den Benutzer frei definiert. Da die RI-Schwankungen normalerweise innerhalb von  $\pm 3$  Einheiten liegen und auch in extremen Fällen  $\pm 10RI$  nicht übersteigen, wurde ein Wert von  $\pm 10RI$  als Standardeinstellung eingeführt. Im Gegensatz dazu weichen fast immer alle falschen Identifikationen deutlich stärker als  $10RI$ -Einheiten ab. Alternativ kann ein Schwellenwert für die Identifikationsgenauigkeit vordefiniert werden. Dieser entspricht dem *Net* - Parameter von AMDIS. Metabolit-Derivate, die diesen Schwellenwert unterschreiten, werden verworfen. Als nächstes wird von allen Derivaten mit gleichem Namen innerhalb einer Probe der Eintrag mit dem größten Signal (*Total Signal*) ausgewählt und die anderen verworfen. Die Position der verbleibenden Komponenten im GC-Chromatogramm entspricht dem Peakmaximum und die entsprechenden Retentionszeiten können dem Programm Xcalibur übergeben werden. Der auf diese Weise korrigierte Report wird im Textformat unter dem Namen „Tables.pro“ ausgegeben. Auf einer zweiten Stufe greift das Programm auf die Datei „Names&Masses“ zu, die die Quantifikationsparameter enthält. Aus diesen Parametern und den Retentionszeiten aus dem korrigierten AMDIS-Report wird eine neue Datenmatrix erstellt und im Textformat unter dem Namen „XCList.pro“ ausgegeben. Diese Datei wird dem Xcalibur-Prozessingmodul übergeben, das die Peakdetektion aufgrund der Retentionszeiten

und anschließend die Peakintegration mit Hilfe des Avalonalgorithmus durchführt. Danach folgt die Ausgabe der Ergebnisse in eine neue Datei mit Hilfe des Reportmoduls. In einem Fenster ist der Korrekturfaktor K (2.7.2) einzutragen. Als Standardeinstellung wird immer der Faktor 1.0 genommen. Dies ist gültig, wenn die Proben sich nicht voneinander unterscheiden. Auf der dritten Stufe werden alle integrierten Flächen der Peaks normalisiert.

$$S = \frac{S_0 \cdot 10^6}{S_{IS} \cdot K}$$

S- normalisierte Fläche  
 S<sub>0</sub>- nicht normalisierte Fläche  
 S<sub>IS</sub>- Fläche des internen Standards  
 K- Korrekturkoeffizient (2.7.2)

Mit Hilfe der Datei „AMDIS\_KEGG\_Library\_new.txt“ werden alle zu einem Metabolit gehörenden Derivate summiert und mit dem entsprechenden KEGG-Namen versehen. Anschließend werden die folgenden Reports im Textformat ausgegeben:

**Tabelle 2.10.** Ausgabefiles bei der Datenauswertung.

Name des Files	Beschreibung des Reports
Results.pro	Normalisierte und summierte Flächen
RawResults.pro	Nicht normierte Integrationsflächen
RawResultsIS.pro	nur mit Normalisierung
OD.pro	Liste der Korrekturkoeffizienten
Errors.pro	Alle Fehler der Prozessierung
FalseID.pro	Falsche Identifikationen von AMDIS
Tables.pro	Korrigierter AMDIS-Report
XCList.pro	Quantifikationsparameter und exakte Retentionszeiten

### 2.8.2. Entwicklung eines Macros in der Microsoft Excel-Umgebung für die Normalisierung der Daten der QualBrowser-Reportdatei und deren Umwandlung in das Format einer zweidimensionalen Matrix

Nach der Prüfung der Peakintegration und einer eventuellen manuellen Korrektur ist es möglich, die Ergebnisse nur im streng definierten Format als Excel-Dokument auszugeben. Der Report, der vom Xcalibur-QuanBrowser erstellt wird, hat ein sehr unbequemes und unübersichtliches Format insbesondere im Hinblick auf weitere mathematische und statistische Auswertung die für Metabolomdaten notwendig sind. Das beste Format ist in

diesem Sinne eine zweidimensionale Matrix mit den Metabolitnamen auf der Ordinate und den Proben auf der Abszisse, wobei das Wertefeld den relativen Metabolitgehalt enthält.

Metabolite \ Proben	1	2	3	...
Lactate	985324	996221	984498	..
Pyruvate	80293	82667	80300	..
Alanine	145898	155216	147772	..
.....	.....	.....	.....	..

**Abb.2.7.** Darstellung der Ergebnisse in Form einer zweidimensionalen Matrize.

Um die Daten aus dem *QuanBrowser*-Report in eine solche Matrix umzustrukturieren, wurde ein Visual Basic-Macro geschrieben. Alle Daten, die für die Matrix nötig sind, werden aus den zahlreichen Seiten dieses Excel-Dokumentes in eine Matrix extrahiert. Dann wird in einem Fenster angeboten, die Korrekturkoeffizienten einzutragen. Die Normalisierung erfolgt, wie für das Programm „Processing“ oben beschrieben. Die Reporttabellen werden als zusätzliche Excel-Seiten eingefügt. Von diesen lässt sich in Excel, wenn nötig, ein Textfile exportieren.

**2.8.3. Entwicklung eines Programms (Processing5) für die quantitative Auswertung basierend auf dem Xcalibur Development Kit, wobei als einziger Identifikationsparameter der RI-Wert dient.**

Das Programm wurde analog dem oben beschriebenen Processing-Programm gestaltet. Als erste Quellendatei dient in diesem Programm auch die AMDIS Reportdatei. Die AMDIS-Auswertung wird in diesem Fall jedoch anders durchgeführt. Bei den gleichen Einstellungen und Vorgängen der Standardprozessierung wird eine andere Zielbibliothek benutzt, die nur aus acht Zeitstandards (Alkane) besteht. Während der AMDIS-Prozessierung werden in jeder Probe diese Alkane gefunden und anschließend in dem Reportdatei für alle Proben zusammengefasst. Die zweite Quellendatei (Names&MassesRI) enthält die Retentionsindices und Quantifikationsparameter für alle Verbindungen. Aus den gegebenen Daten werden die aktuellen Retentionszeiten mit der folgenden Umrechnungsfomel bestimmt und in das Prozingmodul mit den Quantifikationsparametern weitergeleitet.

$$RT_i = \frac{(RI_i - RI_1) \cdot (RT_2 - RT_1)}{RI_2 - RI_1} + RT_1$$

$RT_i$  – gesuchte Retentionszeit der Verbindung  
 $RI_i$  – gegebener Retentionsindex der Verbindung  
 $RT_1$  – Retentionszeit des früher eluierten Alkans  
 $RT_2$  – Retentionszeit des später eluierten Alkans  
 $RI_1$  – Retentionsindex des früher eluierten Alkans  
 $RI_2$  – Retentionsindex des später eluierten Alkans

Der weitere Algorithmus ist dem Processing Programm analog.

#### 2.8.4. Erstellung einer Massenspektren- und Retentionsindexbibliothek für die qualitative Auswertung von GC-MS-Daten

Die zuverlässige, qualitative Auswertung komplexer GC-MS Daten erfolgt nur dann, wenn ein zweidimensionaler Ansatz verwendet wird. In der ersten Dimension werden die Verbindungen aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Massenspektren zu den in der Bibliothek abgelegten Massenspektren identifiziert und in Gruppen möglicher Kandidaten zusammengefasst. In der zweiten Dimension wird unter Berücksichtigung des Retentionsindex aus der Gruppe möglicher Kandidaten derjenige mit der geringsten Abweichung zum erwarteten Retentionsindex als wahrscheinlichste Verbindung ausgewählt. Die aufgrund ihrer Massenspektren identifizierten Metabolite wurden als reine Stoffe gekauft und als Standardsubstanzen gemessen. Dafür wurden von jedem Stoff 1-5 Kristalle genommen und in einem 1.8mL-Probenglas zuerst mit 50 $\mu$ L Methoxyaminhydrochlorid in Pyridin und dann mit 80 $\mu$ L MSTFA - wie beschrieben- derivatisiert. Nach der Derivatisierung wurden entsprechend der Standardmethode Zeitstandards zugegeben und die derivatisierten Stoffe wurden mit der Standardmethode gemessen. Falls zu viel Substanz genommen wurde und daher der chromatographische Peak stark überladen war, wurden die Proben mit einem Gemisch von Pyridin:MSTFA 5:8 (Vol.) 100-Fach verdünnt und erneut gemessen. Die auf diese Weise aufgenommenen GC-MS Daten wurden weiter mit AMDIS und dem Xcalibur-*QualBrowser* ausgewertet.

## Erstellung einer Bibliothek von Massenspektren mit Hilfe des Programms AMDIS

Alle .RAW GC-MS Dateien wurden mit der Standardmethode für AMDIS prozessiert. Anschließend wurde jeder File in AMDIS geöffnet, der Zielpeak identifiziert und das entsprechende Spektrum in die Bibliothek eingetragen. Dabei war es sehr wichtig zu kontrollieren, dass das Massenspektrum von AMDIS richtig extrahiert wurde und kein Peak verloren gegangen war. Dem Benutzer werden normalerweise mehrere Varianten extrahierter Massenspektren vorgeschlagen. Die RI-Werte wurden mit den Massenspektren automatisch gespeichert. Anschließend wurde in einem Editor jedem neuen Eintrag ein kurzer Namen gegeben.

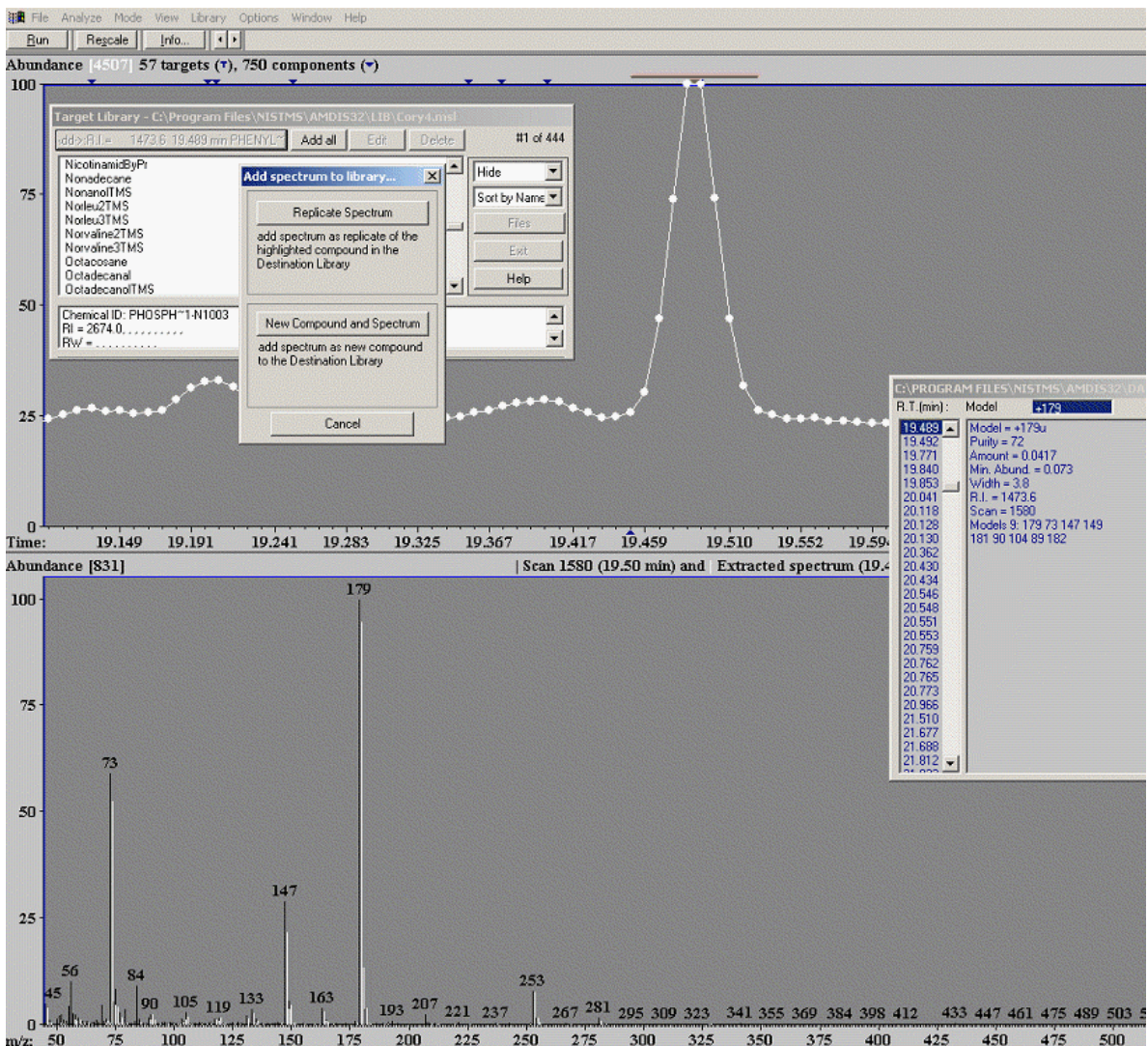


Abb. 2.8. Interface des AMDIS Programms bei dem Aufbau der MS-Bibliothek.



## Erstellung der Bibliothek mit Hilfe von AMDIS, MS-Search 1.7 und Xcalibur

Alle .RAW GC-MS Dateien wurden mit der Standardmethode für AMDIS prozessiert. Anschließend wurde jeder File mit dem *Xcalibur-QualBrowser* geöffnet, der Zielpeak identifiziert und von ihm das Signalrauschen abgezogen (subtract spectra). Dann wurde das Spektrum in das MS-Search-Programm exportiert (Library→Export to Library Browser) und von dort in eine Zwischenbibliothek .MSP (Librarian→Export) exportiert. Parallel wurde die sich in Bearbeitung befindende Dateien mit AMDIS geöffnet und der RI-Wert für den Standard abgelesen. Der Transfer des Massenspektrums aus der Zwischenbibliothek .MSP in die Zielbibliothek Cory4.msl wurde mit AMDIS durchgeführt (Library→Library Transfer) und der abgelesene RI-Wert für den Stoff mit dem Editor eingetragen. RI-Wert kann wie folgend errechnet werden:

$$RI_i = \frac{RT_i - RT_1}{RI_2 - RI_1}$$

$RI_i$  – gesuchter Retentionsindex der Verbindung;  
 $RT_i$  – gegebene Retentionszeit der Verbindung;  
 $RT_1$  – Retentionszeit des früher eluierten Alkans;  
 $RI_1$  - Retentionsindex des früher eluierten Alkans;  
 $RI_2$  - Retentionsindex des später eluierten Alkans;  
 Retentionsindex der Alkane wurde als Anzahl der Kohlenstoffatome mal 100 errechnet.

## 2.9. Absolute Quantifizierung

Für den unmittelbaren quantitativen Vergleich von identifizierten Metaboliten in einer Probe wurden zwei Ansätze benutzt:

- a) externe Quantifizierung
- b) interne Quantifizierung

basierend auf der Methode der Standardaddition (*spiken*).

### Entwicklung der Quantifikationsmische

Um Zeit zu sparen, wurden für die Aufnahme von Kalibrationskurven nicht die einzelnen Standards verwendet, sondern verschiedene Gemische. Die Standards wurden so für ein Gemisch ausgewählt, dass sie sich in einem Chromatogramm mit guter Auflösung trennen lassen und keine möglichen Abbauprodukte von einem Metabolit mit einem anderen

strukturell gleich sind. Darüber hinaus wurden nur so viele Substanzen in einem Mix zusammengemischt, so dass sie sich untereinander nicht beeinflussen können.

**Tabelle 2.11.** Mix 1 (gelöst in Methanol, pH=1 HCl).

Standard	Mw (g/mol)	2mM Theoretisch	Aktuell zugegeben	Konzentration	
		(g/50mL)	(g/50mL)	(g/L)	(mM)
Alanin	89	0.0089	0.0098	0.196	2.20
Arabinose	150	0.0150	0.0229	0.458	3.05
Arginin	174	0.0174	0.0180	0.360	2.07
Asparagin	132	0.0132	0.0132	0.264	2.00
Aspartat	133	0.0133	0.0138	0.276	2.08
Citrat·H <sub>2</sub> O*	294	0.0294	0.0353	0.706	2.40
Cystein	121	0.0121	0.0130	0.260	2.15
Fructose	180	0.0180	0.0407	0.814	4.52
Glutamin	146	0.0146	0.0149	0.298	2.04
Glutamat	147	0.0147	0.0530	1.060	7.21
Glucose	180	0.0180	0.0182	0.364	2.02
Glycin	75	0.0075	0.0085	0.170	2.27
Glycolsäure	76	0.0076	0.0095	0.190	2.50
Histidin	155	0.0155	0.0175	0.350	2.26
Homoserin	119	0.0119	0.0147	0.294	2.47
Isoleucin	131	0.0131	0.0133	0.266	2.03
Lactat (Lithiumsalz)	96	0.0096	0.0117	0.234	2.44
Leucin	131	0.0131	0.0145	0.290	2.21
Lysin	146	0.0146	0.0148	0.296	2.03
Maleat*	160	0.0160	0.0167	0.334	2.09
Malicsäure	134	0.0134	0.0182	0.364	2.72
Malonat·H <sub>2</sub> O*	166	0.0166	0.0180	0.360	2.17
Methionin	149	0.0149	0.0151	0.302	2.03
Norvalin	117	0.0117	0.0122	0.244	2.09
Oxoglutarat*	190	0.0190	0.0190	0.380	2.00
Phenylalanin	165	0.0165	0.0166	0.332	2.01
Phosphat·10H <sub>2</sub> O*	380	0.0380	0.0397	0.794	2.09
Prolin	115	0.0115	0.0118	0.236	2.05
Pyruvat*	110	0.0110	0.0160	0.320	2.91
Serin	105	0.0105	0.0115	0.230	2.19
Succinat·6H <sub>2</sub> O*	270	0.0270	0.0373	0.746	2.76
Sucrose	342	0.0342	0.0418	0.836	2.44
Threonin	119	0.0119	0.0125	0.250	2.10
Trehalose·2H <sub>2</sub> O	378	0.0378	0.0400	0.800	2.12
Tryptophan	204	0.0204	0.0205	0.410	2.01
Tyrosin	181	0.0181	0.0180	0.360	1.99
Valin	117	0.0117	0.0122	0.244	2.09

\*Natriumsalz

**Tabelle 2.12.** Mix 2. (gelöst in Wasser).

Standard	Mw (g/mol)	1mM theoretisch	aktuell zugegeben	Konzentration.	
		(g/100mL)	(g/100mL)	(g/L)	(mM)
2-Aminobuttersäure	103.1	0.0103	0.0189	0.189	1.83
Cytosin	111.1	0.0111	0.0113	0.113	1.02
Cycloleucin	129.6	0.0130	0.0127	0.127	0.98
Galactosamin-HCl	215.6	0.0216	0.0218	0.218	1.01
Glucono-1,5-lacton	178.1	0.0178	0.0195	0.195	1.09
Glycerensäure	125.1	0.0125	0.0114	0.114	0.91
Mannitol	182.2	0.0182	0.0225	0.225	1.23
Fumarsäure	116.1	0.0116	0.0115	0.115	0.99
Glucosamin-HCl	215.6	0.0216	0.0225	0.225	1.04
Glutarsäure	132.1	0.0132	0.0132	0.132	1.00
Glycerol	92.1	0.0092	0.0082	0.082	0.89
Lactose	360.3	0.0360	0.0364	0.364	1.01
Maltose	360.3	0.0360	0.0349	0.349	0.97
Mannose	180.2	0.0180	0.0176	0.176	0.98
N-Acetylglutaminsäure	189.2	0.0189	0.0214	0.214	1.13
N-Acetylglutamin	188.2	0.0188	0.0201	0.201	1.07
Nicotinamid	122.1	0.0122	0.0126	0.126	1.03
Ornithin	168.6	0.0169	0.0100	0.100	0.59
Oxalsäure	134.0	0.0134	0.0142	0.142	1.06
Harnstoff	60.1	0.0060	0.0064	0.064	1.06
Diaminopimellicsäure	190.2	0.0190	0.0195	0.195	1.03

**Tabelle 2.13.** Mix 3. (gelöst in Methanol:Wasser 1:1).

Standard	Mw (g/mol)	Spezifikationen	M, aktuell	aktuell zugegeben	Konzentration
			(g/mol)	(mg/50mL)	(mM)
2-Phosphoglycerat·H <sub>2</sub> O**	186.10*	3mol/molNa, 28.3%H <sub>2</sub> O	257.20	2.0	0.16
3-Phosphoglycerat**	230.00	3%H <sub>2</sub> O	230.54	2.2	0.19
AMP**	347.20*	2mol/molNa	391.20	1.8	0.09
Deoxyribose-5-phosphat**	214.10*	2mol/molNa, 2mol/molH <sub>2</sub> O	294.10	2.3	0.16
Erythrose-4-phosphat**	200.10*	0.5mol/molNa, 7%H <sub>2</sub> O	211.86	2.0	0.19
Fructose-1,6-biphosphat·8H <sub>2</sub> O**	550.18		550.18	3.6	0.13
Fructose-6-phosphat·2H <sub>2</sub> O**	340.10		340.10	2.0	0.12
Gluconat-6-Phosphat**	342.10	1.5mol/molH <sub>2</sub> O	369.10	2.0	0.11
Glucose-6-phosphat**	282.12		282.12	2.0	0.14
Glycero-1-phosphat	216.00		216.00	2.1	0.19
Glycero-2-phosphat	216.00		216.00	2.0	0.19
Glyceronphosphat (Lithiumsalz)	170.10*	2mol/molLi, 1mol/molH <sub>2</sub> O	199.90	2.0	0.20
Phosphoenolpyruvat·H <sub>2</sub> O**	190.00		190.00	2.1	0.22
Pyrophosphat	446.10		446.10	2.2	0.10
Ribose-5-phosphat·2H <sub>2</sub> O**	310.14		310.14	2.0	0.13
Ribulose-5-phosphat**	230.10*	1.4mol/molNa, 1.5mol/molH <sub>2</sub> O	287.90	1.9	0.13
Xylulose-5-phosphat**	230.10*	1.5mol/molNa, 0.75mol/molH <sub>2</sub> O	276.60	2.4	0.17

\*freie Substanz; \*\* Natriumsalz

Nach dem Zusammenmischen wurden die Mixe in Eppendorfgefäße aliquotiert, sofort eingefroren (-80°C) und unmittelbar vor jedem Experiment aufgetaut und verwendet.

## **Externe Kalibrierung**

Für die Messung einer Konzentrationsreihe wurden von einem Mix verschiedene Volumina von 2µL bis maximal 1000µL (Schrittweite ungefähr  $V_i=2*V_{i-1}$  oder häufiger) in die 1.8mL-Probengläser pipettiert. Nach der Zugabe von internem Standard (50µL Ribitolösung) wurden die Proben abgedampft und, wie in der Standardmethode beschrieben wird, mit 50µL MethoxyaminHCl in Pyridin und 80µL MSTFA derivatisiert und gemessen. Alternativ wurden zu 100µL eines Mixes 50µL Ribitolösung zugegeben und die Proben abgedampft und derivatisiert. Anschließend wurden Verdünnungsreihen vorbereitet. Zur Verdünnung wurde ein Gemisch von 50:80 Pyridin:MSTFA verwendet.

## **Interne Kalibrierung**

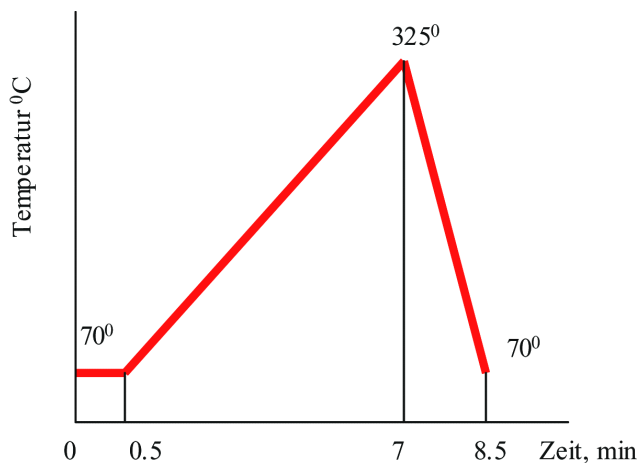
Nach der unter 2.3.4 beschriebenen Aufarbeitung von Zellextrakten, wurden von einem Standardmix 2µL bis maximal 1000 µL (schrittweise  $V_i=2*V_{i-1}$  oder häufiger) zugegeben. Um die Kalibrationskurve auch in Richtung geringerer Konzentrationen zu verlängern, wurden von diesem Extrakt nicht 1000µL sondern in absteigender Reihe bis 700µL genommen. Nach der Zugabe vom internen Standard (50µL Ribitolösung) wurden die Proben getrocknet und wie in der Standardmethode beschrieben mit 50µL MethoxyaminHCl in Pyridin und 80µL MSTFA derivatisiert und gemessen.

## **2.10. Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle**

Um alle möglichen Kontaminationen bei der Probenaufarbeitung zu berücksichtigen, wurde ab dem Moment des Waschens der Zellen auch eine Blindprobe bearbeitet.

Um mögliche Kreuzkontaminationen zwischen Proben bei den GC-MS-Messungen festzustellen und zu vermeiden, wurde vor der Messreihe und nach jeder zehnten Messung reines MSTFA gemessen.

Um das GC-MS-System zu equilibrieren wurde nach jeder Reinigung der Ionisationsquelle (2.5.4) das Massenspektrometer getuned. Dazu wurde 2-3 mal reines MSTFA gemessen und das Massenspektrometer erneut getuned. Anschließend wurden 2µL 0.4g/L Pentadekan in Cyclohexan gemessen. Hierfür ist ein kurzer Temperaturgradient ausreichend (70°C, 30sec; von 70°C bis 325°C mit einer Rate von 40°C/min).



**Abb. 2.9.** GC-Temperaturprogramm für die Qualitätskontrollmessung mit Pentadekan.

Der Pentadekanpeak ist bei einer solch schnellen Chromatographie sehr schmal, deswegen wurde er massenspektrometrisch im SIM - (*selected ion monitoring*) Modus gemessen, wobei eine deutlich schnellere Scan-Geschwindigkeit möglich ist, weil nur eine Massenspur ( $m/z$  212.3 für Pentadekan) gemessen wird. Hinzu kommt noch, dass in diesem Modus unmittelbar nach der Messung eine quantitative Auswertung basierend auf einer Massenspur, und damit rauschfrei und in wenigen Minuten möglich ist. Die MS-Einstellungen sind in der Tabelle dargestellt

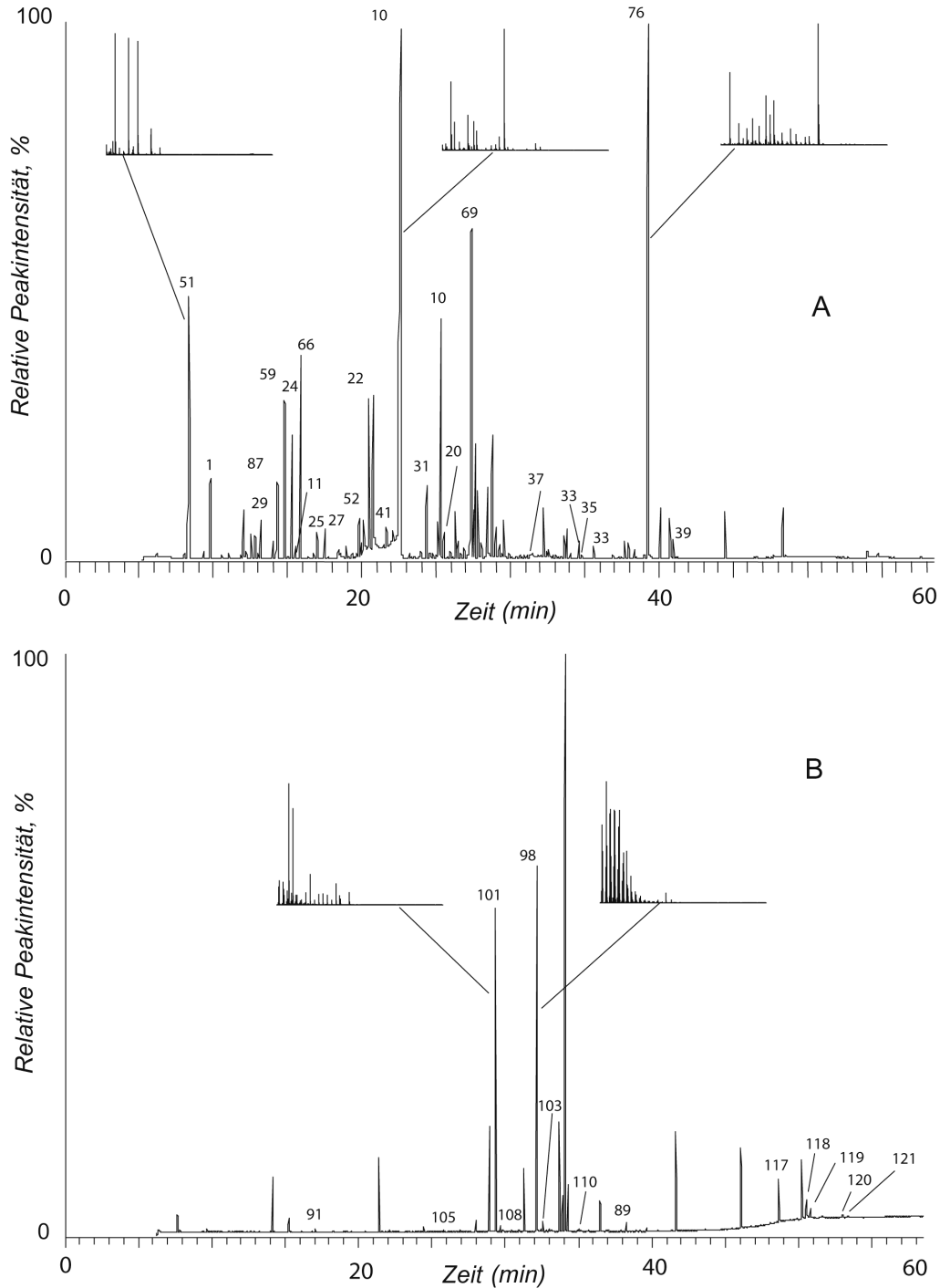
**Tabelle 2.14.** MS-Parameter für die Qualitätskontrollmessung mit Pentadekan.

Parameter	Wert
Detector Voltage (V)	100
Mass Trace ( $m/z$ )	212.2
Scan Mode	SIM
Peak Width (points per peak)	12
Solvent delay (min)	2

Bei guter Empfindlichkeit lag die Fläche des Peaks zwischen 40000-50000 relativen Einheiten. Nach der Messung von 40-50 Proben wurde diese Standardlösung noch einmal eingespritzt. Wenn die Signalfäche des Pentadekanpeaks unter 25000 lag wurde die Ionisationsquelle ausgebaut und gereinigt. Um den Abfall der Empfindlichkeit zu kompensieren, wurde für die letzten Proben die Detektorspannung (Detektorempfindlichkeit) bis auf 500V erhöht. Die Qualitätskontrolle bei der Datenauswertung wurde in Teil 2.8 dargestellt.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

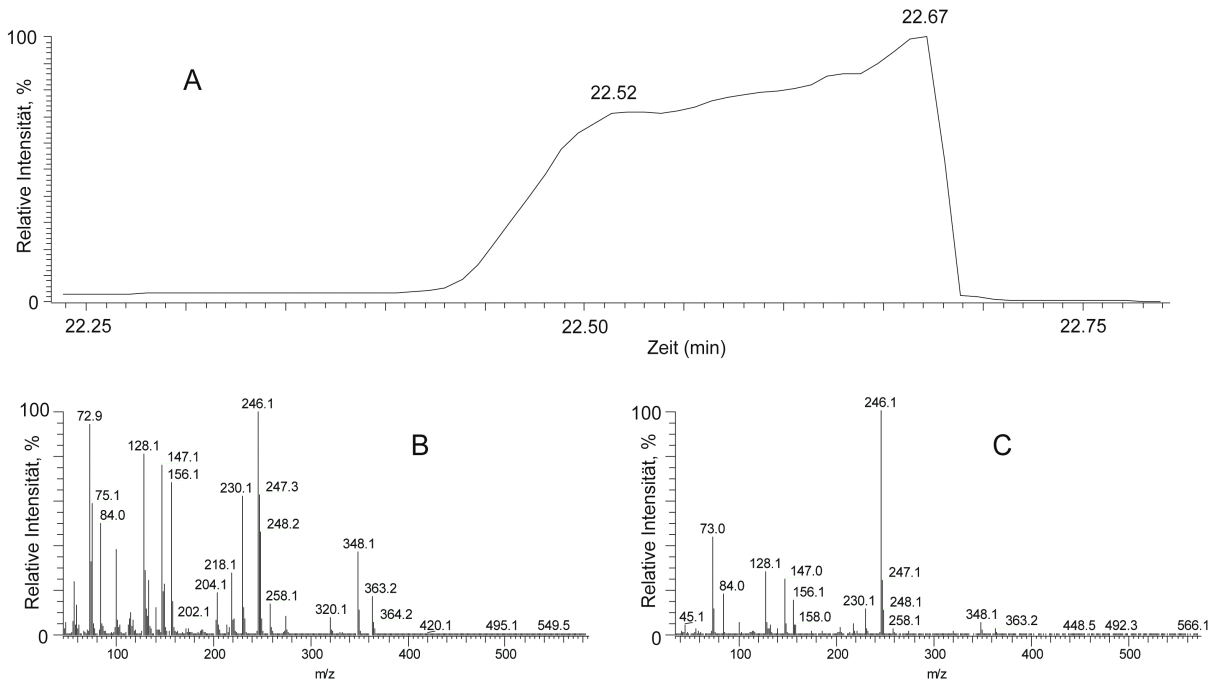
#### 3.2. Chromatographisches GC-MS-Profil des *C. glutamicum* WT ATCC 13032



**Abb. 3.1.** Chromatografisches GC-MS-Profil des *Corynebacterium glutamicum* WT ATCC 13032 (A) polare Phase und (B) unpolare Phase . Die Verbindungen sind entsprechend Anhang 6.1 nummeriert.

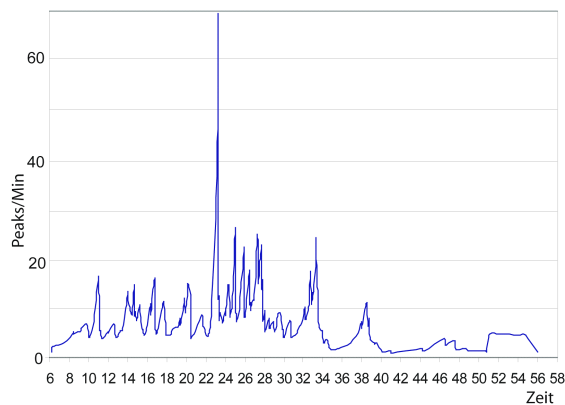
Bei der Anwendung der entwickelten analytischen Methode ergeben sich für den *C. glutamicum* WT ATCC 13032 sehr typische chromatographische Profile. Die entsprechenden Chromatogramme sind in Abb. 3.1 dargestellt.

Insbesondere das Profil der polaren Phase weist große Unterschiede in den Metabolitkonzentrationen auf. Wie man erwarten konnte, dominieren in der polaren Phase die Metabolite Glutamat und Trehalose. Diese Peaks sind sowohl chromatographisch als auch massenspektrometrisch sehr stark überladen. Daneben ergeben sich hohe Konzentrationen für die Metabolite Lactat, Alanin, Prolin, Succinat, Phosphat, Harnstoff und Glucose. In der unpolaren Phase sind - typische für Bakterien - die Fettsäuren Hexadecanoat und Oktadecanoat in großen Mengen zu finden. In diesem Zusammenhang bleibt nicht viel Spielraum für die Analyse der Metabolite, die sich im Spurenbereich befinden. Prinzipiell wäre noch eine Anreicherung durch die Verwendung von Splitless- oder PTV *large volume* Injektionen möglich. Auf der Ebene der Probenaufbereitung ist dies praktisch ausgeschlossen, da jede mögliche Aufkonzentrierung dazu führt, dass in Spuren vertretende Komponenten durch eine limitierte Löslichkeitskapazität des Extraktionsmittels verloren gehen. Aus der Sicht der GC-MS sind Glutamat und Trehalose schon bei dieser Konzentration nur begrenzt qualitativ zu erfassen und nicht quantifizierbar. Dazu kommt, dass benachbarte Peaks komplett durch große Peaks überlagert werden. Theoretisch könnte behauptet werden, dass bei der Auflösung aller einzelnen Massenspuren noch eine akzeptable qualitative und quantitative Analyse möglich wäre. Wenn man z.B. den überladenen Glutamatpeak (Abb. 3.2) quantifizieren möchte, dann könnte zur Integration eine schwache Massenspur genommen werden, die noch im linearen Messbereich des Detektors liegt. Für eine unter dem Glutamatpeak verborgene Substanz könnten eine oder mehrere charakteristische Massenspuren gefunden werden, die für diese Substanz eine quantitative Messung ermöglichen. In der Praxis aber stellt man fest, dass der massenspektrometrische Detektor im Bereich der „intensiven Peaks“ durch die hohe Ionenlast überladen ist und daher eine einwandfreie Funktion nicht gewährleistet ist. Darüber hinaus sind z.B. im überladenen Glutamatspektrum alle  $m/z$ -Spuren so stark amplifiziert, dass für eine überlagerte Substanz keine Massenspur mehr charakteristisch ist. Bei der in dieser Arbeit entwickelten Methode fällt in Folge des Glutamatsignals ein Bereich von 30-40sec aus und im Bereich von 2min ist die Datenauswertung erschwert.



**Abb. 3.2.** Überladener Glutamat-Peak im TIC (*total ion currency*)-Chromatogramm (A), das überladene Massenspektrum von Glutamat3TMS (B) und das normale Massenspektrum von Glutamat3TMS (C).

Im Falle des Trehalosepeaks ist die Situation etwas besser. Dort fallen nur 12-15sec des Chromatogramms aus, was aber reicht um eines von zwei Maltose-Derivaten zu verlieren. In diesem Zusammenhang ist es interessant die Verteilung von Peaks im Chromatogramm abzuschätzen. Dies ist in Abb 3.3 dargestellt.



**Abb. 3.3.** Peakverteilung für das Chromatogramm in Abb. 3.1.



Die maximale Anzahl von Peaks findet man direkt hinter dem Glutamat bei einer Retentionszeit zwischen 23 und 24 Minuten. Vor dem Glutamat und auf der Stelle des Glutamats kann ein Minimum beobachtet werden, was auf unterdrückte Peaks hindeutet. Im hinteren Teil sind deutlich weniger Peaks detektierbar. Die nächste Überlegung ist, ob es möglich wäre die GC-Messbedingungen so zu optimieren, dass die Metabolite gleichmäßiger verteilt werden könnten und sich dadurch eine bessere chromatographische Auftrennung erreichen lässt. Dieser Möglichkeit spricht die Tatsache entgegen, dass bei gleicher Dauer der Chromatographie die Aufenthaltszeit von schwerer flüchtigen Metaboliten in der Säule bei höherer Temperatur steigt. Das ist für labile Verbindungen nicht optimal. Dazu kommt, dass sich die Zuckerphosphate im mittleren Teil des Chromatogramms befinden und bei einer solchen Optimierung unmittelbar in den Hochtemperaturbereich verschoben werden.

### **3.3 Anzahl der detektierten Peaks im GC-MS Chromatogramm**

Um die potentielle Anzahl von Metaboliten, die bei Verwendung der entwickelten Methode für diesen Organismus gemessen werden können abzuschätzen, wurden alle Peaks im Chromatogramm gezählt. Dies wurde mit Hilfe des Programms AMDIS gemacht, so dass im Gesamtionenstrom (TIC) nicht aufgelöste Peaks aufgrund ihrer charakteristischen Massenspuren detektiert werden konnten. Bei der automatischen Auswertung wurden in der polaren Phase mit Hilfe von AMDIS 2185 Peaks detektiert. Es kommt aber oft vor, dass AMDIS eine Substanz mehrmals identifiziert oder kleine Fluktuationen im Chromatogramm als ein individueller Stoff falsch identifiziert werden. Alle möglichen Fehler und die korrekte Anzahl der detektierten Stoffe konnten nur bei genauer manueller Prüfung festgestellt werden. Dafür wurde ein Chromatogramm der polaren Phase verwendet und 50% dieses Chromatogramms manuell ausgewertet. Von den mit AMDIS detektierten 2185 Peaks wurden 1450 geprüft. Dies entspricht den ersten 30min eines chromatographischen Laufes. Dabei zeigte sich, dass nur 629 Peaks (43%) von AMDIS korrekt erkannt werden. Die Datenmenge ist groß genug um eine Anzahl von 950 Peaks für das gesamte Chromatogramm vorherzusagen. In der unpolaren Phase findet man 150-190 Stoffe. Das ergibt 1100 Stoffe pro Experiment. Dies entspricht jedoch nicht der Anzahl der vorhandenen Metabolite, da man bei der Derivatisierung für die meisten  $\alpha$ -Aminosäuren zwei oder drei Derivate und manchmal weitere Produkte durch Zyklisierungsreaktionen (z.B. Glutamat zu 5-Oxoprolin [59]) sowie Syn- und Antiisomere für metoxymierte Aldehyd- oder Ketogruppen erhält. Es konnten auch Produkte aus thermischen Abspaltungsreaktionen festgestellt werden, wie z.B. Aldehyde aus Corynomycolsäuren [60]. Auch bekannt sind mehrere

Artefakte, die durch Derivatisierungsreagenzien verursacht werden [61]. Die Identifizierung dieser Produkte ist sehr schwierig und oft nicht eindeutig. Wenn man für die identifizierten Metabolite alle Derivate summiert, dann entsprechen 202 Substanzen 133 (66%) Metaboliten. Es lässt sich daher abschätzen, dass die 1100 vorkommenden Derivate aus ca. 720 Metaboliten hervorgehen. Unter der Annahme, dass 20% aller Peaks artifiziell sind, kommt man auf ungefähr 600 Metabolite. Dabei sind aber wegen der schon erwähnten Schwierigkeiten nur ungefähr 300 quantifizierbar.

### **3.4. Identifizierung der Metabolite**

#### **3.4.1. Übersicht**

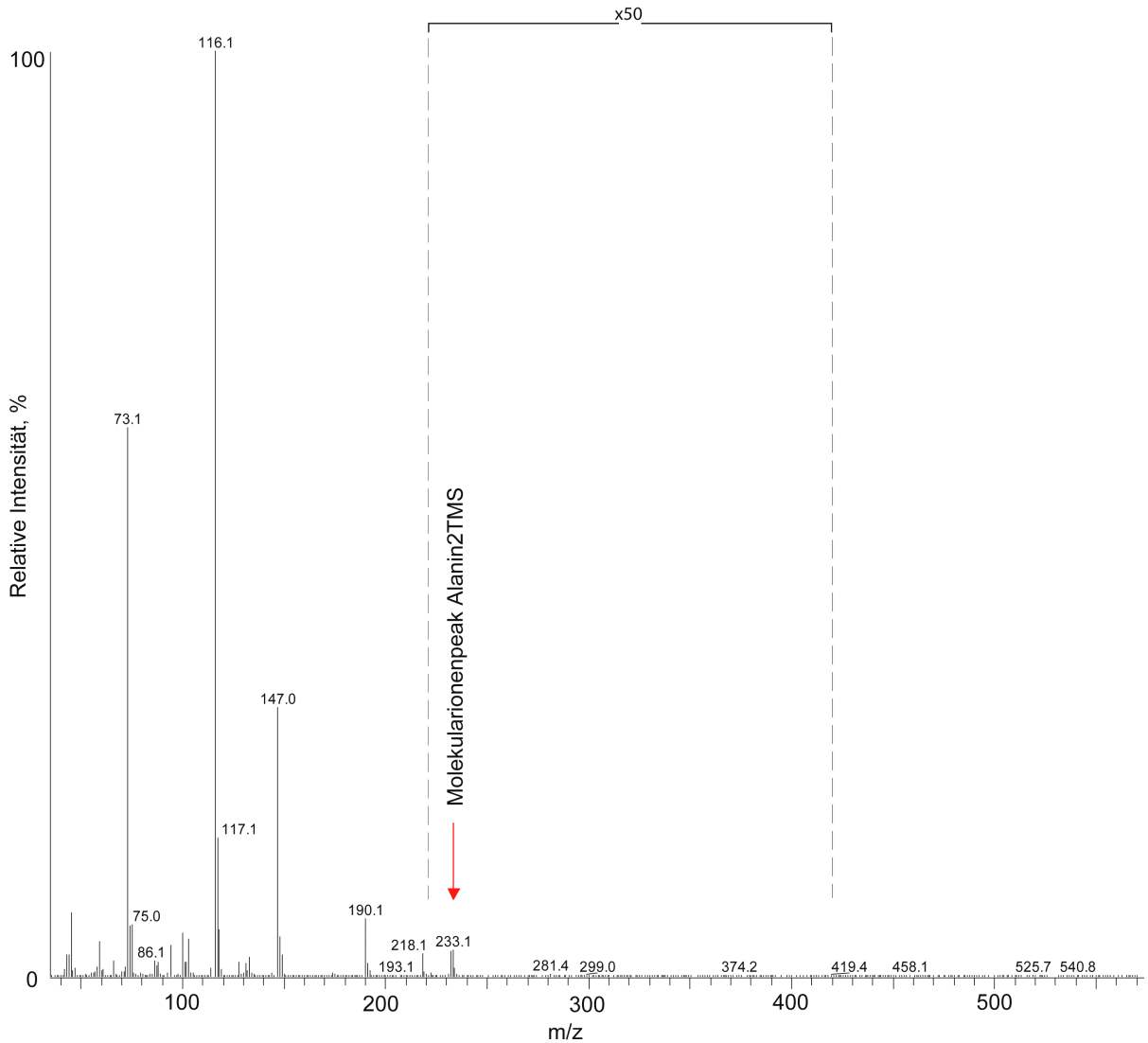
Mit Hilfe von verschiedenen Identifikationsmethoden wurden 166 Verbindungen identifiziert, die in der polaren Phase 88 und in der lipophilen Phase 33 vorkommenden Metabolite entsprechen.

#### **3.4.2. Identifizierung mit Hilfe der NIST-MS Bibliothek**

Bei der Identifizierung unbekannter Metabolite wurde der in 2.8.4. beschriebene Ansatz verwendet.

Durch den Abgleich von Massenspektren unbekannter Stoffe mit der NIST-Spektrenbibliothek konnten gute Vorhersagen für Substanzen getroffen werden, die auch üblicherweise im Zuge von pharmazeutischen Studien und in der Lebensmittelchemie analysiert werden. Dazu gehören Aminosäuren, Metabolite aus der Glycolyse und des Citratcyclus und weit verbreitete Fettsäuren. Die massenspektrometrische Übereinstimmung mit der NIST-Bibliothek lag für diese Stoffe meist zwischen 80% und 100%. Nach der Messung von entsprechenden Standards konnte der Erfolg der ursprünglichen Identifikation über die NIST-Bibliothek hinsichtlich der ursprünglich nicht derivatisierten Metabolite zu 90% verifiziert werden. Bei den restlichen 10% wurde der Derivatisierungsgrad falsch zugeordnet. Der Derivatisierungsgrad einer Substanz ließ sich jedoch häufig anhand des Molekülionenpeaks nach Verstärkung des Massenspektrums feststellen. So wurden beispielsweise im Fall von Alanin zwei Derivate gefunden. Mögliche Derivatisierungsgrade im Fall des Alanins sind eine einfache, zweifache und dreifache Silylierung.

Aus der molaren Masse für Alanin  $M=89$  g/mol und der Masse der Trimethylsilylgruppe  $M=73$  g/mol minus der entsprechenden Anzahl an Wasserstoffatomen errechnet man die Masse des Metabolitderivates (Tabelle 3.1).

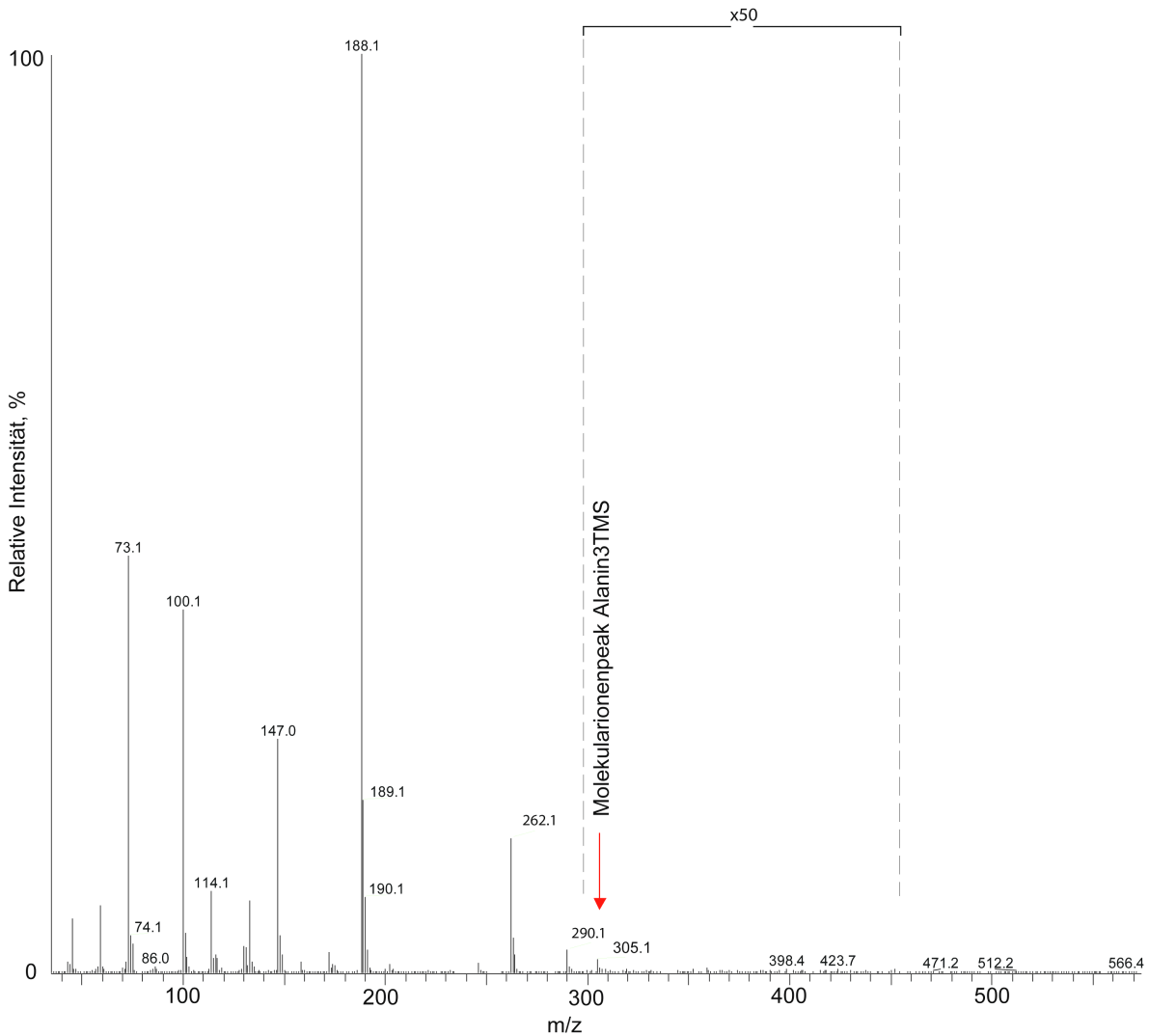


**Abb.3.4.** Massenspektrum von Alanin2TMS. Der  $m/z$  Bereich von 220 bis 440 amu ist um den Faktor 50 verstärkt.

**Tabelle 3.1.** Molekulargewichte von Verschiedenen Alaninderivaten.

Stoff	Masse ( $m/z$ )
Alanin1TMS	161
Alanin2TMS	233
Alanin3TMS	305

Auf den Massenspektren erkennt man den Massenpeak für zweifach (Abb.3.4) und dreifach (Abb. 3.5) silyliertes Alanin.



**Abb. 3.5.** Massenspektrum von Alanin3TMS. Der m/z Bereich von 300 bis 450 amu ist um den Faktor 50 verstärkt.

Für viele Substanzen gibt es Einträge in der NIST-Bibliothek, aber nicht für die jeweiligen trimethylsilylierten Formen. Da die Ähnlichkeit zwischen verschiedenen Derivaten viel zu gering ist, ist eine Identifikation über den Spektrenvergleich verschiedener Derivate nicht sinnvoll.

### 3.4.3. Identifikation basierend auf biochemischen Information und Standards

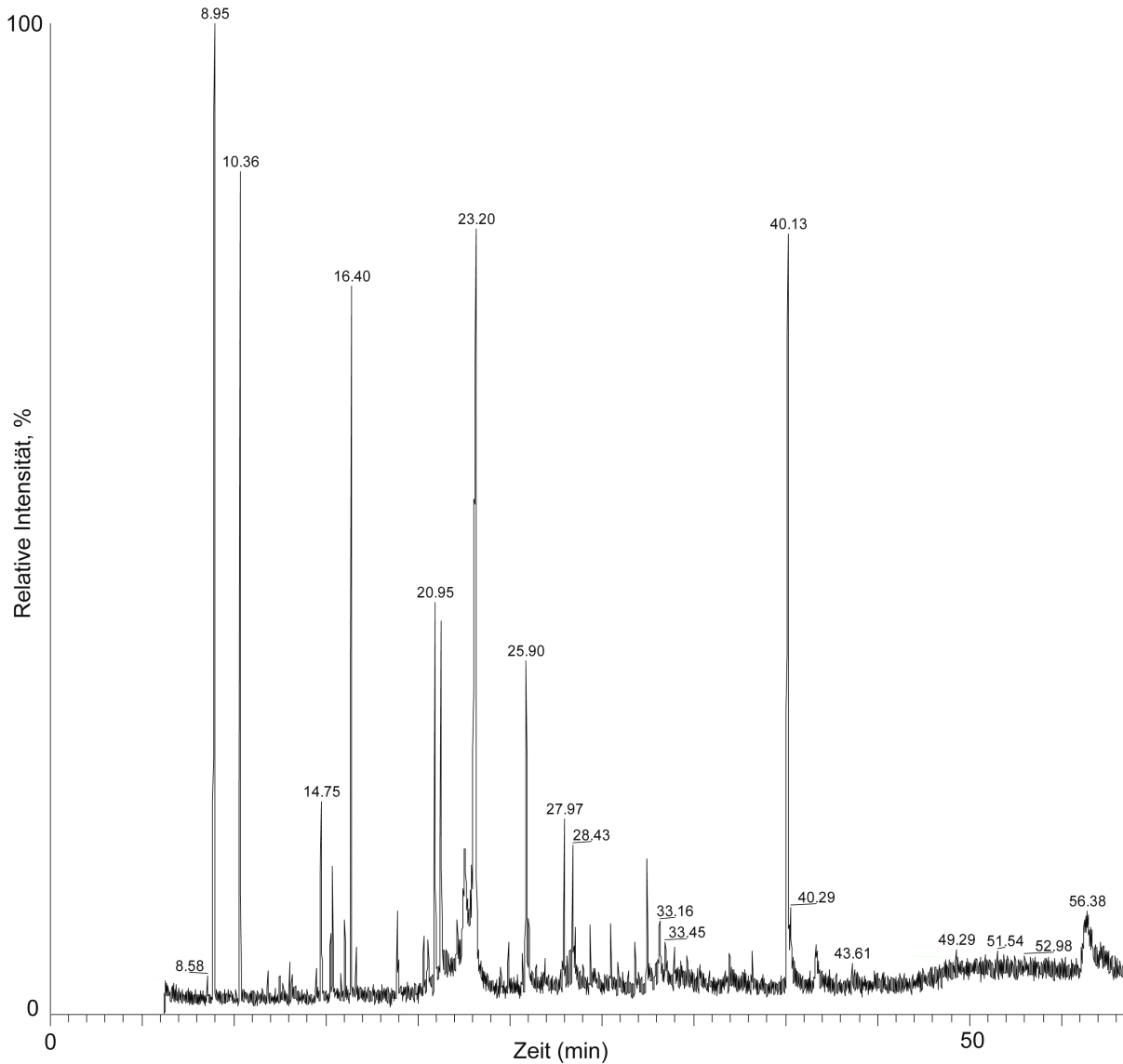
Eine weitere Identifizierungsphilosophie basierte auf der Idee, die Lücken in metabolischen Stoffwechselwegen zwischen schon identifizierten Metaboliten zu schließen und darüber hinaus die für dieses Organismus bekannten Stoffwechselwege abzudecken. Die Zielmetabolite wurden direkt als Standards gemessen und anschließend wurde nach ihnen im Zellextrakt gesucht. Es zeigte sich, dass viele Stoffe nicht mit der NIST-Bibliothek

identifiziert werden konnten, weil die Spektren zu schwach und zu verrauscht waren. Durch die zusätzliche Information über die Retentionszeit der als Standard vermessenen Substanzen war eine Identifizierung in Kombination mit dem Massenspektrum zu 90% erfolgreich. Leider ergibt sich das Problem, dass es nicht alle Metabolite kommerziell erhältlich sind. Der Aufwand, der mit der organischen Synthese dieser Metabolite verbunden ist, oder die hohen Preise bei einer Auftragssynthese, fordern zusätzliche Hilfsmethoden für genauere strukturelle Vorhersagen von im *C. glutamicum*-Extrakt detektierten Metaboliten.

#### 3.4.4. Chemische Ionisation $Cl^+$

Als mögliche Hilfsmethode zur Identifizierung der unbekannt Metabolite könnte die chemische Ionisation dienen. Bei dieser Art der Ionisation, die sanfter als die EI-Ionisation ist, findet man im Massenspektrum normalerweise auch mit guter Intensität den Molekülionenpeak. Bei verstärkter Auflösung des Gerätes und weiterer Verfeinerung der Auflösung durch statistische Auswertung, ist eine Massengenauigkeit von  $\pm 0.003/0.005$  amu zu erwarten [23]. Dies erlaubt eine relativ genaue Messung des Molekulargewichtes und eröffnet so die Möglichkeit zur Bestimmung der Elementzusammensetzung. Ein mit  $Cl^+$  aufgenommenes Chromatogramm mit iso-Butan als Ionisationsgas ist in Abb. 3.6 dargestellt.

Wie man in der Abbildung sehen kann, fällt die Intensität von Massenspektren mit steigender Temperatur drastisch ab. Darüber hinaus ist zwar in jedem Massenspektrum der Molekülpeak zu detektieren, jedoch ist er nicht intensiv genug, um präzise Massen zu bestimmen. Daher führte dieser Ansatz nur bei intensiven Signalen zum Erfolg. Die negativen Effekten liegen wahrscheinlich daran, dass die Ionisierungskraft des Reaktionsgases von der Temperatur abhängt [62]. Eine leichte Verbesserung erbrachte die Verstärkung der Detektorspannung auf 500V, da jedoch das Signalrauschen mitverstärkt wurde und so das Signal-zu-Rausch-Verhältnis nicht entscheidend erhöht wurde, ergab sich keine substanzielle Verbesserung. Da sich alle unbekannt Metabolite im Bereich von niedrigen Konzentrationen und nicht am Anfang des Chromatogramms befinden, konnten für sie keine nützlichen Massenspektren aufgenommen werden. Die Lösung dieses Problems liegt an der Konstruktion oder Funktionsweise des Gerätes. Wenn es technisch möglich wäre, die Temperatur in der Ionenquelle unabhängig von der GC-Temperatur niedrig zu halten (100-150<sup>0</sup>C), könnten die ganze Zeit gute  $Cl^+$  Spektren aufgenommen werden.



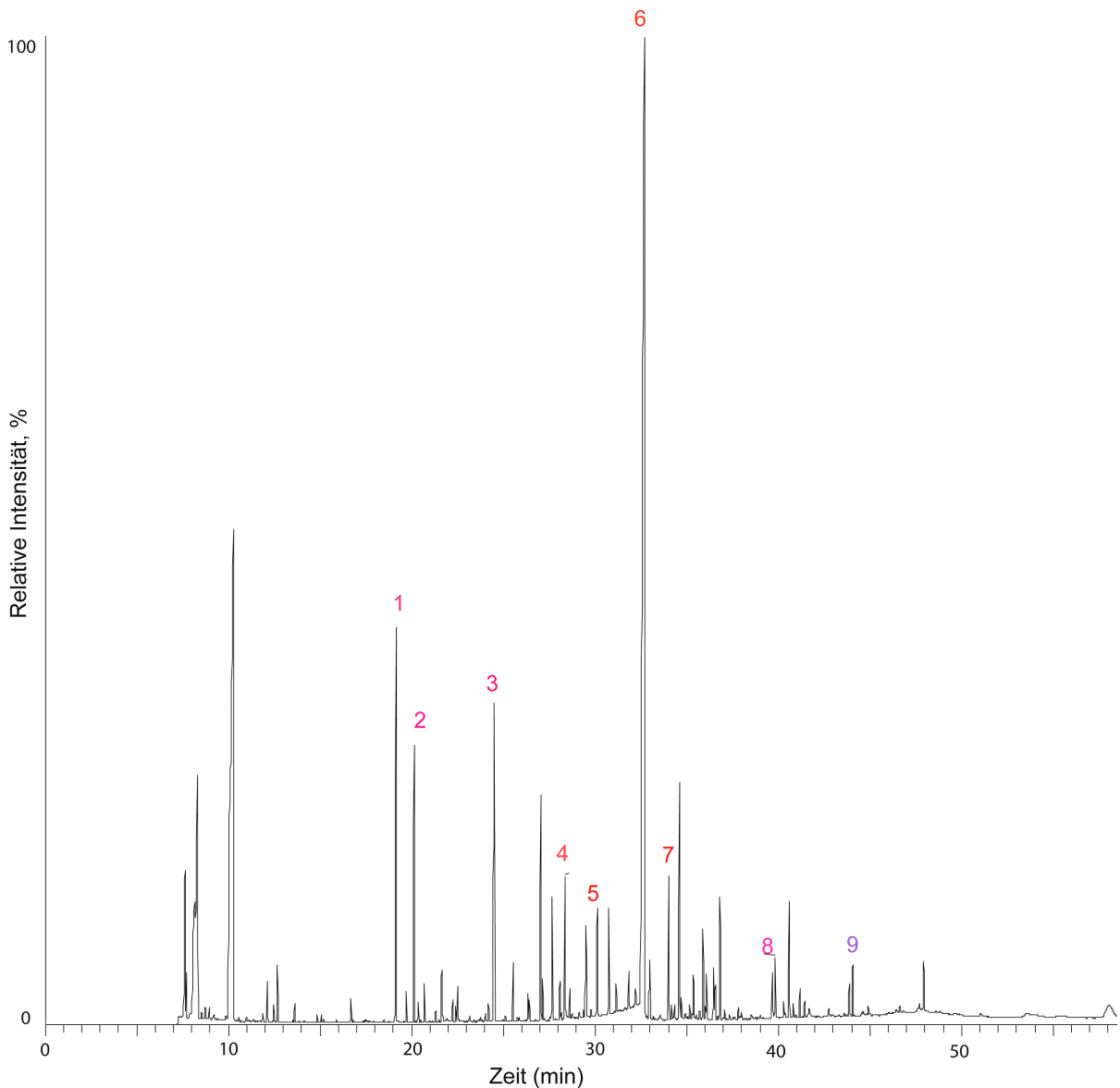
**Abb.3.6.** Typisches CI+-Chromatogramm von der polaren Phase eines *C.glutamicum* -Extraktes

### 3.4.5. Derivatisierung mit MBDSTFA

Wie bei der chemischen Ionisation kann die alternative Derivatisierung mit MBDSTFA (N-Methyl-N-tert-butyldimethylsilyltrifluoroacetamid) die Information über die genaue molekulare Masse des unbekannt Metaboliten zugänglich machen. In diesem Fall passiert das aber auf indirekter Weise, da in jedem Massenspektrum der intensivste Peak genau  $m/z=M-57$  – aufgrund des abspaltenden tert-Butylradikals- entspricht [23]. Bei guter Massengenauigkeit wie bei der chemischen Ionisation lassen sich Molekulargewicht und mögliche Elementzusammensetzung berechnen. Durch die Isotopenverhältnisse der Si-Atome kann darüber hinaus die Anzahl der durch Silylierung ersetzten Atome bestimmt werden und damit die Anzahl von Amino-, Hydroxy- oder Carboxylgruppen. Anschließend kann man

nach möglichen Kandidaten aufgrund des Molekulargewichtes oder der Bruttoformel in einer Datenbank suchen.

In der Abb. 3.7 ist ein typisches TBS (Tertbutylsilyl-) Chromatogramm dargestellt. Für eine erste Übersicht wurden die Peaks nur aufgrund ihrer Massenspektren mit Hilfe der TBS-Massenspektrenbibliothek des Max-Planck Instituts für Pflanzenphysiologie identifiziert (<http://www.mpimp-golm.mpg.de/mms-library/>).



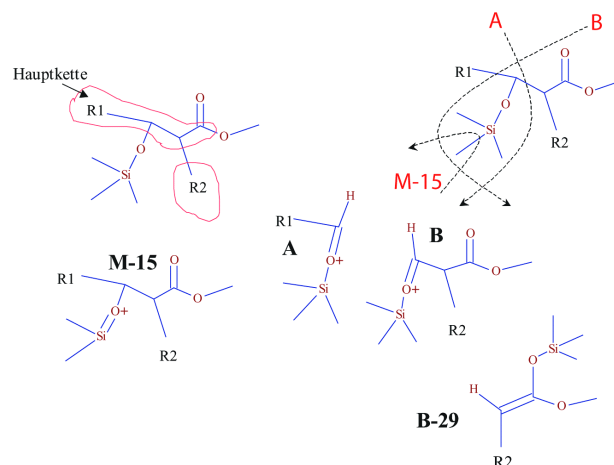
**Abb 3.7.** Typisches Chromatogramm für mit MBDSTFA silylierte Substanzen der polaren Phase des *C. glutamicum*-Wildtyps. Viele Metabolite konnten mit der TBS-MS-Bibliothek identifiziert werden. 1:Lactat2TBS, 2:Alanin2TBS, 3:Succinat2TBS, 4:Glutamat2TBS, 5:Malat2TBS, 6:Glutamat3TBS, 7:Lysin3TBS, 8:Diaminopimelat4TMS, 9:C32-Zeitstandard.

Nach verschiedenen artifiziiellen Signalen eluieren ungefähr ab der 12ten Minute organische Säuren wie z.B. Pyruvat und Lactat, danach kommen Aminosäuren. Zwischen 33-40min lassen sich Monosaccharide detektieren und am Ende des chromatographischen Laufes ließ sich 4-fach silyliertes Diaminopimelat identifizieren. Leider gibt es im Chromatogramm weder

Phosphate von Monosacchariden, noch Disaccharide und ihre Phosphate. Möglicherweise sind solche Verbindungen zu schwer und unter diesen GC-Bedingungen nicht flüchtig genug, um gaschromatographisch zugänglich zu sein. Das ist nicht verwunderlich, da die Masse des tert-Butyldimethylsilylradikals ( $m/z=145$ ) zweimal größer als die Masse des Trimethylsilylradikals ( $m/z=73$ ) ist. Im Vergleich ist die Masse des TBS-derivatisierten Glucosephosphats  $m/z=1044$  und nur  $m/z=692$  im Falle der TMS-Derivatisierung. Für Trehalose betragen die Werte  $m/z=1494$  gegen  $m/z=918$ . Unter diesem Gesichtspunkt hilft die Derivatisierung von Metaboliten aus *C. glutamicum*-Extrakten bei der Identifizierung unbekannter Substanzen nicht entscheidend weiter, da die meisten unbekanntes TMS-Derivate im Bereich von Zuckerphosphaten oder später eluieren. Daher sind diese Stoffe durch die oben beschriebene Massenzunahme im Falle der TBS-Derivatisierung nicht flüchtig. Für die Identifizierung aller anderen unbekanntes Metabolite, müsste zunächst eine aus Massenspektren und Retentionszeiten bestehende TBS-Bibliothek mit Hilfe von Standards aufgebaut werden. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgesehen. Die existierende TBS-Bibliothek des Max-Planck Instituts für Pflanzenphysiologie in Golm war nicht zugänglich.

### 3.4.6. Corynomycolsäuren

Corynomycolsäuren wurden in der unpolaren Phase des *C. glutamicum*-Extraktes identifiziert [63]. Die Identifizierung wurde aufgrund des sehr charakteristischen Spaltungsmusters durchgeführt (Abb. 3.8) [60].



**Abb. 3.8.** Spaltungsmuster für Corynomycolsäuren.

Zur Charakterisierung des Zerfallsmusters und zur Abschätzung der von der Kohlenstoffkettenlänge abhängigen Retentionszeit, wurde 18:0\_14:0



Corynomycolsäuremethylester (Methyl-2-tetradecyl-3-hydroxyoktadekanoat) als Standard gemessen.

**Tabelle 3.2.** Identifizierte Corynomycolsäuremethylester. Beobachtete charakteristische Fragmente A, B, B-29 und M-15 sind in Abb. 3.8 dargestellt.

Hauptkette	Seitenkette	RT	M	M-15	M-15 (Praktisch)	A	B	B-29
16:0	0:0	32.42	358.6372	343.6372	343	285	175	146?
18:1	0:0	34.9	384.6751	369.6751	369	311	175	146?
14:0	8:0	37.92	442.7985	427.7985	427	257	287	258
18:0	6:0	40.47	470.8522	455.8522	455	313	259	230
18:0	8:0	42.63	498.906	483.906	483	313	287	258
18:0	10:0	44.7	526.9597	511.9597	511	313	315	286
18:0	12:0	46.7	555.0135	540.0135	539	313	343	314
18:1	14:0	48.38	581.0514	566.0514	565	311	371	342
18:0	14:0	48.62	583.0673	568.0673	567	313	371	342
18:0	16:1	50.52	609.1051	594.1051	xxx	313	397	368
20:0	14:0	50.77	611.121	596.121	xxx	341	371	342
20:1	16:1	52.92	637.1589	622.1589	xxx	339	397	368
20:0	16:1	53.26	639.1748	624.1748	xxx	341	397	368

xxx- Ausserhalb des Messbereiches

Für alle Corynomycolsäuren wurden Massen für Fragmentationen vorhergesagt und jeder Kandidat aus dem Chromatogramm mit charakteristischem  $m/z=133$  Massenpeak wurde daraufhin genau untersucht. Falls drei Ionen entsprechend dem Spaltungsmuster gefunden werden konnten und die Retentionszeit der Elutionsreihenfolge nach Kettenlänge nicht widersprach wurde dieses Derivat als Corynomycolsäure identifiziert. Eine andere Variante der Identifizierung als in der Arbeit [63] beschrieben, ist in der Tabelle 3.2 dargestellt.

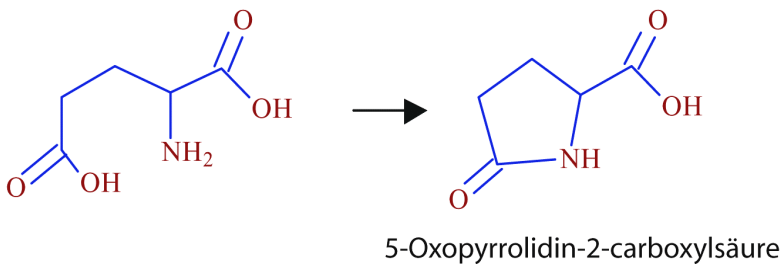
### 3.4.7. Besonderheiten bei der qualitativen Analyse einzelner Metabolite

Einige Metabolite können während des Probenaufarbeitungsprozesses Nebenprodukte bilden. Ob das passiert, kann nach der Messung von Standards festgestellt werden.

### Glutamat und Glutamin

Es ist bekannt, dass Glutaminsäure und Glutamin durch eine Zyklisierungsreaktion 5-Oxopyrrolidin-2-carboxylsäure (Pyroglutaminsäure, 5-Oxoprolin) bilden können [59, 64]. Im gemessenen Standard von Glutaminsäure und Glutamin konnte dieses Produkt ebenfalls gefunden werden. Diese Reaktion verläuft mit einer merklichen Geschwindigkeit in MSTFA ab, so dass sie bei der quantitativen Auswertung berücksichtigt werden muss.

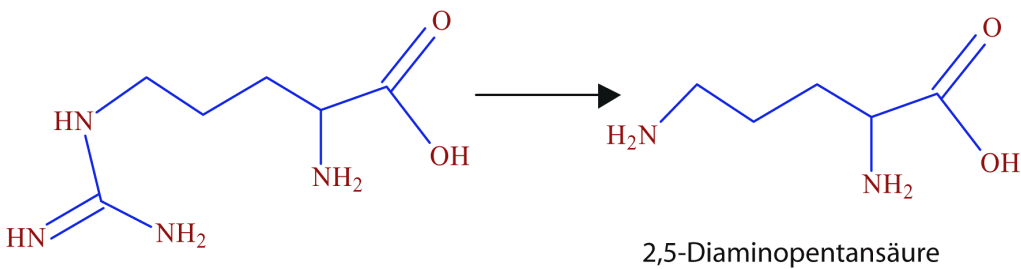
Eine Hydrolyse von Glutamin mit Umwandlung in die Glutaminsäure, bei der Probenaufarbeitung wurde nicht festgestellt.



**Abb. 3.9.** Zyklisierungsreaktion von Glutaminsäure.

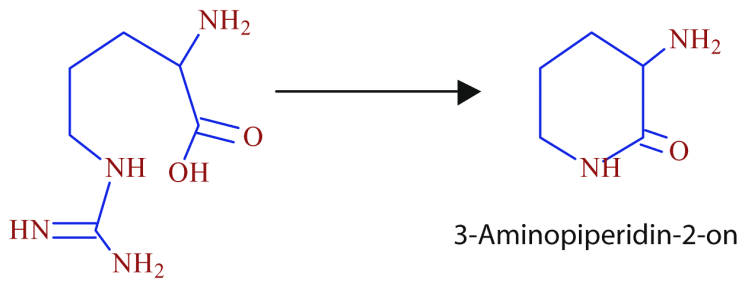
### Arginin

TMS-Derivate von Arginin sind nicht besonders stabil unter den Bedingungen der Trimethylsilylierung und können in Ornithin und ein TMS-Derivat von Harnstoff zerfallen [54].



**Abb. 3.10.** Abspaltungsreaktion von Arginin.

Bei der Messung von Arginin-Standards wurde ein zusätzliches Produkt gefunden, das mit der NIST-MS Bibliothek mit einer Übereinstimmung von über 90% als 3-Aminopiperidin-2-on identifiziert wurde. Theoretisch ist solche Zyklisierung möglich, wurde aber in der Literatur nicht beschrieben.



**Abb. 3.11.** Zyklisierungsreaktion von Arginin.

## 3.5. Quantifizierung

### 3.5.1. Quantifizierung mit Hilfe von AMDIS

Auf den ersten Blick scheint die Philosophie von AMDIS zur Identifizierung [65] auch gut für die Quantifizierung geeignet zu sein:

1. Massenspuren, die zu einer Komponente gehören, werden aufgrund ihres gemeinsamen, ähnlichen Verlaufs vom Rauschen und anderen benachbarten Komponenten extrahiert.
2. Die Summe aller Massenspuren in einem vollen Massenspektrum ist besser als eine oder mehrere Massenspuren, weil dabei ein intensiveres Signal geliefert wird und damit die Sensitivität zunimmt.
3. Die Peakfläche wird im Ausgabefile des Programms abgelegt.

In der Realität ist die Extraktion eines Massenspektrums vom Rauschen und von benachbarten Peaks nur für einzelne Massenspuren eines gegebenen Metabolits vollständig. Andere Massenspuren können mit mehreren anderen Komponenten oder mit dem Signalrauschen gemeinsam sein. Das beeinflusst die Identifikation nur geringfügig, weil ein extrahiertes Spektrum nur von der Spitze eines Peaks genommen wird. Für die Quantifizierung, bei der die ganze Fläche unter dem Peak wichtig ist, ist das nicht akzeptabel. Die quantitative Auswertung mit AMDIS von parallel gemessenen Proben ergab eine 70-100%ige Standardabweichung. Aus der Korrespondenz mit den AMDIS-Autoren ist klar geworden, dass das Programm ausschließlich für Identifikationszwecke entwickelt wurde.

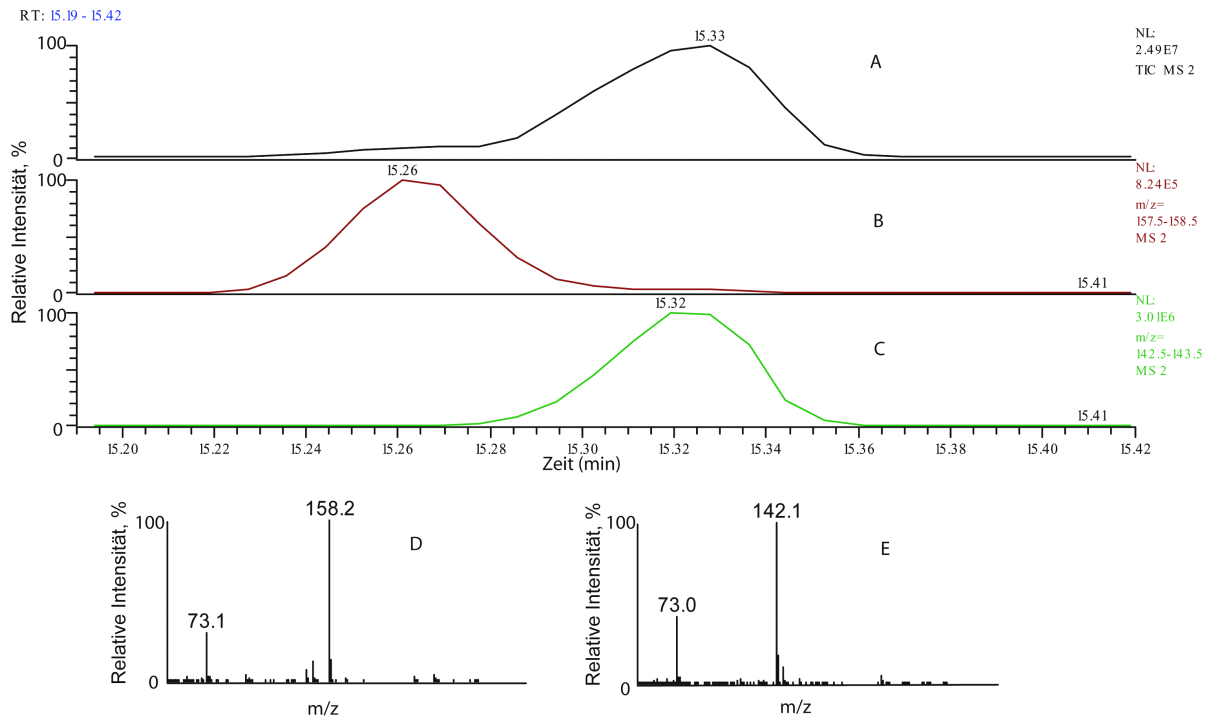
### 3.5.2. Quantifizierung mit Hilfe von Xcalibur

Der beste Weg zur Quantifizierung von Metaboliten in einem komplexen Chromatogramm ist die Verwendung von charakteristischen Massenspuren mit deren Hilfe man das Signal eines Derivates vom Rauschen und von Signalen anderer Substanzen extrahieren kann (Abb. 3.12). Selbstverständlich können solche charakteristischen Massenspuren nur begrenzt theoretisch vorhergesagt werden, weil die Wahrscheinlichkeit eines möglichen Fehlers zu groß ist. Deswegen wurden sie per Hand für jede Substanz durch detaillierte Untersuchung realer Rohextraktchromatogramme ermittelt.

Im Xcalibur-Programm (Thermo Finnigan) ist es möglich eine Quantifizierung mittels spezifischer Massenspuren durchzuführen. Darüber hinaus gibt es mehrere Quantifizierungsalgorithmen zur Auswahl.

Das in diesem Programm implementierte Initialisierungsverfahren muss unbedingt folgende Teile enthalten:

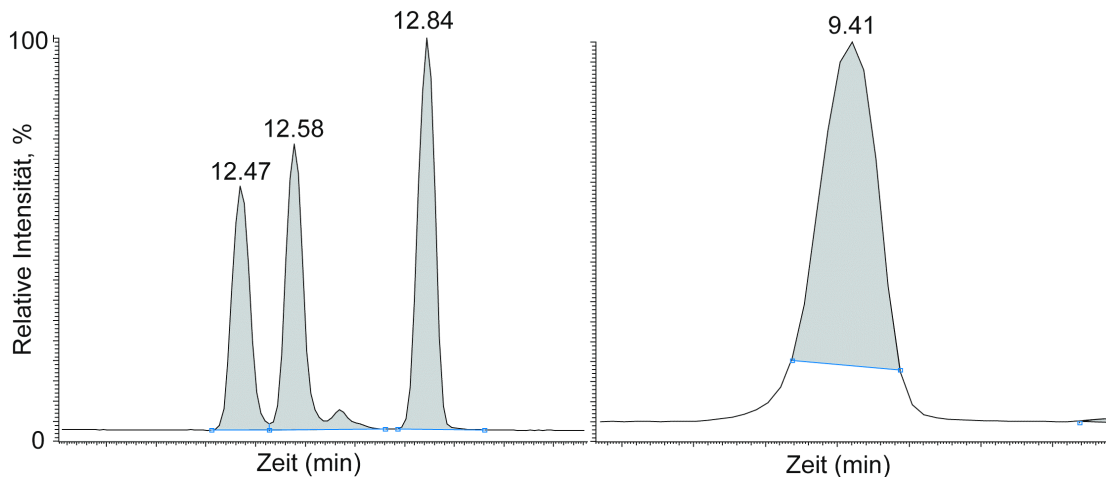
1. Eine Liste mit Metaboliten, die quantifiziert werden sollen.
2. Individuelle Massenspuren für die Quantifizierung oder alternativ der TIC (Total Ion Currency, summierter Ionenstrom).
3. Quantifizierungsparameter, die für jede Komponente spezifisch sind.
4. Wenn nötig eine Kalibrationskurve.



**Abb 3.12.** TIC(A) und individuelle Massenspuren von Isoleucin2TMS(B)  $m/z=158$ , Prolin2TMS(C)  $m/z=142$  und Massenspektren von Isoleucin2TMS (D) und Prolin2TMS (E).

Der ICIS-Algorithmus (*Interactive Chemical Information System*) wird als erste Wahl von den Programmentwicklern für die Quantifizierung von massenspektrometrischen Daten empfohlen. Bei der Anwendung dieses Algorithmus auf unsere Chromatogramme war es

jedoch nicht möglich, mehr als 50% aller Komponenten genau aufzulösen. Für komplexe Chromatogramme war es unmöglich befriedigende Einstellungen für die Parameter "baseline window", "area noise factor" und "peak noise factor" zu definieren. Die typischen Quantifizierungsfehler sind in Abb. 3.13 gezeigt.



**Abb.3.13.** Typische Quantifizierungsfehler bei der Verwendung des ICIS-Algorithmus.

Der zweite Quantifizierungsmöglichkeit in Xcalibur ist durch den Genesisalgorithmus gegeben. Dieser Algorithmus ist einfacher als der ICIS-Algorithmus und hat weniger Initialisierungsparameter für die Quantifizierung. Es treten genauso viele Fehler bei der Auswertung von komplexen Chromatogramme auf wie bei der ICIS-Methode.

Die besten Ergebnisse wurden bei der Verwendung des Avalon-Algorithmus erhalten. Dies ist der komplexeste Algorithmus, bei dem viele geometrische und Intensivitätsparameter für jeden Peak eingestellt werden können. Die wichtigsten von ihnen sind:

1. *Start threshold*- Signalintensität auf der linken Seite des Peaks
2. *End threshold*- Signalintensität auf der rechten Seite des Peaks
3. *Area threshold*- Minimale Peakfläche
4. *P-P threshold* und *Tension* – sind wichtig um Signale sauber von einander abzutrennen
5. *Bunch factor*- wird benutzt um falsch getrennte Peaks zu verbinden
6. *Smoothing points*- Anzahl von Punkten bei der Signalglättung
7. RT- Retentionszeit
8. RT Window – Retentionszeitfenster
9. m/z – Charakteristische Ionenspuren

In den allen Algorithmen wird angeboten die Detektion eines Peaks aufgrund seines Massenspektrums mit der Quantifizierung zu kombinieren. Die Qualität der Identifikation hinsichtlich der massenspektrometrischen Übereinstimmung zwischen dem Metabolitspektrum im Chromatogramm und in der massenspektrometrischen Bibliothek

(*direkt fit*, *reversed fit*) soll auch vermittelt werden. Leider wurden benachbarte Peaks mit ähnlichen Massenspektren oft verwechselt, wenn die Detektion auf einem charakteristischen Massenspektrum basierte. Die zweite Möglichkeit besteht darin, eine unbekante Substanz aufgrund ihres intensivsten Massenpeaks zu detektieren. Dies spricht jedoch dem Ansatz, zur Quantifizierung spezifische Massenspuren zu verwenden, entgegen (Auflösung eng benachbarter Peaks), da die spezifische Spur nicht zwangsläufig die intensivste ist.

Der einzige mögliche Detektionsparameter ist die Retentionszeit, die mit den zwei Initialisierungsparametern, erwartete Retentionszeit (*expected retention time*) und Retentionszeitfenster (*retention time window*) kontrolliert wird.

Die Einstellungen für alle 9 oben genannten Parameter wurden empirisch gefunden, und fortlaufend optimiert, um die beste Quantifizierung mit einem Minimum an Fehler für alle bekannten und unbekannt Metabolite zu erreichen. Unter der Voraussetzung, dass Organismus und analytische Bedingungen konstant bleiben, können mit Ausnahme der Retentionszeitparameter alle übrigen Einstellungen unverändert übernommen werden.

Mit der auf diesem Ansatz basierenden Quantifizierung wurde eine hervorragende Qualität erreicht. Problematisch bleiben jedoch Signale mit schlechter Qualität aufgrund von Überladungseffekten (Glutamat, Harnstoff), oder aufgrund höher Polarität, die eine schlechte Affinität zum unpolaren Säulenmaterial verursacht (Harnstoff2TMS, Valin1TMS). Das Ergebnis dieser Effekten ist ein Peaktailing und eine stark schwankende Retentionszeit. Ebenfalls schwierig sind eng benachbarte Peaks mit fast gleichen Massenspektren wie z.B. Glucose und Mannose. Schlecht geformt sind auch Peaks mit sehr kleiner Signalintensität, aber für diese ist eine korrekte Quantifizierung ohnehin fraglich, weil sich ihre Fläche oft unter dem Quantifizierungsgrenzwert befindet. Alle obengenannten Fälle verursachen eine falsche geometrische Integration von Peaks, die nur per Hand korrigiert werden kann. In einem durchschnittlichen Chromatogramm werden 90-95% aller Peaks völlig automatisch richtig integriert.

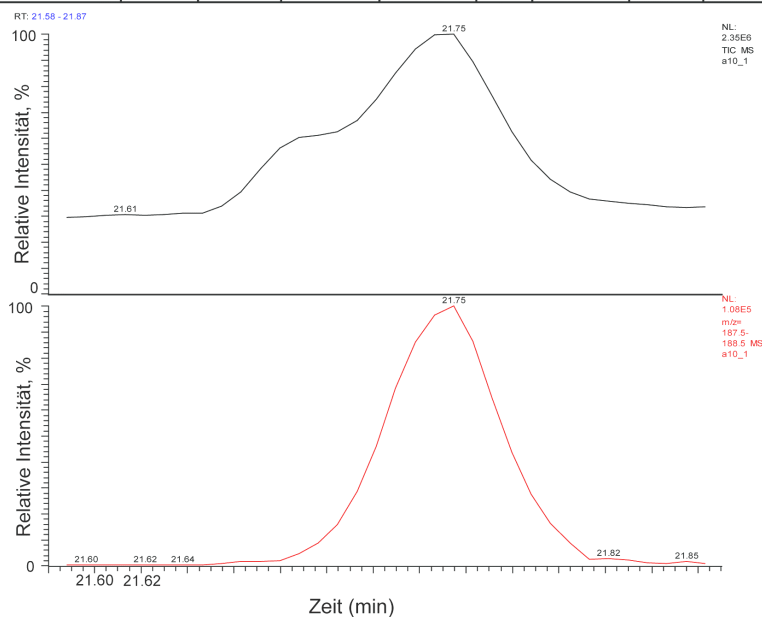
### **3.5.3. Entwicklung eines Programms zur Verbesserung/Beschleunigung des Auswertungsprozesses**

Das Programm Xcalibur hat sich als geeignete Software für die quantitative Analyse erwiesen. Ein großer Nachteil bestand jedoch darin, dass kein einziger Quantifikationsparameter in Xcalibur automatisch importiert werden konnte. Das Xcalibur-Programminterface ist so gestaltet, dass jeder Parameter in ein Fenster eingetragen werden muss. Die Fenster befinden sich auf verschiedenen Seiten und jede Eintragung muss mit einem Knopfdruck bestätigt werden. Der Aufwand alle Quantifizierungsparameter für

mehrere hundert Metabolite einzutragen war nicht akzeptabel. Hinzu kommt, dass die Ergebnisse in sehr unbequemen Formaten ausgegeben werden. Das ist im besten Fall ein mehrseitiges Microsoft Excel Dokument bei dem auf jeder Seite ein Metabolit mit seinem Ausgabeparametern abgelegt wird. Zwar gibt es die Möglichkeit alle Quantifizierungsparameter in einem nur von Xcalibur lesbaren File abzuspeichern, aber nur unter der Voraussetzung, dass alle Parameter schon für einen bestimmter Proben typen optimiert sind. Dies ist für das Konzept der Retentionszeitkorrektur nicht gegeben und funktioniert daher nicht. Sehr positiv ist die Tatsache, dass für Xcalibur ein Entwicklungskit mitinstalliert werden kann. Dieses Entwicklungskit enthält alle wichtigen Bausteine von Xcalibur für eine weitere Programmierung im Form eines Visual-Basic 6 Projektes. Die Idee war daher ein Programm zu entwickeln, das es ermöglicht, die Liste von mit AMDIS identifizierten Metaboliten und ihrer Retentionszeiten in Xcalibur für die Quantifizierung zu importieren und dadurch die besten Eigenschaften von beiden Programmen zu vereinen.

### Vorbereitung des AMDIS Ausgabefiles

Name	R.T.	R.I.	Tot.Signal	RI-RI(lib)	Net	Weighted	Simple	Reverse
??? Asp4TMS	21.689	1603.6	161088	1.2	52	58	54	64
? Asp4TMS	21.744	1606.5	107398	4.1	76	80	48	79
Asp4TMS	21.748	1606.8	387423	4.4	91	92	79	91
Asp4TMS	21.755	1607.2	382396	4.8	91	92	77	91
Asp4TMS	21.762	1607.5	373271	5.1	89	92	71	90
Glu3TMS	22.156	1628.6	2695742	0.1	93	96	89	95
Glu3TMS	22.16	1628.8	3660153	0.3	93	95	90	95
ArabinoseL1	22.925	1669.7	1010493	0.1	98	97	95	97
ArabinoseL1	22.93	1669.9	1498565	0.3	99	98	96	98
ArabinoseL1	22.972	1672.2	4282163	2.6	86	89	88	89



**Abb. 3.14.** AMDIS Report mit mehrfachen Identifikationen für Aspartat4TMS, TIC und spezifische Massenspur für Aspartat4TMS.

Um die Identifizierung von in Spuren vorhandenen Metaboliten mit AMDIS zu sichern, müssen die für die Geometrie des Peaks und die Empfindlichkeit verantwortlichen Parameter in AMDIS auf ihren höchsten Wert eingestellt werden. Der Nachteil solcher Einstellungen ist, dass intensive Peaks mehrfach identifiziert werden. Jede Fluktuation von Massenspuren wird als Komponente identifiziert (Abb. 3.14). Diese Situation kann vereinfacht werden, wenn alle Komponenten mit dem selben Namen innerhalb eines Retentionszeitabschnittes als ein Metabolit betrachtet werden. Dann entspricht die gesuchte Retentionszeit derjenigen unter der Peakspitze. Die Komponente innerhalb des Retentionszeitcluster, für die die größte Peakfläche im AMDIS-Report ausgegeben wird (*Total Signal*), liegt in der Regel genau unter der Peakspitze. Alle anderen Komponenten mit dem selben Namen können im Report gelöscht werden.

Das zweite Problem besteht darin, dass AMDIS Substanzen sehr oft falsch identifiziert. Es gibt mehrere Komponenten, die fast gleiche Massenspektren aber verschiedene Retentionszeiten haben. Es ist in AMDIS möglich für die Komponenten außerhalb des RI-Fensters (Retentionsindexfenster) der Bibliothek die Ausschlussparameter zu verstärken. Das ist aber nur generell für alle Komponenten im Chromatogramm möglich. Dies ist nicht erwünscht, da einige Komponenten sehr un stabile Retentionszeiten aufweisen (Harnstoff). Darüber hinaus schwanken auch die Retentionszeiten überladener Peaks und die unmittelbar darauf folgenden Signale. Werden Proben gleicher Art analysiert so funktioniert dieses System gut. In diesem Fall können zusätzlich die Retentionsindices für alle Komponenten korrigiert werden und ausschließend der Parameter für Strafpunkte (*penalty*) für die Abweichung von der Bibliothek bei der AMDIS-Beurteilung der Identifikationsqualität auf unendlich stark (*infinite*) gestellt werden. Alle Identifikationen außerhalb des RI-Fensters nach dem AMDIS-Processing können im AMDIS-Report gelöscht werden.

### **3.5.4. Einfache Verbindung des AMDIS Ausgabefiles mit dem Xcalibur-Programm**

Es wurde ein Versuch unternommen, mit dem Ziel ein Programm zu schreiben, das nötige Korrekturen im AMDIS-Report machen kann und diesen als einfache Matrize als „gefundene Metabolit-Retentionsindices“ ausgibt. Dann werden zu diesen Matrizen alle Xcalibur-Quantifikationsparameter geschrieben und in eine Xcalibur-Quantifikationsmethode umgewandelt. Dies sollte mit Hilfe des Xcalibur-Entwicklungskits geschehen. Nach der Erstellung des entsprechenden Programms wurden jedoch schnell die Limitationen der Idee der einfachen Verknüpfung zwischen AMDIS und Xcalibur sichtbar.



1. Nur eine Liste von Retentionszeiten konnte für mehrere Proben gleichzeitig mit Xcalibur prozessiert werden.

Im ersten Versuch wurde für jede Komponente aus allen Proben eines Experimentes eine mittlere Retentionszeit errechnet. Ein durch AMDIS verursachter Identifikationsfehler führte aufgrund einer nicht korrekten Retentionszeit zu einer veränderten mittleren Retentionszeit, so dass in Xcalibur eine Identifizierung der entsprechenden Komponente nicht möglich war. Solche Fehler mussten per Hand korrigiert werden.

2. Nach der Prozessierung musste der ziemlich unbequeme Xcalibur Report erneut bearbeitet werden, um ihn in einem akzeptablen Format zu gestalten. Darüber hinaus mussten alle quantitativen Werte auf den internen Standard und die Zellenmenge normiert werden, was in Xcalibur nicht möglich war.

### **3.5.5. Neuaufbau des Xcalibur-Quantifizierungsteils**

Alle Module, deren Kombination den Quantifizierungs- und Reportausgabeteil von Xcalibur ergeben, wurden aus dem Xcalibur Entwicklungskit genommen. Ihre Quellcodes wurden teilweise neu geschrieben und zusammen mit dem AMDIS-Korrekturteil in ein Gesamtprogramm implementiert.

Bei der Verwendung dieses Programms wurde die Anzahl von Fehlern deutlich aber nicht komplett reduziert. Die Fehlerrate hängt von der Qualität des Chromatogramms ab und kann weiter reduziert werden, wenn eine AMDIS-Bibliothek für jeden Probenotyp vorbereitet wird. Die wichtigste Rolle spielen dabei präzisere Retentionsindices und engere RI-Fenster, die die Möglichkeit falscher Identifikationen reduzieren.

### **3.5.6. Manuelle Korrektur der Peaksintegration**

Es ist möglich im Quanbrowser von Xcalibur zu prüfen, wie gut jeder Peak integriert wurde. Um absolut zuverlässige Ergebnisse zu bekommen, muss jeder Peak geprüft werden. In der Regel ist jede fünfzehnte Probe mit verschiedenen GC-MS Fehlern belastet, die nicht einfach zu erklären sind, aber als Fehler qualifiziert werden können. Nach der manuellen Korrektur von Peaksflächen wird ein üblicher Xcalibur Report in Form eines Microsoft-Excel-Dokuments erstellt. Um eine -der automatischen Prozessierung analogen- Ausgabetablelle zu erhalten, wurde ein Visual-Basic-Macro programmiert.

### 3.5.7. Relative und absolute Quantifizierung

In der Massenspektrometrie besitzen Stoffe verschiedener Natur ungleiche Ionisierbarkeit. Die Steigung von linearen Kalibrationskurven für verschiedene Metabolite ist deswegen unterschiedlich und kann zusätzlich vom Matrixgehalt der Probe beeinflusst werden. Wenn die Quantifizierung auf individuellen Massenspuren basiert, können sogar ungefähre Abschätzungen über die Konzentrationverhältnisse zwischen verschiedenen Metaboliten innerhalb einer Probe falsch sein. Wenn man an einem Vergleich von metabolischen Profilen interessiert ist, ist eine absolute Quantifizierung nicht notwendig. Für eine solche relative Quantifizierung ist es aber wichtig zu wissen, wie groß der dynamische Bereich der Messung ist (Quantifizierungsgrenze). Um Metabolite in einer Probe grob vergleichen zu können, werden Signal-zu-Konzentrations-Werte (Responsefaktoren) benötigt. Von einer genauen absoluten Quantifizierung kann man bei diesem Ansatz jedoch noch nicht sprechen, weil die Vollständigkeit der Extraktion für jeden einzelnen Metaboliten geprüft werden muss, was mit sehr großem Aufwand verbunden ist. Um Responsefaktoren zu bestimmen und Quantifizierungsgrenzen für identifizierte Metabolite festzustellen, wurden zunächst alle identifizierten Metabolite in drei verschiedenen Gemischen zusammengesetzt und anschließend Verdünnungsreihen von diesen Lösungen gemessen. Zusätzlich wurde auch eine interne Quantifizierung durchgeführt, um Matrixeffekte zu berücksichtigen. Die Auswertung basiert auf der Methode der Standardaddition [66, 67]. Das intrazelluläre Volumen beträgt für *C.glutamicum*  $0.4\mu\text{m}^3$  [68] oder anders ausgedrückt  $2\mu\text{L}/\text{mg}$  Trockengewicht. 1g Feuchtmasse entspricht 0.21g Trockengewicht [69], Optische Dichte von 1 (600nm) entspricht 0.34 mg Trockengewicht/mL [70, 71]. Aufgrund dieser Information konnte das gesamte intrazelluläre Volumen einer Probe und anschließend die intrazelluläre Konzentration von Metaboliten bestimmt werden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.3 (externe Quantifizierung) und Tabelle 3.4 (interne Quantifizierung) zusammengefasst. Die Responsefaktoren zum Ribitol lagen im Bereich zwischen 0.1 und 3. Die gesamte Übereinstimmung zwischen Responsefaktoren aus der Messung von Standardlösungen und bei der internen Quantifizierung aufgrund von Matrixeffekten war relativ gering. Nur für 26% der Metabolite konnte sie als gut beurteilt werden (z.B. 2-Oxoglutarat, Lysin, Leucin, Glycin, Alanin, Threonin, Cytosin, Glutarat, Glycerat) und für 10% der Metabolite als sehr schlecht (z.B. Diaminopimelat, Galactosamin, Tryptophan, Ornitin, Norvalin, Fructose). Der größte Anteil von Metaboliten befindet sich im Spurenbereich. Um den Arbeitsbereich bei der Quantifizierung abzuschätzen, wurden bei der internen Quantifizierung auch im Vergleich zur Standardmethode reduzierte Mengen des Extrakts gemessen. Nach der Bestimmung der Metabolitkonzentrationen im Extrakt mit Hilfe von der Methode der Standardaddition

konnten die Kalibrationskurven weiter in die Richtung der Konzentrationsabnahme verlängert werden (Abb.3.15). Auf dieser Weise konnte der lineare Arbeitsbereich bei der Quantifizierung in Standardextrakten charakterisiert werden.

## Ergebnisse und Diskussion

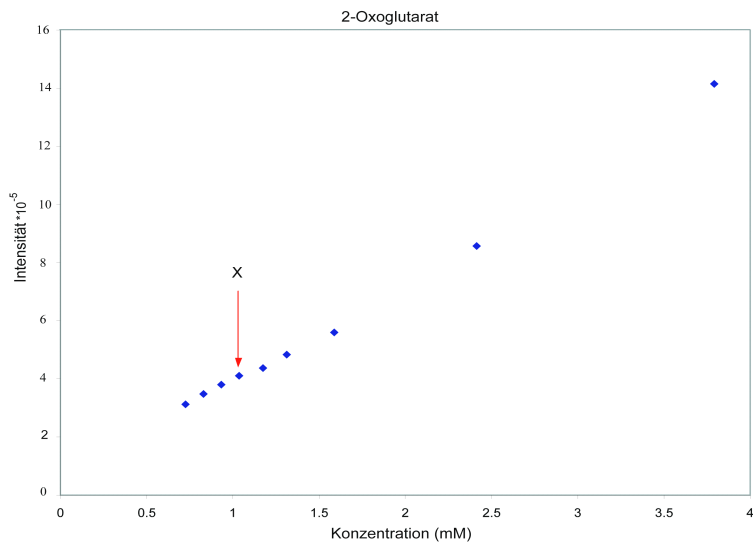
Metabolite	Summierte Derivate(Massenspuren m/z)			Konz.in 1mL MeOH (nmol/L)	Signal	RFrib (mol/mol)	
<b>MIX 1</b>							
2-Oxoglutarat	1MeOX2TMS(198)			160.00	5422206	0.24	
Alanin	2TMS(190)			176.18	1869415	0.07	
Arabinose	1MeOX4TMS(103,307)	1MeOX4TMS(103,307)		244.27	50089958	1.44	
Asparagin	ByPr(218,261)	3TMS(116,118)		160.00	13747878	0.61	
Aspartat	2TMS(160)	3TMS(232)	4TMS(188,216)	166.02	2654327	0.11	
Citrat	4TMS(273)			192.11	15660880	0.57	
Cystein	3TMS(218,220)			171.90	20872964	0.86	
Fructose	1MeOX5TMS(103,217)	1MeOX5TMS(307)		361.78	58156927	1.13	
Glucose	1MeOX5TMS(205,319)	1MeOX5TMS(205,319)		161.78	37755690	1.64	
Glutamat	2TMS(174)	3TMS(156)		576.87	7145517	0.09	
Glutamin	3TMS(156)			163.29	7068864	0.31	
Glycin	2TMS(102)	3TMS(174)		181.33	18341043	0.71	
Glycolat	2TMS(133,161,177)			200.00	10013225	0.35	
Homoserin	3TMS(128,218)	4TMS(146)		197.65	29688624	1.06	
Isoleucin	2TMS(158,218)			162.44	28412863	1.23	
Lactat	2TMS(117)			195.00	16727420	0.60	
Leucin	2TMS(158)			177.10	21238730	0.84	
Lysin	3TMS(174,200)	4TMS(156,230)		162.19	26668893	1.16	
Maleat	2TMS(215,245)			167.00	1546857	0.07	
Malat	3TMS(233)			217.31	10930942	0.35	
Malonat	2TMS(233)			173.49	1797874	0.07	
Methionin	ByPr(104)	2TMS(177,250,293)		162.15	8692174	0.38	
Norvalin	2TMS(144)	3TMS(216)		166.84	17549841	0.74	
Ornithin(Arginin)	4TMS(142)			165.52	140128	0.01	
Phenylalanin	1TMS(120)			160.97	4200725	0.18	
Phosphat	3TMS(299)			167.16	14805976	0.62	
Prolin	1TMS(70)	2TMS(142,216)		164.17	26491637	1.14	
Pyruvat	1MeOX1TMS(115,174)			232.73	8864406	0.27	
Serin	2TMS(116,132)	3TMS(204,218)	ByPr(114)	175.24	1963105	0.08	
Succinat	2TMS(129,172)			221.04	5789757	0.18	
Sucrose	8TMS(271,319,451,437)			195.56	42037430	1.51	
Threonin	2TMS(117)	3TMS(117)		168.07	13434597	0.56	
Trehalose	8TMS(103)			169.31	16754654	0.70	
Tryptophan	2TMS(202)	3TMS(202)		160.78	34844168	1.53	
Tyrosin	2TMS(179)	3TMS(218,280,354)		159.12	26261953	1.16	
Valin	1TMS(72)	2TMS(144,218)		166.84	28580048	1.21	
Ribitol	5TMS(103)			22.49	3192108	1.00	
<b>MIX 2</b>							
2-Aminobutyrat	2TMS(130)	3TMS(202)		36.66	10755525	2.09	
CycloLeucin	2TMS(84)	3TMS(156)		19.60	7854498	2.85	
Cytosine	2TMS(240,254)			20.34	3426648	1.20	
Galactosamin	6TMS(203)	1MeOX7TMS(159)	5TMS(159)	1MeOX6TMS(203,304)	20.22	752969	0.26
Glucono-1,5-lacton	4TMS(319)	2(217)		21.90	3430072	1.11	
Glycerate	3TMS(189)			18.23	1653715	0.65	
Mannitol	6TMS(205)			24.70	4235322	1.22	
Fumarate	2TMS(245)			19.81	3952110	1.42	
Glucosamin	1MeOX6TMS?(203,204)	1MeOX6TMS?(159)	1MeOX6TMS?(203)		20.87	3461373	1.18
Glutarate	2TMS(261)			19.98	789090	0.28	
Glycerol	3TMS(103,117,205)			17.81	5080868	2.03	
Lactose	1MeOX8TMS(103,117,205,217)	1MeOX8TMS(191,204)		20.21	14237549	5.01	
Diaminopimelat	4TMS(200,272)			20.50	4175021	1.45	
Maltose	1MeOX 8TMS(204)	1MeOX 8TMS(204)		19.37	7759777	2.85	
Mannose	1MeOX5TMS(103,205,217,319)			19.53	9242159	3.37	
N-Acetylglutamat	3TMS(274,289,361)	2TMS(84,158,216)		22.62	5375987	1.69	
N-Acetylglutamin	2TMS(144,156,215)			21.36	711126	0.24	
Nicotinamide	ByPr(151)	1TMS(136,179)		20.64	2959265	1.02	
Ornithine	4TMS(142)			11.86	3669973	2.20	
Oxalate	2TMS(190)			21.19	20100	0.01	
Urea	2TMS(171)			21.30	1002706	0.33	
Ribitol	5TMS(103)			22.49	3161101	1.00	
<b>MIX 3</b>							
2-Deoxyribose-5-phosphat	1MeOX5TMS(357)			15.64	181579	0.14	
2-Phosphoglycerat	4TMS(227,315,357,387)			15.55	853697	0.67	
3-Phosphoglycerat	4TMS(315,369,459)			19.09	211766	0.14	
β-Phosphogluconat	7TMS(387)			10.84	10249	0.01	
Erythrose-4-phosphat	1MeOX4TMS(357)	1MeOX4TMS(357)		18.88	591381	0.38	
Fructose-6-phosphat	1MeOX6TMS(315,357,459)			11.76	771665	0.80	
Ribulose-5-phosphat	1MeOX5TMS(357)	1MeOX5TMS(357)		13.20	1545443	1.43	
Xylulose-5-phosphat	1MeOX5TMS(315)	1MeOX5TMS(357)		17.35	1388947	0.98	
Glucose-6-phosphat	1MeOX6TMS(387)	1MeOX6TMS(357,387)		14.18	380156	0.33	
Glycerol-1-phosphat	4TMS(357)			19.44	359561	0.23	
Glycerol-2-phosphat	4TMS(243)			18.52	965020	0.64	
Glyceronphosphat	1MeOX3TMS(315,400)	1MeOX3TMS(315,400)		20.01	180041	0.11	
Phosphoenolpyruvat	3TMS(369,387,459)			22.11	181200	0.10	
Ribose-5-phosphat	1MeOX5TMS(315,403)	1MeOX5TMS(315,403)		12.90	589716	0.56	
Ribitol	5TMS(103)			67.35	5519458	1.00	

**Tabelle 3.3.** Ergebnisse der externen Quantifizierung. Für die Bestimmung von Responsefaktoren wurden zunächst Signale von allen Derivaten eines Metaboliten summiert. Dann wurden die Signalintensitäten von Metaboliten aus dem linearen Bereich des Detektors durch die Signalintensität des Ribitols geteilt. Anschließend wurden Konzentrationen von Ribitol und Metaboliten berücksichtigt.

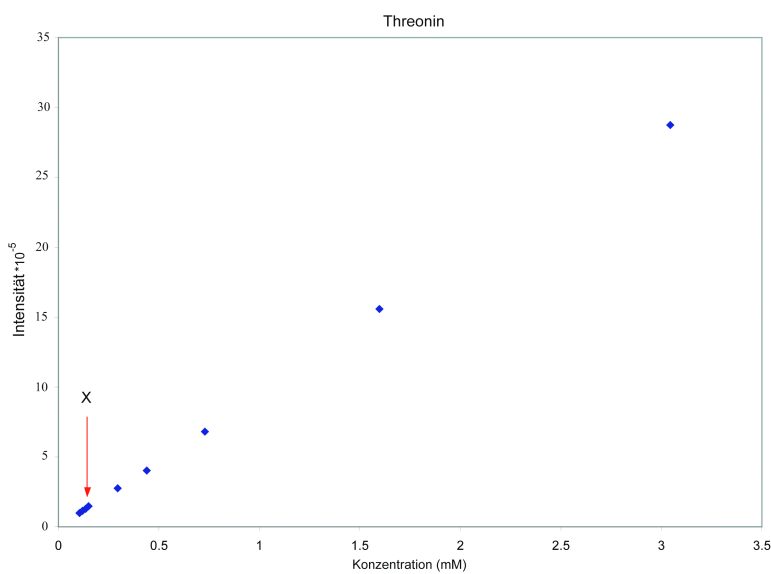
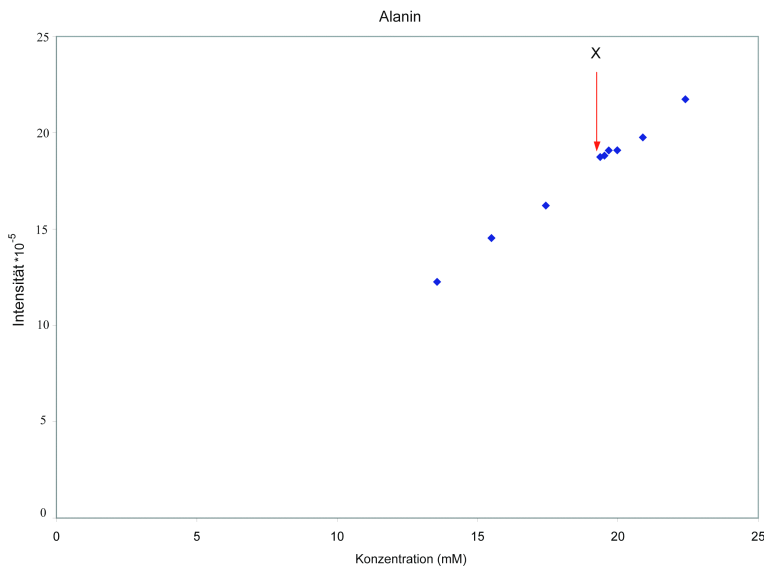
MIX1 Interne Quantifizierung								
Metabolite	Intensität	a	b	R2	b/a	in 1mLMeOH (nmol/L)	inderZelle (mmol/L)	RFrib. (mol/mol)
2-Oxoglutarat	1159748	20266	381332	0.99813	18.816	37.63	1.04	0.25
Alanin	5296233	5838	1863878	0.98421	319.264	703.10	19.37	0.06
Arabinose	76326	344137	-33147	0.99967	-0.096	nicht linear	nicht linear	nicht linear
Asparagin	6519	27160	-39586	0.99796	-1.457	nicht linear	nicht linear	nicht linear
Aspartat	2009984	34780	631181	0.98881	18.148	37.66	1.04	0.42
Citrat	501435	85245	472587	0.98021	5.544	13.31	0.37	0.30
Cystein	991	3308	-20466	0.90617	-6.186	nicht linear	nicht linear	nicht linear
Fructose	105691	264949	875798	0.98493	3.306	14.95	0.41	0.06
Glucose	30477820	87359	10662755	0.99102	122.057	246.83	6.80	0.98
Glutamat	64288155	-69431	22341413	-0.98268	-321.780	nicht linear	nicht linear	nicht linear
Glutamin	17601324	-11159	6124649	-0.67127	-548.833	nicht linear	nicht linear	nicht linear
Glycin	4922938	65014	2112495	0.97666	32.493	73.65	2.03	0.53
Glycolat	21773	39823	3446	0.99999	0.087	0.22	5.96E-03	0.80
Homoserin	1043251	145008	756578	0.98803	5.217	12.89	0.36	0.64
Isoleucin	227119	143790	350121	0.99065	2.435	4.94	0.14	0.37
Lactat	30653015	16900	10541467	0.70318	623.767	1520.43	41.89	0.16
Leucin	520274	213833	580784	0.98267	2.716	6.01	0.17	0.69
Lysin	9708839	117516	3527936	0.99676	30.021	60.86	1.68	1.27
Maleat	72050	8870	23407	0.99980	2.639	5.51	0.15	0.10
Malat	5159248	34434	1875981	0.99739	54.480	147.99	4.08	0.28
Malonat	1074	7572	-8520	0.99902	-1.125	nicht linear	nicht linear	nicht linear
Methionin	48507	26514	3293	0.99936	0.124	0.25	6.93E-03	1.53
Norvalin	74306	94799	225466	0.98181	2.378	4.96	0.14	0.12
Ornithin	41494	58	14928	0.74472	256.967	531.65	14.65	6.2E-04
Phenylalanin	275366	62932	306524	0.97825	4.871	9.80	0.27	0.22
Phosphat	21763835	14315	7638980	0.92873	533.631	1115.01	30.72	0.16
Prolin	5906985	104378	2325194	0.99425	22.276	45.71	1.26	1.03
Pyruvat	818545	39448	196555	0.99433	4.983	14.49	0.40	0.45
Serin	810373	14349	318042	0.98068	22.164	48.55	1.34	0.13
Succinat	8566392	16714	3005640	0.99846	179.832	496.87	13.69	0.14
Sucrose	73728	165161	92810	0.99922	0.562	1.37	0.04	0.43
Threonin	418710	54981	142612	0.99978	2.594	5.45	0.15	0.61
Trehalose	22457551	13414	7851888	0.88727	585.363	1238.86	34.13	0.14
Tryptophan	128146	12815	94684	0.81667	7.389	14.85	0.41	0.07
Tyrosin	814761	190225	695344	0.99319	3.655	7.27	0.20	0.89
Valin	1654363	135984	941713	0.98764	6.925	14.44	0.40	0.91
Ribitol	2825300							
MIX2 Interne Quantifizierung								
Metabolite	Intensität	a	b	R2	b/a	in 1mLMeOH (nmol/L)	in der Zelle (mmol/L)	RFrib. (mol/mol)
2-Aminobutyrat	244482	98905	96246	0.99890	0.973	1.78	0.05	1.17
CyeloLeucin	1286	77392	-1217	0.99831	-0.016	nicht linear	nicht linear	nicht linear
Cytosin	47631	68474	19559	0.99944	0.286	0.29	0.01	1.40
Galactosamin	9657	108974	1403	0.99948	0.013	0.01	3.6E-04	6.33
Glucono-1,5-lacton	228302	51012	91983	0.99800	1.803	1.97	0.05	0.99
Glycerat	23538	22429	9904	0.99888	0.442	0.40	0.01	0.50
Mannitol	10719	85133	2524	0.99840	0.030	0.04	1.0E-03	2.50
Fumarat	208173	34373	81055	0.99957	2.358	2.34	0.06	0.76
Glucosamin	23521	170819	10703	0.99983	0.063	0.07	1.8E-03	3.07
Glutarat	1243	11894	590	0.99936	0.050	0.05	1.4E-03	0.21
Glycerol	15023961	122390	5891602	0.83177	48.138	42.86	1.18	2.99
Lactose	9940	124900	-13672	0.99006	-0.109	nicht linear	nicht linear	nicht linear
Diaminopimelat	82458	90702	3572	0.97904	0.039	0.04	1.1E-03	17.44
Maltose	194715	48114	63086	0.98944	1.311	1.27	0.03	1.31
Mannose	115766	124153	50753	0.99853	0.409	0.40	0.01	2.48
N-Acetylglutamat	1511105	75575	580578	0.99701	7.682	8.69	0.24	1.49
N-Acetylglutamin	426219	42077	161301	0.99096	3.833	4.09	0.11	0.89
Nicotinamid	295279	38286	112509	0.99841	2.939	3.03	0.08	0.83
Ornithin	246119	49613	91287	0.99831	1.840	1.09	0.03	1.93
Oxalat	714	162	147	0.92297	0.909	0.96	0.03	0.01
Urea	480869	2101	181490	0.58825	86.377	91.98	2.53	0.04
Ribitol	2629445							

**Tabelle 3.4.**

Interne Quantifizierung. Die ursprüngliche Konzentration im *C. glutamicum* Rohextrakt wurde mit Hilfe der Methode der Standardaddition bestimmt. Die Extrapolation wurde mit der Methode der kleinsten Quadraten ermöglicht. Steigung(a), Schnittpunkt(b) und der R<sup>2</sup>-Wert sind ebenfalls angegeben.



**Abb.3.15.** Kalibrationskurven bei der internen Quantifizierung. Mit x ist der Standardextrakt von *C.glutamicum* WT ATCC 13032 ohne addierte Standardlösungen markiert.



Bei Verwendung der Standardmethode wurden unter Quantifikationssgrenze die Konzentrationen für Asparagin, Cystein, Malonat gefunden. Im nicht linearen Bereich befanden sich Arabinose, Fructose, Norvalin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Methionin, Citrat, Tryptophan, Glutamin. Über dem Quantifikationsbereich lag die Konzentration von Glutamat. Aus diesem Experiment lässt sich der Arbeitsbereich der Quantifizierung abschätzen. Die Quantifizierungsgrenze liegt knapp unter dem nanomolaren Bereich, die Signalintensität beträgt dabei ca. 1000 Einheiten. Der streng lineare Bereich fängt ab ca.  $10 \cdot 10^3$ - $50 \cdot 10^3$  Einheiten an, was aber für alle Komponenten unterschiedlich und spezifisch ist. Im linearen Bereich befinden sich ca. 80% aller Metabolite, ca. 10% können nicht quantifiziert werden. Da es das Ziel der Arbeit war, mit der analytischen Methode nur Unterschiede im Metabolom bei einem Vergleich zwischen Mutanten und dem Wildtyp feststellen zu können, reicht eine relative Quantifizierung, unter anderem auch im nicht streng linearen Bereich, aus. Für eine genauere Quantifizierung und eine absolute Quantifizierung müssen in jedem Experiment für jede Substanz Kalibrationskurven mit Hilfe von der Methode der Standardaddition bestimmt werden. Für die absolute Quantifizierung ist zusätzlich sehr wichtig, dass die Metabolite vollständig aus der Zelle extrahiert werden. Dass keine vollständige Extraktion bei der Methode vorhanden ist, wird in Kapitel 3.6.2. gezeigt. Das Hauptziel des *metabolomics* Ansatzes ist alle Metabolite innerhalb einer relativ kurzen Zeit analysieren zu können. Dies ist nur dann möglich, wenn ein Kompromiss zwischen der Anzahl der analysierten Komponenten, die verschiedener chemischer Natur sind, und der benötigten Analysezeit auf der einen Seite und der Vollständigkeit der Extraktion und der genauen Quantifizierung auf der anderen Seite, geschlossen wird.

### **3.6. Methodenetablierung**

#### **3.6.1 GC-Einspritztechnik**

Die Einspritztechnik ist in der GC ein wichtiges Element, weil falsche Einspritzbedingungen die Qualität der chromatographischen Trennungen und Präzision der quantitativen Analyse sehr stark verschlechtern können [46]. Um das zu vermeiden, wurden in der ersten Phase der Analyseentwicklung in dieser Richtung einige Versuche unternommen. Zunächst musste entschieden werden, welche generelle Technik benutzt werden sollte. Es bieten sich die drei am häufigsten verwendeten Einspritzbedingungen an:

1. Split oder Splitless mit einfachem Split-/Splitlessinjektor (SSL)
2. On-Column
3. PTV (*programmed temperature vaporizing*)

Eine kalte *on-column* Einspritzung wird für die zuverlässigste Technik der Probendosierung in der Kapillar-GC gehalten. Wenn sie richtig ausgeführt wird, schliesst die direkte Einführung der Probe in die ofenthermostatisierte Säule Verluste von Probenmaterial aus. Die quantitative Analyse kann vereinfacht werden, weil es praktisch keine Diskriminierung einzelner Substanz und andere Abweichungen gibt. Bei diesem einfachen und klaren Konzept sind die Ansprüche an Erfahrung und Fachkenntnisse zur Vermeidung von Fehlern kleiner als bei den Einspritztechniken mit Probenverdampfung. Für labile Verbindungen ist diese Technik optimal, da die Einspritzung keinen thermischen Stress ausübt. Das Probenvolumen kann theoretisch von 0.2µL bis 200µL reichen. Das Hauptproblem bei dieser Einspritztechnik rufen schmutzige Proben mit einem großen Gehalt an unflüchtigen Verbindungen hervor, so dass eine häufige Sanierung der Säule nötig ist. Gewisse Kombinationen von Lösungsmitteln und flüchtigen Verbindungen führen zu schweren Peakdeformationen durch eine unvollständige Fokussierung der Probe (*Solvent trapping*). Oft kann dies nur vermieden werden, indem das Einspritzvolumen solange verkleinert wird, bis die Probenflüssigkeit auf die Trennung der Komponenten keinen merklichen Einfluss mehr ausübt. Dies ist oft nur mit Splitteinspritzung möglich. Die oben beschriebenen negativen Effekte sind von den zu analysierenden *C. glutamicum*-Proben zu erwarten, die eine sehr vielfältige Zusammensetzung auch von leicht flüchtigen Komponenten haben und als Lösungsmittel ein relativ hochsiedendes Gemisch aus polarem Pyridin (Siedepunkt 115.2<sup>0</sup>C) und sehr polarem MSTFA (Siedepunkt 130-132<sup>0</sup>C) benutzt wird. Darüber hinaus sind die Proben stark mit unflüchtiger Matrix belastet.

Die Splitinjektion gilt als die einfachste in der Handhabung. Die Probe wird in einen heissen Injektor eingespritzt und die entstehenden Dämpfe durch den Split geteilt: Ein kleiner Teil wird durch das Trägergas auf die Trennsäule übertragen. Der Hauptteil wird durch den Splitausgang am unteren Ende des Verdampfers abgeführt. Die Probendämpfe werden aus zwei Gründen geteilt: 1) zur Vermeidung einer Säulenüberladung und 2) zur Erzeugung scharfer Anfangsbanden. Die Splitflüsse betragen normalerweise 1:25 bis 1:100. Unabhängig von dem Lösungsmittel und der Anfangstemperatur der Säule bekommt man bei Verwendung dieser Einspritztechnik eine hervorragende Trennungen. Für die quantitative Analyse muss die Technik aber bei jeder Probenart auf Präzision getestet werden. Die präzise quantitative Analyse von Gemischen mit sehr unterschiedlichen Komponenten kann sehr schwierig sein, weil die Gefahr der nicht-linearen Aufteilung von verschiedenen Stoffe im Injektor zu hoch ist.

Eine splitlose Einspritzung wird ohne Splitfluss während der Einspritzung durchgeführt. Da die Probe komplett auf die Säule übertragen wird, erhöht sich die Empfindlichkeit der Säule



erheblich. Dabei muss die ganze Probe mit einem relativ kleinen Gasfluss auf die Trennsäule übertragen werden. Dieser Prozess ist zeitaufwändig. Die am häufigsten auftretende Probleme sind Peakverbreiterung und -deformation, Zersetzung labiler Komponenten und Matrixeffekte wie Adsorption. Dies alles sind Folgen des längeren Aufenthaltes der Probe im heißen Injektor. Für die vorliegenden Proben, die schwer mit Matrix belastet sind und viele labile Verbindungen enthalten, kommt diese Technik daher nicht in Frage.

Bei der relativ neuen PTV-Einspritztechnik wird die Probe in einen kalten Injektor eingespritzt und anschließend wird die Temperatur vom Injektor sehr schnell erhöht und die auf diese Weise verdampfte Probe wird mit oder ohne Split in die Trennsäule weitergeleitet. Die verzerrte Zusammensetzung der analysierten Probe (Diskriminierung), die durch die teilweise Verdampfung von Probe aus der Spritzenadel hervorgerufen wird - ein Problem bei der klassischen Splitinjektion - ist ausgeschlossen. Bei der *PTV-solvent-split-Einspritzung* wird zuerst das Lösungsmittel bei relativ niedriger Temperatur im Injektor abgedampft und anschließend der Rest der Probe verdampft und in die Trennsäule weitergeleitet. Mittels *PTV-solvent-split* oder *large-volume-injection* (LVI) Einspritzung können mehr als 100µL Probe dosiert werden, vorausgesetzt die Probe enthält keine hochflüchtigen Komponenten. Die PTV-splitlose Technik erlaubt Einspritzungen von 20-30µL. Das Abdampfen des Lösungsmittels dauert dabei länger, aber Verluste flüchtiger Komponenten sind ausgeschlossen. Die PTV-splitlose Einspritzung wird durch unflüchtiges Probenmaterial weniger gestört als die klassische splitlose Einspritzung. Es ist auch zu erwarten, dass die PTV-Einspritzung die Analyse labiler Verbindungen durch Abwesenheit des thermischen Stresses im kalten Injektor wesentlich verbessert. Dabei ist jedoch sehr wichtig, dass das Injektorröhrchen sehr gut deaktiviert ist. Da in den Proben ein sehr großer Überschuss von MSTFA vorliegt, ist dies kein Problem, da mit jeder Einspritzung im Injektor jede Oberfläche nachsilyliert wird. Ein Nachteil ist, dass der Einsatz der PTV-Einspritzung komplizierter als die klassische SSL-Methode ist, weil die Wahl geeigneter Säulen- und Injektortemperaturen und die Wahl der passenden Dauer der isothermen Anfangstemperatur des Injektors erforderlich sind.

Durch den praktischen Vergleich der verschiedenen Einspritztechniken - unter anderem für hoch mit Matrix belastete biologische Proben- wurden deutliche Vorteile bei der Verwendung der PTV-Technik gezeigt [72-74]. Darüber hinaus ist eine *large-volume*-Einspritzung für die Minimierung des Probenvolumens der Bakteriensuspension die beste Alternative.

Basierend auf den oben dargelegten Überlegungen musste für die analytische Methode entweder die klassische Split oder die neue PTV Einspritztechnik gewählt werden. Als wichtiger Parameter wurde unter anderem die Präzision der Messung verwendet.

Beide Injektoren wurden mit parallelen Einspritzungen von derivatisierten *C.glutamicum* Rohextrakten auf Präzision geprüft (Tabelle 3.5).

**Tabelle 3.5.** Vergleich von PTV und Split Einpritztechniken.

Metabolite	SSL, sd%	PTV,Leer, sd%	PTV,Watte, sd%
2-Oxoglutarat	3.6	8.8	5.0
2-Aminobutyrat	24.9	19.1	9.0
Alanin	9.2	4.6	3.8
Trehalose	3.8	9.2	8.5
Citrat	3.2	10.4	7.5
Cycloleucin	5.6	9.3	5.0
Fructose-6-phosphat	10.9	12.8	10.8
Glycerat	2.5	3.9	10.3
Fumarat	2.4	14.4	4.2
Glucose	1.7	11.1	6.2
Glutamat	1.5	9.9	1.8
Glutamin	14.8	4.5	3.9
Glycerol	2.4	6.3	2.3
Glycin	2.8	7.2	4.6
Lactat	6.9	11.6	3.8
Aspartat	16.1	18.7	6.9
Homoserin	8.6	12.7	6.7
Isoleucin	12.5	14.3	9.2
2,6-Diaminoheptandioat	8.2	12.0	8.1
Leucin	32.9	16.7	7.7
Lysin	2.2	3.9	5.0
Prolin	47.1	11.5	4.6
Threonin	2.9	7.4	8.0
Valin	8.3	12.8	7.9
Malat	3.9	6.5	7.2
N-Acetylglutamat	6.9	6.8	4.3
N-Acetylglutamin	13.2	11.1	7.5
Nicotinamid	5.4	12.4	2.0
Ornithin	5.2	6.9	5.5
Phosphat	6.3	10.4	6.2
Pyruvat	3.9	46.1	13.5
Serin	5.7	6.3	5.4
Succinat	1.3	9.5	4.0
Tryptophan	7.6	7.5	4.0
Tyrosin	4.0	5.3	4.2
UMP	18.4	8.2	4.3
Uracil	27.0	45.9	5.9
Urea	8.0	10.5	1.3
<b>Mittlere Standardabweichung</b>			
	9.3	11.8	5.9

Die schlechte Reproduzierbarkeit bei der Arbeit mit leerem PTV-*liner* (Injektorröhrchen) kann dadurch erklärt werden, dass die Probe beim Verdampfen nicht im leeren Injektorröhrchen festgehalten wurde. Der PTV-*liner* ist enger als der normale Split-*liner* (2mm zu 5mm). Bei einem Trägergasfluss von 25mL/min wird die Probe zum Boden des Injektors gezogen und von dort abgedampft. Dies ist ungünstig, weil der Eingang der Säule sich über dem Boden befindet und weil die optimal beheizte Zone des Injektors sich in der Mitte des Liners befindet. Das Problem wurde durch Packung des Liners mit detaktivierter Glaswatte gelöst. Auf diese Weise wurde im Durchschnitt für alle Metabolite eine bessere Reproduzierbarkeit als für die Split-Einspritztechnik erreicht.

### 3.6.2. Extraktion

Bei den Untersuchungen von Metaboliten werden am häufigsten sechs verschiedene Methoden mit Variationen verwendet:

- Extraktion mit heissem Ethanol
- Extraktion mit heissem Methanol
- Extraktion mit kaltem Methanol
- Extraktion mit Perchlorsäure
- alkalische Extraktion
- Methanol/Chloroform Extraktion

Bei den Extraktionen mit heissem Ethanol [28] und Methanol [23] werden die Zellen bei Temperaturen nah der Lösungsmittelsiedepunkte lysiert und während der Lyse die Metabolite extrahiert. Bei der kalten alkoholischen Extraktion werden die Zellen in einem Gemisch von 50% Methanol im Wasser durch Einfrieren und Wasserkristallbildung lysiert [75]. Ein gleicher Ansatz wird auch für die Methanol/Chloroform Extraktion mit einem Gemisch von Methanol:Chloroform:Wasser 2.5:4:2 (v) verwendet [76].

Die kalte Perchlorsäure-Extraktion wird mit 35% (v/v)  $\text{HClO}_4$  durchgeführt. Anschließend wird die Probe mit 5M  $\text{K}_2\text{CO}_3$  neutralisiert [27, 77, 78]. Die alkalische Extraktion wird mit Hilfe von 0.1N KOH bei 80°C durchgeführt und anschließend mit 0.5N  $\text{HClO}_4$  neutralisiert [79].

Bei Verwendung von alkoholischen Extraktionsmitteln ergeben sich folgende Vorteile. Es ist davon auszugehen, dass bei diesen Methoden fast alle Proteine denaturiert und ausgefällt werden. Metabolite werden keinen großen pH Änderungen unterzogen und zu einer Probe keine Salze zugegeben, die z.B. für weitere Derivatisierungsschritte für die GC-MS-Analyse oder bei LC-MS-Analysen mit der ESI-Ionisationstechnik nicht erwünscht sind. Weitere Aufkonzentrierungsschritte sind relativ leicht durchzuführen, da diese Lösungsmittel relativ flüchtig sind. Ein Vergleich von verschiedenen Extraktionsmethoden hat gezeigt, dass

alkoholische Extraktionen im Durchschnitt für alle die Metabolite vollständiger sind [75], was im Hinblick auf die Problematik der Metabolomanalyse von Vorteil ist. Obwohl eine enzymatische Zersetzung von Trehalose bei alkoholischer Extraktion mit 50% Ethanol vermutet wurde [80], konnte es bei dem direkten Vergleich von verschiedenen Extraktionen nicht bewiesen werden [75]. Es gibt auch keine direkten Beweise für die Zersetzung anderer Metabolite bei dieser Art der Extraktion. Im Prinzip zielt ein Extraktionsvorgang auf eine effektive Befreiung von Metaboliten aus einer nicht löslichen Matrix. Zur Erhöhung der Vollständigkeit und Reproduzierbarkeit der Extraktion kann eine hohe Temperatur und eine zusätzliche Behandlung der Probe mit Ultraschall beitragen. Das einzige Problem bei der methanolischen Extraktion ist die begrenzte Löslichkeit von sehr polaren Metaboliten in reinem Methanol. Um abzuschätzen, wie vollständig Metabolite sich nach dem Zellaufschluss in Methanol lösen, wurden nach einem normalen Extraktionsvorgang sukzessiv weitere Extraktionsschritte durchgeführt.

**Tabelle 3.6.** Zusammenfassung der Experimente mit verschiedenen zusätzlichen Extraktionsschritten.

Probenbezeichnung	Extraktionsschritte		
	1	2	3
X	Zellaufschluss und Extraktion mit 3mL Methanol, 15min 70°C, Ultraschall	-	-
A	wie X, Extrakt wurde verworfen	3mL Methanol, 15min 70°C, Ultraschall	-
B	wie A	3mL Methanol, 15min Raumtemperatur	-
C	wie A	3mL Wasser, 15min Raumtemperatur	-
D	wie A	3mL Methanol, 15min Raumtemperatur, Extrakt wurde verworfen	3mL Methanol, 15 min Raumtemperatur

**Tabelle 3.7.** Ergebnisse des Experimentes mit verschiedenen zusätzlichen Extraktionsschritten. Nach dem ersten Extraktionsschritt wurden die unlöslichen Zelltrümmer erneut extrahiert und analysiert. In der Tabelle sind Prozent in Bezug auf die erste Extraktion angegeben. Die Extraktionsvorgänge sind in der Tabelle 3.6 spezifiziert.

Metabolite	A%vonX	B%vonX	C%vonX	D%vonX
2-Oxoglutarat	16.4	10.9	10.9	3.6
2-Aminobutyrat	3.4	2.6	3.0	0.6
3-Phospho-D-glycerat	0.4	1.1	292.5	0.2
5-Amino-4-oxopentanoat	8.8	5.7	11.2	1.9
5-Oxoprolin	10.2	8.5	9.4	5.3
Alanin	1.8	1.4	3.7	0.4
Trehalose	12.2	10.8	18.2	5.0
AMP	2.4	0.2	171.7	0.4
$\beta$ -Alanin	3.7	3.4	8.1	1.4
Pentadecanoat	28.0	19.6	25.7	51.7
Hexadecanoat	29.6	21.8	20.0	24.6
Hentriacontanoat	122.8	149.2	191.8	226.4
cis-9-OctadecenoatMeO	36.7	14.2	15.7	19.8
Citrat	11.0	8.6	150.2	9.3
Cytosin	9.7	9.9	52.8	0.8
Fructose-1,6-bisphosphat	3.0	2.6	1269.3	40.6
Fructose-6-phosphat	8.1	4.4	36.0	1.0
Glucono-1,5-lacton	13.2	18.7	17.8	7.7
Glycerat	6.3	4.8	21.3	5.5
Mannitol	21.3	4.3	10.8	2.0
Ribulose-5-phosphat	0.0	0.0	1.3	0.0
Xylulose	4.6	4.3	5.6	1.4
Xylulose-5-phosphat	0.4	0.6	22.2	0.0
Fructose	74.2	6.1	3.0	4.4
Fumarat	7.0	9.5	41.5	6.1
Glucose	42.0	37.3	8.4	8.5
Glucose-6-phosphat	7.5	5.8	66.8	1.3
Glutamat	46.1	28.0	88.0	6.0
Glutamin	3.4	0.4	8.2	0.0
Glutarat	507.6	279.5	341.8	282.4
Glycerol	6.3	5.9	51.3	2.3
Glycerol-1-phosphat	10.1	11.0	10.1	0.4
Glycerol-2-phosphat	1.4	0.9	1.5	0.0
Glyceronphosphat	0.1	0.5	3.2	0.0
Glycin	7.0	6.5	25.9	3.2
Glycolat	18.6	13.1	24.9	13.7
Homocystein	18.0	8.5	78.5	3.5
Lactat	8.5	9.1	15.6	5.2
Asparagin	0.8	0.9	2.3	2.1
Aspartat	23.2	20.4	46.4	9.3
Homoserin	8.6	6.1	8.4	1.6
Isoleucin	4.8	3.4	3.6	1.1
Leucin	5.7	4.4	0.5	1.1
Lysin	2.3	1.3	33.4	0.5
Prolin	7.6	6.0	8.5	1.4
Threonin	4.5	3.9	8.7	1.3
Valin	4.8	3.8	4.8	1.3
Malat	8.3	5.5	33.5	4.1
Maltose	5.9	4.2	5.9	1.3
Mannose	28.2	30.2	61.3	10.5
N-Acetylglutamat	10.4	8.8	9.6	1.1
N-Acetylglutamin	3.7	3.2	10.8	0.8

Nicotinamid	19.9	5.9	131.2	5.8
Octadecanol	18.1	19.4	32.2	32.0
Ornithin	4.1	2.9	56.4	1.0
Oxalat	77.9	81.3	168.8	134.5
Phosphat	23.3	21.7	181.1	37.7
Pyrophosphat	4.9	5.8	74.3	1.6
Pyruvat	47.1	27.1	23.3	9.6
Ribitol	24.3	23.1	15.8	11.9
Ribose-5-phosphat	0.1	0.1	9.8	0.0
Ribose	14.3	8.1	22.0	6.8
Serin	3.8	4.6	15.2	3.2
Succinat	4.2	4.0	7.3	0.8
Sucrose	37.9	14.7	230.8	24.8
Tetradecanol	3.5	2.1	5.4	17.4
Tryptophan	6.0	3.5	6.8	0.8
Tyrosin	3.8	3.4	7.5	0.7
Uracil	11.7	9.9	35.7	39.0
Urea	44.3	56.5	1.7	34.3
Trehalose-6-phosphat	7.6	4.3	23.1	1.2

Eine Extraktion wurde dann als unvollständig angesehen, wenn in einer der vier folgenden Extraktionsschritte ein Metabolitgehalt über 5% des Wertes bei der ersten Extraktion gemessen wurde. Wie man aus dem Vergleich von aller Proben sehen kann, wurden mit reinem Methanol nur 12% aller Metabolite nach oben stehender Definition vollständig extrahiert. Ein zusätzlicher Extraktionsschritt mit hoher Temperatur und Ultraschall (Probe A) hat dazu geführt, dass für 12% der Komponenten die Extraktionseffektivität gegenüber der Probe B (Methanol, RT) erhöht wurde. Die betroffene Komponenten waren Glutamin, Glutamat, Homocystein, Tryptophan, Pyruvat, Glutarat, Saccharose, Fructose, Mannitol, Trehalose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, AMP, Nicotinamid.

Die Abnahme wurde von Glyceronphosphat und für 3-Phosphoglycerat beruht vermutlich auf ihrer Zersetzung.

Ein Vergleich der mit Wasser und mit Methanol durchgeführten Extraktionen hat folgendes gezeigt. Nur 7% aller Komponenten wurden besser mit reinem Methanol extrahiert: Harnstoff, Pyruvat, Leucin, Glycerol-1-phosphat, Glucose und Fructose.

Für weitere 17% gab es keinen Unterschied: N-Acetylglutamat, Valin, Prolin, Isoleucin, Homoserin, Xylulose, Oktadecensäure, Hexadecensäure, 5-Oxoprolin, 2-Aminobutyrat und 2-Oxoglutarat.

Die restlichen 76% wurden besser mit Wasser extrahiert. Hierbei lässt sich eine Korrelation zwischen Löslichkeit und Polarität beobachten. Beispielsweise wurde das sehr polare Fructose-1,6-biphosphat mit Wasser ca. 600 mal besser extrahiert als mit Methanol. Das relativ lipophile Leucin wurde ca. 8 mal besser mit Methanol extrahiert. Aus diesem Experiment lässt sich eine Strategie zur Optimierung der Extraktion ableiten. Die erste Stufe der Extraktion mit heissem Methanol und Ultraschall ermöglicht den Zellaufschluß und die Befreiung von Metaboliten aus der unlöslichen Matrix, die Zugabe von Wasser

vervollständigt die Extraktion. Es besteht immer die Gefahr, dass einige Enzyme nach der Zugabe von Wasser wieder aktiv werden, deswegen sollte dies bei einer niedrigen Temperatur erfolgen.

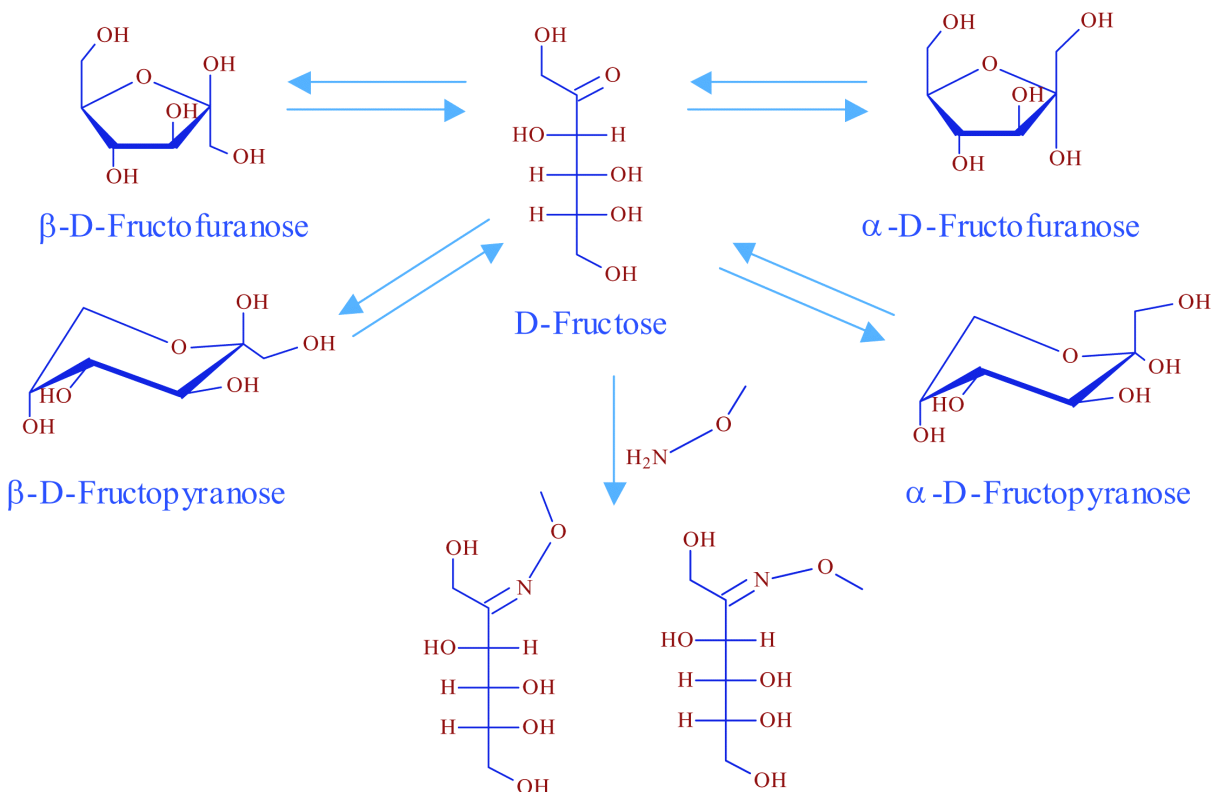
### **3.6.3. Abdampfen des Lösungsmittels**

Das Abdampfen des Lösungsmittels sollte möglichst schnell sein und bei relativ niedriger Temperatur durchgeführt werden. Noch wichtiger ist, dass beim Abdampfen eine Probe möglichst wenig Luftkontakt hat. Das soll unerwünschte oxidative Reaktionen und die Hydrolyse von Komponenten verhindern. Das restliche Wasser muss vollständig entfernt werden, da die folgenden Derivatisierungsreaktionen wasserfrei durchgeführt werden müssen. Eine gut geeignete und ziemlich verbreitete Methode ist das Abdampfen eines Lösungsmittels unter einem leichten Stickstofffluß. Zunächst wurde diese Methode angewendet. Bei dem steigenden Probendurchsatz und relativ hohen Preisen für Flaschenstickstoff wurde der Stickstoffverbrauch durch das Abdampfen des Lösungsmittels in einem Vakuum-Konzentrator (SpeedVac) vermindert. Während des Abdampfprozesses unter Vakuum werden die Probenansätze schnell rotiert, um durch Zentrifugalkräfte ein explosives Sieden von einem Lösungsmittel zu unterdrücken. Dadurch bildet die Probe jedoch am Boden des Reaktionsgefäßes eine kompakte polymerähnliche Masse. Ein weiterer Nachteil des Rotationsvakuumkonzentrators war die mit der Zeit bis auf 50°C steigende Temperatur, die teilweise zur Polymerisierung der Probenmasse beitrug und dadurch ein vollständiges Entfernen des restlichen Wassers verhinderte. Bei diesem Probenzustand konnte das restliche Wasser mit Hilfe eines azeotropen Abdampfens durch Zugabe von Dichlorethan vollständig entfernt werden. Diese Probenverteilung führte trotzdem zu Problemen beim abschließenden Lösen von Probenmaterial in Pyridin. Es wurde versucht, die Proben in einem Exsiccatormodus ohne Rotation abzdampfen. Bei hoher Konzentration des Extraktes wurde, im Gegensatz zu verdünnten methanolischen Extrakten, kein explosives Sieden beobachtet. Die Verteilung einer Probe in Form eines dünnen Films auf der relativ großen Oberfläche eines Reaktionsgefäßes war vergleichbar mit dem Trocknen im Stickstoff.

### **3.6.4. Derivatisierung**

Die Derivatisierung spielt bei der GC-Analyse von biologischen Proben eine sehr wichtige Rolle. Erstens ist es möglich bei der Zuckeranalyse die Anzahl von Zuckerisomeren stark zu reduzieren, was die Komplexität des Chromatogramms deutlich verringert [43-45]. Dies wird

durch eine Oximierungsreaktion erreicht (Abb.3.16). Als Oximierungsreagenzien können Hydrochloride von Hydroxylamin oder Methoxyamin, gelöst in Pyridin, verwendet werden. Methoxyamin ist in sofern besser, da später keine zusätzlichen OH- Gruppen trimethylsilyliert werden müssen. Die Reaktionsbedingungen für das Methoximieren variieren von 2 Stunden bei 80°C [51] bis 1 Stunde bei Raumtemperatur [50]. Nach der Oximierung bilden sich nur zwei syn- und anti- Isomere, bezüglich der Position der freien Elektronenpaare des Stickstoffatoms relativ zur Doppelbindung der Oxymgruppe. Es wurde bewiesen, dass die Verhältnisse von syn- und anti- Formen stabil und unabhängig von der analysierten Menge sind. Die Verteilung syn zu anti ist für den Zuckertyp charakteristisch [44].

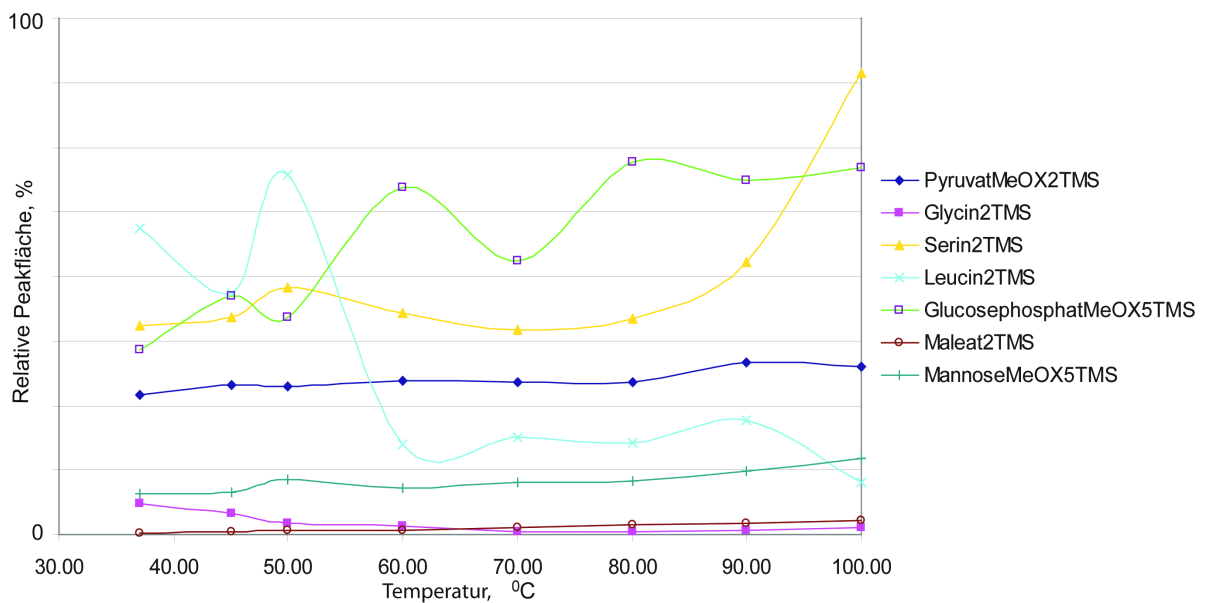


**Abb 3.16.** Isomere der D-Fructose und die Derivatisierungsreaktion mit Methoxyamin.

In einem zweiten Schritt ist es wichtig, die Flüchtigkeit der Komponenten zu erhöhen. Das wird hauptsächlich durch eine Veresterung erreicht. Die universellste Methode ist dabei das Silylieren. Bei dieser Methode werden bei Verwendung von genug aggressiven Reagenzien nicht nur Carboxylgruppen sondern auch Hydroxy- und Aminogruppen derivatisiert. Die nach der Reaktion gebildeten Ester sind nicht nur flüchtiger sondern auch thermisch stabiler als die Ausgangssubstanzen. Es sind viele Silylierungsmittel auf dem Markt, doch für die Derivatisierung von „schmutzigen“ biologischen Proben ohne Vorreinigung muss das Silylierungsmittel sehr reaktiv und möglichst universell sein. In Frage kommen hierfür BSA (N,O-bis-Trimethylsilylacetamid), BSTFA (N,O-bis-Trimethylsilyltrifluoroacetamid) und



MSTFA (N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoroacetamid) [43]. Das aggressivste Reagenz von diesen dreien ist das BSTFA. Die wenigsten Artefakten wurde jedoch bei der Verwendung von MSTFA gefunden [61]. Darüber hinaus ist der Siedepunkt von MSTFA geringer als von BSTFA, so dass leichtflüchtige Komponenten vom BSTFA-Lösungsmittelpeak überlagert werden. Wie bei Verwendung von BSA oder BSTFA können mit MSTFA keine Zucker-1-phosphate derivatisiert werden [50]. Dafür muss Trimethylsilylimidazol (TMSI) in Acetonitril im Verhältnis 1:1 verwendet werden. Die Reaktion ist dabei in 5min bei Raumtemperatur abgeschlossen. Da dieses Problem jedoch ausschließlich auf den Zucker(-)1-phosphaten beruht, erscheint der zusätzliche Aufwand durch den zweiten Derivatisierungsschritt für eine Standardanalytik nicht gerechtfertigt. Typische Reaktionstemperaturen variieren im Falle des Silylierens von Raumtemperatur bis 200<sup>0</sup>C, die Reaktionstemperatur wird für jede Anwendung angepasst und ist umgekehrt proportional zur Dauer der Reaktion. Im Hinblick auf die Analytik sind die Vollständigkeit der Derivatisierung und Stabilität der Produkte von besonderem Interesse.



**Abb. 3.17.** Trimethylsilylierung bei verschiedenen Temperaturen für 60 Minuten.

Mit dem Ziel den Einfluss verschiedener Bedingungen auf die Trimethylsilylierungsreaktion abzuschätzen, wurden die polaren Extrakte bei 37, 45, 50, 60, 70, 80, 90 und 100<sup>0</sup>C für 30min und 60min derivatisiert. Die Vollständigkeit der Derivatisierung war nach 60min um 10-20% besser als nach 30min. Tendenziell zeigen alle Derivate unabhängig von der Reaktionsdauer das gleiche Verhalten gegenüber einer Temperaturveränderung. Die Ergebnisse für eine Reaktionszeit von 60 Min. sind in Abb 3.17 dargestellt. Für die steigende Temperatur konnte für alle Stoffe eine deutliche Tendenz in Richtung vollständiger Derivatisierung festgestellt werden. Es zeigen sich jedoch Ausnahmen für Leucin2TMS

(gezeigt) ebenso wie für Glycin2TMS, Harnstoff2TMS, Isoleucin2TMS, Fumarate2TMS, Pyrophosphate4TMS, Acetylglutamate2TMS, deren Menge mit steigender Temperatur abnimmt. Dieses Verhalten kann nur für Pyrophosphat als eine labile Verbindung, die bei hoher Temperatur zerfällt, erklärt werden. Thermisch labile Zuckerphosphate bleiben bis 100°C stabil und folgen der Tendenz vollständigerer Derivatisierung. Es ist auch interessant, dass die stärksten Veränderungen erst ab 50°C stattfinden. Es ist aber zu berücksichtigen, dass bei höheren Temperaturen durch Zersetzungsreaktionen von größeren Metaboliten, die durch GC nicht erfassbar sind, durchaus kleine Metabolite abgespalten werden können. Dadurch steigt die Gefahr falsche Ergebnisse zu bekommen. Essentiell ist, dass die Proben immer bei gleichen Bedingungen derivatisiert werden und dass dieser Prozess reproduzierbar ist. In diesem Zusammenhang ist unter anderem wichtig, Parameter wie den Zustand der getrockneten Probe und alle anderen Faktoren die die Löslichkeit der Metabolite rein mechanisch beeinflussen können auszuschließen.

### 3.6.5. Quenching

Unter dem Begriff Quenching versteht man das schlagartige Abkühlen der Zellen mit dem Ziel den aktuellen Metabolomzustand zu fixieren. Wie wichtig dieser Schritt ist zeigt sich an der Tatsache, dass die Umwandlungsgeschwindigkeit für cytosolische Glucose ungefähr 1mM/sec beträgt [76] und viele Metabolite in millimolaren Konzentrationen in der Zelle vorliegen. Bei der Problemstellung möglichst alle intrazellulären Metabolite zu erfassen, müssen die Zellen vom Medium getrennt und gewaschen werden. Der gut funktionierende Ansatz für die Proteinanalytik oder für Untersuchung von intrazellulären Metaboliten in Pflanzen durch das Einfrieren in flüssigem Stickstoff kann nicht verwendet werden.

Es wurde versucht die Zellen von *C.glutamicum* mit 60%igem, bis -50°C vorgekühltem Methanol zu quenchen. Dem Quenchen folgte das Waschen der Zellen mit kalter (-20°C) 30%-iger methanolischer 0.9%-iger NaCl-Lösung. Im Vergleich zu parallel nach der Standardmethode aufgearbeiteten Proben wurde im Durchschnitt 100 mal weniger von allen Metaboliten gefunden. Am stärksten sind Aminosäuren z.B. Glutamin, Tyrosin und Homoserin betroffen. Eine Zunahme wurde für Fettsäuren, Glucose, Maltose und Lactose festgestellt. Nur wenig nahm die Konzentration von Glycerol-1-phosphat, Glycerol-2-phosphat, Phosphat, Fumarat, Arabinose, Mannose und Harnstoff ab. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass die Zellwände der Bakterien beschädigt wurden und die cytosolischen Metabolite mehr oder weniger stark aus der Zelle ausgetreten sind. Umgekehrt wurden durch eine beschädigte Zellwand Stoffe aus dem Medium eingelassen. So kann man beispielsweise die zunehmende Konzentration von Glucose erklären. Es wurden weitere Optimierungsversuche unternommen (2.3.10), die aber nicht zum Erfolg führten.

Fast für alle heute bekannten Quenching-Methoden wurde eine Methode mit 60%igem kaltem Methanol ( $-40^{\circ}\text{C}$ ) verwendet [76]. In dieser ursprünglichen Methode wurden 10-15mL Hefe-Zellen nicht nur mit 60mL 60%igem Methanol gequenchet, sondern auch auf einem Filter mit  $3\times 5\text{mL}$  60%igem Methanol gewaschen. Die Autoren untersuchten dabei verschiedene Phosphate und konnten durch die Analyse des Überstands feststellen, dass zumindest für Phosphate die Zellen beim Quenching intakt bleiben. Diese Methode wurde ohne weiteren Prüfungen für *E.coli* übernommen (5mL Probe in 15mL 60%igem Methanol bei  $-50^{\circ}\text{C}$ ) [27, 77, 78]. Auch für *C.glutamicum* wurde diese Methode für die Untersuchung von Phosphaten verwendet (5mL Probe in 10mL 60%igem Methanol bei  $-58^{\circ}\text{C}$ )[81]. Hier wurde versucht, die Zellstabilität zu prüfen. Die Zellen wurden länger der Quenchlösung ausgesetzt und mit schnell gequenchten Proben verglichen. Die Autoren schlossen aus der Tatsache, dass sich nach dem Quenchen keine zeitlichen Änderungen im Gehalt von Metaboliten zeigten, dass diese Methode zum Abstoppen des Metabolismus von *C.glutamicum* geeignet ist. Dabei wurden jedoch die Veränderungen, die durch die initiale Mischung der Kultur mit der Quenchlösung hervorgerufen werden, nicht berücksichtigt.

Eine spätere Arbeit von Heinzle *et al.* (2004) [82] zeigt, ebenso wie im Arbeitskreis durchgeführte Experimente (Yaho, Diplomarbeit, Universität zu Köln, 2004), dass sich insbesondere im Hinblick auf den Gehalt von Aminosäuren drastische Änderungen (Abnahme um bis zu 80%) durch das Mischen der Zellen mit kalter Quenchlösung ergeben. In der nächsten Variation dieser Methode wurde nur 1mL der Zellsuspension mit 40mL 60%igem Methanol bei  $-58^{\circ}\text{C}$  gemischt [83]. Alternativ wurde ein Quenchen mit Hilfe einer Spritze, die mit kalten ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) Kugeln aus Glas befüllt ist, durchgeführt [84]. Aber auch hier wurden nur Phosphate untersucht und es wurde angenommen, dass sie nur als intrazelluläre Metabolite vorkommen. Unter dieser Annahme ist es nicht nötig die Zellen vom Medium oder von der Quenchlösung vor einer Extraktion zu trennen. Im Bezug auf alle intrazellulären Metabolite wurde die Wirkung des Quenchens nicht untersucht. Vor kurzem wurden die Verluste während des Quenchens nach den oben genannten Methoden [81, 83] bei der Analyse von intrazellulären Aminosäuren beobachtet. Eine Lösung dieses Problems existiert heutzutage nicht.

Für weitere Experimente konnten einige Hinweise beobachtet werden. Zellwände konnten entweder wegen Eiskristallbildung oder wegen hoher Methanol Konzentration beschädigt werden. Beide Prozesse sind von der Temperatur abhängig. Bei höherer Temperatur und höherem Methanolgehalt wird die Zellwand schneller lysiert. Bei niedrigem Methanolgehalt ist aber die Temperaturniedrigung durch das Einfrieren des Gemisches begrenzt. Das Optimum für die Quenchtemperatur sollte auf der Linie des Einfrierens liegen. Zusätzlich könnten „Cryoprotektante“ wie z.B. Zucker zur Stabilisierung der Zellwand verwendet

werden. Eine Temperaturenniedrigung bis minus 20°C könnte akzeptabel sein, weil *C.glutamicum* ein Bodenbakterium ist und daher Winterkälte überleben sollte.

### **3.7. Stabilität von Metaboliten und Derivaten**

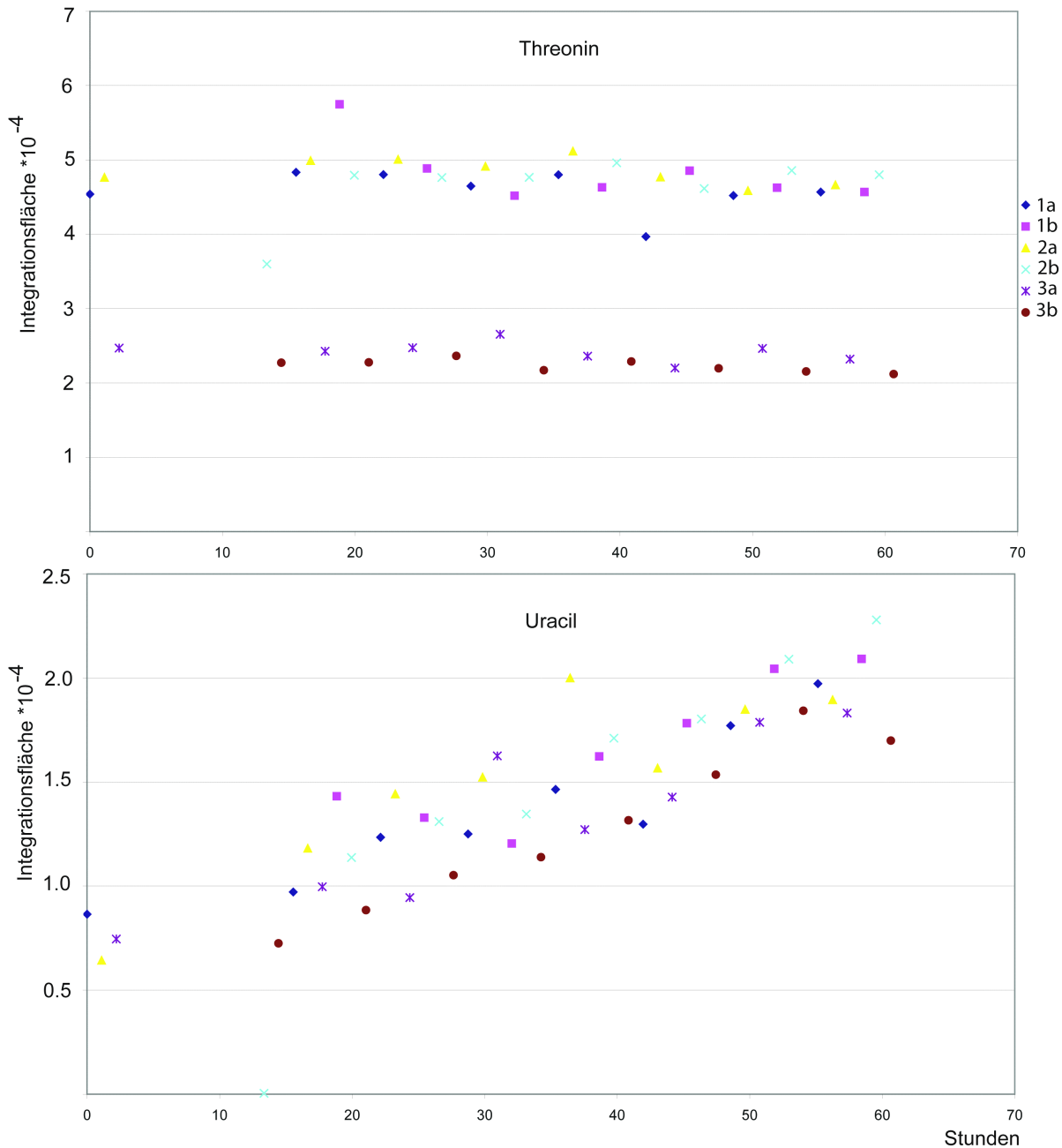
#### **3.7.1. Stabilität von Metaboliten bei der Probenaufarbeitung**

Bei der Extraktion von polaren Metaboliten werden ziemlich harte Bedingungen angewendet, um Zellwände möglichst vollständig zu zerstören und die polaren Metabolite zu befreien. Die Metabolite müssen eine 15-minütige Behandlung mit heissem Methanol (65°C) und Ultraschall überstehen. Es besteht die Gefahr, dass die Carboxylgruppen methyliert werden und labile Verbindungen wie Phosphate zersetzt werden. Um das festzustellen, wurde eine Lösung aus Substanzen verschiedener chemischer Natur vorbereitet und davon zwei Aliquots genommen. Der erste Teil wurde einschließlich der Extraktion unter Standardbedingungen aufgearbeitet und der zweite Teil wurde nur abgedampft und derivatisiert. Nach dem Vergleich von beiden Proben konnte keine Konzentrationsabnahme für einzelne Stoffe insbesondere auch für Zuckerphosphate in der mit Methanol und Ultraschall bearbeiteten Probe festgestellt werden. Die einzige Ausnahme stellen Pyruvat und Lactat dar, deren Menge um Faktor zwei abnahm. Ob das Pyruvat einen Methylester oder ein anderes Produkt während der Extraktion bildet war schwierig festzustellen, aber beim direkten visuellen Vergleich von beiden Chromatogrammen aus diesem Experiment-einfache Standards und methanolysierte Standards- wurde ein zusätzlicher Peak ca. 40 Sekunden nach dem Pyruvatpeak gefunden, der mit der Fläche des Pyruvatpeaks vergleichbar war.

#### **3.7.2. Stabilität der Metabolitderivate bei GC-MS Messung**

Die Stabilität der Metabolitderivate im Verlauf ein GC-MS-Messreihe ist sehr wichtig. Aufgrund der Messzeit einer Probe von ca. 1h ergibt sich schnell eine Messdauer von über einem Tag für eine komplette Messreihe. Über diese Zeit hinweg müssen die derivatisierten Proben stabil sein. Dieses Problem kann vermieden werden, wenn der Derivatisierungsprozess erst unmittelbar vor der Einspritzung mit einem Roboter durchgeführt wird [85, 86]. Bei manuellem Betrieb ist diese Strategie mit einem großen Aufwand verbunden und im Hinblick auf eine hohe Präzision ist eine parallele Derivatisierung erwünscht. Um die Stabilität aller Metabolite zu prüfen, wurden Extrakte mit polaren Metaboliten derivatisiert und 6 Proben 60 Stunden lang gemessen. Es wurde gleichzeitig versucht, die Abhängigkeit der Stabilität von den Derivatisierungsbedingungen

und den Trocknungsbedingungen festzustellen. Dafür wurden zwei Proben im Stickstoffstrom getrocknet und für 30min bei 37°C mit MSTFA derivatisiert. Zwei andere Proben wurden bei 50°C für 30min im Ultraschallbad mit MSTFA derivatisiert und die letzten zwei in der Speedvac getrocknet und für 30min bei 37°C mit MSTFA derivatisiert. Die meisten Metabolite zeigten eine hervorragende Stabilität während des Experimentes und ihr Zeitprofil ähnelt dem in Abb 3.18 gezeigten Profil für Threonin. Die Ausnahmen können folgenderweise zusammengefasst werden: systematische Zunahme oder Abnahme einiger unbekannter Komponenten, die Zunahme von 5-Oxoprolin als Produkt der langsamen Umwandlung von Glutamat. Die Abnahme von Pyrophosphat ist auf eine Spaltung des Moleküls zurückzuführen. Dies kann jedoch aufgrund des um Grössenordnungen höheren Gehaltes an Phosphat nicht durch eine Zunahme des Phosphatsignals verifiziert werden.



**Abb.3.18.** Stabilität der Derivate. Die doppelten Proben (a, b) aus drei verschiedenen Experimenten wurden über 60 Stunden hinweg eingespritzt und gemessen.

Weiterhin steigt der Gehalt von Nucleotid-Basen, namentlich Cytosin (+490%), Uridin (+230%) und Uracil (+180%).

Es ist hier wichtig anzumerken, dass alle zu einem Metaboliten gehörenden Derivate bei der Auswertung summiert wurden. Da sich das Verhältnis verschiedener TMS-Derivate von einem einzelnen Metabolit über die Zeit hinweg verändert. Nur das Verhältnis der syn- und anti-Derivate von methoxymierten Zuckern bleibt stabil. Da eine Aufsummierung nicht identischer Komponenten nicht sinnvoll ist, lässt sich über die Stabilität der unbekannt Derivate keine Aussage machen.

### 3.8. Präzision

Solange man als Ziel nicht eine universelle Methode für die Metabolomanalyse zu entwickeln hat, sondern eine nur für einen Organismus spezifische, sind alle Proben einander sehr ähnlich. Dies erlaubt Probleme wie Vollständigkeit der Extraktion und Vollständigkeit der Derivatisierung teilweise zu umgehen. Was aber sehr wichtig bleibt, ist die Reproduzierbarkeit oder Präzision der Messung. Nach den ersten Versuche fiel auf, dass die Präzision nicht besonders hoch war. Daher musste festgestellt werden, auf welcher Ebene der Analyse die Präzision abnimmt, um weitere Optimierungsschritte durchführen zu können. Dafür wurden mehrere parallele Proben auf jeder Stufe der Probenaufarbeitung analysiert. Bei der GC-MS Messung selbst - wie im Teil 3.6.1. gezeigt - kann eine mittlere relative Standardabweichung von 6% erreicht werden. Parallel getrocknete und derivatisierte Proben aus einem Extrakt tragen nicht sehr zur Abweichung bei und die relative mittlere Standardabweichung bleibt innerhalb von 6%

**Tabelle 3.8.** Standardabweichung auf verschiedenen Ebenen der analytischen Methode

Metabolite	<i>Parallele Proben aus:</i>			
	<i>Extrakt</i>		<i>Fermentation</i>	<i>Kolben</i>
	SD%, n=4	Metabolite	SD%, n=4	SD%, n=4
Pyruvat2TMS1MeOX	3.3	2-Oxoglutarat	15.2	6.9
Lactat2TMS	2.7	2-Phosphoglycerat	10.9	17.0
Glycolat2TMS	4.4	3-Phosphoglycerat	12.7	10.2
Pyruvat4TMS	15.7	2-Aminobutyrat	18.8	10.5
Valin1TMS	8.0	5-Amino-4-oxopentanoat	8.2	17.2
Alanin2TMS	1.7	5-Oxoprolin	11.5	11.2
Glycin2TMS	5.3	6-Phosphogluconat	20.0	36.9
Aminobutyrat3TMS	4.0	Adenin	40.1	37.2
Prolin1TMS	7.5	Alanin	4.1	6.0
IleucinByPr(Nebenprodukt)	4.6	Trehalose	2.6	6.1
Cycloleucin2TMS	2.6	Hexadecanoat	6.7	12.8
Malonat2TMS	9.0	Citrat	12.7	21.5
Valin2TMS	6.6	Cycloleucin	10.0	13.6
Norvalin2TMS	8.3	Cytosin	12.1	12.6
Hernstoff2TMS	57.3	Erythrose-4-phosphat	52.2	18.7
Serin2TMS	3.9	Fructose-1,6-bisphosphat	11.2	50.4
Leucin2TMS	5.4	Fructose-6-phosphat	13.2	17.5
Phosphat3TMS	4.3	Glucono-1,5-lacton	35.3	45.7
Glycerol3TMS	3.6	Glucosamin-6-phosphat	48.3	37.4
Ileucin2TMS	4.8	Glycerat	3.1	4.5
Threonin2TMS	3.8	Lyxose	11.9	28.7
Prolin2TMS	4.7	Mannitol	5.4	6.9
Glycin3TMS	1.7	Ribulose-5-phosphat	21.7	36.5
Succinat2TMS	1.7	Xylulose	28.6	12.4

Fumarat2TMS	9.2	Xylulose-5-phosphat	36.3	36.9
Homoserin4TMS	16.0	Fructose	14.3	4.7
Serin3TMS	1.8	Fumarat	14.2	30.5
Cycloleucin3TMS	3.5	Glucose	26.6	24.4
Threonin3TMS	2.2	Glucose-6-phosphat	15.0	16.5
Alanin3TMS	3.7	Glutamat	1.8	5.3
Homoserin3TMS	1.4	Glutamin	12.2	14.3
5-Oxoprolin2TMS	6.8	Glycerol	8.9	18.0
Aspartat3TMS	3.3	Glyceronphosphat	25.4	55.3
Glutamat2TMS	2.1	Glycin	2.3	5.2
$\alpha$ -KetoglutaratMeOX2TMS	2.9	Glycolat	16.1	25.7
Glutamat3TMS	2.6	Guanin	60.0	13.6
ArabinoseMeOX4TMS <sup>a</sup>	3.9	Histidin	63.8	36.9
ArabinoseMeOX4TMS <sup>b</sup>	5.4	Homocystein	13.2	6.9
RiboseMeOX4TMS <sup>a</sup>	2.4	Lactat	2.3	4.7
Ribitol5TMS	5.5	Lactose	14.4	13.3
Glutamin4TMS	11.4	Arabinose	11.8	18.1
Acetylglutamat3TMS	6.0	Asparagin	38.9	17.8
Tetradecano1TMS	7.9	Aspartat	14.1	8.3
Glutamin3TMS	2.0	Homoserin	40.0	28.1
Acetylglutamat2TMS	1.4	Isoleucin	43.0	13.9
Citrat4TMS	1.7	2,6-Diaminoheptandioat	68.1	45.4
Lysin3TMS	4.9	Leucin	20.6	7.9
Adenin2TMS	1.9	Lysin	6.7	3.6
FructoseMeOX5TMS <sup>a</sup>	6.5	Norvalin	40.0	24.1
MannoseMeOX5TMS <sup>b</sup>	6.3	Prolin	11.9	10.6
GlucoseMeOX5TMS <sup>a</sup>	3.6	Threonin	14.1	6.4
GlucoseMeOX5TMS <sup>b</sup>	3.3	Valin	19.1	17.5
Lysin4TMS	1.4	Maleat	19.6	30.3
Acetylglutamin2TMS	2.4	Malat	9.8	9.7
Tyrosin3TMS	1.7	Malonat	18.4	37.3
Hexadecanoat1TMS	6.1	Maltose	12.8	6.5
cis-9-OctadecenoatMeO	1.9	Mannose	20.6	21.7
RibosephosphatMeOX5TMS <sup>a</sup>	4.4	Methionin	39.9	26.8
RibosephosphatMeOX5TMS <sup>b</sup>	6.7	N-Acetylglutamat	5.9	8.5
Octadecano1TMS	22.9	N-Acetylglutamin	36.9	6.4
FructosephosphatMeOX6TMS <sup>a</sup>	3.4	Nicotinamid	15.0	12.1
GlucosephosphatMeOX6TMS <sup>a</sup>	3.2	Ornithin	14.7	21.9
GlucosephosphatMeOX6TMS <sup>b</sup>	2.8	Phenylalanin	27.7	61.3
Glucosephosphat6TMS	9.0	Phosphat	7.9	8.7
LactoseMeOX8TMS	3.7	Phosphoenolpyruvat	7.9	12.1
Trehalose8TMS	1.7	Pyrophosphat	54.6	63.8
MaltoseMeOX8TMS <sup>b</sup>	6.2	Pyruvat	13.3	16.9
Hentriacontanoat1TMS	6.8	Ribitol	4.8	7.2
		Ribose-5-phosphat	8.5	17.2
		Ribose	19.9	10.8
		Serin	40.1	39.3
		Succinat	6.7	8.4
		Sucrose	50.6	16.9
		Thymin	26.7	12.7
		Tryptophan	22.4	9.1
		Tyrosin	5.5	7.6



		Uracil	2.7	8.2
		Urea	28.3	25.6
		Uridin	4.5	6.9
<b>Mittlere relative Standardabweichung</b>				
	5.7		20.2	19.1

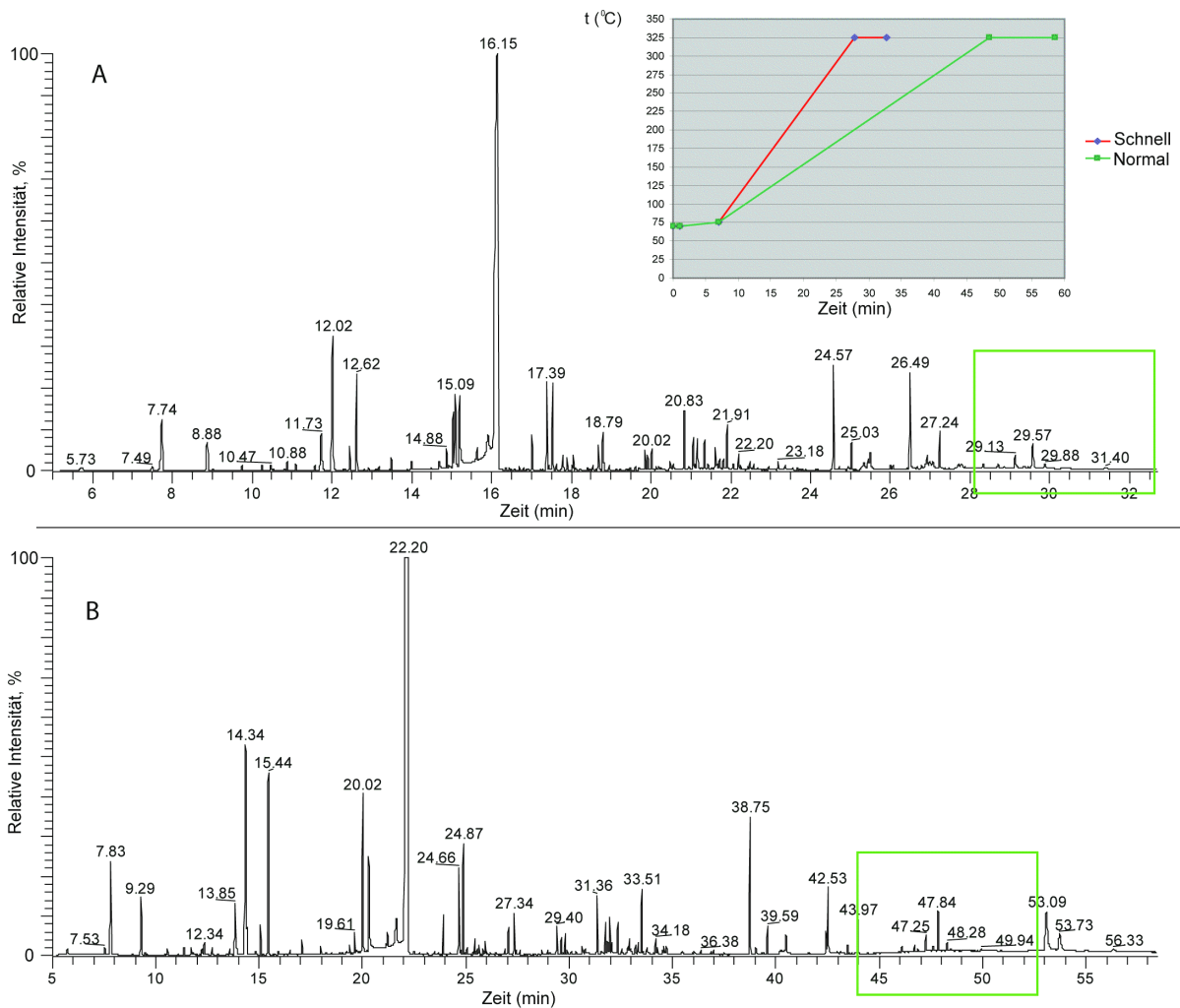
a,b- Syn- und Antiisomere

Erst durch die Extraktion nahm die Präzision drastisch ab. Der Fehler lag bei verschiedenen Experimenten zwischen 20 und 30%. Auf der nächsten Ebene wurden Proben verglichen, die zu einer gemeinsamen Fermentation gehören, aber aus zwei unabhängigen Kulturen des *C.glutamicum* Wildtyps entstammen. Es wurde keine Zunahme für den experimentellen Fehler festgestellt. Eine ähnliche Präzision kann auch bei früheren Untersuchungen von Pflanzen beobachtet werden, wenn die komplette Probenaufarbeitung und nicht nur die Derivatisierung und die GC-MS Messung betrachtet werden [15, 22, 52]. Aus diesen Experimenten ist deutlich zu sehen, dass der Schritt der Probennahme und die Extraktion im Prozess der Probenaufarbeitung limitierend war. Leider war es technisch schwierig Probennahme und Extraktion mit zuverlässigen Experimenten von einander zu trennen, aber mit grober Annäherung trägt wahrscheinlich die Probennahme mehr als die Extraktion zur Präzisionsabnahme bei. Die Experimente für die Extraktionsoptimierung haben keine substantielle Verbesserung erbracht. Dagegen konnte mit der optimierten Probennahme (schnelle Aufarbeitung bei 30°C) eine Präzision innerhalb von 15% mittlerer Standardabweichung erreicht werden. Technisch gesehen kann die Extraktion besser kontrolliert werden und mehrere Proben können unter gleichen Bedingungen aufgearbeitet werden. Bei der Probennahme konnten die Proben nur einzeln hintereinander bearbeitet werden und dabei können nur schwierig alle Bedingungen für ein so labiles System wie eine lebendige Zelle gleich gehalten werden. Der entscheidende Faktor ist dabei immer die Zeit. Bei unserem Probennahmeprozess kann man folgende wichtige Stressfaktoren unterscheiden: Sauerstofflimitierung während der Zentrifugation, deutliche Temperaturveränderungen, osmotische Veränderungen. Von diesen Parametern kann die Temperatur gut kontrolliert werden. In diesen Experimenten wurden, während der Probennahme und schnelleren Probenaufarbeitung, die NaCl-Waschlösung und die Zentrifuge immer kontrolliert bei der für *C.glutamicum* optimalen Temperatur von 30°C gehalten. Wie schon erwähnt wurde, konnte hierbei eine Präzision von 15% mittlerer Standardabweichung erreicht werden. Bei der Routineprobenaufarbeitung von mehreren Proben ist jedoch dies schwer zu erreichen, da Zeit- und Temperaturkontrolle mit ziemlich großem Aufwand verbunden ist. Andererseits kann das Problem der Probennahme durch Quenching gelöst werden.

### **3.9. Optimierung einiger Parameter**

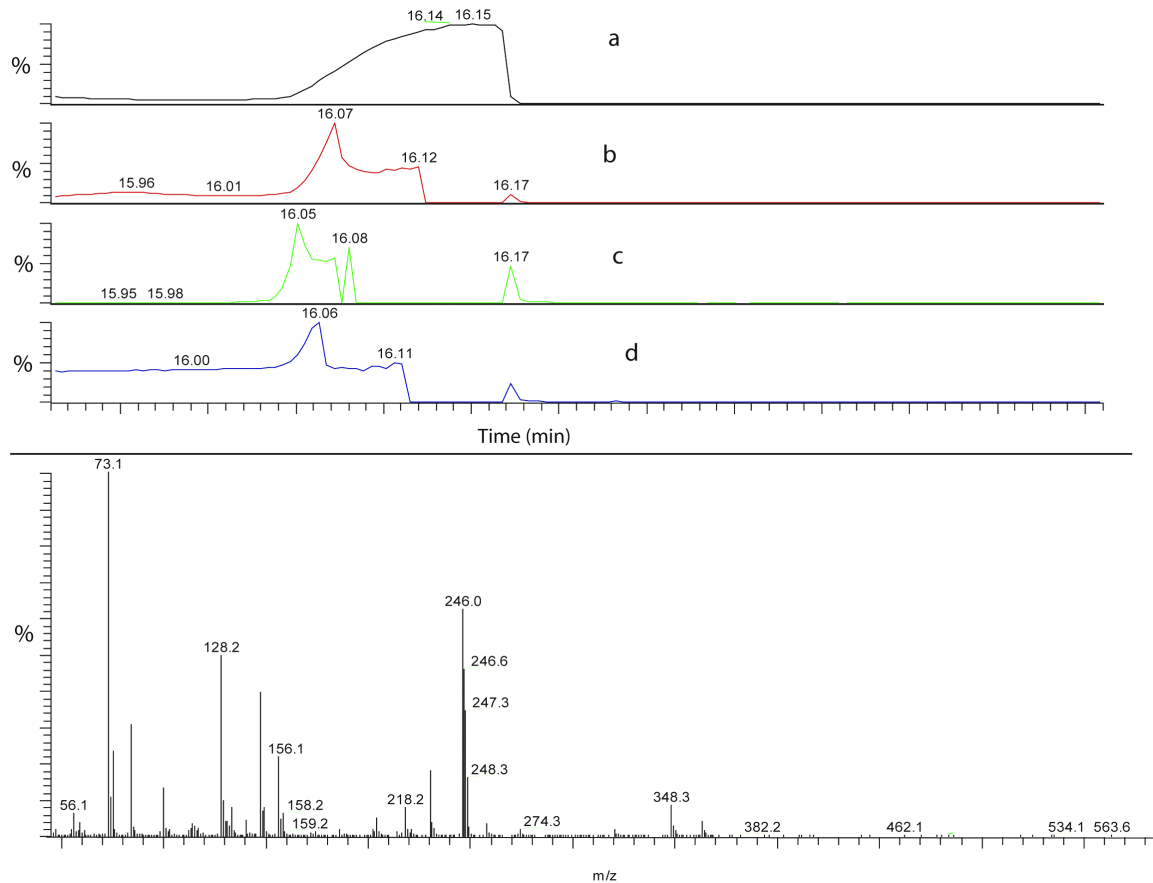
#### **3.9.1. Schnelle GC-MS**

Es wurde versucht, die Zeit für die GC-MS Messungen zu verkürzen. Dafür gibt es viele Möglichkeiten, die aber sehr oft alternative oder zusätzliche Materialien und Geräte benötigen [85, 87-89]. Als einfachste Variante wurde die Chromatographiezeit durch eine schnellere Temperatursteigerung (Temperaturgradient) halbiert. Dabei erwartet man Peaks von einer halben Breite. Im normalen Betrieb wurden mit dem Trace- MS-Gerät die Massenspektren mit einer Geschwindigkeit von 2 *scans* pro Minute im Massenbereich  $m/z$  von 45-585 aufgenommen. Dies bedeutet  $540 \times 2 = 1080$  amu (*atomic mass units*) pro Sekunde. Das entspricht der vom Hersteller des Gerätes maximalen Geschwindigkeit, wobei auf keinen Fall die Qualität eines Massenspektrums negativ beeinflusst wird. Prinzipiell ist es aber möglich die Aufnahmegeschwindigkeit bis auf 6000 amu pro Sekunde zu erhöhen. Bei der normalen Aufnahmegeschwindigkeit besteht ein kleiner, aber noch quantifizierbarer chromatographischer Peak aus acht Messpunkten. Eine kleinere Anzahl von Aufnahmepunkten kann zu größeren Integrations- und dadurch Quantifizierungsfehlern führen. Um das zu vermeiden, wurde die Aufnahmegeschwindigkeit bis 2160 amu pro Sekunde erhöht. Ein Vergleich von einem üblichen Chromatogramm und einem schnellen Chromatogramm ist in Abb. 3.19 dargestellt .



**Abb. 3.19.** Programmierte Temperaturgradienten und Chromatogramme für schnelle (A) und normale (B) Chromatographie. Der schnelle Gradient muss um 3-5 Minuten verlängert werden, um die letzten zwei Peaks in dem Chromatogramm zu erfassen

Die letzten beiden Peaks die im schnelleren Experiment nicht sichtbar sind, sind nicht quantifizierbare Acylglyceride, die aber bei mehreren hintereinander gemessenen Proben beim nächsten Chromatogramm nicht eluiert wurden und entweder während der Abkühlphase des GCs von der Säule eluieren oder auf der Säule bleiben, was auf Dauer nicht erwünscht sein kann. Wenn bei der Zellyse unpolare Metabolite extrahiert werden, stören Acylglyceride nicht mehr. Die Auflösung der chromatographischen Peaks hat sich bei dem schnelleren Lauf fast nicht verändert. Die Qualität der MS-Spektren war akzeptabel. Einzige Ausnahme stellte der aufgrund von Überladung ohnehin problematische Glutamat-Peak dar, bei dem massenspektrometrische Fehler auftraten (Abb. 3.20).



**Abb. 3.20.** Fehler bei einem schnellen chromatographischen Lauf. Massenspektrum von Glutamat3TMS, überladene TIC-Massenspur (summierte Massenspur) (a), spezifische Massenspuren  $m/z=156$ (b), 246(c) und 147 (d).

Dieser Fehler tritt nur bei stark überladenen und nicht quantifizierbaren Peaks auf, so dass er nicht als großer Nachteil der schnellen Methode bewertet werden kann. Die Übereinstimmung der Retentionsindices mit der MS-Bibliothek war im Durchschnitt doppelt so schlecht im Vergleich zum normalen chromatographischen Lauf ( $\pm 12$  RI Einheiten). Dies entspricht den Erwartungen, weil der Temperaturgradient nicht überall linear ist und eine präzise Übertragung von einem Retentionsindexsystem nur begrenzt möglich ist [90]. Die Retentionsindices können aber empirisch korrigiert werden. Da das Risiko eines möglichen MS-Fehlers existiert, wurde diese Optimierung nicht weiter verfolgt.

### 3.9.2. Reduzierung der Probenmenge

Ein Volumen von 35-40mL der Bakteriensuspension ( $OD_{600}=4-5$ ) war für die standardisierte Probenaufarbeitung für GC-MS und LC-MS Analysen vorgesehen. Bei einem großen Screening-Durchsatz ist es aber erwünscht die Aufzucht von Bakterien in Mikroformat zu gestalten. Nach der Extraktion wurde bei der Standardmethode für die Untersuchung von

polaren Metabolite mittels GC-MS nur ein Drittel des Zellextraktes für die Messung verwendet. Dies entsprach der optimalen Probenmenge für die GC-MS Analyse. Entsprechend kann die Probenmenge auf 12mL reduziert werden, wenn der gesamte Extrakt für die GC-MS-Messung verwendet wird. Bei zehnfacher Reduzierung entspricht das einem Probenvolumen von 1.2mL. Bei der *large-volume*-PTV-Injektion kann bis zu 10-20µL einer Probe eingespritzt werden. Dadurch lässt sich das Probennahmenvolumen noch mal 10-fach (bis 120µL bei OD<sub>600</sub>=5) reduzieren. Die größten Probleme sind bei der Derivatisierung zu erwarten, weil das Volumen von Methoxyamin in Pyridin auf 5µL und von MSTFA auf 8µL proportional reduziert werden muss. Es kann auch mehr von dem Derivatisierungsmittel genommen werden, aber dann wird ein Aufkonzentrierungsschritt benötigt, der bei diesen aggressiven und gegenüber Luftfeuchtigkeit empfindlichen Derivatisierungsmitteln zu einem nicht erwünschten zusätzlichen Aufwand führt. Das nächste Ziel war die Probenaufarbeitung auf relativ billige Eppendorfgefäße aus Polypropylen zu übertragen.

Die Ergebnisse von diesem Experiment sind in Tabelle 3.9 und in Anhang 6.4 dargestellt.

**Tabelle 3.9.** Summierte Standardabweichung für alle Komponente bei Variation von Probenvolumen und Gefäß.

Gefäße	Glas				Eppendorf		
	100	200	400	1000	100	200	1000
Extraktvolumen, µL	100	200	400	1000	100	200	1000
MeONH <sub>2</sub> in Pyridin, µL	5	10	20	50	5	10	50
MSTFA, µL	8	16	32	80	8	16	80
Summierte Standardabweichung, %, n=3	1313	1487	1800	1889	3256	3179	2421

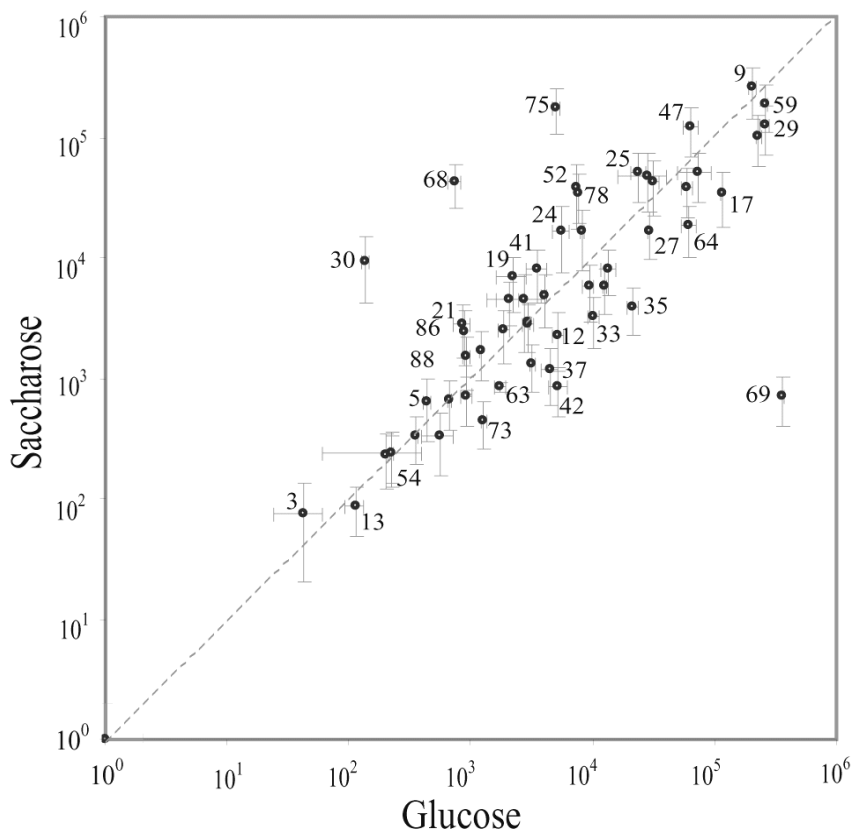
Sehr große quantitative Unterschiede zwischen der Derivatisierung im Glasgefäß und Eppendorfgefäße wurden nicht festgestellt. Im Eppendorfgefäß konnten beispielsweise mehr hydrophobe Aminosäuren und dagegen weniger Fructose-1,6-bisphosphat gefunden werden. Es ist aber schwierig einen Zusammenhang zwischen Material und Stoffklassen zu finden. Viel wichtiger war die Frage, wie sich die Reproduzierbarkeit der Messung verändert. Die schlechtesten Ergebnisse wurden in Eppendorfgefäßen erhalten, was wahrscheinlich mit den stärkeren Absorptionseigenschaften vom Kunststoff verbunden ist. Für das kleinste Derivatisierungsvolumen wurde eine unerwartet hohe Präzision erreicht. Die Löslichkeit von kleineren Mengen des getrockneten Extrakts im Derivatisierungsmittel war dabei wahrscheinlich viel effektiver als erwartet.

### 3.10 Anwendung der Methode

Nach der ersten Optimierung der analytischen Methode war es nötig, die Empfindlichkeit der Methode zu testen. Für eine erste Überprüfung wurden die wichtigsten Aufzuchtbedingungen wie Temperatur und Kohlenstoffquelle für den *C.glutamicum* Wildtyp geändert. Im Hinblick auf zukünftige Metabolomics-Experimente, wobei eine Antwort im Metabolom von *C.glutamicum* auf Mutationen zu erwarten ist, wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor Krämer Mutanten mit knock-outs im Trehalose Stoffwechselweg analysiert.

#### 3.10.1. Glucose/Saccharose Experiment

In diesem Versuch wurde Glucose als Kohlenstoffquelle durch eine äquimolare Menge von Saccharose ersetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.21 dargestellt.

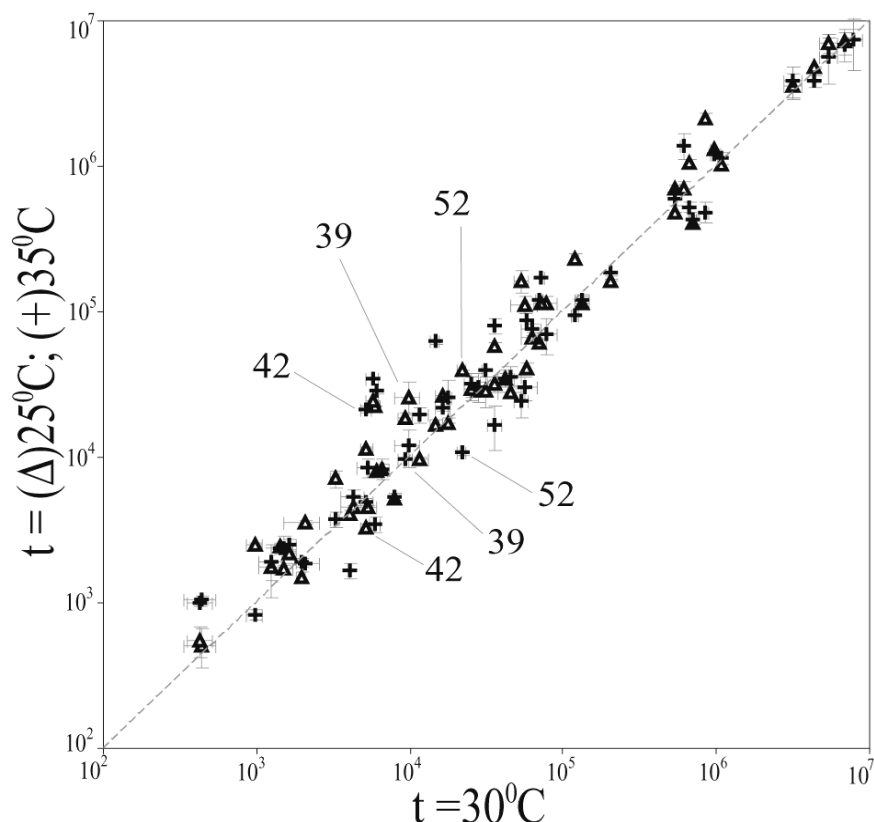


**Abb. 3.21.** Zellen vom *C.glutamicum*-Wildtyp ATCC 13032 wurden unter gleichen Bedingungen auf verschiedenen Kohlenstoffquellen aufgezogen. Auf den Achsen sind logarithmisch die Signalintensitäten aufgetragen. Metabolite: 30=Mannitol, 68=Fructose, 69=Glucose, 75=Sucrose. Die Verbindungen sind entsprechend Anhang 6.1 nummeriert.

Bei der Aufzucht von *C.glutamicum* auf Saccharose wurden alterierte Mengen von Fructose, Mannitol und Saccharose beobachtet. Es ist bekannt, dass während der Aufzucht von *C.glutamicum* auf Saccharose, freie Fructose durch Spaltung von Saccharose entsteht [91], und nur relativ langsam metabolisiert wird. Um den hohem Mannitollevel zu erklären, kann nach Analogien zu anderen Organismen gesucht werden. Beispielsweise produziert der Organismus *L.intermedius* das Enzym Mannitol-2-dehydrogenase während der Aufzucht auf Fructose oder Saccharose [92]. Dabei ist Fructose möglicherweise ein Induktor zur Produktion dieses Enzymes, weil keine Aktivität der Mannitol-2-dehydrogenase, während des Wachstums auf Glucose, Galactose, Trehalose, Arabinose und Glucuronsäure, festgestellt wurde. Detailliertere Untersuchungen dieses Phänomens waren im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgesehen.

### 3.10.2. Variierung von Temperatur

Abweichend von der für *C.glutamicum* optimalen Wachstumstemperatur von 30°C wurden Kulturen bei 25°C und 35°C angezogen, um den Einfluss der Temperatur auf das metabolische Profil zu untersuchen. Die Ergebnisse sind in der Abb.3.22 zusammengefasst.



**Abb.3.22.** Metabolische Profile von *C.glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 bei 25°C und 35°C gegenüber dem metabolischen Profil bei 30°C. Auf den Achsen sind logarithmisch die Signalintensitäten aufgetragen. Metabolite 39=Trehalose-6-phosphat; 42=Citrat; 52=Malat. Die Verbindungen sind entsprechend Anhang 6.1 nummeriert.

Es wurden multiple Änderungen beobachtet, die aber meist nicht größer als Faktor zwei waren. Starke Unterschiede wurden für Citrat, Glucose-6-phosphat, Trehalose-6-phosphat, Prolin und 2-Aminobutyrat beobachtet.

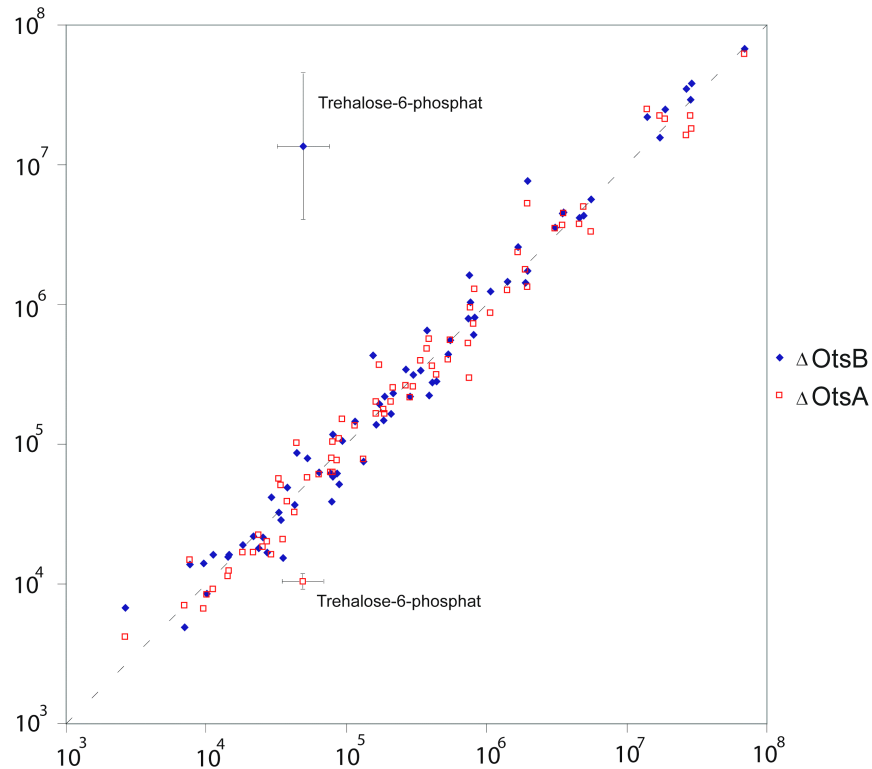
### 3.10.3. Knock-out-Mutanten des Trehalose Stoffwechselweges

Für die Synthese von Trehalose in *C.glutamicum* sind drei Wege beschrieben [93]. Ein Weg ist die Trehalosesynthese von Glucose-6-phosphat und UDP-Glucose über Trehalose-6-phosphat, katalysiert durch die Trehalose-6-phosphatsynthase (OtsA) und die Trehalose-6-phosphatphosphatase (OtsB):



Es ist interessant zu sehen, welche Unterschiede im metabolischen Profil die Mutanten mit einem knock-out in diesem Stoffwechselweg gegenüber dem Wildtyp aufweisen. Mutanten mit OtsA und OtsB knock-out wurden analysiert und ihre metabolischen Profile mit dem Wildtyp verglichen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.23 dargestellt. Wie erwartet werden konnte, hat die Deletion von OtsB eine starke Akkumulation von Trehalose-6-phosphat verursacht. Bei der Deletion von OtsA wurde eine Abnahme von Trehalose-6-phosphat beobachtet. Der Effekt ist aber nicht so stark, wie bei der Deletion von OtsB. Für Trehalose selbst wurden keine deutlichen Änderungen beobachtet. Die zwei letzten Beobachtungen können dadurch erklärt werden, dass durch alternative Stoffwechselwege für die Trehalosesynthese die Deletionseffekte kompensiert wurden. Die experimentellen Fehler lagen weit unter den beobachteten Effekten. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass prinzipiell eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation möglich ist, die zur Aufklärung bislang unbekannter Genfunktionen durch die Analyse zufälliger knock-out-Mutanten beitragen kann.





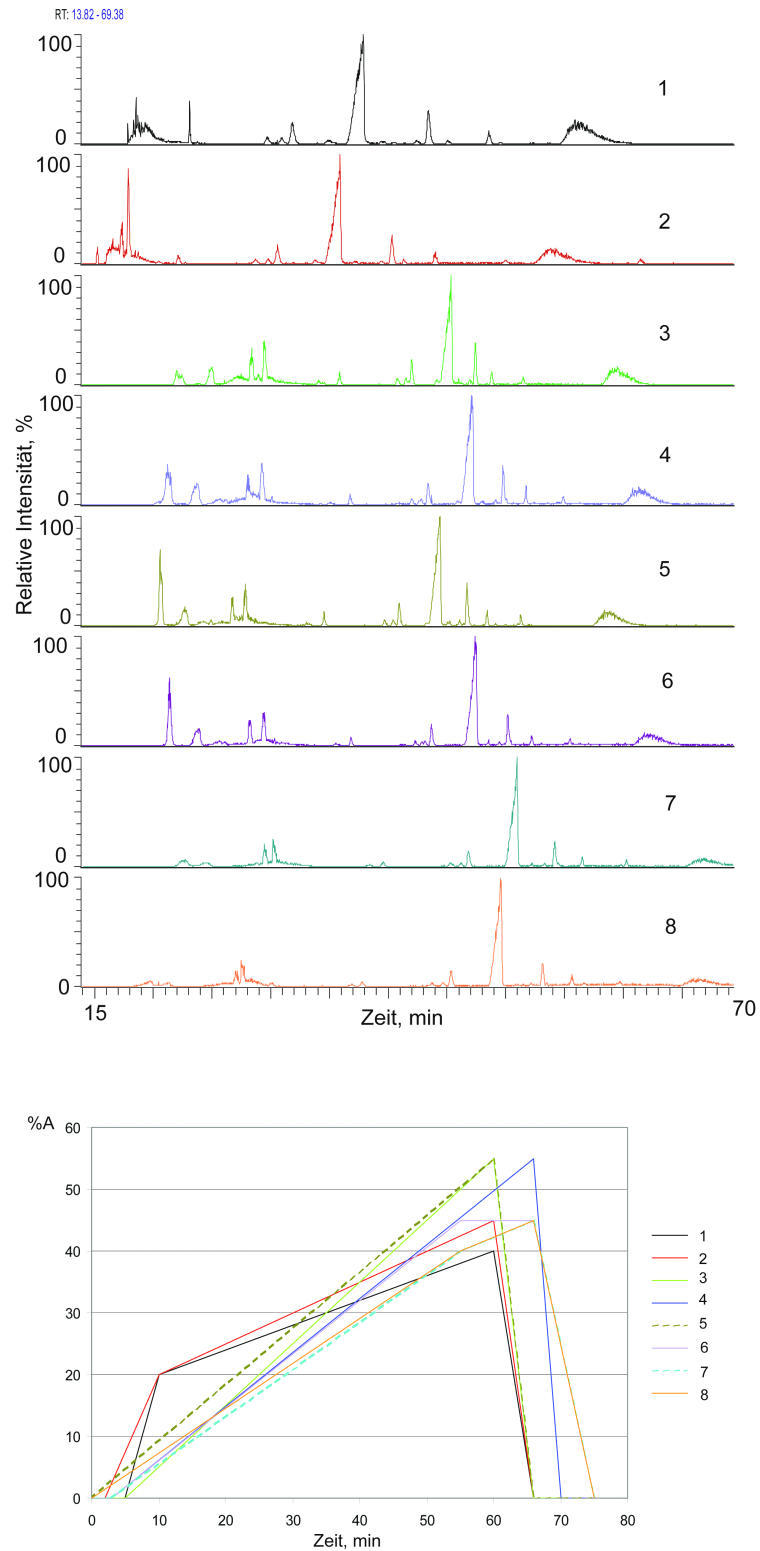
**Abb.3.23.** Metabolische Profile von  $\Delta$ OtsA und  $\Delta$ OtsB Mutanten (Ordinate) gegenüber dem Wildtyp (Abszisse). Dargestellt ist die Signalstärke in einer logarithmischen Auftragung. Es wurde ein Mittelwert für die exponentielle und stationäre Wachstumsphase genommen.

Die durch Mutationen erzeugten Effekte können stark genug sein, wenn ein Stoffwechselweg nicht verzweigt ist. Die metabolischen Veränderungen erstrecken sich primär auf die unmittelbar in der katalysierten Reaktion involvierten Metabolite (Substrate oder Produkte), dies ist auch für andere Mutanten anzunehmen. Für eine richtige Interpretation von anderen, schwächeren Änderungen in einem metabolischen Profil können bioinformatische Ansätze helfen.

### 3.11. HPLC-MS (*high performance liquid chromatography mass spectrometry*)

Trotz aller Vorteile und Einfachheit und der Möglichkeit ein sehr breites Spektrum von Stoffen sehr verschiedener Natur gleichzeitig zu analysieren, ist die GC-MS - wie auch jeder andere Ansatz - nicht absolut universell. Große und thermisch labile Stoffe wie Zuckernucleotide oder große Oligosaccharide können mittels GC-MS nicht analysiert werden, da sie nur begrenzt flüchtig sind. Solche Verbindungen müssen mit anderen Methoden, wie CE-MS (*capillary electrophoresis*) oder LC-MS analysiert werden. Für die HPLC-Trennungen sind zwei, sich einander ergänzende Methoden nötig, um polare und

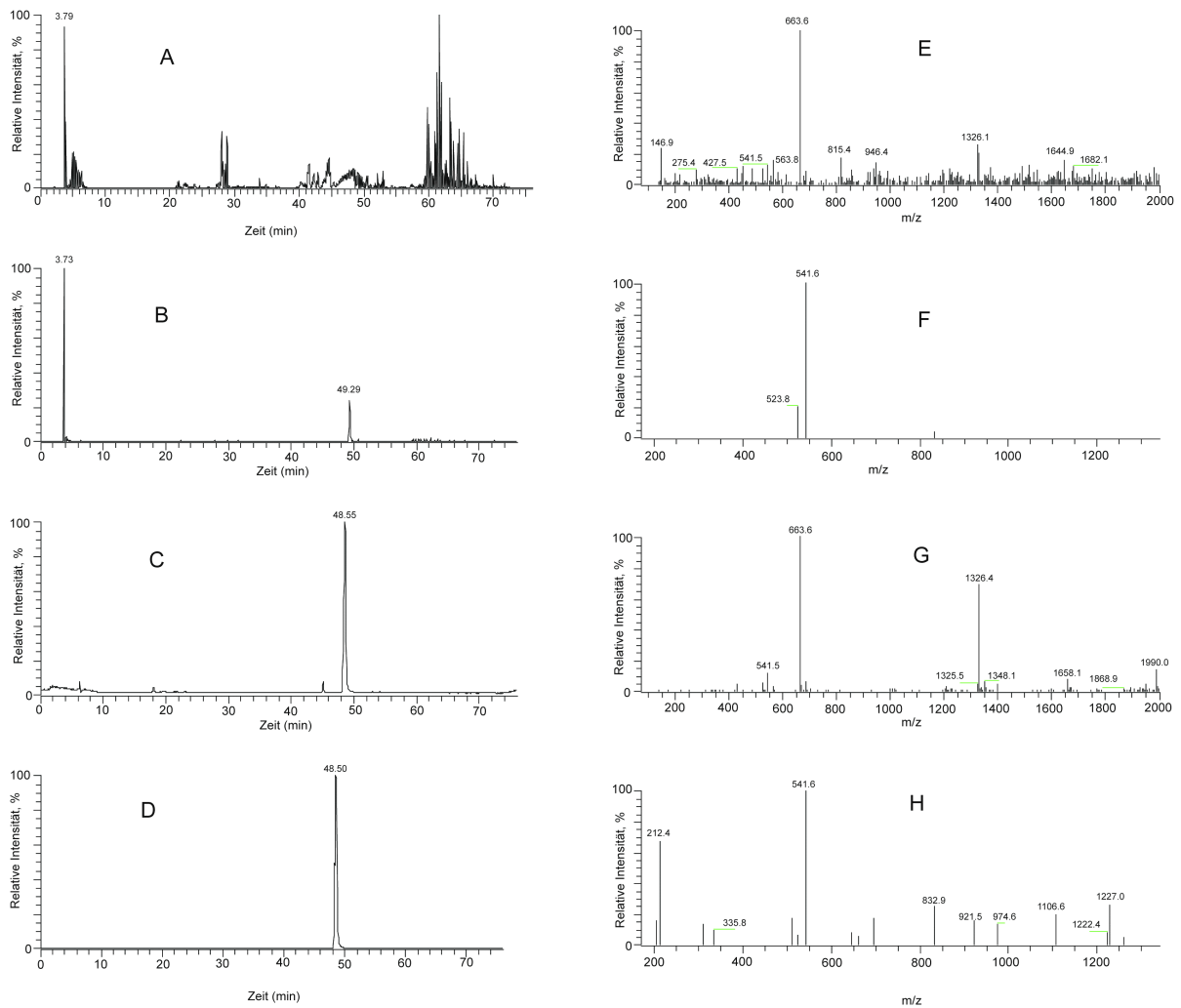
unpolare Metabolite mittels HPLC-MS zu analysieren. Die Umkehrphasenchromatographie (RP) ist eine weit entwickelte Methode, die mit MS-Kopplung für die Analyse von Stoffen mit überwiegend hydrophobem Charakter wie Lipide, Flavonoide oder hydrophobe Peptide gut geeignet ist. Polare Metabolite, die am interessantesten sind, wie Saccharide und andere polare Verbindungen, werden auf einer RP - Trennsäule nicht gut genug zurückgehalten. Sie werden normalerweise mittels Ionenaustausch-Chromatographie (IE) getrennt. Leider kann dabei ein Massenspektrometer nicht als Detektor benutzt werden, da übliche IE-Elutionslösungen einen sehr hohen Salzgehalt aufweisen und die Ionisation der Analyten dabei stark unterdrückt wird. Um dieses Problem zu überwinden, können polare Verbindungen so derivatisiert werden, dass sich hydrophobere Derivate bilden. Alternativ können im Laufmittel Stoffe zugeben werden, die hydrophobere Ionenpaare mit polaren Analyten bilden (ion pairing chromatography). Eine Derivatisierung ist unerwünscht, weil noch ein zusätzlicher Schritt in der Probenvorbereitung auf Grund der bekannten Probleme (Vollständigkeit der Derivatisierungsreaktion) die Reproduzierbarkeit der Messung verschlechtert. Darüber hinaus ist es schwierig, eine passende Derivatisierungsmethode oder ein ion-pairing-Reagenz für mehrere Stoffklassen zu finden. Dieses Problem beruht hauptsächlich auf der Unterdrückung der Ionisierungsreaktion. So können beispielsweise relativ problemlos Aminosäuren mit 9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC) derivatisiert und mit einer RP-Trennsäule chromatographiert werden [94]. Auch ist es möglich Pentadecafluorooctansäure als Ionenpaar für eine *reversed-phase*-Chromatographie zu verwenden [95]. Diese Methode funktioniert aber nicht für andere polare Stoffe wie Zucker. *Hydrophilic- interaction-* Chromatographie (HILIC) ist eine relativ neue Methode und wurde erfolgreich als eine gute Lösung für dieses Problem angewendet [96]. Der Trennmechanismus besteht darin, dass sich Analyte zwischen der hydrophoben mobilen Phase und einer Schicht aus der mobilen Phase verteilen, die mit Wasser angereichert und teilweise auf der stationären Phase immobilisiert ist. Dies ist für eine gute Bindung und letztendlich für eine gute chromatographische Trennung von polaren Verbindungen günstig. Eine gute Trennung wurde für Peptide, Aminosäuren, Zucker, organische Säuren und Basen und Oligonucleotide erhalten [96]. Die dabei verwendeten Laufmittel sind von ihrer Zusammensetzung optimal mit der ESI-Ionisierungsmethode kompatibel. Eine HILIC-MS(ESI)-Kopplung wurde für die Analyse von Aminozyklaren [97], komplexen Kohlenhydraten [98] und anderen Stoffen polarer Natur [99, 100] demonstriert. Auch für die Metabolomanalyse von komplexen biologischen Gemischen aus Pflanzen wurde das Potenzial dieser Methode gezeigt [24]. Für die Analyse von *C.glutamicum*-Extrakten wurden zunächst die chromatographischen Bedingungen optimiert. Im Gegensatz zur RP-Chromatographie ist die HILIC nicht so gut untersucht, so dass eine Vorhersage von für eine optimale Trennung nötigen Parametern schwierig ist.



**Abb.3.24.** Optimierung der chromatographischen Bedingungen für die HILIC von *C.glutamicum* Rohextrakten. Die Chromatogramme (oben) wurden hinsichtlich einer guten Auflösung durch Variation der Zusammensetzung der mobilen Phase (unten) optimiert. ( A- 6.5mM Ammoniumacetat und B- Acetonitril)

Der Ansatz bestand darin zunächst eine optimale chromatographische Auflösung für den Rohextrakt zu erreichen und anschließend mit der Identifizierung anzufangen. Für einen solchen chromatographischen Lauf waren in der Regel 60-80 Minuten nötig [24, 99], was auch akzeptabel war. Der maximale Anteil von wässriger Komponente sollte 50-60% nicht übersteigen, da bei einer höheren Konzentration keine HILIC-Verteilung mehr möglich ist. Um polare Komponenten auf dem Säulenmaterial zurückzuhalten, war es nötig, im organischen Lösungsmittel einen Anteil von Wasser in der analysierten Probe zu haben. Gegenüber dem Wasseranteil hat die HILIC eine hohe Empfindlichkeit gezeigt. Eine gute Reproduzierbarkeit bezüglich der Retentionszeiten konnte mit 50% Wasseranteil in der Probe erhalten werden. Am Anfang wurden mit reinem Acetonitril alle unpolaren Verbindungen fast mit der Lösungsmittelfront eluiert. Mit einem schnellen Gradienten war es möglich, erste Komponenten innerhalb von 15 Minuten zu detektieren (Abb.3.24). Wie man aus dem Vergleich der Chromatogramme 3, 5 und 7, 8 sehen kann, konnte mit reinem Acetonitril das ganze Chromatogramm nach hinten verschoben werden. Mit langsameren Gradienten wurde der Trennbereich erweitert (Chromatogramme 8,6). Der Gradient 4 hatte gegenüber Gradient 6 eine zusätzliche Steigung von 45 bis 55% A. Die etwas kürzeren Retentionszeiten am Ende des Chromatogramms 4 zeigen, dass in diesem Bereich der Gehalt von A die Chromatographie noch beeinflusst und der HILIC Mechanismus noch in Kraft ist. Für weitere Arbeiten wurde der Gradient 4 ausgewählt, der bei gleicher Auflösung ein um 5 Minuten kürzeres Chromatogramm als der Gradient 8 ergab.

Die Identifizierung von Metaboliten im Rohextrakt aufgrund von gemessenen Standards wurde am Beispiel von NAD gezeigt (Abb. 3.25). Eine reine NAD-Standardlösung und *C. glutamicum*-Rohextrakt wurden mit HILIC-MS(ESI) gemessen. Es wurde ein volles Massenspektrum  $m/z$  70-2000 aufgenommen und im *dependent-scan*-Modus ein MSMS Spektrum von jedem prominenten Peak aufgenommen. Wie im Standard konnte auch im Rohextrakt bei gleicher Retentionszeit ein  $MH^+$ -Ion von NAD mit  $m/z=664$  detektiert werden. In beiden Fälle dissoziierte das  $m/z=664$  Ion zu einem Fragment mit  $m/z=542$ , das durch einen Verlust von Nicotinamid entsteht [101].



**Abb. 3.25.** Identifizierung von NAD. A- *base peak*-Chromatogramm des *C. glutamicum*-Wildtyp-ATCC-13032-Rohextrakts, B- Chromatogramm des Massenbereiches m/z 663-664 vom Rohextrakt, C- TIC Chromatogramm des NAD-Standards, D- Chromatogramm des Massenbereiches m/z 663-664 des NAD-Standards, E- das volle MS-Spektrum von NAD im Chromatogramm des Rohextrakts, F- MSMS-Spektrum des Ions m/z=663.5 aus E, G- das volle MS-Spektrum des NAD-Standards, H- MSMS-Spektrum des Ions m/z=663.5 aus G.

Auf diese Weise können im Prinzip alle bekannten, in *C. glutamicum* vorkommenden Metabolite identifiziert werden, vorausgesetzt entsprechende Standards sind zugänglich und diese entweder im positiven oder negativen Modus mittels ESI ionisierbar. Völlig unbekannte Peaks können mit niedrig auflösenden Massenspektrometern kaum identifiziert werden, so dass andere Strategien nötig sind. Mit einer Massengenauigkeit von <1ppm bei Messungen mit *Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance* Massenspektrometer [102],[103] konnte man für 75% aller Komponenten mit einem Molekulargewicht bis zu 400Da die genaue Bruttoformel bestimmen, aus der nur eine begrenzte Anzahl von strukturell sinnvollen Moleküle gebildet werden kann. Bei Verwendung von logischen und mathematischen Methoden wurde die Grenze bis 900Da erweitert, was aber nur bei der Analyse von Rohöl mit Komponenten hoher Analogie möglich ist. Weitere Informationen über eine mögliche Struktur kann mit Hilfe von MSMS-Experimenten erhalten

werden. Eine zuverlässige Strukturaufklärung von unbekanntem Metaboliten kann jedoch nur mit Hilfe von NMR erfolgen. Im Gegensatz zu üblichen NMR-Methoden, bei denen normalerweise Mengen eines Stoffes im Milligramm-Bereich für eine erfolgreiche Messung nötig sind, reichen für eine Mikro-NMR Messung schon 2 µg einer Substanz. Sogar eine HPLC-NMR Kopplung ist möglich [104]. Bei einer HILIC-Trennung kann z.B. nach der Trennsäule durch einen eingebauten Split bei jedem beobachteten chromatographischen Peak eine Probe gesammelt werden und später mittels NMR charakterisiert werden.

## 4. Ausblick

### Vollständigkeit und Quantifizierung

Wegen der großen Diversität von Stoffwechselprodukten ist es unmöglich das ganze Metabolom eines Organismus mit einer einzigen analytischen Methode zu analysieren. In diesem Zusammenhang ist es interessant abzuschätzen, welchen Teil des Metaboloms mit der einer oder anderen Methode analysierbar ist. In der Hefe *S. cerevisiae* sind ca. 600 niedermolekulare Intermediate zu erwarten[105], während die Anzahl von proteinkodierenden Genen ca. 6000 beträgt[106]. Für *C. glutamicum* ATCC 13032 wurden ca. 3000 proteinkodierende Gene identifiziert[2] und es kann angenommen werden, dass die Anzahl von Metaboliten zumindest nicht größer als für *S. cerevisiae* ist. So kann mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten analytischen Methode die Hälfte (ca. 300 Metabolite) des Metaboloms quantifiziert werden.

Einige Teile der beschriebenen Methode sind weiter zu optimieren. Die Richtung dieser Optimierung hängt von der konkreten Zielsetzung ab. Für *functional genomics* ist keine absolute Quantifizierung notwendig, wodurch sich die Probleme der Vollständigkeit der Extraktion oder Matrixeffekte bei der Messung umgehen lassen. Wenn aber ein dynamisches Metabolombild untersucht wird und Veränderungen von Metabolitkonzentrationen gegeneinander von Interesse sind, braucht man genauere quantitative Daten. In diesem Fall müssen zusätzliche Proben zur Erstellung von Kalibrierungskurven während der Analyse gemessen werden. Wenn andererseits nur ein begrenzter Teil von Metaboliten (z.B. eine Stoffklasse) genau untersucht wird, besteht ein Interesse an einer verkürzten Messzeit. Eine quantitative Routineanalytik kann auf die Analyse von einem gut definierten und analytisch gut untersuchten Metabolitensatz gezielt sein (z.B. *metabolic profiling* von allen identifizierten Metaboliten in *C. glutamicum*). Identifizierung einer exzellenter Qualität ist dabei nicht notwendig und Metabolite können nur aufgrund ihrer charakteristischen Massenspuren und Retentionszeiten identifiziert werden. Dies erlaubt das Massenspektrometer in einem SIM-Modus (*selected ion monitoring*) zu betreiben und eine ca. 100-fache Verstärkung vom Signal zu bekommen, was für die quantitative Analytik von Metaboliten, die in der Zelle nur im Spurenbereich vorliegen, sehr wichtig ist. Da massenspektrometrische Messparametern dabei vordefiniert werden können, die in normaler Konzentration vorhandene Komponenten werden mit normaler Intensität gemessen.

Es wurde in Rahmen dieser Arbeit versucht einen Zeitgewinn durch Kürzung (Halbierung) der nötigen für die chromatographische Trennung Zeiten zu bekommen. Die chromatographische Auflösung wurde fast nicht vermindert und unter bestimmten

Voraussetzungen lässt sich die Chromatographie noch weiter beschleunigen. Für die Aufnahme von vollen Massenspektren wird dabei für ein Quadrupolmassenspektrometer seine technische Leistungsfähigkeit überschritten und ein schnelleres z.B. TOF-Massenspektrometer (*time-of-flight*) wird benötigt [107].

### **Identifizierung**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 121 Metabolite identifiziert und mit Standards verifiziert. Da nicht alle Standards kommerziell zugänglich sind müssen andere Möglichkeiten zur Identifizierung gefunden werden. Die komplette Identifizierung von unbekanntem Verbindungen mittels GC-MS allein, ohne Standards, scheint wenig aussichtsreich zu sein. Mit verschiedenen Ansätzen kann eine erste Information über eine mögliche Molekularstruktur erhalten werden. Erst dann ist es sinnvoll, die Verbindung zu synthetisieren. Eine relativ genaue Identifizierung erfolgt durch Verwendung von anderen, fertigen massenspektrometrischen Bibliotheken unter der Voraussetzung, dass sie Retentionsindices enthalten und die chromatographischen Bedingungen vergleichbar sind. Bei der HPLC-ESI/MS-Analyse ist eine sichere Identifizierung von Metaboliten aufgrund einer MS-Bibliothek- wegen größerer Diversität der massenspektrometrischen Messbedingungen- kaum möglich [108]. Eine organische Synthese von sekundären Metaboliten mit größerer und komplizierterer Struktur ist sehr aufwändig. Alternativ kann die präparative HPLC in Kombination mit NMR, oder *on-line* Kopplung von Kapillar-HPLC-NMR-MS als mögliche Lösung sein [104].

### **GC-MS und alternative Meßmethoden**

Eine GC-MS basierende Methode bietet für die Analyse von Metaboliten viele Vorteile an. Ein breites Spektrum von Stoffen sehr unterschiedlicher chemischer Natur wird mit einer Methode analysiert. Bei Verwendung einer schon etablierten Methode ist der Aufwand bei der Messung minimal und die Analyse kann automatisch durchgeführt werden. Die chromatographische Trennleistung ist sehr hoch- es gibt kaum vollständig überlappende Peaks und die für einen chromatographischen Lauf notwendigen Zeiten sind kurz (von 20min mit TOF-MS bis 60min mit Quadrupol-MS). Dazu kommt, dass durch die EI-Ionisationsmethode aussagekräftige, qualitative Informationen erhalten werden. Die Massenspektren sind informationsreich und für die meisten Substanzen spezifisch. Es besteht die Möglichkeit mit großer Zuverlässigkeit MS-Bibliotheken zu verwenden. Leider gibt es für die GC-MS eine deutliche Begrenzung. Da für alle Analyten ihre Flüchtigkeit Voraussetzung ist, können nur Stoffe mit einem Molekulargewicht von maximal 500-600Da analysiert werden. Der Aufwand bei der Derivatisierung- zusätzliche Stabilitätstests und



mehrere aus einem Metaboliten hervorgehende Derivatisierungsprodukte- spricht oft gegen eine GC-MS Methode.

Bei Betrachtung anderer, alternativer Methoden, unter dem Gesichtspunkt guter Selektivität, Empfindlichkeit, Universalität und akzeptabler Kosten kommen nur wenige Methoden in Frage. Diese sind HPLC-MS, CE-MS und HPLC-NMR.

Obwohl mittels NMR-Detektion eine aussagekräftige Information über die Struktur eines Moleküls erhalten wird kann eine Kapillar-HPLC-NMR-Kopplung kaum für reale Analysen von biologischen Proben angewendet werden, da immer noch Probenmenge von ca. 1 µg für eine erfolgreiche Detektion erforderlich sind. Im *stop flow*- Betrieb ist bei der Kapillar-HPLC-NMR die Detektion im Nanogrammbereich möglich. Apparativ ist dieser halb-präparative Betrieb jedoch kaum für die Routineanalyse von mehreren hundert Stoffen gut zu realisieren [104].

Bei den heutzutage existierenden HPLC-MS und CE-MS Methoden unterscheiden sich nur die Trennbedingungen. Als Detektor dient bei beiden Methoden hauptsächlich ESI-MS, das in einem negativen und positiven Massmodus betrieben werden kann.

In einer mittlerweile viel diskutierten Anwendung der CE-MS Methode wurde die Möglichkeit, viele Metabolite in einem breiten Massenbereich (70-1027Da) analysieren zu können demonstriert [39]. Der Aufwand für die beschriebene CE-Methode ist jedoch sehr groß. Eine Kombination von drei verschiedenen Methoden ist für eine Trennung von Metaboliten notwendig: eine für anionische Metabolite, eine zweite für kationische Metabolite und drittens eine für Nucleotide und CoenzymA- ähnliche Metabolite. Die Trennleistung ist bei den einzelnen Methoden nicht besonders hoch. In einem insgesamt 30-minütigen Lauf wird nur ein Bereich von 15min effektiv genutzt. Aufgrund des kleinen dynamischen Messbereich müssen für verschiedene Stoffe, abhängig von ihrer Konzentration, mehrere CE-Läufe durchgeführt werden. So waren für die Analyse von *B. subtilis*-Rohextrakten 33 Läufe (je 30min pro Lauf) nötig. Die Detektionsgrenze ist 1-2 Größenordnungen schlechter als bei der GC-MS (0.3-11 µmol/L), dies beruht hauptsächlich auf der Verwendung eines anderen Massenspektrometers nicht jedoch auf der Trennmethode.

Die etablierten HPLC-MS-Anwendungen wurden für eher lipophile Stoffe entwickelt und basieren hauptsächlich auf der Umkehrphasenchromatographie. Für die polaren Metabolite wurde Ionenaustauschchromatographie verwendet, die jedoch wegen eines hohen Salzgehaltes nicht mit einer ESI-Ionisationsquelle kompatibel ist. Ein Durchbruch auf dem Feld der polaren Metabolite wurde vor kurzer Zeit mit der Einführung der HILIC-Technik erzielt [96, 98]. Bei der Anwendung dieser Methode wurden hervorragende Trennungen auf einer *microbore*-Säule erreicht [24]. Der dynamische Bereich ist größer als bei der CE. Ein Wechsel auf Kapillar-HPLC sollte die Trennungen noch verbessern. Die gesamte HPLC-MS-Methode kann dann aus einer Kombination von zwei Trennmethode- Kapillar-RP-HPLC für

lipophile Metabolite [25] und Kapillar-HILIC-HPLC für die polaren Metabolite (ca. 70min pro Lauf) bestehen.

## 5. Zusammenfassung

In der letzten Zeit gelangt die Metabolomanalyse mehr und mehr in den Fokus des Interesses. Neben gut etablierten, analytischen Techniken im Proteomics- und Transkriptomicsbereich wird eine ergänzende Metabolomics-Technik für einen kompletten systembiologischen Ansatz benötigt. Heutzutage sind die kompletten Genomsequenzen vieler Organismen vollständig entschlüsselt und frei zugänglich. Doch nur für einen Teil der Gene ist die Funktion bekannt. Bei der Aufklärung von Genfunktionen ermöglicht die Information von Metabolitkonzentrationen einen direkten Zugang zum Wissen über Enzymaktivität und komplettiert somit Genom-, Transkriptom- und Proteomforschung. Da bei der Aufklärung von unbekanntem Genfunktionen eine Störung auf Genomebene eine unerwartete Antwort in jedem Bereich des Metaboloms hervorrufen kann, soll möglichst das gesamte Metabolom analysiert werden. Dafür ist eine analytische Methode nötig, die eine möglichst große Anzahl von Metaboliten erfasst. Hierfür bieten sich massenspektrometrische Techniken wie GC-MS und/oder LC-MS mit ihrer großen Universalität, Selektivität und Einfachheit besonders an. Wegen der großen chemischen Diversität von Metaboliten gegenüber den chemisch relativ homogenen Proteinen oder der mRNA, stellt die Entwicklung einer analytischen Methode zur Metabolomanalyse eine große Herausforderung dar.

Der Modellorganismus *Corynebacterium glutamicum* wird in der Industrie für die Produktion von L-Glutamat und L-Lysin benutzt. Es besteht ein großes Interesse an der Optimierung von Produktionsstämmen, aber das Wissen über die metabolische Organisation in der Zelle ist limitiert. Das Genom von *C. glutamicum* wurde vollständig sequenziert und enthält ca. 3000 postulierte Gene. Um die potentielle Anzahl von Metaboliten vorherzusagen, ist eine Annäherung nötig. So wurden beispielsweise in Hefe mit einer Genomgröße von ca. 6000 Genen theoretisch ca. 600 Metabolite bestimmt. Für *C. glutamicum* kann in erster Näherung ebenfalls diese Anzahl angenommen werden.

In Rahmen dieser Arbeit wurde eine GC-MS basierende Methode zur Metabolomanalyse entwickelt und etabliert.

Die aufgenommenen GC-MS-Chromatogramme enthalten die Information von ca. 1000 detektierten Komponenten. Davon lassen sich 300 Metabolite quantitativ, reproduzierbar messen, das entspricht ca. 50% der erwarteten Metabolite. Von diesen wurden im Rahmen dieser Arbeit 121 (88 in der polaren Phase und 33 in der lipophilen Phase) identifiziert. Durch ein optimiertes Extraktions- und Zellernteverfahren, eine optimierte Derivatisierungs- und Einspritztechnik war es möglich, eine Präzision innerhalb von 6% mittlerer Standardabweichung bei der Messung allein und 15% bei Extraktion und Probennahme

zusammen zu erreichen. Die Anwendung dieser Methode für die funktionelle Genomanalyse wurde am Beispiel von Deletionsmutanten des Trehalose Stoffwechselweges durchgeführt. Entsprechend den Erwartungen ließ sich nach der Deletion der Trehalose-6-phosphatphosphatase (kodiert durch *OtsB*) eine ca. 100-fache Akkumulation des entsprechenden Substrates Trehalose-6-phosphat messen. Umgekehrt führte eine Deletion des Gens *OtsA* (kodiert für Trehalose-6-phosphatsynthase) zu einer Abnahme Trehalose-6-phosphat. Zur Evaluierung der Methodenempfindlichkeit wurden Wachstumsbedingungen (Temperatur und Kohlenstoffquelle) variiert. Es wurden dabei multiple Änderungen beobachtet, die den experimentellen Fehler überstiegen. Damit die hier entwickelte Methode als Datengrundlage für eine computergestützte Modellierung metabolischer Netzwerke eingesetzt werden kann, ist eine Kenntnis über die tatsächlichen intrazellulären Metabolitkonzentrationen notwendig. Daher wurden für 71 der identifizierten Metabolite Kalibrationskurven aufgenommen, um den jeweiligen linearen Massenbereich zu charakterisieren und Responsefaktoren zu ermitteln. Als ergänzende Technik zur Analyse von hochmolekularen nichtflüchtigen GC-MS Verbindungen wurde mit der Etablierung eines HPLC-HILIC-ESI-MS Ansatzes begonnen. Die Identifikation eines unbekanntes Metaboliten aus *C. glutamicum*- Rohextrakt wurde am Beispiel von NAD gezeigt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Metabolomanalyse mittels massenspektrometrischer Methoden- insbesondere der in der vorliegenden Arbeit etablierte GC-MS-Ansatz- die Möglichkeit eröffnet, sowohl die durch genetische Veränderungen als auch die durch eine Variation der Umweltbedingungen hervorgerufenen Auswirkungen auf den Metabolismus zu charakterisieren und somit eine Datengrundlage für eine detaillierte Analyse des metabolischen Netzwerkes zu schaffen.

## 6. Anhang

### 6.1. Identifizierte Metabolite

polare Phase						
N	Massenspuren	Peakfläche	N	Massenspuren	Peakfläche	
<i>Aminosäuren</i>			<i>organische Säuren</i>			
1	Alanin	248,290	627284	41	$\alpha$ -Ketoglutarat	198 373882
2	2-Aminobutyrat	130	743613	42	Citrat	273 117413
3	5-Amino-4-oxopentanoat	345	458	43	Fumarat	245 425291
4	3-Amino-2-piperidon	115,141,24	88864	44	Glucuronat	333 12772
5	Arginin	142	63054	45	Glutarat	156,261 12366
6	Asparagin	116,188	4546	46	Glycerat	189 23526
7	Asparaginsäure	232	340870	47	Glycerol	103,117,205 6304407
8	Diaminopimelat	200,272	119629	48	Glycolat	133,161,17 13244
9	Glutamin	156	9180291	49	Hentriacontansäure <sup>a</sup>	71 53146
10	Glutaminsäure	156	42997049	50	Hexadecansäure <sup>a</sup>	117,129,133,313 571260
11	Glycin	174	1227549	51	Lactat	117 33315622
12	Histidin	155,254	3061	52	Malat	233 580429
13	Homocystein	234	13631	53	Maleat	215 1034
14	Homoserin	128,218	1451290	54	Malonat	233 236
15	Isoleucin	158,218	2836730	55	Nonansäure <sup>a</sup>	215 7403
16	Leucin	158	1595841	56	Methylnonadecanoat	87,143,269,312 31768
17	Lysin	174,200	1054326	57	Oxalat	190 54294
18	Methionin	177,250,293	4336	58	Pentadecansäure <sup>a</sup>	117,129,132,299 21135
19	N-Acetylglutamin	144,156,215	487170	59	Phosphat	299 21212502
20	N-Acetylglutamat	84,158,216	2200940	60	2-Phosphoglycerat	227,315,357,387 139843
21	Norvalin	144	91052	61	3-Phosphoglycerat	315,369,459 18628
22	5-Oxoprolin	84	220931	62	Phosphoenolpyruvat	369,387,459 65076
23	Phenylalanin	120	43030	63	Pyrophosphat	451 621890
24	Prolin	142,216	22410338	64	Pyruvat	189,217 672903
25	Serin	204,218	1854930	65	Shikimat	204 117908
26	Tryptophan	202	709582	66	Succinat	129,172 5596440
27	Threonin	117	813061			
28	Tyrosin	218,280,354	422559		Zucker	
29	Valin	144,218	11475454			
	<i>Zuckeralcohole</i>			67	Arabinose	103,234,307 40249
				68	Fructose	103,217 13580
				69	Glucose	205,319 27940230
30	Mannitol	205	5468	70	Lactose	191,204 58441
31	Ribitol	103	1926013	71	Lyxose	103,307 23112
	<i>Zuckerphosphate</i>			72	Maltose	204 41402
				73	Mannose	103,205,217,319 85838
32	Erythrose-4-phosphat	357	652	74	Ribose	103 74192
33	Fructose-6-phosphat	315, 357459	751012	75	Sucrose	271,319,451,437 46290
34	Fructose-1,6-biphosphat	230,315	2514	76	Trehalose	103 16177718
35	Glucose-6-phosphat	387	654016	77	Xylulose	306 33136
36	Glucosamin-6-phosphat	159	496			
37	Ribose-5-phosphat	315, 403	79976			
38	Ribulose-5-phosphat	357	129768			
39	Trehalose-6-phosphat	271,315	6562			
40	Xylulose-5-phosphat	357	129768			
	<i>Andere</i>					
78	Adenin	192,264,279	2283136	84	6-Phosphogluconat	387 3648
79	Cytosin	240,254	224676	85	Thymin	255 52449
80	Gluconatlacton	160	763003	86	Uracil	99,113,241,255 598956

## Anhang

81	Glyceraldehyd	160,217	4228	87	Harnstoff	171	1241758
82	Glyceronphosphat	315,400	87007	88	Uridin	217,259	1761699
83	Nicotinamid	136,179	606062				
<b>lipophile Phase</b>							
<i>Fettalcohole</i>				<i>Aldehyde<sup>c</sup></i>			
89	Docosanol	383	22972	106	Hexadecanal	82	230317
90	Dodecanol	229	8740	107	Octadecanal	82	103098
91	Glycerol	103,117,205	159066	108	Octadecanal	82	124976
92	Heneicosanol	369	2538				
93	Hexadecanol	299	22060		<i>β-Hydroxyfettsäuren<sup>c</sup></i>		
94	Nonanol	201	68827				
95	Tetradecanol	271	6010	109	β-Hydroxyhexadecansäure	343	292911
96	Tridecanol	257	6296	110	β-Hydroxyoctadecansäure	369	77833
<i>Fettsäuren<sup>b</sup></i>				<i>Corynomycolsäuren<sup>c</sup></i>			
97	cis-9-Hexadecensäure	194,236	24948				
98	cis-9-Octadecensäure	222,264	3099411	111	14:0_8:0	427	3705
99	Eicosensäure	283,326	12917	112	18:0_6:0	455	3445
100	Heptadecensäure	241,284	36248	113	18:0_8:0	483	27226
101	Hexadecensäure	227,270	3327812	114	18:0_10:0	511	26101
102	Nonadecensäure	269,312	3496960	115	18:0_12:0	539	53697
103	Octadecensäure	255,298	1355284	116	18:1_14:0	565	20138
104	Pentadecensäure	213,256	20243	117	18:0_14:0 <sup>d</sup>	567	977795
105	Tetradecensäure	199,242	79834	118	18:0_16:1	133	645956
				119	20:0_14:0	133	409665
				120	20:1_16:1	133	184795
				121	20:0_16:1	133	135624

<sup>a</sup>Freie Fettsäuren

<sup>b</sup>Fettsäuren, die durch Transmethylierung erhalten wurden

<sup>c</sup>Identifiziert aufgrund des charakteristischen Massenspektrums. In der verwendeten Nomenklatur auf der ersten Stelle wird Hauptkohlenstoffkette bezeichnet und auf der zweiten  $\alpha$ -Seitenkohlenstoffkette.

<sup>d</sup>Identifiziert mit Hilfe eines Standards

## 6.2. Metabolitderivate

Verbindung	Massenspur	Rt	Verbindungsclass
<b>polare Phase</b>			
Pyruvat2TMS1MeOX	115,174	1055.7	organische Säure
Lactat2TMS	117	1062.9	organische Säure
Glycolat2TMS	133,161,17	1083	organische Säure
Valin1TMS	72	1091.5	Aminosäure
Pyruvat2TMS	189,217	1091.9	organische Säure
Valin1TMS	72	1093.7	Aminosäure
Alanin2TMS	190	1106.8	Aminosäure
Glycin2TMS	102	1126.6	Aminosäure
Oxalat2TMS	190	1139.3	organische Säure
Prolin1TMS	70	1172.7	Aminosäure
2-Aminobutyrat2TMS	130	1174.2	Aminosäure
Malonat2TMS	233	1202.5	organische Säure
Glyceraldehyd2TMS1MeOX1	160,217	1207	Aldehyd
Valin2TMS	144,218	1214.5	Aminosäure
Glyceraldehyd2TMS1MeOX2	211	1224.5	Aldehyd
Norvalin2TMS	144	1244	Aminosäure
Serin2TMS	116,132	1258.2	Aminosäure
Harnstoff2TMS	171	1261.9	Amid
Leucin2TMS	158	1274.1	Aminosäure
Phosphat3TMS	299	1278.9	organische Säure
Glycerol3TMS	103,117,205	1282.1	organische Säure
Isoleucin2TMS	158,218	1296.3	Aminosäure

Threonin2TMS	117	1297.4	Aminosäure
Prolin2TMS	142,216	1302.3	Aminosäure
Maleat2TMS	215	1312.4	organische Säure
Glycin3TMS	174	1313.8	Aminosäure
Succinat2TMS	129,172	1325.4	organische Säure
Glycerat3TMS	189	1343.4	organische Säure
Uracil2TMS	99,113,241,255	1346.9	
Fumarat2TMS	245	1362.4	organische Säure
Alanin3TMS	188	1363.7	Aminosäure
Homoserin2TMS	103,147	1368.7	Aminosäure
Serin3TMS	204,218	1368.7	Aminosäure
Nonansäure1TMS	215	1371.8	organische Säure
Threonin3TMS	117	1392.6	Aminosäure
Thymin2TMS	255	1408.4	
Glutarat2TMS	156,261	1413.7	organische Säure
$\beta$ -Alanin3TMS	248,290	1430.1	Aminosäure
AsparaginTMS	160	1431.9	Aminosäure
Homoserin3TMS	128,218	1453	Aminosäure
3-Amino-2-piperidon2TMS	115,141,24	1459	Aminosäure
Norvalin3TMS	216	1478.5	Aminosäure
Nicotinamid1TMS	136,179	1482.3	Amid
Malat3TMS	233	1488.3	organische Säure
5-oxo-Prolin2TMS	84	1518.1	Aminosäure
Methionin2TMS	177,250,293	1520.2	Aminosäure
Aspartat3TMS	232	1520.9	Aminosäure
Cytosin2TMS	240,254	1523.1	
Glutamat2TMS	174	1532.7	Aminosäure
Phenylalanin1TMS	120	1545.8	Aminosäure
$\alpha$ -KetoglutaratMeOX2TMS	198	1581.2	organische Säure
Phosphoenolpyruvat3TMS1	369,387	1615.5	organische Säure
Glutamat3TMS	156	1628.5	Aminosäure
Phosphoenolpyruvat2TMS	266	1629.4	Aminosäure
Asparagin4TMS	303	1634.1	Aminosäure
Lyxose4TMS1MeOX1	103,307	1654.7	Zucker
Lyxose4TMS1MeOX2	103,204,217	1668.7	Zucker
Homocystein3TMS	234	1669.3	Aminosäure
Pyrophosphat4TMS	451	1669.4	organische Säure
Arabinose4TMS1MeOX1	103,307	1669.6	Zucker
Arabinose4TMS1MeOX2	103,307	1671.7	Zucker
Asparagin3TMS	116,188	1681	Aminosäure
Xylulose4TMS1MeOX	306	1685.1	Zucker
Ribose4TMS1MeOX	103	1685.7	Zucker
Ribitol5TMS	103	1727.1	Zuckeralkohol, Quantifizierungsstandard
Glutamin4TMS	108,203,216	1738.4	Aminosäure
Glyceronphosphat3TMS1MeOX1	315,400	1753.9	
Glyceronphosphat3TMS1MeOX2	315,400	1764.8	
5-Amino-4-oxopentanoat3TMS1MeOX1	345	1766.1	Aminosäure
N-Acetylglutamat3TMS	274,289,361	1766.1	Aminosäure
Glutamin3TMS	156	1778.6	Aminosäure
N-Acetylglutamat2TMS	84,158,216	1788.4	Aminosäure
5-Amino-4-oxopentanoat3TMS1MeOX2	174	1788.7	Aminosäure
2-Phosphoglycerat4TMS	227,315,357,387	1793.2	organische Säure
Shikimat4TMS	204	1816.6	organische Säure
Arginin (Ornithine4TMS)	142	1817.5	Aminosäure
3-Phosphoglycerat4TMS	315,369,459	1822	organische Säure
Citrat4TMS	273	1825.5	organische Säure
Lysin3TMS	174,200	1849.9	Aminosäure
N-Acetylglutamin4TMS	203	1862.4	Aminosäure
Adenin2TMS	192,264,279	1869.1	
Fructose5TMS1MeOX1	103,217	1869.2	Zucker
Fructose5TMS1MeOX2	307	1878.8	Zucker
Tyrosin2TMS	179	1882.5	Aminosäure

Mannose5TMS1MeOX1	103,205,217,319	1883.1	Zucker
Gluconolacton4TMS	160	1886.2	
Glucose5TMS1MeOX1	205,319	1891.8	Zucker
Mannose5TMS1MeOX2	319	1894.6	Zucker
Erythrose-4-phosphat4TMS1MeOX1	357	1903.2	ZuckerPhosphat
Glucose5TMS1MeOX2	205,319	1910	Zucker
N-Acetylglutamin3TMS	203	1910.1	Aminosäure
Histidin3TMS	155,254	1915.6	Aminosäure
Lysin4TMS	156,230	1918.1	Aminosäure
Erythrose-4-phosphat4TMS1MeOX2	357	1918.7	ZuckerPhosphat
Mannitol6TMS	205	1925.5	ZuckerAlcohol
N-Acetylglutamin2TMS	144,156,215	1931.7	Aminosäure
Glucuronat5TMS1MeOX1	333	1932.1	organische Säure
Tyrosin3TMS	218,280,354	1935.3	Aminosäure
Glucuronat5TMS1MeOX2	333	1946.5	organische Säure
Pentadecansäure1TMS	117,129,132,299	1948.3	organische Säure
Diaminopimelat4TMS	200,272	1990.8	Aminosäure
Hexadecansäure1TMS	117,129,133,313	2047.1	organische Säure
Xylulose-5-phosphat5TMS1MeOX1	357	2099.9	ZuckerPhosphat
Ribulose-5-phosphat5TMS1MeOX1	357	2101.7	ZuckerPhosphat
Ribulose-5-phosphat5TMS1MeOX2	357	2111.6	ZuckerPhosphat
Ribose-5-phosphat5TMS1MeOX1	315,403	2112	ZuckerPhosphat
Ribose-5-phosphat5TMS1MeOX2	217,299,315,358	2114.6	ZuckerPhosphat
Xylulose-5-phosphat5TMS1MeOX2	315	2117.3	ZuckerPhosphat
Tryptophan2TMS	202	2189.5	Aminosäure
Tryptophan3TMS	202	2205	Aminosäure
Methyl-Nonadecanoat	87,143,269,312	2229.3	organische Säure
Fructose-6-phosphat6TMS1MeOX	315,357,459	2310.3	ZuckerPhosphat
Glucose-6-phosphat6TMS1MeOX1	387	2323.4	ZuckerPhosphat
Glucose-6-phosphat6TMS1MeOX2	357,387	2340.2	ZuckerPhosphat
Glucosamin-6-phosphat6TMSMeOX1	159	2359.7	ZuckerPhosphat
Glucosamin-6-phosphat6TMSMeOX2	159	2366.7	ZuckerPhosphat
Glucosamin-6-phosphatXTMS1	203	2369.3	ZuckerPhosphat
Glucosamin-6-phosphatXTMS2	203	2395.9	ZuckerPhosphat
Glucose-6-phosphat6TMS	204,387	2396.4	ZuckerPhosphat
6-Phosphogluconat7TMS	387	2427.8	
Uridin3TMS	217,259	2459.1	
Sucrose8TMS	271,319,451,437	2643.6	Zucker
Fructose-1,6-biphosphat7TMS	230,315	2677.9	ZuckerPhosphat
Lactose8TMS1MeOX1	191,204	2692.8	Zucker
Lactose8TMS1MeOX2	103,117,205,217	2706.9	Zucker
Fructose-1,6-biphosphat7TMS1MeOX1	315,387	2716.6	ZuckerPhosphat
Fructose-1,6-biphosphat7TMS1MeOX2	315,387	2724.3	ZuckerPhosphat
Maltose8TMS1MeOX2	204	2736.3	Zucker
Trehalose8TMS	103	2741.2	Zucker
Maltose8TMS1MeOX1	204	2760.2	Zucker
Trehalose-6-phosphat9TMS	271,315	3192.8	ZuckerPhosphat
Hentriacontansäure1TMS	71	3404.3	organische Säure
<b>lipophile Phase</b>			
Glycerol1TMS	103,117,205	1282.1	Fettalcohol
Nonanol1TMS	201	1293.9	Fettalcohol
Dodecanol1TMS	229	1572.5	Fettalcohol
Tridecanol1TMS	257	1677.2	Fettalcohol
TetradecansäureMeO	199,242	1732.3	Fettsäure
Tetradecanol1TMS	271	1773.8	Fettalcohol
Hexadecanal	82	1876.4	Aldehyd
cis-9-HexadecensäureMeO	194,236	1902.7	Fettsäure
HexadecansäureMeO	227,270	1924.1	Fettsäure
Hexadecanol1TMS	299	1964	Fettalcohol
Octadecenal	82	1999.8	Aldehyd
Octadecanal	82	2025.1	Aldehyd



HeptadecansäureMeO	241,284	2029.5	Fettsäure
cis-9-OctadecensäureMeO	222,264	2103.4	Fettsäure
$\beta$ -hydroxyhexadecensäure1TMSMeO	343	2120.4	$\beta$ -Hydroxyfettsäure
OctadecansäureMeO	255,298	2127.2	Fettsäure
PentadecansäureMeO	213,256	2128.8	Fettsäure
NonadecansäureMeO	269,312	2229.3	Fettsäure
$\beta$ -Hydroxyoctadecensäure1TMSMeO	369	2291.7	$\beta$ -Hydroxyfettsäure
EicosansäureMeO	283,326	2339.2	Fettsäure
Heneicosanol1TMS	369	2468.6	Fettalcohol
14:0_8:0 1TMSMeO	427	2520.3	Corynomycolsäure
Docosanol1TMS	383	2565.8	Fettalcohol
18:0_6:0 1TMSMeO	455	2712.7	Corynomycolsäure
18:0_8:0 1TMSMeO	483	2890.7	Corynomycolsäure
18:0_10:0 1TMSMeO	511	3077.8	Corynomycolsäure
18:0_12:0 1TMSMeO	539	3262.5	Corynomycolsäure
18:1_14:0 1TMSMeO	565	3426	Corynomycolsäure
18:0_14:0 1TMSMeO	567	3447.9	Corynomycolsäure
18:0_16:1 1TMSMeO	133	3631.3	Corynomycolsäure
20:0_14:0 1TMSMeO	133	3656.9	Corynomycolsäure
20:1_16:1 1TMSMeO	133	3865.6	Corynomycolsäure
20:0_16:1 1TMSMeO	133	3897.8	Corynomycolsäure

### 6.3. Gemessene Standards und ihre Wiederfindung im *C. glutamicum*-Extrakt

N	Metabolit (Standard)	<i>C. glutamicum</i> Extrakt
1	1,3-Diphosphoglycerat	xi
2	12-Methyltetradecanoat	
3	13-Methyltetradecanoat	
4	14:0_8:0-Mycolat	xi
5	14-Methylpentadecanoat	
6	15-Methylhexadecanoat	
7	18:0_10:0-Mycolat	xi
8	18:0_12:0-Mycolat	xi
9	18:0_14:0-Mycolat	x
10	18:0_16:1-Mycolat	xi
11	18:0_6:0-Mycolat	xi
12	18:0_8:0-Mycolat	xi
13	18:1_14:0-Mycolat	xi
14	20:0_14:0-Mycolat	xi
15	20:0_16:1-Mycolat	xi
16	20:1_16:1-Mycolat	xi
17	2-Aminobutyrat	x
18	2-Desoxyglucose	x
19	2-Hydroxydecanoat	
20	2-Hydroxydodecanoat	
21	2-Hydroxyhexadecanoat	x
22	2-Hydroxyoctadecanoat	x
23	2-Hydroxytetradecanoat	
24	2-Phosphoglycerat	x
25	2-Piperidone-3-amino	x
26	3-Hydroxytetradecanoat	
27	3-Phosphoglycerat	x
28	4-Hydroxyphosphoenolpyruvat	
29	5-Amino-4-oxopentanoat	x
30	5-Oxoprolin	x
31	Acetylglutamat	x
32	Acetylglutamin	x

33	Aconitat	
34	Adenin	x
35	$\alpha$ -Ketoglutarat	x
36	Alanin	x
37	Arabinose	x
38	Arginin	x
39	Asparagin	x
40	Aspartat	x
41	Cadaverin	
42	Caproat	
43	Cis-9,10-methylenehexadecanoat	
44	Cis-9,10-methyleneoctadecanoat	
45	Cis-9,12-octadecdienoat	
46	Cis-9-hexadecenoat	x
47	Cis-9-octadecenoat	x
48	Citrat	x
49	Cycloleucin	x
50	Cystathionin	x
51	Cystein	x
52	Cytosin	x
53	Decan	Zeitstandard
54	Decanoat	
55	Decanol	
56	Deoxyribose	?
57	Deoxyribose-5-phosphat	
58	Diaminopimelat	x
59	Docosan	Zeitstandard
60	Docosanol	x
61	Dodecanol	x
62	Dodecan	Zeitstandard
63	Dodecanoat	
64	Dotriacontan	Zeitstandard
65	Eicosanoat	x
66	Eicosanol	
67	Erythrose-4-phosphat	x
68	Fructose	x
69	Fructose-1,6-biphosphat	x
70	Fructose-6-phosphat	x
71	Fucose	
72	Fumarat	x
73	Galactosamin	x
74	Galacturonat	
75	Gluconat-6-phosphat	x
76	Gluconatlacton	x
77	Glucosamin	x
78	Glucosamin-6-phosphat	x
79	Glucose	x
80	Glucose-6-phosphat	x
81	Glucuronat	x
82	Glutamat	x
83	Glutamin	x
84	Glutarat	x
85	Glyceraldehyd	x
86	Glyceraldehyde-3-phosphat	?
87	Glycerat	x
88	Glycerol	x
89	Glyceronphosphat	x
90	Glycin	x
91	Glycolat	x
92	Guanidin	
93	Guanin	
94	Harnstoff	x
95	Heneicosanol	x

96	Hentriacontanoat	x
97	Heptacosanoat	
98	Heptadecanoat	x
99	Heptadecanol	
100	Heptanoat	
101	Hexadec-9-enal	
102	Hexadecanal	xi
103	Hexadecanoat	x
104	Hexadecanol	x
105	Hexatriacontane	Zeitstandard
106	Histidin	x
107	Homocystein	x
108	Homoserin	x
109	Hydroxylamin	x
110	Isocitrat	
111	Isoleucin	x
112	Kreatinin	x
113	Lactat	x
114	Lactose	x
115	Leucin	x
116	Lysin	x
117	Lyxose	x
118	Malat	x
119	Maleat	x
120	Malonat	x
121	Maltose	x
122	Mannitol	x
123	Mannose	x
124	Methionin	x
125	N-Acetylalanin	
126	N-Acetylneuramat	
127	Nicotinamid	x
128	Nonadecan	
129	Nonadecanoat	x
130	Nonanoat	x
131	Nonanol	x
132	Norleucin	
133	Norvalin	x
134	Octacosan	Zeitstandard
135	Octacosanoat	
136	Octadecanal	xi
137	Octadecanoat	x
138	Octadecanol	x
139	Octadecenal	xi
140	Octanol	
141	Ornithin	x
142	Oxalat	x
143	Oxaloacetat	?
144	Pentadecan	Zeitstandard
145	Pentadecanoat	x
146	Pentadecanol	
147	Phenylalanin	x
148	Phenylpyruvat	?
149	Phosphat	x
150	Phosphoenolpyruvat	x
151	Prolin	x
152	Pyrophosphat	x
153	Pyruvat	x
154	Rhamnose	
155	Ribitol	interner Standard
156	Ribose	x
157	Ribose-5-phosphat	x
158	Ribulose-5-phosphat	x

159	Sarcosin	
160	Serin	x
161	Shikimat	x
162	Succinat	x
163	Sucrose	x
164	Tartrat	
165	Tetracosanoat	
166	Tetradecanoat	x
167	Tetradecanol	x
168	Threonin	x
169	Thymin	x
170	Trans-9-octadecenoat	
171	Trehalose	x
172	Trehalose-6-phosphat	x
173	Tricosanoat	
174	Tridecanoat	
175	Tridecanol	x
176	Tryptophan	x
177	Tyrosin	x
178	Uracil	x
179	Uridin	x
180	Valin	x
181	Xylose	
182	Xylulose	x
183	Xylulose-5-phosphat	x

x- im *C.glutamicum*-Extrakt vorhanden

i- identifiziert ohne Standards

?- Spuren (wurde nur in einigen Proben gefunden)

#### 6.4. Ergebnisse des Experiments 3.9.2.

Metabolite	Standardabweichung %						
	Glas				Eppendorf		
	100µL	200µL	400µL	1000µL	100µL	200µL	1000µL
2-Aminobutyrat	2.1	2.1	2.3	2.5	7.8	7.3	2.7
2-Hydroxy-C16-säure	17.1	21.7	6.7	3.0	6.7	11.4	11.3
2-Oxoglutarat	3.1	4.4	0.7	1.4	2.4	5.1	10.2
3-Phosphoglycerat	3.3	4.7	11.8	10.9	10.5	4.2	11.5
5-Amino-4-oxopentanoat	1.3	22.7	24.6	16.5	11.6	23.5	19.0
5-Oxoprolin	1.4	4.5	3.3	9.4	14.5	61.5	1.6
Adenin	2.3	3.8	1.9	0.6	7.8	4.4	12.4
Alanin	0.3	1.6	2.9	2.7	1.8	8.2	3.5
AMP	3.5	2.2	6.9	16.6	42.2	14.0	25.5
Arabinose	5.7	2.6	6.5	3.1	3.3	5.2	2.6
Aspartat	7.4	5.6	24.3	5.5	12.3	27.2	6.8
β-Alanin	1.3	3.3	2.2	0.9	4.0	2.2	1.3
Citrat	1.6	0.7	1.5	0.8	2.1	2.0	8.1
Cycloleucin	12.1	9.1	24.9	18.5	24.4	53.1	6.9
Cytosin	6.1	1.5	4.8	2.9	6.5	5.3	7.5
Fructose	2.3	3.9	5.1	4.0	35.1	8.3	6.8
Fructose-1,6-bisphosphat	2.1	3.3	9.4	23.3	39.9	20.6	31.3
Fructose-6-phosphat	2.0	4.7	1.1	3.5	4.7	7.6	20.9
Fumarat	7.7	3.0	9.3	10.6	11.5	50.9	11.6
Glucono-1,5-lacton	4.3	10.3	5.0	1.1	6.7	11.3	4.7
Glucosamine-6-phosphat	9.9	20.7	36.0	35.7	42.9	31.8	49.1

Glucose	0.4	3.1	2.3	2.5	15.6	10.1	4.1
Glucose-6-phosphat	3.5	1.9	0.6	0.8	7.6	2.9	18.6
Glutamat	1.2	3.8	5.3	3.0	6.6	6.2	6.3
Glutamin	5.4	0.6	9.0	3.6	1.5	11.3	6.0
Glyceraldehyd-3-phosphat	25.8	81.6	56.6	33.8	71.7	61.2	50.2
Glycerat	4.1	2.6	2.7	3.9	4.1	4.1	6.9
Glycero-2-phosphat	9.4	5.9	2.9	11.9	21.0	2.4	16.2
Glycerol	2.1	2.4	4.8	1.3	2.5	4.3	1.2
Glycerol-1-phosphat	4.1	4.2	2.0	4.4	12.6	8.6	6.9
Glyceronphosphat	1.2	4.7	1.7	1.7	2.9	7.7	8.0
Glycin	0.7	3.5	0.7	0.5	4.7	1.5	1.4
Glycolat	3.8	7.6	6.6	2.3	21.5	26.5	6.7
Harnstoff	2.4	5.1	10.6	3.8	23.1	5.8	4.8
Hexadekanoat	2.1	13.1	15.0	9.5	12.8	7.3	21.1
Homocystein	12.2	8.0	10.0	3.9	6.6	1.8	4.8
Homoserin	1.8	4.6	1.3	1.5	5.5	6.3	2.4
Isoleucin	2.5	1.7	1.6	1.0	14.9	9.1	2.5
Lactat	0.6	1.5	7.0	1.1	14.9	4.6	5.4
Leucin	9.7	7.2	10.7	10.7	16.4	32.1	7.8
Lysin	0.7	2.8	0.6	1.5	3.0	2.4	5.8
Lyxose	5.7	2.6	6.5	3.1	2.2	6.8	2.6
Malat	1.9	3.7	0.6	0.7	2.1	1.3	2.6
Malonat	14.3	17.4	22.6	10.1	26.0	35.4	14.0
Maltose	9.1	9.4	6.9	6.3	6.8	3.0	6.6
Mannitol	8.0	2.2	9.7	48.5	19.1	26.6	9.0
Methionin	2.4	2.0	6.8	6.7	10.3	20.5	8.1
N-Acetylglutamat	1.0	4.4	1.2	2.1	4.8	1.4	5.2
N-Acetylglutamin	7.0	3.7	8.4	11.2	66.5	24.9	27.1
Nicotinamide	3.2	12.2	9.0	9.6	4.4	6.5	7.1
Nonansäure	25.0	18.7	29.5	22.6	33.9	17.5	57.0
Ornithin	1.6	3.4	2.0	0.9	3.4	7.9	4.8
Pentadekanoat	8.6	3.1	6.7	19.8	19.4	33.0	10.2
Phosphat	0.8	2.0	4.2	1.7	9.5	7.6	6.9
Prolin	2.0	2.6	6.2	3.7	12.8	21.2	2.3
Pyrophosphat	6.0	16.7	27.4	23.7	9.1	77.6	35.6
Pyruvat	2.4	3.9	1.5	0.9	2.1	4.7	5.0
Ribose	3.0	5.7	2.6	2.0	4.2	12.6	5.0
Ribose-5-phosphat	2.2	4.2	3.1	1.9	4.5	1.2	23.9
Ribulose-5-phosphat	1.4	3.8	0.5	0.9	6.4	4.8	24.1
Serin	1.3	3.2	1.3	1.7	4.5	8.1	1.5
Shikimat	12.3	17.6	9.5	1.6	11.2	8.0	17.4
Succinat	1.6	2.1	2.2	1.8	2.8	0.9	2.0
Sucrose	11.2	8.4	7.0	6.2	170.9	6.0	4.3
Threonin	1.8	3.6	1.4	1.0	2.4	3.0	1.5
Trehalose	0.3	2.4	2.2	1.4	7.7	3.7	1.5
Trehalose-6-phosphate	5.1	8.4	2.5	1.7	20.8	5.5	9.3
Tryptophan	11.0	4.2	14.2	18.6	15.6	54.9	40.9
Tyrosin	1.1	4.5	0.8	0.7	5.9	2.5	12.1
UMP	8.5	24.8	41.6	32.9	47.2	4.4	21.6
Unknown#10	23.5	16.4	26.5	17.4	45.1	43.9	7.5
Unknown#100	17.1	17.5	3.8	20.9	21.3	16.4	17.9
Unknown#104	12.6	10.8	7.1	15.5	37.9	16.7	10.8

Unknown#106	13.9	15.9	4.8	18.3	4.2	14.6	41.8
Unknown#107	9.9	22.0	30.6	35.3	39.1	11.4	14.7
Unknown#108	9.7	13.2	22.3	9.7	36.6	4.7	12.6
Unknown#109	6.6	20.2	32.4	36.1	47.7	11.0	28.2
Unknown#11	2.0	4.7	0.7	2.5	0.6	5.8	2.1
Unknown#110	3.2	11.9	20.8	48.4	4.9	10.8	6.1
Unknown#111	6.8	7.2	1.0	7.2	156.9	35.8	56.9
Unknown#113	5.7	1.6	4.4	2.5	8.3	20.0	23.8
Unknown#114	7.5	8.5	3.3	5.6	11.9	15.8	19.5
Unknown#116	12.9	4.3	22.9	31.6	171.7	76.0	84.1
Unknown#117	32.5	8.3	13.4	26.4	35.8	32.4	34.3
Unknown#119	1.4	3.7	2.7	1.6	6.6	9.4	17.7
Unknown#120	12.3	39.3	38.2	18.1	29.1	36.9	16.2
Unknown#121	2.4	3.8	4.3	2.4	42.0	3.0	1.6
Unknown#122	4.2	6.9	5.5	4.3	15.0	6.1	3.8
Unknown#126	1.1	2.6	1.6	0.7	4.1	4.4	6.3
Unknown#128	8.5	5.6	7.0	4.1	9.7	13.0	4.7
Unknown#14	4.2	4.5	8.4	2.2	2.2	8.7	3.3
Unknown#15	7.9	17.9	2.8	3.8	13.4	36.1	16.8
Unknown#16	3.6	14.0	7.7	7.1	42.1	12.5	6.1
Unknown#18	5.3	18.3	15.0	31.5	13.2	31.8	10.6
Unknown#19	11.9	7.9	3.4	23.8	27.7	117.7	10.6
Unknown#21	6.7	5.7	14.9	3.6	15.8	10.8	12.0
Unknown#22	7.5	15.4	25.2	10.9	26.5	31.5	22.6
Unknown#23	3.7	9.8	2.4	8.4	8.2	42.1	6.3
Unknown#24	7.5	19.0	8.4	28.8	4.6	27.7	24.5
Unknown#27	3.4	4.0	3.1	4.3	2.3	23.4	4.4
Unknown#30	1.7	2.9	4.2	0.7	10.2	4.3	2.7
Unknown#31	9.9	5.4	8.1	16.8	2.8	11.0	7.8
Unknown#32	16.0	22.7	43.0	24.0	6.6	12.9	13.5
Unknown#33	4.4	7.9	4.3	3.3	1.6	2.6	2.4
Unknown#34	2.4	2.6	1.4	1.6	3.7	5.7	2.7
Unknown#35	5.4	3.1	19.6	6.0	12.1	15.7	6.9
Unknown#36	115.5	45.6	126.4	67.9	44.1	56.2	76.6
Unknown#38	3.1	5.0	3.5	5.0	7.0	21.1	4.7
Unknown#40	11.5	19.0	21.6	28.4	13.5	19.4	17.7
Unknown#46	7.0	19.3	6.8	3.3	11.0	34.5	17.6
Unknown#48	27.9	78.2	8.6	45.6	39.9	34.6	18.5
Unknown#49	0.5	4.0	2.8	1.4	2.4	6.5	2.6
Unknown#5	15.3	22.1	14.8	10.7	25.0	25.1	48.9
Unknown#51	1.5	2.0	6.5	5.9	20.1	13.7	7.5
Unknown#53	1.5	2.0	6.5	9.5	20.1	13.7	7.5
Unknown#55	2.1	5.2	5.1	2.4	0.6	3.0	5.6
Unknown#57	0.7	3.0	0.7	1.0	4.2	2.3	13.0
Unknown#58	16.8	10.3	17.4	22.2	17.9	30.5	13.2
Unknown#6	3.2	11.0	7.8	15.7	11.2	9.2	15.5
Unknown#66	14.8	5.6	4.6	10.5	12.1	9.9	7.7
Unknown#67	1.9	4.2	1.1	3.0	2.4	3.9	17.2
Unknown#69	2.6	9.5	5.6	11.5	23.9	2.2	25.3
Unknown#70	2.9	4.0	2.5	2.3	18.9	1.7	4.9
Unknown#75	1.7	0.5	2.1	2.3	2.0	9.1	1.3
Unknown#76	15.3	9.9	8.8	23.9	27.6	110.3	13.2

Unknown#78	10.3	9.1	1.3	18.7	25.9	103.0	17.6
Unknown#79	5.3	0.3	1.5	3.6	0.4	1.7	2.9
Unknown#8	1.1	4.6	1.7	0.8	5.4	1.7	12.1
Unknown#80	6.0	2.1	1.2	1.7	4.4	13.0	1.9
Unknown#81	2.5	9.9	3.6	1.9	11.8	8.4	4.6
Unknown#84	13.0	14.1	31.7	19.8	19.3	32.1	23.6
Unknown#86	7.5	3.1	4.8	2.1	3.9	9.7	1.6
Unknown#87	12.3	3.9	10.3	10.3	11.8	27.1	16.5
Unknown#88	69.1	10.4	59.7	38.1	152.7	104.8	85.4
Unknown#89	4.1	15.5	29.6	11.3	17.6	15.6	34.2
Unknown#9	8.2	4.2	2.9	3.0	10.1	12.1	14.1
Unknown#90	5.6	8.1	3.5	1.2	10.8	3.1	4.6
Unknown#91	8.6	21.9	45.7	19.4	15.9	19.9	25.5
Unknown#93	93.5	38.8	112.6	167.4	67.2	76.7	56.4
Unknown#94	2.1	5.3	1.2	5.0	4.5	0.3	19.3
Unknown#95	2.9	5.2	6.2	5.1	10.2	10.8	20.1
Unknown#96	3.2	1.1	4.7	20.3	15.8	8.2	10.8
Unknown#97	8.8	9.5	21.4	11.5	6.6	17.3	5.5
Unknown#99	10.9	2.1	12.8	19.1	171.8	93.3	58.2
Unknown#D2	7.3	3.7	8.0	4.2	13.8	35.4	7.4
Unknown#D3	9.9	5.8	9.7	4.3	9.6	23.1	4.4
Unknown#D5	2.5	4.9	8.6	2.6	7.2	28.6	5.1
Unknown#D6	3.4	4.9	7.3	7.9	8.8	24.7	6.3
Unknown#D7	6.4	3.2	3.3	7.1	1.4	17.5	5.2
Unknown#D8	7.1	10.4	11.0	66.2	3.9	14.6	2.0
Unknown#D9	12.6	21.9	11.5	15.8	21.4	33.4	9.5
UnknownA11	3.8	8.6	6.0	2.3	12.3	24.7	5.6
UnknownA12	7.4	9.0	3.6	22.7	10.7	61.7	1.3
UnknownA15	2.7	5.2	2.4	3.3	3.6	5.2	16.5
UnknownA16	8.6	19.4	29.5	28.8	43.2	6.1	21.4
UnknownA17	3.3	8.1	7.4	31.6	73.7	28.6	43.1
UnknownA18	7.7	6.8	5.2	3.4	11.3	9.4	21.7
UnknownA3	17.4	16.4	8.1	5.2	14.4	40.5	28.2
UnknownA4	9.4	2.0	3.9	5.4	7.1	5.4	11.2
UnknownA8	3.7	9.6	1.7	20.3	17.5	17.5	17.2
UnknownA9	3.1	3.1	0.9	0.8	6.1	5.7	14.6
Uracil	13.5	0.5	25.7	5.1	23.6	23.4	9.6
Uridine	9.8	14.5	17.3	2.3	27.6	4.3	37.2
Valin	3.4	0.8	2.1	7.0	16.1	7.1	5.7
Xylulose	1.2	4.4	1.8	0.8	5.3	3.1	2.2
Xylulose-5-phosphat	2.0	4.5	2.5	0.7	6.9	6.6	25.0
SUMME	1312.6	1486.3	1793.4	1885.6	3240.9	3167.8	2408.8

## 7. Literaturverzeichnis

1. ArabidopsisGenomeInitiative, Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* (2000) *Nature*. **408**(6814), p. 796-815.
2. Kalinowski, J., et al., The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins (2003) *J Biotechnol.* **104**(1-3), p. 5-25.
3. ter Linde, J.J., et al., Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* (1999) *J Bacteriol.* **181**(24), p. 7409-13.
4. Lilley, K.S., A. Razzaq, and P. Dupree, Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation (2002) *Curr Opin Chem Biol.* **6**(1), p. 46-50.
5. Shevchenko, A., et al., Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**(25), p. 14440-5.
6. Han, M.J. and S.Y. Lee, Proteome profiling and its use in metabolic and cellular engineering (2003) *Proteomics.* **3**(12), p. 2317-24.
7. Washburn, M.P., D. Wolters, and J.R. Yates, 3rd, Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology (2001) *Nat Biotechnol.* **19**(3), p. 242-7.
8. Nordhoff, E., et al., Large-gel two-dimensional electrophoresis-matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry: an analytical challenge for studying complex protein mixtures (2001) *Electrophoresis.* **22**(14), p. 2844-55.
9. Sechi, S., A method to identify and simultaneously determine the relative quantities of proteins isolated by gel electrophoresis (2002) *Rapid Commun Mass Spectrom.* **16**(15), p. 1416-24.
10. Wolters, D.A., M.P. Washburn, and J.R. Yates, 3rd, An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics (2001) *Anal Chem.* **73**(23), p. 5683-90.
11. Washburn, M.P., et al., Analysis of quantitative proteomic data generated via multidimensional protein identification technology (2002) *Anal Chem.* **74**(7), p. 1650-7.
12. Washburn, M.P., R.R. Ulaszek, and J.R. Yates, 3rd, Reproducibility of quantitative proteomic analyses of complex biological mixtures by multidimensional protein identification technology (2003) *Anal Chem.* **75**(19), p. 5054-61.



13. Phelps, T., A. Palumbo, and A. Beliaev, Metabolomics and microarrays for improved understanding of phenotypic characteristics controlled by both genomics and environmental constraints. (2002) *Curr Opin Biotechnol.* **13**(1), p. 20-4.
14. ter Kuile, B.H. and H.V. Westerhoff, Transcriptome meets metabolome: hierarchical and metabolic regulation of the glycolytic pathway (2001) *FEBS Lett.* **500**(3), p. 169-71.
15. Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R.N., Willmitzer, L., Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry (2000) *Plant J.* **23**(1), p. 131-42.
16. von Roepenack-Lahaye, E., et al., Profiling of Arabidopsis secondary metabolites by capillary liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (2004) *Plant Physiol.* **134**(2), p. 548-59.
17. Raamsdonk, L.M., et al., A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations (2001) *Nat. Biotechnol.* **19**(1), p. 45-50.
18. Gavaghan, C.L., et al., An NMR-based metabolomic approach to investigate the biochemical consequences of genetic strain differences: application to the C57BL10J and *Alpk:ApfCD* mouse (2000) *FEBS Lett.* **484**(3), p. 169-74.
19. Schultz, C.P., The potential role of Fourier transform infrared spectroscopy and imaging in cancer diagnosis incorporating complex mathematical methods (2002) *Technol Cancer Res Treat.* **1**(2), p. 95-104.
20. Fiehn, O., Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks (2001) *Comparative and Functional Genomics.* **2**(3), p. 155-168.
21. Fiehn, O., Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. (2002) *Plant. Mol. Biol.* **48**(1-2), p. 155-71.
22. Fiehn, O., Kopka, J., Dormann, P., Altmann, T., Trethewey, R. N., Willmitzer, L., Metabolite profiling for plant functional genomics (2000) *Nat. Biotechnol.* **18**(11), p. 1157-61.
23. Fiehn, O., Kopka, J., Trethewey, R. N., Willmitzer, L., Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry (2000) *Anal. Chem.* **72**(15), p. 3573-80.
24. Tolstikov, V.V. and O. Fiehn, Analysis of highly polar compounds of plant origin: combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry (2002) *Anal Biochem.* **301**(2), p. 298-307.

25. Tolstikov, V., et al., Monolithic silica-based capillary reversed-phase liquid chromatography/electrospray mass spectrometry for plant metabolomics [In Process Citation] (2003) *Anal Chem.* **75**(23), p. 6737-40 .
26. Farre, E., et al., Analysis of the compartmentation of glycolytic intermediates, nucleotides, sugars, organic acids, amino acids, and sugar alcohols in potato tubers using a nonaqueous fractionation method. (2001) *Plant Physiol.* **127**(2), p. 685-700.
27. Buchholz, A., et al., Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics. (2002) *Biomol Eng.* **19**(1), p. 5-15.
28. Tweeddale, H., Notley-McRobb, L., Ferenci, T., Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool ("metabolome") analysis (1998) *J. Bacteriol.* **180**(19), p. 5109-16.
29. Fredlund, E., et al., Metabolite profiles of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121 grown under oxygen limitation (2004) *Appl Microbiol Biotechnol.* **64**(3), p. 403-9. Epub 2003 Nov 5.
30. Teleman, A., et al., Identification and quantitation of phosphorus metabolites in yeast neutral pH extracts by nuclear magnetic resonance spectroscopy (1999) *Anal Biochem.* **272**(1), p. 71-9.
31. Wendisch, V., et al., Quantitative determination of metabolic fluxes during coutilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. (2000) *J Bacteriol.* **182**(11), p. 3088-96.
32. Wittmann, C., Heinzle, E., MALDI-TOF MS for quantification of substrates and products in cultivations of *Corynebacterium glutamicum* (2001) *Biotechnol. Bioeng.* **72**(6), p. 642-7.
33. Wittmann, C., Heinzle, E., Application of MALDI-TOF MS to lysine-producing *Corynebacterium glutamicum*: a novel approach for metabolic flux analysis (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**(8), p. 2441-55.
34. Dauner, M. and U. Sauer, GC-MS analysis of amino acids rapidly provides rich information for isotopomer balancing. (2000) *Biotechnol Prog.* **16**(4), p. 642-9.
35. Vallino, J.J., Stephanopoulos, G., Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction (1992) *Biotechnol. Bioeng.* **41**, p. 633-646.
36. Kromer, J.O., et al., In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome, and fluxome (2004) *J Bacteriol.* **186**(6), p. 1769-84.

37. Fox, A., Carbohydrate profiling of bacteria by gas chromatography-mass spectrometry and their trace detection in complex matrices by gas chromatography-tandem mass spectrometry (1999) *J. Chromatogr. A.* **843**(1-2), p. 287-300.
38. Castrillo, J.I., Hayes, A., Mohammed, S., Gaskell, S. J., Oliver, S. G., An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry (2003) *Phytochemistry.* **62**(6), p. 929-937.
39. Soga, T., et al., Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry (2003) *Journal of Proteome Research.* **2**(5), p. 488 -494.
40. Kinoshita, S., Udaka, S., and Shimono, M., Studies on the amino acid fermentation. 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. (1957) *J Gen Appl Microbiol.* **3**, p. 193-205.
41. Eggeling, L., S. Oberle, and H. Sahm, Improved L-lysine yield with *Corynebacterium glutamicum*: use of *dapA* resulting in increased flux combined with growth limitation (1998) *Appl Microbiol Biotechnol.* **49**(1), p. 24-30.
42. Nolden, L., et al., Urease of *Corynebacterium glutamicum*: organization of corresponding genes and investigation of activity (2000) *FEMS Microbiology Letters.* **189**(2), p. 305-310.
43. Blau, K., King, G.S. (1977) *Handbook of Derivatives for Chromatography.*, London-Bellmawr, N.J.- Rheine Heyden.
44. Katona, Z.F., Sass, P., Molnar-Perl, I., Simultaneous determination of sugars, sugar alcohols, acids and amino acids in apricots by gas chromatography-mass spectrometry (1999) *J. Chromatogr. A.* **847**(1-2), p. 91-102.
45. Adams, M., et al., Simultaneous determination by capillary gas chromatography of organic acids, sugars, and sugar alcohols in plant tissue extracts as their trimethylsilyl derivatives. (1999) *Anal Biochem.* **266**(1), p. 77-84.
46. Grob, K. (1995) *Einspritztechniken in der Kapillar-Gaschromatographie.*, Heidelberg Huethig GmbH.
47. Bleakney, W., A New Method of Positive Ray Analysis and Its Application to the Measurement of Ionization Potentials in Mercury Vapor (1929) *Phys Rev.* **34**(1), p. 157–160.
48. Nier, A., (1947) *Rev Sci Instrum.* **18**, p. 415.
49. Hušek, P., Macek, K., Gas chromatography of amino acids (1975) *J. Chromatogr.* **113**, p. 139-230.
50. Harvey, D.J., Horning, M.G., Characterization of the trimethylsilyl derivatives of sugar phosphates and related compounds by gas chromatography and gas chromatography mass spectrometry (1973) *J. Chromatogr. A.* **76**, p. 51-62.

51. Laine, R. and C. Sweeley, Analysis of trimethylsilyl O-methyloximes of carbohydrates by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. (1971) *Anal Biochem.* **43**(2), p. 533-8.
52. Roessner, U., Luedemann, A., Brust, D., Fiehn, O., Linke, T., Willmitzer, L., Fernie, A., Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems (2001) *Plant Cell.* **13**(1), p. 11-29.
53. Christie, W., *Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis.*, in *Advances in Lipid Methodology*, W. Christie, Editor. 1993, Oily Press: Dundee. p. 69-111.
54. Leimer, K.R., R.H. Rice, and C.W. Gehrke, Complete mass spectra of the per-trimethylsilylated amino acids (1977) *Journal of Chromatography A.* **141**(3), p. 355-375.
55. Laine, R.S., CC, O-Methyl Oximes of Sugars. Analysis as O-Trimethylsilyl Derivatives by Gas-Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (1973) *Carbohydrate Research.* **27**, p. 199-213.
56. Zinbo, M.S., WR, Gas Chromatography and Mass Spectrometry of Trimethylsilyl Sugar Phosphates (1970) *Journal of the American Chemical Society.* **92**(7), p. 2105-2114.
57. McLafferty, F., Mass Specrometric Analysis. Molecular Rearrangements. (1959) *Analytical Chemistry.* **31**(1), p. 82-87.
58. Kienitz, H. (1968) *Massenspektrometrie.* Verlag Chemie. 504.
59. Bergana, M., et al., NMR and MS analysis of decomposition compounds produced from N-acetyl-L-glutamine at low pH. (2000) *J Agric Food Chem.* **48**(12), p. 6003-10.
60. Gailly, C., Sandra, P., Verzele, M., Cocito, C., Analysis of mycolic acids from a group of corynebacteria by capillary gas chromatography and mass spectrometry (1982) *Eur. J. Biochem.* **125**(1), p. 83-94.
61. Little, J.L., Artifacts in trimethylsilyl derivatization reactions and ways to avoid them (1999) *Journal of Chromatography A.* **844**(1-2), p. 1-22.
62. de Hoffmann, E.S., V (2002) *Mass Spectrometry. Principles and Applications.* 2 ed Wiley.
63. von Elstermann, M., *Chemisch- massenspektrometrische Identifizierung hydrophober Metabolite von Corynebacterium glutamicum, Diplomarbeit.* 2002: Köln.
64. Gehrke, C.W., Nakamoto, H., Zumwalt, R.W., Gas-liquid chromatography of protein amino acid trimethylsilyl derivatives (1969) *J. Chromatogr. A.* **45**, p. 24-51.
65. Stein, S., An Integrated Method for Spectrum Extraction and Compound Identification from GC/MS Data (1999) *Journal of the American Society of Mass Spectrometry.* **10**, p. 770-781.

66. Saxberg, B.K., B, Generalized Standard Addition Method (1979) *Analytical Chemistry*. **51**(7), p. 1031-1038.
67. Badder, M., A Systematic Approach to Standard Addition Methods in Instrumental Analysis (1980) *Journal of Chemical education*. **57**(10), p. 703-706.
68. Schoberth, S., et al., Pulsed high-field gradient in vivo NMR spectroscopy to measure diffusional water permeability in *Corynebacterium glutamicum*. (2000) *Anal Biochem*. **279**(1), p. 100-5.
69. Wendisch, V., et al., Regulation of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control of the isocitrate lyase and malate synthase genes. (1997) *Arch Microbiol*. **168**(4), p. 262-9.
70. Ruffert, S., et al., Efflux of compatible solutes in *Corynebacterium glutamicum* mediated by osmoregulated channel activity. (1997) *Eur J Biochem*. **247**(2), p. 572-80.
71. Molenaar, D., et al., Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Corynebacterium glutamicum*. (2000) *J Bacteriol*. **182**(24), p. 6884-91.
72. Hajslova, J. and J. Zrostlikova, Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. (2003) *J Chromatogr A*. **1000**(1-2), p. 181-97.
73. Engewald, W., J. Teske, and J. Efer, Programmed temperature vaporiser-based injection in capillary gas chromatography. (1999) *J Chromatogr A*. **856**(1-2), p. 259-78.
74. Zrostlikova, J., et al., Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. (2001) *J Chromatogr A*. **937**(1-2), p. 73-86.
75. Maharjan, R.P. and T. Ferenci, Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli* (2003) *Anal Biochem*. **313**(1), p. 145-54.
76. de Koning, W., van Dam, K., A method for the determination of changes of glycolytic metabolites yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. (1992) *Anal Biochem*. **204**(1), p. 118-23.
77. Schaefer, U., Boos, W., Takors, R., Weuster-Botz, D., Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamics (1999) *Anal. Biochem*. **270**(1), p. 88-96.
78. Buchholz, A., Takors, R., Wandrey, C., Quantification of intracellular metabolites in *Escherichia coli* K12 using liquid chromatographic-electrospray ionization tandem mass spectrometric techniques (2001) *Anal. Biochem*. **295**(2), p. 129-37.

79. Hajjaj, H., et al., Sampling techniques and comparative extraction procedures for quantitative determination of intra- and extracellular metabolites in filamentous fungi (1998) *FEMS Microbiology Letters*. **164**(1), p. 195-200.
80. Margot, L.K., YA; Cunningham, PR; Clark, DP, Accumulation of Trehalose by *Escherichia coli* K-12 at High Osmotic Pressure Depends on the Presence of Amber Suppressors (1988) *Journal of Bacteriology*. **170**(8), p. 3601-3610.
81. Moritz, B., et al., Kinetic properties of the glucose-6-phosphate and 6 phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* and their application for predicting pentose phosphate pathway flux in vivo (2000) *Eur J Biochem*. **267**(12), p. 3442-3452.
82. Wittmann, C., et al., Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria [In Process Citation] (2004) *Anal Biochem*. **327**(1), p. 135-9 .
83. Hans, M., E. Heinzle, and C. Wittmann, Free intracellular amino acid pools during autonomous oscillations in *Saccharomyces cerevisiae*. (2003) *Biotechnol Bioeng*. **82**(2), p. 143-51.
84. Theobald, U., et al., In vivo analysis of glucose-induced fast changes in yeast adenine nucleotide pool applying a rapid sampling technique. (1993) *Anal Biochem*. **214**(1), p. 31-7.
85. Mastovska, K. and S. Lehotay, Practical approaches to fast gas chromatography-mass spectrometry. (2003) *J Chromatogr A*. **1000**(1-2), p. 153-80.
86. Fussell, R., Nicholas, D. (2002) *ATAS Chromatography Note*. Vol. 33 ATAS UK.
87. Mastovska, K., S. Lehotay, and J. Hajslova, Optimization and evaluation of low-pressure gas chromatography-mass spectrometry for the fast analysis of multiple pesticide residues in a food commodity. (2001) *J Chromatogr A*. **926**(2), p. 291-308.
88. Mastovska, K., et al., Fast temperature programming in routine analysis of multiple pesticide residues in food matrices. (2001) *J Chromatogr A*. **907**(1-2), p. 235-45.
89. Dagan, S. and A. Amirav, Fast, Very Fast, and Ultra-Fast Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Thermally Labile Steroids, Carbamates, and Drugs in Supersonic Molecular Beams (1996) *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. **7**(8), p. 737-752.
90. Van Den Dool, H.K., P. Dec., A Generalization Of The Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography (1963) *J Chromatogr A*. **11**, p. 463-471.
91. Dominguez, H., Lindley, N.D., Complete sucrose metabolism requires fructose phosphotransferase activity in *Corynebacterium glutamicum* to ensure

- phosphorylation of liberated fructose (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(10), p. 3878-3880.
92. Saha, B.C. and L.K. Nakamura, Production of mannitol and lactic acid by fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693 (2003) *Biotechnol Bioeng.* **82**(7), p. 864-71.
93. Wolf, A., R. Kramer, and S. Morbach, Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress. (2003) *Mol Microbiol.* **49**(4), p. 1119-34.
94. Roturier, J.M., D. Le Bars, and J.C. Gripon, Separation and identification of hydrophilic peptides in dairy products using FMOc derivatization (1995) *Journal of Chromatography A.* **696**(2), p. 209-217.
95. Qu, J., et al., Rapid determination of underivatized pyroglutamic acid, glutamic acid, glutamine and other relevant amino acids in fermentation media by LC-MS-MS. (2002) *Analyst.* **127**(1), p. 66-9.
96. Alpert, A., Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. (1990) *J Chromatogr.* **499**, p. 177-96.
97. Schlichtherle-Cerny, H., M. Affolter, and C. Cerny, Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry of small polar compounds in food analysis. (2003) *Anal Chem.* **75**(10), p. 2349-54.
98. Alpert, A., et al., Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates. (1994) *J Chromatogr A.* **676**(1), p. 191-22.
99. Strege, M., Hydrophilic Interaction Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry Analysis of Polar Compounds for Natural Product Drug Discovery (1998) *Anal Chem.* **70**, p. 2439-2445.
100. Strege, M., S. Stevenson, and S. Lawrence, Mixed-mode anion-cation exchange/hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray mass spectrometry as an alternative to reversed phase for small molecule drug discovery [Record Supplied By Publisher] (2000) *Anal Chem.* **72**(19), p. 4629-33 .
101. Evans, J., et al., LC/MS analysis of NAD biosynthesis using stable isotope pyridine precursors. (2002) *Anal Biochem.* **306**(2), p. 197-203.
102. Wu, Z.R., RP; Marshall AG, Two- and Three-Dimensional van Krevelen Diagrams: A Graphical Analysis Complementary to the Kendrick Mass Plot for Sorting Elemental Compositions of Complex Organic Mixtures Based on Ultrahigh-Resolution Broadband Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Measurements (2004) *Anal. Chem.* **76**(9), p. 2511 -2516.

103. Hughey, C.R., RP; Marshall, AG, Resolution of 11 000 Compositionally Distinct Components in a Single Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrum of Crude Oil (2002) *Anal. Chem.* **74**(16), p. 4145 -4149.
104. Kruckler, M.L., A; Putzbach, K; Grynbaum, MB; Schuler, P; Albert, K, Hyphenation of Capillary HPLC to Microcoil 1H NMR Spectroscopy for the Determination of Tocopherol Homologues (2004) *Anal. Chem.* **76**(9), p. 2623 -2628.
105. Oliver, S.G., Winson, M.K., Kell, D.B., Baganz, F., Systematic functional analysis of the yeast genome (1998) *Trends Biotech.* **16**(9), p. 373-378.
106. Goffeau, A., et al., Life with 6000 genes (1996) *Science.* **274**(5287), p. 546, 563-7.
107. Zrostlikova, J., J. Hajslova, and T. Cajka, Evaluation of two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the determination of multiple pesticide residues in fruit (2003) *J Chromatogr A.* **1019**(1-2), p. 173-86.
108. Kienhuis, P. and R. Geerdink, A mass spectral library based on chemical ionization and collision-induced dissociation. (2002) *J Chromatogr A.* **974**(1-2), p. 161-8.



## Lebenslauf



- 23.04.1973** Geboren in Moskau, Russland
- 1990** Abschluss der allgemeinbildenden Schule 1287 in Moskau (Abitur)
- 1990-1996** Studium an der Russischen D.I. Mendeleew- Universität für Chemietechnologien
- 1996** Chemie-Diplom an der Russischen D.I. Mendeleew- Universität für Chemietechnologien
- 1996-1999** Wissenschaftliche Tätigkeit an der Russischen D.I. Mendeleew-Universität für Chemietechnologien
- 1999** Abschlussprüfung in der Aspirantur der Russischen D.I. Mendeleew-Universität für Chemietechnologien
- 2001- 2004** Doktorarbeit an der Universität zu Köln

